



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Nauk Ogrodniczych

mgr inż. Natalia Anna Kuźma

Niechemiczna metoda regulowania pokroju roślin rabatowych

Non-chemical method of regulating the habit of bedding plants

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis



Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Agata Jędrzejuk, prof. SGGW
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii
Instytut Nauk Ogrodniczych

Warszawa 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 22.05.2025..... Czytelny podpis promotora [podpis].....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 22.05.2025..... Czytelny podpis autora rozprawy [podpis].....

Spis treści

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	9
PRZEGLĄD LITERATURY	11
1. Tigmomorfogeneza (stres mechaniczny, stres dotyku)	11
2. Reakcja roślin na stres dotyku	12
2.1.Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej.....	13
2.2.Odpowiedź na poziomie hormonalnym i enzymatycznym.....	17
3. Odpowiedź na poziomie molekularnym-geny TCH (Touch)	21
4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej	22
CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE.....	32
MATERIAŁ I METODY	32
5.1 Materiał roślinny	33
5.2 Układ i zakres doświadczeń.....	35
5.3 Skarlanie mechaniczne (SM)	36
5.4 Retardowanie chemiczne	37
5.5 Pomiary biometryczne i analizy biochemiczne	37
5.5.1. Pomiary biometryczne	37
5.5.2 Analizy biochemiczne.....	38
5.5.2.1 Zawartość IAA (publikacja A,B,C)	38
5.5.2.2 Zawartość giberelin ogólnych (publikacja B).....	38
5.5.2.3 Zawartość GA ₃ (publikacja A).....	38
5.5.2.4 Aktywność peroksydazowa (POX) (EC 1.11.1.x); (publikacja A, C)	39
5.5.2.5 Aktywność oksydazy IAA(IAAO) (EC 1.2.3.7); (publikacja B, C).....	39
5.6 Immunohistochemia nośników auksyny (publikacja A).....	39
5.7 Barwienie safraniną i fioletem krystalicznym (publikacja A)	39
5.8 Ocena ekspresji wybranych genów TCH (publikacja B).....	40
5.9 Analizy statystyczne	41
OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	42
DYSKUSJA	56
WNIOSKI	67
BIBLIOGRAFIA	69
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ORAZ OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW.....	82

Streszczenie

Niechemiczna metoda regulowania pokroju roślin rabatowych

Tigmomorfogeneza jest zjawiskiem, które jest słabo zbadane. Stres dotyku wywołuje kaskadę zmian molekularnych, biochemicznych oraz morfologicznych w roślinach, powodując podobne efekty jak chemiczne regulatory wzrostu. Odpowiedź rośliny jest jednak zależna od rodzaju bodźca dotykowego (wiatr, szczotkowanie, nacisk, wibracje lub potrząsanie), jego częstotliwości i czasu trwania, a także od gatunku, a nawet jej odmiany.

Celem niniejszej pracy było zbadanie indukcji skarlania mechanicznego na architekturę, kwitnienie oraz parametry fizjologiczne i molekularne wybranych gatunków roślin ozdobnych. Badania obejmowały analizę wpływu intensywności stresu mechanicznego na dynamikę wzrostu roślin, poziom fitohormonów (IAA, GA₃, GAs) oraz aktywność enzymów oksydacyjnych (IAAO, POX). Ponadto, przeprowadzono ocenę ekspresji genów TCH, kodujących syntezę kalmodulin (CaM72, CaM53 i CaM81) oraz związanych z homeostazą auksyn (GH 3.1).

Otrzymane wyniki badań wskazują, że stres dotyku istotnie wpływa na procesy wzrostowe, ograniczając wysokość roślin i modyfikując poziomy hormonów wzrostu. Zaobserwowano również różnice w reakcjach odmian roślin oraz korelację pomiędzy intensywnością bodźca a ekspresją genów związanych z odpowiedzią na stres mechaniczny.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że skarlanie mechaniczne może być stosowane jako „substytut” retardantów chemicznych w kontrolowaniu wzrostu *Petunia ×atkinsiana*.

Słowa kluczowe: tigmomorfogeneza, skarlanie mechaniczne, fitohormony, geny TCH, regulacja wzrostu roślin, *Petunia ×atkinsiana*

Abstract

Non-chemical method of regulating the habit of bedding plants

Tigmomorphogenesis is a phenomenon that is poorly studied. Touch stress induces a cascade of molecular, biochemical and morphological changes in plants, producing similar effects to chemical growth regulators. However, the plant's response depends on the type of tactile stimulus (wind, brushing, pressure, vibration or shaking), its frequency and duration, as well as the species and even the cultivar.

The purpose of this study was to investigate the induction of mechanical scarification on the architecture, flowering, and physiological and molecular parameters of selected ornamental plant species. The study involved an analysis of the effect of the intensity of mechanical stress on plant growth dynamics, levels of phytohormones (IAA, GA₃, GAs) and activity of oxidative enzymes (IAAO, POX). In addition, the expression of TCH genes encoding calmodulin synthesis (CaM72, CaM53 and CaM81) and those related to auxin homeostasis (GH 3.1) were evaluated.

The results obtained indicate that touch stress significantly affects growth processes, limiting plant height and modifying growth hormone levels. Differences in the responses of plant varieties and a correlation between the intensity of the stimulus and the expression of genes related to the response to mechanical stress were also observed.

Based on the results, it can be concluded that mechanical stimulation can be used as a „substitute” for chemical retardants in controlling the growth of *Petunia ×atkinsiana*.

Keywords: tigmomorphogenesis, mechanical stimulation, phytohormones, TCH genes, plant growth regulation, *Petunia ×atkinsiana*

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- A. Jędrzejuk, A., Kuźma, N., Orłowski, A., Budzyński, R., Gehl, C., & Serek, M. (2023). Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis but does not affect auxin transport in axillary buds; it also stimulates peroxidase activity in *Petunia ×atkinsiana*. *Molecules*, 28(6), 2714. <https://doi.org/10.3390/molecules28062714>
IF₂₀₂₃ **4.2**,
140 pkt. MNiSW
- B. Kuźma, N., Klimek-Chodacka, M., Budzyński, R., Barański, R., Jędrzejuk, A. (2025). The response of *Petunia ×atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Reports*, 15, 1583. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82364-0>
IF₂₀₂₄ **3.8**,
140 pkt. MNiSW
- C. Jędrzejuk, A., Kuźma, N., Nawrot, K., Budzyński, R., & Orłowski, A. (2020). Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia ×atkinsiana*. *Scientia Horticulturae*, 274, 109661. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109661>
IF₂₀₂₀ **3.463**,
140 pkt. MNiSW

Sumaryczny IF: 11.463

Sumaryczna liczba pkt MNiSW: 420

Lista skrótów

AUX1 – *Auxin Efflux Carrier 1*, nośnik białka auksyn

Ca²⁺ – wolne jony wapnia

CAD – dehydrogenaza alkoholu cynamyłowego

CaM53, CaM72, CaM81 – *CalModuline*, geny kodujące białka kalmodulin

CCC – Cycocel, chlorek chlormekwatu

CKs – cytokininy

CML – *Calmodulin-like proteins*, białka podobne do kalmoduliny

GA₃ – kwas giberelinowy

GAs – gibereliny

GH 3.1 – *Gretchen Hagen 3*, gen kodujący enzym syntetazy amidowej, odpowiedzialny za homeostazę auksyn

IAA – endogenne kwas indolilo-3-octowy

IAAO – oksydaza kwasu indolilo-3-octowego

LAX1 – *Like-Aux1 1*, homolog nośnika białka auksyn

PAL – fenyloalaninoamoniakolizacja

PBZ – paklobutrazol

PIN1 – *PIN-FORMED 1*, białko transportujące auksyny

POX/POD – aktywność peroksydazowa

RAM – *Root Apical Meristem*, merystem wierzchołkowy korzenia

ROS – reaktywne formy tlenu

SAM – *Shoot Apical Meristem*, merystem wierzchołkowy pędu

SM – skarlanie mechaniczne

s.m. – suchej masy

TCH – *Touch-induced genes*, geny indukowane dotykiem

PRZEGLĄD LITERATURY**1. Tigmomorfogeneza (stres mechaniczny, stres dotyku)**

Tigmomorfogeneza to zjawisko, które wciąż pozostaje słabo zbadane, a dostępna literatura na ten temat jest ograniczona. Największe zainteresowanie tym zagadnieniem miało miejsce w latach 70. i 80. XX wieku. Po raz pierwszy zostało opisane w 1973 r. przez Mark'a Jaffe (Jaffe 1973) a inspiracją dla jego badań było opracowanie sporządzone przez Karola Darwina, który w swoich pracach sugerował, że rośliny reagują na bodźce mechaniczne a stres może mieć istotny wpływ na wzrost i rozwój roślin (Darwin i Darwin 1880).

Termin „tigmomorfogeneza” opisuje adaptacyjną kaskadę reakcji rośliny (molekularną, biochemiczną, biofizyczną, fizjologiczną oraz anatomiczną) indukowaną przez bodziec mechaniczny (Kouhen i in. 2023). Wciąż jednak brakuje kompleksowych badań, które by w pełni wyjaśniały mechanizmy oraz skutki tego zjawiska dla rozwoju roślin, co sprawia, że jest to obszar wymagający dalszych badań. W kontekście rosnącego nacisku na zrównoważone rolnictwo oraz wycofywanie chemicznych regulatorów wzrostu przez Unię Europejską (European Commission 2020), temat ten nabiera szczególnego znaczenia. Mechaniczne bodźce, które indukują zmiany molekularne, biochemiczne i morfologiczne w roślinach, mogą stanowić realną alternatywę dla tradycyjnych metod kontrolowania wzrostu z użyciem różnych regulatorów. Dlatego istnieje pilna potrzeba dalszych badań, które pogłębią wiedzę na temat mechanizmów rządzących tigmomorfogenezą i możliwości jej zastosowania w praktyce ogrodniczej, co jest szczególnie istotne w obliczu współczesnych wyzwań ekologicznych i ekonomicznych.

Bodźce fizyczne odbierane przez rośliny są zróżnicowane. Zgodnie z nomenklaturą opracowaną przez Mitchella i Myers'a (1995), reakcje roślin na oddziaływanie bodźca dotykowego, możemy podzielić na tigmotropizm oraz tigmonastie. Tigmotropizm to reakcja rośliny na bodziec o działaniu kierunkowym, których skutkiem jest zahamowanie lub zmiana wzrostu tylko z jednej strony (Telewski 2012). Przykładem takiej reakcji jest owijanie się wąsów czepnych roślin pnących wokół podpór (Sparke i Wünsche 2020). Tigmonastia jest to reakcja rośliny na bodziec mechaniczny, która przebiega autonomicznie, od kierunku bodźca, i obejmuje wysoce

wyspecjalizowane modyfikacje organów roślinnych (Monshausen i in. 2008). Przykładem jest mechanizm zamykający liście pułapkowe np. u *Dionaea muscipula* czy *Drosera capensis* (Markin i Volkov 2012).

Reakcja roślin na bodziec mechaniczny zależna jest od częstotliwości, rodzaju oraz intensywności działania bodźca, a także niejednokrotnie gatunku lub odmiany roślin (Jaffe i Forbes 1993; Braam 2005; Wang i in. 2024a). U roślin wyższych z reguły odpowiedź na występujący bodziec jest długofalowa i opiera się na szeregu zmianach na poziomie molekularnym, biochemicznym oraz morfologicznym (Jaffe 1973; Braam 1990; Braam 2005; Chehab i in. 2012; Monshausen i Haswell 2013; Moulia i in. 2015).

2. Reakcja roślin na stres dotyku

Reakcje roślin na stres dotyku są istotnym ogniwem aklimatyzacji/adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Odpowiedź roślin na stres mechaniczny może być zaskakująco szybka, a pierwsze oznaki mogą pojawić się w przeciągu kilku sekund od wystąpienia stresora (Telewski 2021). Szybkości reakcji rośliny można podzielić na krótko i długoterminową. Badania nad reakcjami długoterminowymi dostarczają informacji o dynamice wzrostu mierzonej w przedziale od tygodnia do miesiąca, natomiast badania krótkoterminowe traktują najczęściej o reakcji rośliny z precyzyjną rozdzielczością czasową i zakresem od kilku sekund do kilku dni. Zarówno krótko- jak i długoterminowe odpowiedzi roślin na stres mechaniczny są kluczowe dla ich przetrwania w zmiennych warunkach środowiskowych. W odpowiedzi na krótkotrwałe bodźce, rośliny uruchamiają natychmiastowe reakcje na poziomie biochemicznym i molekularnym, które mogą obejmować zmiany np. w transporcie jonów wapnia i innych, aktywację genów związanych ze stresem oraz modyfikację struktur komórkowych (Kouhen 2023). Natomiast długotrwałe narażenie na stres dotyku prowadzi do trwałych zmian w budowie roślin, takich jak zwiększona lignifikacja ścian komórkowych czy zmiana charakteru wzrostu. Te wieloaspektowe odpowiedzi roślin pozwalają im na optymalizację swoich funkcji życiowych i lepsze przystosowanie do trudnych warunków środowiskowych. Istnieje jednak wiele niewiadomych, wynikających z braku kompleksowych badań nad większością gatunków roślin, co ogranicza zrozumienie reakcji roślin na stres dotyku.

2.1. Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej

Warto podkreślić, iż większość dostępnych badań nad odpowiedzią roślin zielnych na bodziec mechaniczny opiera się na badaniach przeprowadzonych na *Arabidopsis thaliana* (Johnson i in. 1998; Uchida i in. 2002; Kimbrough i in. 2004; Montgomery i in. 2004; Kimbrough i in. 2004; Paul-Victor i in. 2011; Louveaux i in. 2016; Zhou i in. 2017; Börnke i in. 2018; Mousavi i in. 2021; Matsumura i in. 2022; Šutevski i in. 2023). Pomimo szerokiego zastosowania tej rośliny w licznych badaniach, nie zawsze otrzymane wyniki mają przełożenie na reakcje innych gatunków. W związku z tym, istnieje potrzeba prowadzenia badań na różnych gatunkach, aby lepiej zrozumieć mechanizmy tigmomorfogenezy w kontekście szerszego poznania strategii adaptacyjnych roślin oraz jej zastosowania w ogrodnictwie.

2.1. Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej

Pierwszym wyraźnym efektem działania stresu mechanicznego na wzrost rośliny jest zahamowanie wzrostu (Coutand i in. 2010). Zmiana charakteru wzrostu roślin w wyniku działania bodźca stresu mechanicznego była przedmiotem wielu badań na gatunkach roślin uprawnych (Jaffe 1973; Latimer 1991; Coutand i in. 2000; Paul-Victor i Rowe 2011), ozdobnych (Autio i in. 1994; Smith i Ennos 2003; Anten i in. 2005) oraz na drzewach (Telewski i Jaffe 1986; Jaffe i Forbes 1993; Watt i in. 2005; Gardiner i in. 2016). Powszechnie znaną reakcją tigmomorfogenetyczną jest zahamowanie wydłużania pędów połączone ze zwiększeniem jego średnicy (Telewski i Jaffe, 1986; Braam i Davis 1990; Braam 2005; Anten i in. 2005; Hamant 2013). Stres mechaniczny powoduje znaczne ograniczenie wzrostu u *Helianthus annuus* (o 14%), *Euphorbia pulcherrima* (o 11%), *Scaevola aemula* (o 39%), *Ocimum basilicum* (o 31%), *Aster dumosus* (o 25%), *Serianthes nelsonii* (o 17%) czy *Pelargonium* sp. (o 21%) (Autio i in. 1994; Börnke i Rocks 2018; Marler 2019). Rośliny poddawane stresowi dotyku stają się mniejsze, a ich pędy grubsze (Monshausen i Gilroy 2009). Zatrzymanie wzrostu obserwuje się między trzecią a szóstą minutą po zastosowaniu bodźca mechanicznego (Jaffe i in. 1976; Jaffe i in. 1985; Peacock i Berg 1994; Young i in. 1997; Coutand 2000). Czas potrzebny na zatrzymanie wydłużania pędów jest ściśle zależny od badanego gatunku rośliny np. dla *Solanum lycopersicum* wzrost został zahamowany po godzinie od zadziałania bodźca (Coutand i in. 2000). Zahamowanie wzrostu w wyniku pocierania, u młodych roślin *Cucumis sativus*, zostało odnotowane po 1 dniu od rozpoczęciu stymulacji, natomiast u *Mimosa pudica* dopiero po 15 dniach (Jaffe 1973).

2.1. Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej

W przypadku *Bryonia dioica* wzrost został zahamowany po 3 minutach po zastosowaniu bodźca mechanicznego. Po zatrzymaniu wzrostu, nie zaobserwowano dalszego wydłużania przez około 2,5–3,5 godziny. Po tym czasie obserwowano ponowny wzrost pędu, ale na znacznie obniżonym poziomie. Zdaniem Telewskiego i in. (2021), wzrost zostaje wznowiony po ok. 30-60 minutach od zakończenia stresu. Modyfikacja wzrostu roślin jest reakcją adaptacyjną do zaistniałych warunków środowiskowych (Telewski i Jaffe 1986). W badaniach na *Phaseolus vulgaris* zaobserwowano, że zmniejszone wydłużanie międzywęźli było spowodowane zarówno zmniejszonym wydłużaniem komórek epidermy oraz komórek kory jak i mniejszą liczbą komórek miękiszowych towarzyszącym wiązkom przewodzącym i w rdzeniu pędu (Biro i in. 1980). Zwiększona średnica łodygi wynikała ze zwiększonej średnicy komórek kory oraz zwiększonej produkcji wtórnego ksylemu. W odpowiedzi na bodziec mechaniczny u *Zea mays*, *Liquidambar styraciflua*, *Ficus costaricensis*, *Apium graveolens*, *Helianthus annuus*, *Petunia ×atkinsiana* zaobserwowano tworzenie się tkanki wzmacniającej w pędach (Whitehead i Luti 1962; Biddington 1986; Jaffe i in. 2002; Chehab i in. 2009). Jednakże w przypadku niektórych gatunków (*Solanum lycopersicum*, *Festuca arundinacea*, *Phaseolus vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*), działający bodziec spowodował zwiększoną elastyczność tkanek (Biddington 1986; Niklas 1998; Anten i in. 2005; Wang i in. 2008). W doświadczeniu na *Helianthus annuus* wykazano, że sztywność i zwiększona wytrzymałość łodygi występuje podczas jej dotykania (Smith i Ennos 2003). Natomiast zastosowanie strumienia powietrza powoduje zwiotczenie łodygi i większą jej elastyczność niż u roślin kontrolnych.

Tigmomorfogeneza jest procesem złożonym. Pomimo, że zjawisko jest uważane za uniwersalne, odpowiedź u roślin drzewiastych oraz zielnych jest zupełnie inna. W przypadku roślin drzewiastych, odpowiedź rośliny często powoduje zmiany w strukturze drewna oraz charakterze przyrostu wtórnego, co prowadzi do bardziej złożonych modyfikacji na poziomie architektury całej rośliny (Telewski i in. 1996; Telewski i Pruyne 1998; Badel i in. 2015; Gardiner i in. 2016). Rośliny te mogą reagować na bodźce mechaniczne poprzez zwiększenie grubości pnia, co stanowi adaptację pozwalającą na większą odporność na siły zewnętrzne, takie jak wiatr. Wzrost może być bardziej kompaktowy, z mniejszą liczbą pędów bocznych, mniejszą powierzchnią liści/igieł oraz gęstszym ulistnieniem (Telewski i Jaffe 1986; Niklas 1996; Telewski i Pruyne 1998; Wu i in. 2016). Larson (1965) odnotował wzrost liczby

2.1. Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej

grubościennych cewek w drzewach poruszających się pod wpływem wiatru w porównaniu z drzewami nie poddanymi stresowi. Z kolei u *Liquidambar styraciflua* długość i średnica elementów naczyniowych oraz długość włókien drzewnych uległy zmniejszeniu po poddaniu roślin wymuszonemu ruchowi (Neel 1971).

Obserwuje się, że po ustaniu wzrostu na długość, następuje szybkie zwiększanie średnicy rośliny, jako następstwo stresu dotyku (Coutand 2010). W przypadku topoli, zaobserwowano, iż wzrost średnicy młodych łodyg trwał od 2 do 3 dni. Następnie zaobserwowano spadek tempa wzrostu na szerokość oraz powrót szybkości wzrostu do wartości przed dotykiem. Zdaniem Telewski i in. (2021) rozrastanie się roślin na szerokość, odbywa się od 6 do 24 godzin od wystąpienia bodźca stresowego. Brak jest jednak większej liczby badań w tym zakresie, aby potwierdzić otrzymane wyniki.

Stres mechaniczny oddziałuje nie tylko na architekturę całej rośliny, ale modyfikuje wygląd liści (Johjima i in. 1992; Zajączkowska i in. 2024). W badaniach Liu i in. (2016), Marković i in. (2016), Zajączkowska i in. (2024) zaobserwowano, że w następstwie działania stresu dochodzi do modyfikacji włosków wydzielniczych. W badaniach Liu i in. (2016) zaobserwowano, że włoski na liściach *Arabidopsis thaliana* mogą działać jako przełącznik mechanosensoryczny, przekształcając bodźce mechaniczne w sygnały fizjologiczne, głównie poprzez nacisk wywierany na podstawę włosków wydzielniczych (np. wywieranej przez owady). Dodatkowo autorzy zaobserwowali spadek stężenia wapnia w ścianach komórkowych włosków pod wpływem dotyku.

W przypadku doświadczenia na pomidorze zaobserwowano znaczne zmniejszenie powierzchni liści, ich liczby oraz obniżenie suchej masy, w następstwie dotykania wierzchołka pędów (Johjima i in. 1992). W badaniach na *Urtica dioica* zaobserwowano zmianę geometrii liścia na skutek kierunkowego bodźca dotyku (Zajączkowska i in. 2024). W badaniach Anten i in. (2010), stwierdzono, że u *Plantago major* dotyk powoduje tworzenie liści z dłuższymi ogonkami liściowymi, blaszki liściowe są wydłużone i cieńsze. Jednak w tym samym doświadczeniu zauważono, że zastosowanie podmuchu wiatru, jako bodźca mechanicznego, powoduje odwrotny efekt, do tego otrzymanego przez dotyk. W badaniach Cipolliniego (1997) na *Phaseolus vulgaris* stwierdzono zwiększenie grubości blaszki liściowej w następstwie stresu mechanicznego. Zdaniem Anten i in. (2010), odmienne reakcje adaptacyjne roślin są związane z rodzajem bodźca mechanicznego. Zarówno zwiększenie jak i zmniejszanie grubości blaszki liściowej ma za zadanie zmniejszyć prawdopodobieństwo uszkodzenia

2.1. Odpowiedź na poziomie budowy morfologicznej i anatomicznej

rośliny na skutek silnych naprężeń. Zdaniem Gardinera i in. (2016), zmniejszenie powierzchni liści jest reakcją adaptacyjną rośliny, w celu zmniejszenia oporu na czynnik mechaniczny i zapobiegnięciu ewentualnym uszkodzeniom (wylamaniu czy wyrwaniu). U roślin zielnych, reakcje na bodźce mechaniczne są zazwyczaj prostsze i bardziej skoncentrowane na bezpośrednich modyfikacjach wzrostu, takich jak hamowanie wydłużania pędów, zwiększenie liczby pędów bocznych czy zmian w budowie liści (Telewski i Jaffe 1986; Johjima i in. 1992; Braam 2005; Hamant 2013; Gardiner i in. 2016).

Stres jest czynnikiem zaburzającym proces kwitnienia u roślin (Wada i in. 2010, Blanvillain i in. 2011; Pieterse 2012; Riboni i in. 2014; Rasool i in. 2015; Kazan i Lyons 2016; Takeno 2016). Przyspieszenie lub zahamowanie kwitnienia indukowanego stresem jest odpowiedzią adaptacyjną rośliny w następstwie występującego stresu (Vernieri i in. 2006; Morel i in. 2012). Reakcja na stres jest zależna od rodzaju bodźca, gatunku rośliny, a nawet odmiany (Wada i Takeno 2010; Takeno 2012; Takeno 2016). Według Telewskiego (2021), tigmomorfogeneza jest zjawiskiem zmniejszającym potencjał reprodukcyjny roślin poprzez zmniejszenie liczby kwiatów oraz opóźnienie kwitnienia. Te wyniki zostały potwierdzone w doświadczeniach m.in. Braama (2005), Chehaba i in. (2012) czy Grahama i Wheelera (2017). W doświadczeniu nad *Capsicum annum* 'California Wonder', zaobserwowano zmniejszenie liczby kwiatów o 10 szt./ roślinę oraz odnotowano zdecydowanie późniejsze kwitnienie niż u roślin kontrolnych (Graham i Wheeler 2017).

Stres mechaniczny wpływa także na architekturę systemu korzeniowego (Johjima i in. 1992; Gartner 1994; Gardiner i in. 2016; Sparke i Wünsche 2020). Kluczowym czynnikiem wpływającym bezpośrednio na te zmiany jest środowisko glebowe (rodzaj gleby, dostępność próchnicy czy liczba przestworów glebowych). Darwin był pierwszym badaczem, który zaobserwował wpływ stymulacji mechanicznej na wzrost korzeni (Darwin 1880). Przymocował mały kawałek miki do jednej strony wierzchołka korzenia grochu, a jej dotyk powodował odginanie się korzenia w kierunku przeciwnym do materiału. Zdaniem Ennos'a (1993), korzenie pierwszego rzędu są skuteczne w zakotwiczeniu małych roślin oraz małych drzew. Główną strategią przeciwstawiania się ewentualnym perturbacjom jest tworzenie głęboko zakorzenionych korzeni bocznych, dzięki czemu większa objętość gleby ulega podtrzymaniu, a masa korzeniowa jest trudna do oddzielenia od gleby. U roślin zielnych, zaobserwowano zwiększenie liczby oraz grubości korzeni bocznych pierwszego rzędu na skutek

2.2. Odpowiedź na poziomie hormonalnym i enzymatycznym

regularnego jednokierunkowego poruszania części nadziemnych (Goodman i Ennos 1998; Richter i in. 2009).

Przedstawione powyżej wyniki podkreślają złożoność reakcji adaptacyjnych roślin na stres mechaniczny oraz ich zależność od innych czynników środowiskowych. Pogłębianie wiedzy na temat reakcji roślin na różne bodźce mechaniczne pozwoli nie tylko lepiej zrozumieć złożone procesy fizjologiczne i biochemiczne, które podlegają regulacji, ale również może mieć praktyczne zastosowanie. Identyfikacja i zrozumienie tych mechanizmów może prowadzić do opracowania nowych strategii regulacji funkcji roślin w warunkach stresu środowiskowego.

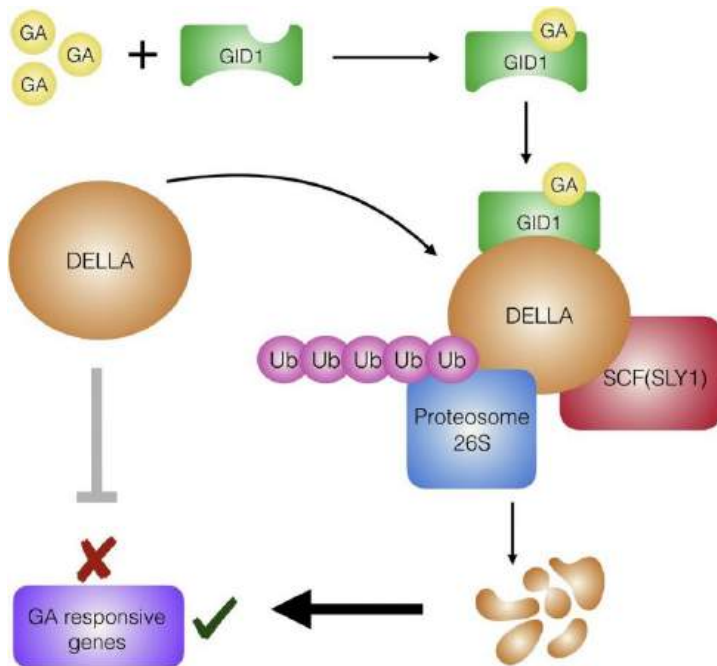
2.2. Odpowiedź na poziomie hormonalnym i enzymatycznym

Auksyny odgrywają ważną rolę w procesach aklimatyzacji metabolicznej roślin w odpowiedzi na stres mechaniczny (Mitchell 1977; Erner i Jaffe 1982; Sanyal i Bangerth 1998; Morita i Tasaka 2004; Esmon i in. 2006; Chehab i in. 2009; Sparke i in. 2020; Telewski 2021). Stres dotyku powoduje zmniejszenie zawartości kwasu indoliloctowego (IAA) w roślinach *Plantago major*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Cyclanthera brachybotrys* i *Phaseolus vulgaris* (Erner i Jaffe 1982; Onoda i Anten 2011; Markovic i in. 2016). Zdaniem Tanimoto (2007) współdziałanie auksyn oraz giberelin jest kluczowe dla wzrostu wydłużeniowego pędów.

Badania fizjologiczne wskazują na ważną rolę giberelin (GAs) w wydłużaniu międzywęźli (Sun 2008; Prusinkiewicz i in. 2009; Tian i Jiao 2015; Rinne i in. 2016; Binenbaum i in. 2018; Serova i in. 2019). Stres mechaniczny prowadzi do zmniejszenia zawartości GA₁, GA₃, GA₄ oraz GA₇ (Suge 1978; Takahashi i Suge 1980; Lange i Lange 2015). W badaniach Lange i Lange (2015) na mutantach *Arabidopsis* z utratą funkcji sygnalizacji giberelin (GA₁, GA₃, GA₄ oraz GA₇) udowodniono, że hormon ten pełni kluczową rolę w tigmomorfogenezie roślin. W badaniach Wang i in. (2024a) dowiedziono, że w kontroli zawartości GA₄, w wyniku działania stresu dotyku, kluczową rolę pełnią etylen oraz kwas jasmonowy. Jednak nie jest znane, czy istnieje interakcja między sygnalizacją kwasem jasmonowym (JA) i GAs w tigmomorfogenezie (Wang i in. 2024a).

2.2. Odpowiedź na poziome hormonalnym i enzymatycznym

W badaniach na *Arabidopsis thaliana* (Suge 1978) zaobserwowano spadek, po około miesiącu, zawartości GA₃, w następstwie stresu mechanicznego. Do obniżenia poziomu bioaktywnego GAs, dochodzi między innymi w wyniku akumulacji jądrowych białek DELLA (Zentella i in. 2007; Qianyu i in. 2021). Gdy GAs wiąże się ze swoim receptorem (GID1), ten jest aktywowany, umożliwiając rozpoznanie białek DELLA. Po utworzeniu kompleksu GID1-GA-DELLA jest on lokalizowany przez ligazę SCF (SLY1), wyzwalając ubikwitynację DELLA i degradację przez proteasom 26S. (Ryc.1)



(Fleet i Sun 2005; Harberd i in., 2009; Gao i in. 2011; Wallner i in. 2016). Usunięcie białek DELLA powoduje ogromne zmiany w ekspresji genów i prowadzi tym samym do wydłużenia komórek. Białka te mogą również częściowo regulować wzrost i rozwój roślin poprzez oddziaływanie z różnymi szlakami sygnalizacyjnymi, takimi jak te

Rycina 1. Model szlaku sygnalizacyjnego GAs.

Likwidowanie represji przez DELLA stymuluje wzrost roślin. **DELLA** (białko pełniące rolę inhibitora w szlaku sygnalizacji giberelinowej), **GID1** (*GA insensitive dwarf1*; receptor GA), **SCF** (*SLY1, Skp1-cullin-F-box*; kompleks białkowy regulujący degradację białek poprzez przyłączenie ubikwityny), **Ub** (*ubikwityna*; białko pełniące rolę znacznika, umożliwiające proces ubikwitynacji), **Proteosome 26s** (złożona struktura białkowa będąca kluczowym komponent układu degradacji białek). Źródło: Salazar-Cerezo i in. (2018).

związane z kwasem abscysynowym, cytokinami, etylenem, brassinosteroidami oraz kwasem jasmonowym.

Po ekspozycji roślin na stres abiotyczny, dochodzi do zahamowania wzrostu, co częściowo jest regulowane przez białka DELLA (Achard i in. 2006; Achard i in. 2008b; Magome i in. 2008). U siewek

Arabidopsis thaliana ekspozycja na zasolenie wywołała redukcję endogennych bioaktywnych GAs (Achard i in. 2008a; Magome i in. 2008), oraz jednoczesną akumulację białek DELLA (Achard i in. 2006). Wiele badań łączy funkcję tych białek z

2.2. Odpowiedź na poziomie hormonalnym i enzymatycznym

ograniczonym wzrostem, w warunkach stresu abiotycznego, oraz pozytywnym wpływem na zwiększenie tolerancji na stres (Magome i in. 2004; Achard i in. 2008b; Fukao i Bailey-Serres 2008). W wyniku akumulacji białek DELLA zaobserwowano zmniejszenie tempa tworzenia liści, opóźnienie czasu kwitnienia oraz spowolnienie rozrostu korzeni (Achard i in. 2006). Brak jest szerszych badań dotyczących powiązania sygnalizacji GAs z tolerancją rośliny na stres, poza dobrze poznaną rolę giberelin w regulacji zawartości reaktywnych form tlenu (ROS) (Achard i in. 2008a).

Podczas stresu mechanicznego dochodzi także do zahamowania wydłużania się pędów, co jest wynikiem wzrostu aktywności oksydazy kwasu indoliloctowego (IAAO), liazy amoniaku fenyloalaniny (PAL), dehydrogenazy alkoholu cynamyłowego (CAD) lub peroksydaz (POX), związanych z obroną przed ROS (Cipollini 1998; Karami i Saidi 2010). Zarówno PAL jak i CAD są elementami szlaku enzymatycznego odpowiedzialnego za biosyntezę lignin. POX również odpowiada za lignifikację i suberynizację ścian komórkowych, co prowadzi do spowolnienia wydłużania się komórek (Quiroga i in. 2000; Gładala-Kostarz 2019). Zwiększona aktywność tych enzymów i powstawanie zdrewniałej tkanki uznaje się za niespecyficzną odpowiedź obronną rośliny w odpowiedzi na bodziec mechaniczny (Sparke i in. 2020). W wyniku stymulacji mechanicznej dochodzi również do zwiększenia aktywności kwasu 1-aminocyklopropanokarboksylowego, kluczowego enzymu w szlaku biosyntezy etylenu (de Jaegher i in. 1987).

Cytokininy (CKs) odgrywają natomiast ważną rolę w łagodzeniu uszkodzeń roślin spowodowanych stresami abiotycznymi (Ullah i in. 2018; Keshishian i in. 2018; Prerostova i in. 2018; Liu i in. 2020). Oprócz stymulacji podziałów komórkowych, cytokininy są również odpowiedzialne za starzenie się roślin, poprzez hamowanie rozkładu chlorofilu, kwasów nukleinowych, białek oraz innych związków, oraz redystrybucję niezbędnych aminokwasów, hormonów i soli nieorganicznych do różnych części rośliny (Ullah i in. 2018). W badaniach Beyla i Mitchell (1983) zaobserwowano zwiększoną zawartość cytokinin w soku ksylemowych łodygi *Helianthus annuus*, natomiast niską zawartość w liściach roślin stresowanych mechanicznie. Na poziomie molekularnym zmiany stężenia cytokinin wpływają na reakcje rośliny na stres, najprawdopodobniej poprzez zmianę produkcji ROS. Rośliny traktowane cytokininą (lub mutanty ze zmienioną produkcją lub degradacją cytokinin) wykazują zaburzenia

2.2. Odpowiedź na poziomie hormonalnym i enzymatycznym

homeostazy ROS, co może mieć wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalaza, peroksydaza askorbinianowa), peroksydację lipidów oraz ekspresję genów zaangażowanych w fotosyntezę i odpowiedź rośliny na stres abiotyczny (Zavaleta-Mancera i in. 2007; Nishiyama i in. 2011; Lubovská i in. 2014; Xu i in. 2016; Skalák i in. 2016).

Szczegółowe badania dotyczące zmian zawartości cytokinin pod wpływem stresu mechanicznego są ograniczone. Zdaniem Liu i in. (2020), wszystkie stresy abiotyczne hamują wzrost roślin i indukują produkcję ROS, co wskazuje na, podobieństwa mechanizmów wywoływanych działaniem różnych stresów. Na podstawie dostępnych danych dotyczących roli cytokinin w reakcji roślin na różne stresy abiotyczne, można przypuszczać, że ich mechanizmy działania również w przypadku stresu mechanicznego mogą być podobne. Zatem cytokininy mogą również uczestniczyć w adaptacji roślin do stresu dotyku, regulując produkcję ROS, poprzez aktywację układu antyoksydacyjnego i następnie łagodząc skutki stresu. Ponadto, ich rola w redystrybucji metabolitów oraz hamowaniu procesów starzenia mogłaby również odgrywać kluczową funkcję w adaptacji roślin do długotrwałego działania bodźców mechanicznych. Jednakże na poparcie tych hipotez, konieczne jest przeprowadzenie szczegółowych badań.

3. Odpowiedź na poziomie molekularnym-geny TCH (Touch)

Badania na *Arabidopsis thaliana* dostarczyły istotnych informacji o sposobach, reakcji, roślin na różnorodne bodźce środowiskowe, takie jak dotyk, wiatr, woda czy zmiany temperatury (Braam i in. 1990; Braam 1992; Antosiewicz i in. 1995; Xu i in. 1995; Polisensky i Braam 1996). Geny indukowane dotykiem TOUCH (TCH) zostały odkryte przypadkowo przez Braama i Davisa (1990). Przeprowadzony przez nich eksperyment wykazał, że pewne geny ulegają gwałtownemu wzrostowi ekspresji podczas zastosowania pozornie nieszkodliwych bodźców mechanicznych (Braam i Davis 1990). Następnie zaobserwowano, że ekspresja genów TCH jest również indukowana przez bodźce, które nie wydają się mieć właściwości mechanicznych, takie jak ciemność czy szok temperaturowy. Regulacja opisanych przez nich genów jest zatem niezwykle złożona, a ich indukcja może zachodzić nie tylko w wyniku bodźców mechanicznych, ale także hormonalnych (Braam i in. 2000; Lee i in. 2005).

Produkty genów TCH odgrywają kluczową rolę w adaptacji roślin do środowiska. TCH1 jest odpowiedzialny za syntezę kalmodulin (ang. *Calmodulin*, białko kalmodulina), a TCH2 i TCH3 kodują białka CML (ang. *Calmodulin-like proteins*), natomiast TCH4 jest związany z syntezą endotransglukozylazy/hydrolazy ksyloglukanu (XTH22). Kalmoduliny są zaangażowane w wewnątrzkomórkowy przekaz sygnałów z udziałem wapnia (Ca^{2+}), co może umożliwiać wzmocnienie odpowiedzi komórek na stres mechaniczny (Braam i in. 1996). Geny TCH, takie jak TCH1, TCH3 czy TCH4, ulegają przejściowej nadekspresji już w kilka minut po wystąpieniu bodźca (Braam i Davis 1990; Braam i in. 1996).

W badaniu Antosiewicz i in. (1995), zaobserwowano, że stymulacja wiatrem powoduje ekspresję białka TCH3, a najwyższą jego zawartość stwierdzono w centralnej części merystemu wierzchołkowego, w primordiach liściowych oraz wewnątrz kambium naczyniowego. Sygnałem uaktywniającym geny TCH2, TCH3 oraz TCH4, jest zwiększający się poziom wolnych jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytoplazmie (Braam i in. 1992). Rozpoczęcie ekspresji genów TCH obserwuje się już 10-30 min od wystąpienia stresu, natomiast powrót ekspresji do wyjściowego poziomu po 1-2 h od jego wywołania (Telewski in. 2021).

Jones i Mitchell (1989) zaobserwowali częściowe zahamowanie reakcji tigmomorfogenetycznej u *Glycine max* w wyniku zastosowania inhibitorów kalmoduliny. Wyniki te sugerują zatem, że funkcja kalmoduliny jest przynajmniej

3. Odpowiedź na poziomie molekularnym-geny TCH (Touch)

częściowo wymagana do zahamowania wzrostu po zastosowaniu stresu dotyku. Wg. Ko i in. (2004), ekspresja genu TCH2 jest indukowana w międzywęźlach pędów nie narażanych na bodziec zewnętrzny, co sugeruje, że rosnąca roślina sama generuje bodźce wewnętrzne a białka wiążące wapń mogą przekazywać ten sygnał. Zdaniem autorów możliwe jest, że gen ten odgrywa rolę w przekazywaniu sygnału w momencie formowania wtórnego ksylemu. Dane te wskazują, że ekspresja TCH może być nie tylko regulowana w odpowiedzi na zewnętrzne zaburzenia mechaniczne, takie jak dotyk, ale także przez siły mechaniczne, które ujawniają się podczas normalnej morfogenezy roślin (Xu i in. 1995; Braam 2000).

W przypadku *Arabidopsis thaliana* tigmomorfogeneza jest regulowana przez złożoną sieć sygnalizacyjną składającą się z ponad 3000 genów (ponad 11% genów *A. thaliana*) (Wang i in. 2024b). Pierwsze zmiany w poziomie ich ekspresji zachodzą już 5 min od wystąpienia bodźca dotyku. U *A. thaliana* ponad 2,5% z 589 genów zaangażowanych w tigmomorfogenezę, pod wpływem dotyku zwiększa przynajmniej dwukrotnie aktywność (Lee i in. 2005). Natomiast w badaniach Braama i Davisa (1990), u roślin *A. thaliana* „stresowanych ciemnością”, po 30 minutach od rozpoczęcia stresu, zaobserwowano 10-100 krotny wzrost ekspresji genów TCH. U ponad połowy wszystkich genów *A. thaliana* indukowanych dotykiem obserwuje się również wzrost ekspresji w wyniku stresu ciemności (Lee i in. 2005). Regulacja ekspresji genów TCH została dodatkowo powiązana z sygnalizacją jasmonianową (JA) (Hamant i in. 2017). Mechanostymulacja wiąże się tutaj z uruchomieniem szlaków sygnalizacji JA jako części regulacji funkcji kambium, która indukuje produkcję JA i ekspresję genów biosyntezy JA (Sehr i in. 2010). Zatem rozwój wiedzy o genach TCH pozwala lepiej zrozumieć szlaki sygnałowe umożliwiające roślinom przystosowanie się do dynamicznie zmieniających się warunków otoczenia.

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

Retardanty wzrostu (ang. plant growth regulators, PGRs) są grupą regulatorów roślinnych szeroko stosowanych w rolnictwie oraz ogrodnictwie w celu kontrolowania wzrostu roślin poprzez zahamowanie elongacji pędów, a jednocześnie wspieranie rozwoju generatywnego, takiego jak kwitnienie czy owocowanie (Pateliya i in. 2014; Koutroubas i in. 2015; Kasem i in. 2015; Rademacher 2016; Koutroubas i Damalas 2016). Historia stosowania retardantów wzrostu sięga połowy XX. wieku, kiedy to po raz pierwszy wprowadzono środki chemiczne mające wpływ na procesy wzrostu roślin (Rademacher 2016). W 1950 r. jednym z pierwszych zastosowanych retardantów wzrostu był chlorek chlormekwatu (CCC, Cycocel), wykorzystywany w celu zwiększenia odporności zbóż na wyleganie (Fletcher i Kirkwood 1982). Zastosowanie CCC hamowało elongację pędów oraz zwiększało ich stabilność (Rademacher 2000). W przypadku upraw *Brassica napus* stosowanie retardantów nie tylko ograniczyło długości pędów, ale również wpłynęło na rozkład biomasy, zwiększając rozrost systemu korzeniowego (Miliuviene i in. 2004; Mihaylov 2024).

Retardanty wzrostu znajdują szerokie zastosowanie również w uprawach sadowniczych, głównie w celu regulacji wzrostu wegetatywnego, poprawy plonowania oraz zwiększenia odporności drzew owocowych na warunki stresowe. Substancje aktywne takie jak proheksadion wapnia czy paclobutrazol (PBZ) są wykorzystywane do ograniczenia wzrostu pędów, co ułatwia pielęgnację, poprawia dostęp światła wewnątrz korony oraz sprzyja lepszemu zawiązywaniu owoców (Rademacher 2000). Retardanty są również stosowane w celu zwiększenia efektywności fotosyntezy poprzez zwiększenie stosunku liści asymilacyjnych do masy drewna. Badania wykazały, że zastosowanie proheksadionu wapnia w sadach jabłoniowych zmniejsza ryzyko wylegania drzew oraz poprawia jakość owoców dzięki zwiększonej akumulacji węglowodanów w owocach (Rademacher i in. 2004; Kashirskaya i in. 2021).

Retardowanie chemiczne odgrywa kluczową rolę podczas produkcji roślin rabatowych oraz doniczkowych (Pobudkiewicz i Nowak 1994; Pobudkiewicz 2014). Odpowiednia kontrola pokroju rośliny jest niezwykle ważna zarówno z perspektywy estetycznej jak i funkcjonalnej. W przypadku roślin rabatowych, zbyt intensywny wzrost, wybujałość oraz nieregularny kształt wpływają negatywnie na odbiór wizualny

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

rośliny. Według Henschke i in. (2013) wygląd rośliny oraz jakość są determinantami, którymi kieruje się konsument podczas zakupu roślin. Sprzedawcy detaliczni oraz konsumenci chętniej kupują rośliny które są zwarte i dobrze zagęszczone (Bergstrand 2017).

Retardanty wzrostu mają za zadanie zapobiegać podziałom komórkowym oraz wzrostowi w obszarze poniżej wierzchołka, ale nie mają wpływu bezpośrednio na tkanki merystematyczne (Latimer i Whipker 2019). Najczęściej działanie PGR odbywa się poprzez zahamowanie produkcji giberelin (blokowanie szlaku biosyntezy giberelin, przez zahamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za ich syntezę), co wpływa na ograniczenie tempa wzrostu rośliny (Bañón i in. 2005; Warner i Erwin 2005). W badaniach Bosch i in. (2016) na *Physalis angulata* zauważono, że im wyższe stężenie PBZ, jednego ze stosowanych w produkcji roślinnej retardantu, tym silniejszy efekt zahamowania wysokości roślin. Jednakże przy wysokim stężeniu preparatu ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) rośliny wykazują oznaki fitotoksyczności oraz nie wydają owoców. Badania Hamza i in. (2007) na *Pelargonium zonale*, potwierdziły, że zastosowanie retardantów chemicznych wpływa na zwiększenie liczby pędów bocznych, zmniejszenie średnicy kwiatów, zmniejszenie liczby kwiatów w kwiatostanie oraz opóźnienie kwitnienia. Zastosowanie CCC spowodowało zmniejszenie wysokości roślin średnio o 26%, a PBZ o 45%. Ponadto badacze zauważyli istotny wpływ rodzaju stosowanych retardantów, liczby zabiegów retardowania chemicznego w sezonie, na badane parametry. Nieco inne wyniki otrzymali Pobudkiewicz i Maciorowski (2015). Badali oni wpływ flurprimidolu na dwóch odmianach *Pelargonium xhortorum*. Zaobserwowali, że rośliny retardowane chemicznie były niższe (średnio o 45% w stosunku do kontroli), ale retardant nie miał wpływu na przewodnictwo szparkowe, szybkość transpiracji, liczbę dni kwitnienia, powierzchnię liści, świeżą oraz suchą masę kwiatostanu oraz liczbę kwiatostanów. W badaniach Taherpazira i Hashemabadiego (2016) na *Zinnia elegans*, zauważono zależność między wielkością doniczek a retardantem (CCC). Przy większej doniczce (14-16 cm) oraz wysokiej dawce preparatu (1000 ppm), otrzymano rośliny wysokie z dużą liczbą kwiatów. Ponadto stężenie retardantu nie miało wpływu na średnicę kwiatów oraz okres kwitnienia.

Oprócz zaspokajania potrzeb konsumenta, podczas produkcji ważne są również inne aspekty niskich oraz kompaktowych roślin. Z punktu widzenia logistyki, zbyt wybujała roślina jest zdecydowanie trudniejsza w transporcie, łatwiej jest ją uszkodzić oraz początkowo stwarza dość dużą trudność w sadzeniu oraz pielęgnacji (Bergstrand

2017). Stosowanie przez producentów retardantów wzrostu, pozwala na dostosowanie wzrostu i pokroju rośliny do określonych standardów podwyższając tym samym jej wartość handlową. Ponadto mniejsza roślina pozwala na wyprodukowanie większej ilości roślin na tej samej powierzchni, co ma pozytywny przekład na rentowność produkcji.

Rosnąca świadomość ekologiczna oraz liczne regulacje prawne, zwiększają nacisk na zrównoważone praktyki ogrodnicze (Bergstrand 2017). Kluczowym krokiem w produkcji stało się poszukiwanie alternatywnych rozwiązań regulowania pokroju roślin rabatowych, tak aby możliwie w jak największym stopniu zrezygnować ze stosowania chemicznych środków. Wprowadzenie strategii "od pola do stołu" (ang. *from Farm to Fork*) przez Komisję Europejską w 2020 roku podkreśla konieczność redukcji stosowania chemicznych środków w rolnictwie w celu zwiększenia zrównoważenia produkcji żywności oraz ochrony zdrowia ludzi i środowiska (European Commission, 2020). Strategia ta zakłada ograniczenie stosowania chemicznych regulatorów wzrostu, które mogą wpływać na jakość gleby, bioróżnorodność i bezpieczeństwo żywności. Alternatywne technologie, takie jak mechaniczne regulowanie wzrostu, biostymulatory czy metody inżynierii genetycznej, są kluczowe dla realizacji celów strategii, ponieważ pozwalają zmniejszyć zależność od chemicznych środków i ograniczyć ich negatywny wpływ na środowisko. Wspieranie takich technologii wpisuje się w założenia Europejskiego Zielonego Ładu i dążeń do neutralności klimatycznej, zgodnie z wizją zrównoważonego systemu rolno-spożywczego (European Commission, 2020).

Początkowo badania nad stresem mechanicznym w roślinach, jako alternatywą dla retardantów chemicznych, były intensywnie prowadzone w latach 70. i 80. XX wieku. (Turgeon 1971; Hammer i in. 1974; Jaffe 1976; Beyl i Mitchell 1977; Takaki 1977; Wheeler i Salisbury 1979; Biddington 1986). Jednak w miarę upływu czasu, sceptycyzm związany z trudnością uzyskania spójnych wyników oraz wygoda i skuteczność chemicznych regulatorów wzrostu spowodowały zahamowanie dalszych prac w tej dziedzinie. Niemniej jednak, począwszy od początku XXI wieku, zainteresowanie mechanizmami stresu mechanicznego zostało ponownie podjęte, głównie w odpowiedzi na rosnące obawy dotyczące negatywnego wpływu chemicznych substancji na środowisko i zdrowie człowieka. (Tatineni i in. 2000; Singh i in. 2000; Rademacher i Bucci 2002; Silva i in. 2003).

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

Odpowiedź roślin na stres mechaniczny jest zróżnicowany i może się różnić w zależności od gatunku rośliny oraz rodzaju zastosowanego bodźca mechanicznego, co wpływa na ostateczne efekty adaptacyjne i wizualne (Jaffe 1973; Telewski i Jaffe 1986; Latimer 1991; Autio i in. 1994; Coutand i in. 2000; Braam 2005; Monshausen i Gilroy 2009; Hamant 2013; Börnke i Rocks 2018; Marler 2019). Różne formy stresu mechanicznego, takie jak zginanie, potrząsanie, zranienie, dotyk, wiatr, czy uderzenia, wywołują odmienne odpowiedzi fizjologiczne i biochemiczne w roślinach, co sprawia, że zjawisko to jest jeszcze bardziej skomplikowane i wymaga dalszych badań (Kouhen i in. 2023).

Zmiany morfologiczne zachodzące pod wpływem wiatru były pierwszym bodźcem badanym w kontekście stresu mechanicznego (Jaffe 1976, Jaffe 1985). Ze względu na charakter bodźca, zdecydowanie większa część publikacji na ten temat dotyczy drzew i krzewów (Gardiner i in. 2016). W przypadku badań na roślinach zielnych, w wyniku działania wiatru, główną reakcją jest zahamowanie wzrostu, elongacji pędów, relokację biomasy do korzenia oraz zwiększenie średnicy łodygi (Whitehead 1962; Jaffe 1985; Niklas 1998; Moulia i in. 2006; Telewski 2006; Coutand 2010; Gardiner i in 2016).

Zastosowanie wiatraków w szklarniach jest obecnie uznawane za jedną z najbardziej ekonomicznych i prostych metod poprawy warunków uprawy roślin. Mechaniczne oddziaływanie wiatru ma istotny wpływ na wzrost i pokrój roślin, co czyni go potencjalną alternatywą dla chemicznych regulatorów wzrostu. Jednakże stosując to rozwiązanie należy pamiętać o wpływie wiatru na modyfikację mikroklimatu w szklarni (np. obniżenie temperatury, zmniejszenie wilgotności powietrza czy zwiększenie tempa transpiracji) (Anten i in. 2006). Wyniki badań wskazują, że skuteczność tego rozwiązania jest silnie zależna od gatunku rośliny, prędkości wiatru oraz czasu trwania ekspozycji (Tab. 1). Szczegóły dotyczące wpływu wiatru na wygląd różnych gatunków, w kontekście alternatywy dla stosowania retardantów chemicznych, zostały zestawione w Tabeli 1, która podsumowuje różnorodność reakcji roślin na ten rodzaj bodźca mechanicznego oraz różnorodność metod badawczych stosowanych w eksperymentach.

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

Tabela 1. Wpływ wiatru na wygląd rośliny oraz kwitnienie

Gatunek	Efekt	Parametry stymulacji dotykowej roślin	Źródło
<i>Sinapis alba</i>	Obniżenie ilości liści oraz biomasy; skrócenie łodygi	2,2 i 6,0 m s ⁻¹ , przez 42 dni	Retuerto i Woodward (1992)
<i>Rosa</i> sp.	Brak wpływu na pokrój; opóźnienie kwitnienia	Od 0,08 do 0,35 m·s ⁻¹ , brak danych o czasie trwania	Mortensen i Gislerød (1997)
<i>Plantago major</i>	Zmniejszenie powierzchni blaszki liściowej; skrócenie ogonków liściowych	0,2 lub ok. 2,3 m·s ⁻¹ , 24 h/dobę	Anten i in. (2010)
<i>Impatiens walleriana</i> ‘DeZire’	Im wyższa prędkość tym niższe rośliny	4,5 m·s ⁻¹ , sekwencja 5 min działania na 10 min przerwy przez 24 h	Andersson (2011)
	Spadek ogólnej świeżej masy roślin	powyżej 0,8 m·s ⁻¹ , sekwencja 5 min działania na 10 min przerwy przez 24 h	
<i>Petunia hybrida</i> ‘Tidal Wave’	Brak wpływu na wysokość	4,5 m·s ⁻¹ , sekwencja 5 min działania na 10 min przerwy przez 24 h	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Zahamowanie wydłużania łodygi	8 m·s ⁻¹ , przez 24 h	Van Gaal i Erwin (2005)
	Wpływ na architekturę rośliny porównywalny do zastosowania retardantu chemicznego (Diniconazol)	2 m·s ⁻¹ , 10 h dziennie przez 20 dni	Hwang i in. (2019)
	Spowolnienie tempa wzrostu; wzrost masy korzeni o ok. 35%	0,6 m·s ⁻¹ , co 30 min, czas trwania 5 min	Li i in. (2020)
	Redukcja wzrostu o 33%	17,1 m·s ⁻¹ , przez 14 dni	Sparke i in. (2022)
	Uszkodzenie liści oraz pędów bocznych	2 m·s ⁻¹ , brak danych	Liu i in. (2023)
	Spowolnienie tempa wzrostu pędów oraz liści; Stymulacja wzrostu korzeni	3 m·s ⁻¹ , 30 min/15 dni	Yang i in. (2024)

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

Kolejnym efektywnym rozwiązaniem w regulowaniu pokroju roślin jest zastosowanie mechanicznych bodźców takich jak bezpośrednie potrząsanie lub wibracje. Szczegóły dotyczące wpływu wibracji i potrząsania na różne gatunki roślin oraz zastosowanych metodologii badawczych zostały przedstawione w tabeli poniżej. W Tabeli 2 przedstawiono zarówno potencjał tej metody, jak i różnice w odpowiedzi poszczególnych gatunków na ten rodzaj bodźca mechanicznego.

Tabela 2. Wpływ wibracji na wygląd oraz kwitnienie roślin

Gatunek	Efekt	Parametry stymulacji dotykowej roślin	Źródło
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Zmniejszenie wysokości roślin o 20-30%; większa liczba krótszych międzywęźli.	1 raz dziennie przez 30s	Hammer i in. (1974)
<i>Chrysanthemum morifolium</i> ‘May Shoesmith’	Zmniejszenie wydłużenia międzywęźli; większa liczba pędów bocznych	3 razy dziennie przez 5 min (czas trwania oraz intensywność stresu dostosowywany do fazy rozwoju rośliny)	Beyl i Mitchell (1977)
<i>Helianthus annuus</i> ‘Sungold Double’	Zahamowanie wzrostu pędów; zmniejszenie blaszki liściowej; redukcja suchej biomasy	2 razy dziennie przy 225 do 250 obr./min na platformie wibracyjnej, czas trwania 23 dni	Beyl i in. (1983)
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Skrócenie oraz pogrubienie łodyg; opóźnienie dojrzewania kwiatów oraz owoców	1 minutowa wibracja dziennie przez 49 dni	Niklas (1998)
<i>Coleus blumei</i>	Zmniejszenie wysokości roślin o 31%; właściwości mechaniczne łodygi uległy pogorszeniu wraz ze zwiększaniem się czasu trwania drgań oraz częstotliwości	częstotliwość drgań 12,5 Hz przez 10 min	Safaei i in. (2019)

Bezpośredni kontakt z rośliną, taki jak dotykanie czy zginanie części nadziemnych, ma największy potencjał w generowaniu stresu mechanicznego w produkcji roślinnej. Tego typu bodziec wywołuje zmiany w morfologii i fizjologii roślin, które mogą być wykorzystane w kontrolowaniu ich wzrostu i pokroju. Kluczowe znaczenie dla efektów stresu mechanicznego mają rodzaj zastosowanego bodźca,

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

częstotliwość stymulacji oraz czas jej trwania (Jaffe i Forbes 1993; Braam 2005; Wada i Takeno 2010; Takeno 2012; Takeno 2016; Wang i in., 2024a). Materiałem użytym do generowania bezpośredniego stresu dotyku w produkcji może być papier (Pöntinen i in. 1992; He i in. 2009), tektura (Latimer 1990), materiał (Anten i in. 2010; Zhdanov i in. 2022), drewniana belka (Keller i Stellen 1995) czy folia polietylenowa (Paul-Victor i Rowe 2011). W Tabeli 3 przedstawiono szczegóły eksperymentów, w tym różnorodność zastosowanych bodźców, częstotliwości i czasu trwania stresu oraz ich efektów w przypadku różnych gatunków roślin.

Tabela. 3 Wpływ bezpośredniej stymulacji dotykowej na pokrój oraz kwitnienie roślin

Gatunek	Efekt	Parametry stymulacji dotykowej roślin	Cytowanie
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Zmniejszenie roślin; zwiększenie powierzchni liści brak uszkodzeń mechanicznych	40 razy na minutę, przez 21 dni	Biddington i Dearman (1985)
<i>Lactuca</i> L.			
<i>Apium graveolens</i> 'Lathom Blanching'			
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Zmniejszenie wysokości roślin; zmniejszenie powierzchni pierwszego liścia	1,5 min dziennie	Pöntinen i in. (1992)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Skrócenie międzywęzli; zgrubienie łodygi	1 raz dziennie przez 5 dni	Takano i in. (1995)
<i>Viola tricolor</i>	Zmniejszenie wydłużenia ogonków liściowych od 25 do 30%; brak uszkodzeń rośliny; brak wpływu na kwitnienie	od 10 do 20 dotknięć dziennie, 1 lub 2 razy dziennie (brak różnic między kombinacjami)	Garner i Langton (1996)
<i>Cucumis sativus</i> 'Turbo' (siewki)	Zahamowanie wzrostu (po 4 dniach stresu); brak wpływu na powierzchnię liści i liści właściwych; 20 dotknięć dziennie powoduje znaczne uszkodzenie roślin; zalecane jest stosowanie 10 dotknięć dziennie rano, przez 6 dni, aby zmniejszyć wzrost o	10 dotknięć na dzień przez 10 dni	Björkman (1999)

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

	25%		
<i>Nicotianum tabacum</i>	Pogrubienie oraz skrócenie międzywęźli	1 raz dziennie przez 26 dni	Anten i in. (2006)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Skrócenie pędów kwiatostanowych; opóźnienie tworzenia pędów kwiatostanowych; zwiększona średnica rośliny; skrócenie ogonków liściowych	2 razy dziennie siła dotyku ok. $4 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$	Braam i Davis (1990)
	50% krótsze łodygi kwiatostanu; 75% mniej elastyczne; 70% mniej wytrzymałe (kruche); mniejsza średnica rośliny	4 razy dziennie przez 4 h, 37 dni	Paul-Victor i Rowe (2011)
	Zmniejszenie długości łodygi kwiatostanu o 65%; zwiększenie sztywność pędów	3 razy dziennie przez 7 dni	Verhertbruggen i in. (2013)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Zmniejszenie liczby liści; zmniejszenie ich powierzchni	2 razy dziennie przez 18 dni	Johjima i in. (1992)
	Zmniejszenie wysokości odmiany 'Celebrity' o 26% a 'Jet Star' o 31,5%	2 razy dziennie po 40 dotknięć przez 5 tygodni	Schnelle i in. (1994)
	Zahamowanie wydłużania międzywęźli o ok. 33%; Lignifikacja ścian komórkowych o ok. 3%	1 raz dziennie przez 10 sekund	Saidi i in. (2009)
<i>Capsicum annum</i> 'California Wonder'	Zmniejszenie wysokości; rośliny stresowane wytwarzały większe owoce, ale w mniejszej liczbie	2 razy dziennie przez 1 h	Graham i Wheeler (2017)

Generowanie stresu mechanicznego, w postaci potrząsania roślin, bezpośredniego dotyku czy stosowania wibracji, stanowią obiecującą alternatywę dla chemicznych metod skarlania roślin w ogrodnictwie. Badania wykazują, że tego typu bodźce mogą wpływać na morfologię i wzrost roślin, prowadząc do podobnych efektów jak retardanty wzrostu, takich jak zahamowanie elongacji pędów, skrócenie międzywęźli czy pogrubienie łodyg. Zastosowanie mechanicznego stresu umożliwia

4. Potencjalne zastosowanie tigmomorfogenezy w produkcji roślinnej

bardziej ekologiczne i zrównoważone zarządzanie rozwojem roślin, jednak kluczowe znaczenie ma dobór odpowiednich parametrów takich jak intensywność, czas trwania i częstotliwość bodźca, które różnie wpływają na różne gatunki roślin.

CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

Głównym celem podjętych badań było zbadanie wpływu skarlania mechanicznego na architekturę, kwitnienie oraz parametry fizjologiczne i molekularne wybranych gatunków roślin ozdobnych, na przykładzie *Petunia ×atkinsiana*.

W ramach celu głównego realizowano kilka celów szczegółowych, których wyniki zostały opublikowane. Były to (w nawiasie podano oznaczenie publikacji):

- Określenie wpływu intensywności skarlania mechanicznego na stopień zahamowania dynamiki wzrostu badanych roślin, zawartości egzogennej IAA, GA₃, giberelin ogólnych oraz aktywności enzymatycznej peroksydazowej i oksydazy IAA u *Petunia ×atkinsiana* (publikacja A, B, C);
- Ocena wpływu skarlania mechanicznego na zaburzenia syntezy i/lub transportu endogennych auksyn (publikacja A);
- Analiza ekspresji wybranych genów TCH oraz genów związanych z homeostazą auksyn, w zależności od intensywności i długości trwania stresu skarlania mechanicznego oraz ich korelacji z odpowiedzią morfologiczną i fizjologiczną badanych petunii (publikacja B);
- Porównanie odpowiedzi fizjologicznej dwóch odmian petunii ogrodowej na skarlanie mechaniczne (publikacja C).

Hipotezy badawcze

Na podstawie postawionych celów oraz kwerendy literatury przedmiotu postawiono następujące hipotezy badawcze:

- 1) Stres mechaniczny może być stosowany jako substytut retardowania chemicznego;
- 2) Zahamowanie wzrostu na skutek skarlania mechanicznego może być spowodowane zmniejszoną syntezą endogennych auksyn, GA₃, zahamowania transportu IAA, zwiększoną aktywnością peroksydazową lub oksydazy IAA;
- 3) Stres mechaniczny może zmniejszać liczbę kwiatów i wpływać na zmniejszoną syntezę giberelin ogólnych skarlanych roślin;
- 4) W zależności od intensywności i długości trwania stresu mechanicznego uruchamiane są poszczególne grupy genów TCH oraz genów związanych z homeostazą auksyn, których ekspresja może być skorelowana z odpowiedzią morfologiczną i fizjologiczną badanych roślin.

MATERIAŁ I METODY

Szczegółowy opis materiałów i metod wykorzystanych do przygotowania niniejszej dysertacji został przedstawiony w publikacjach wchodzących w jej skład (publikacje A – C). W dalszej części przedstawiono skrótowy opis materiałów i metod oraz układ i plan realizacji badań.

5.1 Materiał roślinny

Badania prowadzono w latach 2019 - 2022. Materiał roślinny stanowiła petunia ogrodowa *Petunia ×atkinsiana*, w 2 odmianach kompaktowych o czerwonych kwiatach 'Dark Red' i 'Table White' o białych kwiatach, oraz 2 silnie rosnących 'Pegasus® Velvet Picotee' o głęboko purpurowych kwiatach z białymi brzegami i 'Pegasus® Burgundy Bicolor' o jasnofioletowych kwiatach z białymi wstawkami (zdjęcia 1-4). Rośliny do badań pochodziły z firmy Volmary Polska w Gawartowej Woli (centralna Polska) jako 4-tygodniowe ukorzenione sadzonki na początku sezonu wegetacyjnego (luty – marzec). Rośliny przesadzono do doniczek produkcyjnych P11 (średnica 11 cm) do substratu składającego się z wysokiego torfu (50%), włókien drzewnych Ecofibrex® (20%) i kory (30%), o pH 5,5 (Lasland, Polska) i umieszczono w szklarni Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie na stołach zalewowych z systemem odpływowo-napływowym (95 × 480 cm) przy gęstości 15 roślin na 1 m². Średnie temperatury nocne/dzienne wynosiły odpowiednio 18°C i 22°C, a względna wilgotność powietrza 75%, kontrolowana przez komputer klimatyczny HortiMax z oprogramowaniem Synopta – HortiMax.



Zdjęcie 1. *Petunia* ×*atkinsiana* 'Dark Red'.
Zdjęcie własne



Zdjęcie 2. *Petunia* ×*atkinsiana* 'Table White'. Zdjęcie własne



Zdjęcie 3. *Petunia* ×*atkinsiana* 'Pegasus® Velvet Picotee'. Zdjęcie własne



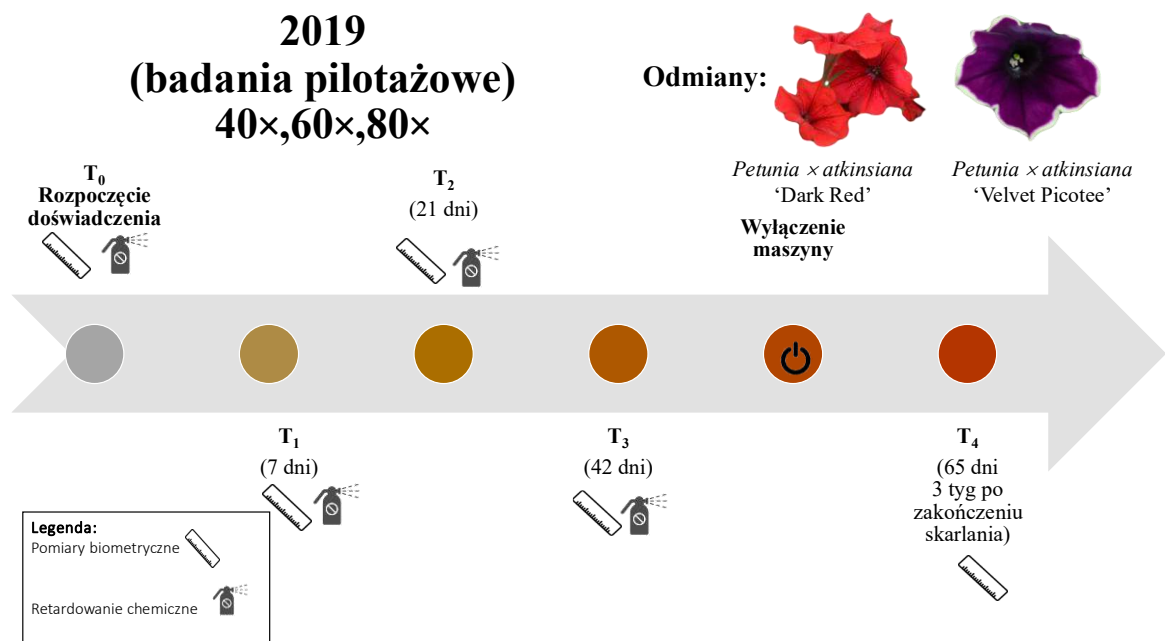
Zdjęcie 4. *Petunia* ×*atkinsiana* 'Pegasus® Burgundy Bicolor'. Zdjęcie własne

W trakcie badań rośliny były regularnie nawożone 0,2% nawozem płynnym Cristalon™ Gena (EC 1,2 mS·cm⁻¹) za pomocą dozatronu Dosatron D25RE2 (Royal Brinkman, Polska). PH i przewodnictwo elektryczne (EC) podłoża monitorowano dwa razy w tygodniu za pomocą pH-metru HI 99,121 (Hanna Instruments, Polska) i konduktometru Gro Line HI 98,331 (Hanna Instruments, Polska). Aby uniknąć niedoboru żelaza w wierzchołkach roślin, co dwa tygodnie stosowano 0,02% Rexolin X 60 zgodnie z zaleceniami producenta (Yara, Polska) jako aplikację dolistną.

W celu przedłużenia długości dnia do 16 godzin (6:00 rano – 22:00) w uprawie petunii, użyto wysokociśnieniowych lamp sodowych o mocy 600 W (około $110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Dodatkowe oświetlenie dodawano, gdy poziom globalnego promieniowania słonecznego spadał poniżej $400 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ (stałe przez 16 godzin w lutym oraz marcu i w razie potrzeby w kwietniu).

5.2 Układ i zakres doświadczeń

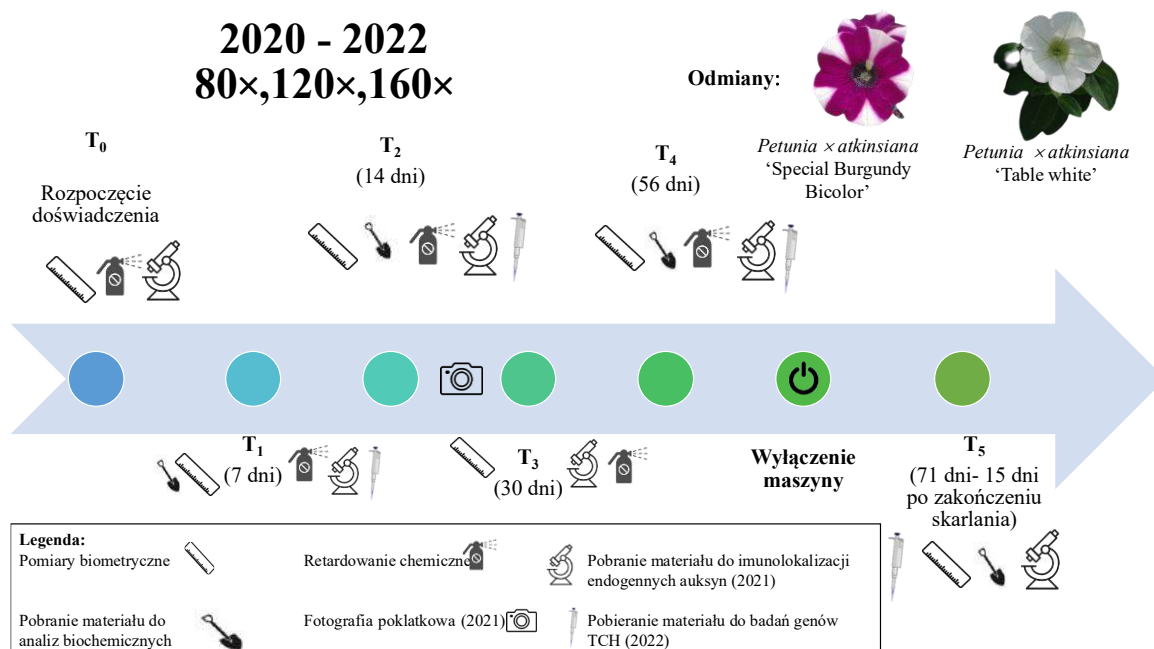
W pierwszym sezonie doświadczeń (rok 2019), w każdym traktowaniu (rośliny kontrolne oraz skarlane 40, 60 i 80×) znajdowało się po 10 roślin. Pomiary biometryczne oraz pobieranie materiału roślinnego do analiz odbywało się w 4 terminach: T_0 - początek eksperymentu, T_1 -7 dni po rozpoczęciu SM, T_2 -21 dni po rozpoczęciu eksperymentu, T_3 -42 dni po rozpoczęciu eksperymentu (koniec procesu SM), oraz T_5 -65 dni po rozpoczęciu eksperymentu (23 dni po wyłączeniu SM, aby sprawdzić zachowanie roślin)(schemat 1).



Schemat 1. Układ doświadczenia w badaniach pilotażowych, 2019 r. Źródło: wykonanie własne

Od drugiego sezonu doświadczeń, w każdym traktowaniu znajdowało się 90 roślin. Pomiary biometryczne oraz pobieranie materiału roślinnego do analiz odbywało się w 5 terminach: T_0 -początek eksperymentu, T_1 -7 dni po rozpoczęciu SM, T_2 -14 dni po rozpoczęciu eksperymentu, T_3 -30 dni po rozpoczęciu eksperymentu, T_4 -56 dni po rozpoczęciu eksperymentu (koniec procesu SM), oraz T_5 -71 dni po rozpoczęciu

eksperymentu (15 dni po wyłączeniu SM, aby sprawdzić zachowanie roślin)(schemat 2). Do pomiarów biometrycznych rośliny podzielono na trzy bloki po 15 roślin każdy. Te same rośliny były badane w każdym terminie. Między T₂ a T₃ przez 10 dni badano wzrost roślin kontrolnych i poddanych SM 160 razy dziennie, korzystając z metody fotografii poklatkowej (Materiały Uzupełniające – publikacja A).



Schemat 2. Układ doświadczenia w badaniach właściwych 2020-2022. Źródło: wykonanie własne

5.3 Skarłanie mechaniczne (SM)

Pilotażowe badania dotyczące skarłania mechanicznego przeprowadzono w roku 2019 na dwóch odmianach petunii ogrodowej opisanych szerzej w publikacji C. Aparat skarłający, będący wówczas pierwowzorem obecnej wersji maszyny, składał się z czterech sekcjach pasków agrowłókniny zamontowanych na ramie napędzanej silnikiem elektrycznym. System był zaprogramowany na częstotliwość 40, 60 lub 80 cykli dziennie. Dane szczegółowe dotyczące pracy aparatu skarłającego opisano w publikacji C. Stymulacji mechanicznej były poddawane wyłącznie wierzchołki wzrostu pędów, ale zarówno wierzchołki, jak i korzenie poddano analizie biochemicznej. Decyzja ta była podyktowana faktem, że korzenie mogą reagować na stres szybciej i silniej niż wierzchołki pędów (Potocka i Szymanowska-Pułka 2018). Po zakończeniu skarłania, rośliny obserwowano jeszcze przez ok. 15 dni w celu analizy dynamiki wzrostu po ustaniu stresu dotyku.

Od sezonu 2020 konstrukcja maszyny została zmodyfikowana — stała się bardziej kompaktowa i lżejsza w porównaniu do poprzedniej wersji. Ponadto zwiększono liczbę cykli do 80, 120 i 160× dziennie. Cały cykl skarłania trwał średnio 56 dni (publikacja A, B). Po ustaniu skarłania rośliny były dalej oceniane przez kolejne 15 dni (do 71. dnia eksperymentu). Rośliny kontrolne rosły w tym samym czasie bez stresu dotyku.

5.4 Retardowanie chemiczne

Rośliny retardowane chemicznie podzielono na trzy bloki po 5 roślin każdy (15 roślin w kombinacji). Zostały one ponumerowane i służyły wyłącznie do pomiarów biometrycznych. Wybrany został preparat B-nine 85 SG, marki Arysta LifeScience Netherlands B.V., którego substancją aktywną jest daminozyd (związek z grupy hydrazydów). Zabieg wykonywany był za pomocą opryskiwacza ręcznego Marolex Hobby cieczą roboczą o stężeniu 0,1% (100 g środka w 100 l wody). W 2019 r. (badania pilotażowe) zabieg był wykonywany 4-krotnie: 06.03, 20.03, 18.04 i 25.04. W kolejnych sezonach (2020-2022) zabieg wykonywano 5-krotnie: 23.02, 04.03, 18.03, 30.03 i 16.04. Preparat zastosowano zgodnie z zaleceniami producenta.

5.5 Pomiary biometryczne i analizy biochemiczne

5.5.1. Pomiary biometryczne

Przeprowadzono następujące pomiary biometryczne:

- a) długość łodygi mierzona od poziomego podłoża do wierzchołka rośliny (długości służyły do obliczania przyrostów między poszczególnymi terminami) (publikacja A, B, C)
- b) liczba otwartych kwiatów (publikacja B,C).

Pomiary biometryczne były wykonywane na 15 ponumerowanych roślinach, konsekwentnie podczas wszystkich powyższych terminów (schemat 1-2). Rośliny wybrane do pomiarów nie służyły do analiz biochemicznych.

5.5.2 Analizy biochemiczne

Do analiz biochemicznych zbierano 1,5 cm wierzchołki pędów (SAM) lub korzeni (RAM) z 9 roślin (podzielonych na trzy bloki po trzy rośliny) w każdej kombinacji i każdym terminie (łącznie 45 roślin na traktowanie). W przypadku analiz biochemicznych na korzeniach, ze względu na małą ilość materiału roślinnego, w terminie oraz 4 (56 dni po rozpoczęciu eksperymentu), nie wykonano części analiz. Próbkę do wszystkich analiz zbierano natychmiast po zakończeniu szczotkowania oraz zamrażano w ciekłym azocie (w -196°C).

Sucha masa została określana przez wysuszenie trzech próbek 1 g każda w temperaturze 105°C do momentu uzyskania stałej wagi.

5.5.2.1 Zawartość IAA (publikacja A,B,C)

Wolne endogenne IAA zostało wyekstrahowane za pomocą 80% metanolu i oznaczone spektrofotometrycznie za pomocą odczynnika Salkowskiego (Gang i in. 2019) przy 520 nm (AOE Instruments UV-1600, Tajwan), zgodnie z krzywą standardową IAA ($10\text{--}100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i wyrażone jako $\mu\text{g IAA}\cdot\text{g}^{-1}\text{ s. m.}$

5.5.2.2 Zawartość giberelin ogólnych (publikacja B)

Całkowitą zawartość GA oznaczono zgodnie z metodą Grahama i Thomasa (1961). Metoda ta jest skuteczna w oznaczaniu endogennych soli potasowych GA_3 , GA_1 i soli potasowej kwasu giberelinowego. Metoda ta nie oznacza auksyn i cytokinin. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy 430 nm za pomocą instrumentu UV1600 (AOE Instruments, Szanghaj). Próbą kontrolną była woda destylowana. Zawartość całkowitych GA oznaczono zgodnie z krzywą dla GA_3 i wyrażono w $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}$

5.5.2.3 Zawartość GA_3 (publikacja A)

Kwas giberelinowy (GA_3) został oznaczony zgodnie z procedurą opisaną przez Sharma i in. (1998) oraz zmodyfikowany dla tkanek petunii przy długości fali 254 nm zgodnie z krzywą kalibracyjną dla GA_3 . Dla każdej z kombinacji wykonane zostały trzy powtórzenia. Kontrolę zerową stanowił 5% HCl. Zawartość ogólnych giberelin została wyrażona w $\text{ng GA}_3\cdot\text{g}^{-1}\text{ s. m.}$

5.5.2.4 Aktywność peroksydazowa (POX) (EC 1.11.1.x); (publikacja A, C)

Aktywność peroksydazowa została określona zgodnie z opisem w publikacji C w następujący sposób: 500 mg tkanki zostało zhomogenizowanych w 3 mL buforu fosforanowego sodowego o stężeniu 0,1 M (pH 7,0) (Merck, Niemcy), a następnie odwirowanych przy 20 000 obr. min⁻¹ przez 15 minut w temperaturze 4 °C. Mieszanka do oznaczenia zawierała 3 mL pirogallolu 0,5 M (Warchem, Polska), 0,1 mL ekstraktu enzymatycznego i 0,5 mL 1% H₂O₂ (Warchem, Polska). Aktywność została oszacowana spektrofotometrycznie przy 430 nm (AOE Instruments UV-1600, Tajwan) i wyrażona w jednostkach (U) na g s. m.

5.5.2.5 Aktywność oksydazy IAA(IAAO) (EC 1.2.3.7); (publikacja B, C)

Aktywność oksydazy IAA określono zgodnie z Zhang (2011). Absorbancję mierzono przy 530 nm za pomocą spektrofotometru UV1600 (AOE Instruments, Szanghaj). Dla każdej kombinacji wykonano trzy powtórzenia. Wyniki wyrażono w µg·IAA na g⁻¹ s. m. na godzinę. Zakłada się, że 1 jednostka (1U) oksydazy IAA ulega degradacji w ciągu 1 godziny.

5.6 Immunohistochemia nośników auksyny (publikacja A)

Immunolokalizacja białek AUX1, LAX1 i PIN1 została przeprowadzona na podłużnych odcinkach pędów (SAM) oraz pąków bocznych 1 cm poniżej SAM, a także na wierzchołkowych częściach korzeni (RAM). Przeciwciała anty-*Arabidopsis*-PIN1, AUX1 i LAX1 (AGRISERA, Szwecja) także rozpoznane jako homologiczne białka u petunii, które prawdopodobnie są funkcjonalnymi ortologami na podstawie podobieństwa ekspresji i sygnału lokalizacyjnego do *Arabidopsis*. Przeciwciała i rozcieńczenia użyte w badaniu to 1:100 dla pierwszorzędowych przeciwciał oraz drugorzędowy anty-króliczy FITC (długość fali wzbudzenia 490 nm) (1:500, AGRISERA, Szwecja). Próbki obejrzano pod mikroskopem epifluorescencyjnym Zeiss AxioScope A. Obrazy zostały zarejestrowane za pomocą cyfrowej kamery Zeiss Axio Cam MRm z oprogramowaniem AxioVision (wersja 4.8.2).

5.7 Barwienie safraniną i fioletem krystalicznym (publikacja A)

Przygotowano podłużne przekroje próbek SAM i RAM o grubości 10 µm za pomocą mikrotomu obrotowego. Próbki zostały zabarwione w 0,1% wodnym roztworze

safraniny (safraniny O, Merck, Niemcy) przez 30 minut, a następnie przepłukane trzy razy po 10 minut każde w ciepłej wodzie o temperaturze 37 °C. Następnie preparaty zostały wysuszone w piecu i zabezpieczone w oleju immersyjnym (Merck, Niemcy) do mikroskopii fluorescencyjnej. Sekcje barwione safraniną były pobudzane przy 488 nm.

Dla obserwacji anatomicznych komórek kolenchymy i sklerenchymy, próbki były przygotowywane zgodnie z metodami przygotowania do mikroskopii elektronowej (Robinson i in. 1987). Półgrube (3 µm) przekroje były barwione w 0,1% wodnym roztworze fioletu krystalicznego (Earchem, Polska) i suszone w temperaturze 70 °C.

5.8 Ocena ekspresji wybranych genów TCH (publikacja B)

Pobieranie materiału do analizy ekspresji genów przeprowadzano w 2022 r. Materiał roślinny zebrano w 4 terminach: 7 i 14 dni po rozpoczęciu eksperymentu, 56 dni po rozpoczęciu eksperymentu (koniec procesu SM) i 71 dni po rozpoczęciu eksperymentu (15 dni po wyłączeniu SM, aby sprawdzić zachowanie roślin)(schemat 2, 5.2. Układ doświadczenia) (publikacja B).

Ekspresja wybranych genów TCH została określona za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Materiał roślinny został pobrany w 4 terminach: 7 dni po rozpoczęciu stresu dotykowego, 14 dni po rozpoczęciu eksperymentu, 56 dni po rozpoczęciu eksperymentu (zakończenie procesu stresu dotykowego) oraz 71 dni po rozpoczęciu eksperymentu (15 dni po zakończeniu stresu dotykowego). Pobierano merystemy wierzchołkowe pędów o długości 1,5 cm. Materiał pobierano z 9 roślin (podzielonych na trzy bloki po trzy rośliny w każdym zabiegu) do sterylnych probówek. Materiał natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Analiza została przeprowadzona w 2022 roku.

Całkowite RNA wyizolowano przy użyciu zestawu Direct-zol RNA MiniPrep Plus z odczynnikami TRI (Zymo Research, Irvine, CA, USA), a następnie poddano działaniu DNazy I (Thermo Fisher Scientific). Czystość RNA oceniano za pomocą NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). Czystość RNA sprawdzono metodą PCR i qPCR na kontroli RT. cDNA zsyntetyzowano przy użyciu zestawu NG dART RT (EURx). Ilościowe RT-PCR przeprowadzono w trzech powtórzeniach przy użyciu QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) z Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), ze starterami wymienionymi na rysunku uzupełniającym (Tabela S3, publikacja C).

Startery zostały zweryfikowane pod kątem specyficzności pojedynczego produktu i ich skuteczności w zakresie od 90 do 105%

Warunki cyklu PCR w czasie rzeczywistym były następujące: 3 min denaturacja w 95°C i 40 cykli amplifikacji (10 s w 95°C, 45 s w 55°C). Krzywe topnienia produktu zostały wygenerowane po PCR w celu zapewnienia czystości produktów amplifikacji.

Normalizację przeprowadzono dla ekspresji genu PhCYP. Do obliczenia względnej ekspresji genów zastosowano metodę Pfaffla, a test randomizacji z domyślnymi 10 000 losowymi realokacjami w celu przetestowania istotności statystycznej obliczonych stosunków ekspresji próbki do kontroli przeprowadzono przy użyciu oprogramowania REST 2009 (Qiagen) (Pfaffl i in. 2002). Różnica między średnimi ekspresjami została uznana za istotną przy $p < 0,05$. Względne wartości badanych genów w roślinach stresowanych odnoszono do wartości w roślinach kontrolnych (nie stresowanych).

5.9 Analizy statystyczne

Dane zostały zanalizowane za pomocą ogólnego programu modelu liniowego Statgraphics Centurion XIX 2019 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA) (Licencja do użytku domowego doktorantki). ANOVA 1 została użyta do pomiarów wzrostu pędów i analiz biochemicznych, a średnie zostały porównane za pomocą testu zakresu wielokrotnego LSD lub Tukey–Kramera na poziomie istotności $p = 0,05$. Do oceny liczby kwiatów posłużono się nieparametrycznym testem Manna-Whitneya dla porównań dwugrupowych. Natomiast średnie z traktowań oraz dni stresu porównywano przy pomocy testu Friedmana, a istotne różnice analizowano za pomocą testu post hoc Conovera.

Korelacje między zmiennymi oceniano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona (r). Analizy korelacji przeprowadzono za pomocą programu Statgraphics Centurion XIX 2019, przy ustalonym poziomie istotności $p < 0,05$. Współczynniki korelacji w zakresie od -1 do 1 interpretowano w następujący sposób: współczynnik bliski 1 wskazuje na silną dodatnią korelację, bliski -1 wskazuje na silną ujemną korelację, a bliski 0 oznacza brak korelacji. Wyniki korelacji zostały zawarte w dodatkowym materiale (tablica dodatkowa S1 i S2, publikacja C).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki zaprezentowano w nawiązaniu do hipotez badawczych wyszczególnionych powyżej.

1) Stres mechaniczny może być stosowany jako substytut retardowania chemicznego:

Ze względu na różny charakter wzrostu roślin pod kątem uprawianych odmian, do badań wybrano petunie z grupy silnie rosnących oraz o umiarkowanym wzroście.

Petunia 'Dark Red' – należąca do grupy odmian stołowych, o umiarkowanym wzroście (Publikacja C).

Po 7, 42 oraz 65 dniach (3 tygodnie po zakończeniu skarłania) od rozpoczęcia eksperymentu, rośliny kontrolne (nie skarłane) były najwyższe, a najniższe były rośliny poddane stresowi dotyku 80 razy dziennie (publikacja C). Po 42 dniach od rozpoczęcia stresu, rośliny dotykane 80 razy były niższe od roślin kontrolnych o 39,80% (publikacja C). 3 tygodnie po zaprzestaniu stresu dotyku, obserwowano przyrost roślin kontrolnych na poziomie, 4,74 cm, podczas gdy u roślin poddanych stresowi obserwowano przyrost odpowiednio o 8,12 cm, 8,62 cm i 11,44 cm przy 40, 60 i 80 cyklach.

Petunia 'Pegasus ® Velvet Picotee' oraz 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' należące do grupy odmian silnie rosnących (publikacje A, B i C)

W przypadku odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' we wszystkich dniach pomiarów rośliny poddane skarłaniu mechanicznemu były znacząco niższe niż kontrolne, z wyjątkiem 21. dnia stresu (publikacja C). W 42. dniu eksperymentu, u roślin skarłanych 40 razy dziennie obserwowano zahamowanie wzrostu o 13,00%, 60 razy o 21,00%, a 80 razy o 43,50% w stosunku do roślin kontrolnych. U odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' największe różnice w intensywności przyrostu roślin na długość zaobserwowano po 30 i 56 dniach od rozpoczęcia stresu dotyku (publikacja A,B). U tej odmiany najintensywniejszy wzrost pędów zaobserwowano u roślin kontrolnych (odpowiednio 5,63 i średnio 10,50 cm – dane uśrednione z publikacji A i B), a najmniej intensywny w roślinach stresowanych 160 razy dziennie (odpowiednio 3,82 i 7,91cm – dane uśrednione z publikacji A i B). U obydwu odmian zaobserwowano, że im wyższa była liczba cykli skarłania, tym większe zahamowanie

wzrostu obserwowano. U odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' po zaprzestaniu stresu dotyku, rośliny skarlane wciąż były znacząco niższe niż kontrolne (publikacja C). Z kolei w przypadku odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', obserwowano intensywny wzrost roślin skarlanych na długość, który bądź statystycznie przewyższał, bądź był równy sile wzrostu roślin kontrolnych (publikacja A,B).

Porównanie skarłania mechanicznego oraz retardowania chemicznego (dane niepublikowane)

Petunia 'Table White' należąca do grupy odmian stołowych, o umiarkowanym wzroście

Na podstawie danych zawartych w tabeli 4, w 7. dniu doświadczenia najniższymi roślinami były te stresowane mechanicznie 80× dziennie oraz kontrolne (odpowiednio: 2,97; 3,27 cm). Najwyższymi roślinami były te retardowane chemicznie (4,13 cm). Po 14 dniach od rozpoczęcia doświadczenia widoczne były wyraźne różnice między kombinacjami. Rośliny stresowane 80× dziennie były najniższymi roślinami spośród badanych (5,00 cm).

Tabela 4. Wysokość petunii 'Table White' w zależności od rodzaju skarłania, jego intensywności oraz długości trwania stresu. (cm)

Dni	Kontrola	Skarłanie mechaniczne			Retardowanie chemiczne	Średnia
		80×	120×	160×		
0	2,40 Fb	1,87 Fc	2,53 Fab	2,67 Fab	2,97 Fa	2,49 F
7	3,27 Ec	2,97 Ec	3,47 Ebc	3,93 Eab	4,13 Ea	3,55 E
14	5,80 Db	5,00 Dc	6,37 Dab	6,47 Da	6,13 Dab	5,95 D
30	11,77 Ca	8,30 Cc	10,00 Cb	10,00 Cb	9,73 Cb	9,96 C
56	22,00 Ba	12,67 Bb	13,80 Bb	13,53 Bb	13,27 Bb	15,05 B
71	26,93 Aa	19,67 Ab	19,93 Ab	19,67 Ab	17,93 Ac	20,83 A
średnia	12,03 a	8,41 c	9,35 b	9,38 b	9,03 bc	

Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy ANOVA 1, dla poszczególnych terminów, test post hoc LSD. Średnie z traktowań oraz dni stresu porównywano przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA 2 z testem post hoc Tukeya. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarłanie mechaniczne, skarłanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021 r.

W 56. dniu doświadczenia zaobserwowano wyraźne różnice między kontrolą, roślinami stresowanymi mechanicznie, a tymi po zastosowaniu retardantu

chemicznegon(Tab.4). Zarówno rośliny stresowane mechanicznie (80×, 120×, 160×) jak i retardowane chemicznie miały porównywalną wysokość (Zdj. 5).

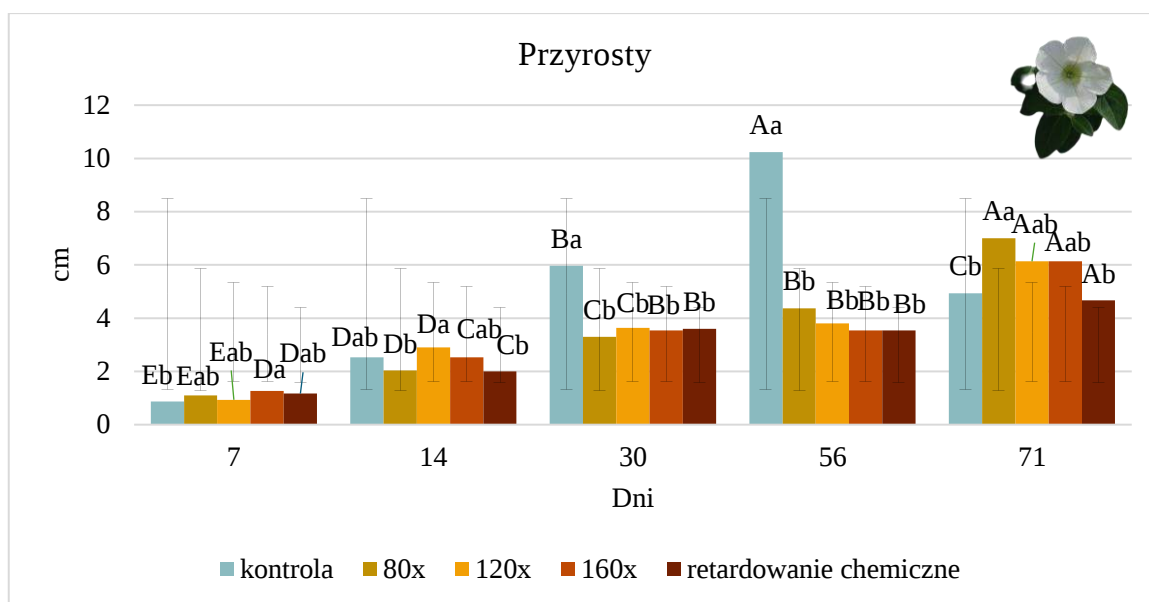


Zdjęcie 5. *Petunia ×atkinsiana* 'Table White' w 56. dniu doświadczenia. Zdjęcie własne

15 dni po zakończeniu doświadczenia (71 dzień) rośliny kontrolne były zdecydowanie najwyższymi roślinami spośród badanych (29,93 cm). Rośliny retardowane chemicznie były najniższe (17,93 cm).

Analizując średnie między kombinacjami widoczne było, że zarówno rośliny stresowane mechanicznie, jak i te retardowane chemicznie, charakteryzowały się statystycznie zbliżoną wysokością (Tab.4).

Analizując dynamikę wzrostu petunii 'Table White' widoczne jest, że między 14. a 30. dniem doświadczenia są wyraźniejsze różnice we wzroście między kombinacjami (Wyk. 1). W 30. dniu, rośliny stresowane mechanicznie, oraz te retardowane chemicznie, charakteryzowały się podobną dynamiką wzrostu, miały zdecydowanie mniejsze przyrosty niż rośliny kontrolne. W kolejnym terminie pomiarów (56 dzień) trend ten uległ jeszcze większemu uwypukleniu, ponieważ rośliny stresowane mechanicznie oraz retardowane, charakteryzowały się prawie trzykrotnie mniejszymi przyrostami niż rośliny kontrolne.



Wykres 1. Wpływ intensywności skarlania mechanicznego i chemicznego na przyrosty petunii 'Table White' w kolejnych dniach stresu (cm)

Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy ANOVA 1, dla poszczególnych terminów, test post hoc LSD. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarlanie mechaniczne, skarlanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021 r.

15 dni po zakończeniu stresu zaobserwowano, że rośliny retardowane chemicznie oraz kontrolne, charakteryzowały się podobną niską dynamiką wzrostu w odniesieniu do stresowanych mechanicznie (Wyk.1).

Traktowanie miało istotnie statyczny wpływ na średnią liczbę kwiatów u petunii 'Table White' (Tab. 5). W 30. dniu doświadczenia, rośliny stresowane mechanicznie 120 oraz 160× dziennie jak i te retardowane chemicznie, miały najwyższą liczbę kwiatów, w odniesieniu do kontroli (odpowiednio: 5,00; 5,53; 5,00 szt./roślinę).

W 56. dniu doświadczenia odnotowano podobną zależność w liczbie kwiatów między kombinacjami. Rośliny stresowane najintensywniej (120× oraz 160× dziennie) jak i te retardowane chemicznie, posiadały średnio najwyższą liczbę kwiatów, w odniesieniu do pozostałych kombinacji. Natomiast w 71. dniu doświadczenia, rośliny retardowane chemicznie posiadały największą liczbę kwiatów (49,27 szt./roślinę).

Analizując średnią liczbę kwiatów w poszczególnych kombinacjach, widoczne jest, że rośliny retardowane chemicznie posiadają statystycznie największą liczbę kwiatów. Jednak mimo, że rośliny skarlane mechanicznie posiadały mniejszą liczbę kwiatów, w odniesieniu do roślin retardowanych chemicznie, to ich liczba jest wyższa niż u roślin nie traktowanych (kontrolnych).

Tabela 5. Liczba kwiatów uzyskanych na roślinach petunii 'Table White' poddawanych stresowi mechanicznemu oraz chemicznemu, w poszczególnych dniach doświadczenia (szt./roślinę)

Dni	Kontrola	Skarlanie mechaniczne			Retardowanie chemiczne	Średnia
		80×	120×	160×		
30	0,40 Cc	2,67 Cb	5,00 Ca	5,53 Ca	5,00 Ca	3,72 C
56	12,93 Bb	16,60 Bb	21,80 Ba	23,73 Ba	22,87 Ba	19,59 B
71	30,20 Ac	37,07 Ab	38,33 Ab	32,20 Abc	49,27 Aa	37,41 A
średnia	14,51 c	18,78 b	21,71 b	20,49 b	25,71 a	

Dane analizowano przy pomocy testu Manna-Whitneya dla porównań dwugrupowych. Średnie z traktowań oraz dni stresu porównywano przy pomocy testu Friedmana, a istotne różnice analizowano za pomocą testu post hoc Conovera. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarlanie mechaniczne, skarlanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021 r.

Petunia 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' należąca do grupy odmian silnie rosnących

W przypadku petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', również zaobserwowano różnice w wysokości między traktowaniami (Tab. 6). W 7. dniu doświadczenia, najniższymi roślinami były te retardowane chemicznie (3,00 cm), natomiast najwyższymi skarlane 80x dziennie (3,60 cm). W 14. dniu, rośliny kontrolne oraz te stresowane 80× dziennie były najniższymi roślinami spośród badanych (odpowiednio: 5,79; 5,50 cm). Najwyższymi roślinami, w tym terminie, były stresowane 160x dziennie (6,69 cm).

Tabela 6. Wysokość petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w zależności od rodzaju skarłania, jego intensywności oraz długości trwania stresu. (cm)

Dni	Kontrola	Skarlanie mechaniczne			Retardowanie chemiczne	Średnia
		80×	120×	160×		
0	2,80 Eab	2,33 Fc	2,43 Fbc	2,90 Ea	2,67 Eabc	2,63 E
7	3,20 Eab	3,60 Ea	3,27 Eab	3,37 Eab	3,00 Eb	3,29 E
14	5,79 Db	5,50 Db	6,11 Dab	6,69 Da	6,04 Db	6,02 D
30	11,43 Ca	9,80 Cb	10,20 Cb	10,57 Cab	10,83 Cab	10,57 C
56	22,13 Ba	15,93 Bc	15,87 Bc	16,73 Bc	19,13 Bb	17,96 B
71	28,20 Aa	21,60 Ac	23,67 Abc	24,67 Ab	22,80 Abc	24,19 A
średnia	12,26 a	9,79 c	10,26 bc	10,82 b	10,74 b	średnia

Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy ANOVA 1, dla poszczególnych terminów, test post hoc LSD. Średnie z traktowań oraz dni stresu porównywano przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA 2 z testem post hoc Tukeya. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarlanie mechaniczne, skarlanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021r.

W 56. dniu doświadczenia, rośliny kontrolne nadal pozostawały najwyższymi (22,13 cm). Wszystkie rośliny stresowane mechanicznie (80, 120 oraz 160× dziennie) były najniższe w odniesieniu do pozostałych kombinacji (odpowiednio: 15,93; 15,87; 16,73 cm)(Zdj. 6).



Zdjęcie 6. Petunia 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w 56. dniu doświadczenia. Zdjęcie własne

15 dni po zakończeniu doświadczenia, zarówno rośliny stresowane mechanicznie jak i retardowane chemicznie były statystycznie niższe niż rośliny kontrolne (Tab.6).

Analizując średnią wysokość roślin w kombinacjach, widoczne jest, że rośliny stresowane mechanicznie oraz retardowane chemicznie charakteryzowały się podobną wysokością i były niższe niż rośliny kontrolne (Tab. 6)

W przypadku dynamiki wzrostu petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', wyraźne różnice między kombinacjami, widoczne były już po 7 dniach od rozpoczęcia doświadczenia (Wyk. 2). Największym przyrostem pędów charakteryzowały się rośliny stresowane mechanicznie 80× dziennie (1,27 cm). W tym terminie, najmniejszą dynamiką przyrostów charakteryzowały się rośliny retardowane chemicznie (0,33 cm).

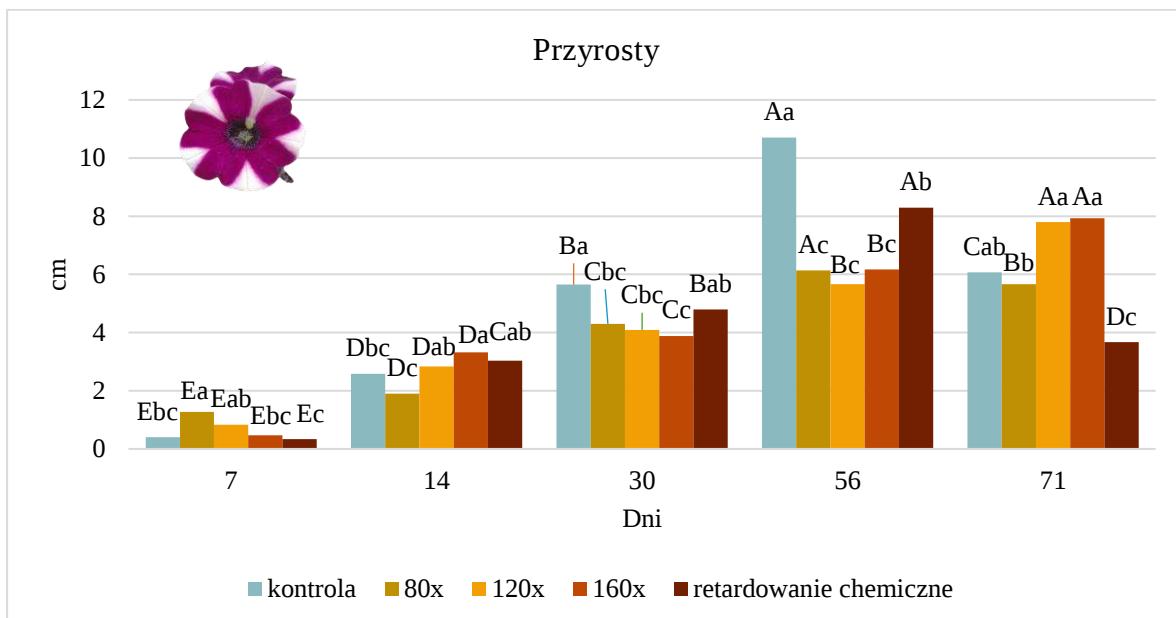
W 14. dniu doświadczenia, najniższymi roślinami były te stresowane mechanicznie z najmniejszą intensywnością (80× dziennie). Rośliny stresowane mechanicznie 120×, 160× dziennie oraz retardowane chemicznie charakteryzowały się podobną dynamiką przyrostów (odpowiednio: 2,84; 3,32; 3,04 cm).

W 30. dniu eksperymentu, rośliny kontrolne charakteryzowały się zdecydowanie największą dynamiką przyrostów pędów (5,65 cm). Rośliny stresowane mechanicznie

oraz retardowane chemicznie, charakteryzowały się zbliżoną dynamiką przyrostów pędów w stosunku do kontroli.

W 56. dniu eksperymentu, różnice w dynamice przyrostów były najlepiej widoczne. Rośliny stresowane mechanicznie (80×, 120×, 160×) miały najmniejsze przyrosty, w odniesieniu do pozostałych kombinacji. Rośliny skarlane mechanicznie miały prawie dwukrotnie mniejsze przyrosty pędów (odpowiednio: 6,13; 5,66; 6,17 cm) w stosunku do kontroli (10,70 cm).

W 71. dniu doświadczenia, rośliny stresowane 120× oraz 160× charakteryzowały się najdłuższymi przyrostami pędów (odpowiednio: 7,80; 7,93 cm). Rośliny retardowane chemicznie posiadały zdecydowanie najkrótsze przyrosty w odniesieniu do pozostałych traktowań (3,67 cm).



Wykres 2. Wpływ intensywności skarłania mechanicznego i chemicznego na przyrosty petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w kolejnych dniach stresu (cm)

Dane analizowano przy pomocy jednoczynnikowej analizy ANOVA 1, dla poszczególnych terminów, test post hoc LSD. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarłanie mechaniczne, skarłanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021r.

Liczba kwiatów u petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' zależała od traktowania (Tab. 7). Analizując średnią liczbę kwiatów, widoczne jest iż rośliny retardowane chemicznie posiadały mniejszą ich liczbę niż pozostałe rośliny w doświadczeniu (5,27 szt./roślinę). Rośliny stresowane 120 oraz 160× dziennie charakteryzowały się największą liczbą kwiatów wśród wszystkich badanych kombinacjach (odpowiednio: 17,33; 15,87 szt./roślinę).

Tabela 7. Liczba kwiatów uzyskanych na roślinach petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' poddawanych stresowi mechanicznemu oraz chemicznemu, w poszczególnych dniach doświadczenia (szt./roślinę)

Dni	Kontrola	Skarlanie mechaniczne			Retardowanie chemiczne	Średnia
		80 ×	120 ×	160 ×		
30	0,53 Cc	1,67 Cb	3,13 Ca	2,73 Cab	0,00 Cd	1,61 C
56	8,73 Bc	12,67 Bb	19,60 Ba	16,27 Bab	1,93 Bd	11,84 B
71	24,07 Aa	29,13 Aa	29,27 Aa	28,60 Aa	13,87 Ab	24,99 A
średnia	11,11 b	14,49 ab	17,33 a	15,87 a	5,27 c	średnia

Dane analizowano przy pomocy testu Manna-Whitneya dla porównań dwugrupowych. Średnie z traktowań oraz dni stresu porównywano przy pomocy testu Friedmana, a istotne różnice analizowano za pomocą testu post hoc Conovera. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$), przy czym „a” oznacza najwyższą wartość. Wielkie litery oznaczają wpływ długości trwania stresu (dni); małe litery rodzaj oraz intensywność traktowania (kontrola, skarlanie mechaniczne, skarlanie chemiczne). Dane przedstawiono jako średnie z 15 roślin. Pomiary wykonano w 2021 r.

Podsumowując, skarlanie mechaniczne znacząco spowalniało wzrost traktowanych roślin, wraz ze wzrostem intensywności stresu dotyku, co zostało udokumentowane w zamieszczonych publikacjach. Dynamika zahamowania wzrostu w trakcie skarłania oraz przyspieszenia wzrostu po zakończeniu stresu, różniła się w zależności od odmiany.

Skarlanie mechaniczne może być używane w komercyjnym ogrodnictwie do kontrolowania wzrostu pędów roślin ozdobnych w sposób przyjazny dla środowiska.

2) Zahamowanie wzrostu na skutek skarłania mechanicznego może być spowodowane zmniejszoną syntezą endogennych auksyn, GA_3 , zahamowania transportu IAA, zwiększoną aktywnością peroksydazową lub oksydazy IAA (publikacje A,B,C).

Petunia 'Dark Red' – należąca do grupy odmian stołowych, o umiarkowanym wzroście (Publikacja C)

W publikacji C przedstawiono wyniki dotyczące zawartości endogennego IAA oraz aktywności POD jedynie w stożkach wzrostu.

Zawartości endogennego IAA (kwasu indoliloctowego) w stożkach wzrostu pędów badanej odmiany zależały od długości stresu, a w mniejszym stopniu od intensywności stresu skarłania. Najniższa zawartość IAA była obserwowana po 7 dniach stresu, a najwyższa po 71 dniach, trzy tygodnie po zaprzestaniu dotyku.

We wszystkich kombinacjach aktywność peroksydazowa rosła wraz z czasem trwania skarlania mechanicznego, jednak tempo wzrostu wydawało się zależeć również od liczby cykli (publikacja C).

Petunie 'Pegasus ® Velvet Picotee' oraz 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' należące do grupy silnie rosnących (publikacja A,B, C)

Zawartość oraz lokalizacja endogennego IAA

U odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' zawartość endogennego IAA różniła się w zależności od liczby cykli skarlania we wszystkich dniach obserwacji (publikacja C). Zawartość IAA była znacząco wyższa w 7. dniu u wszystkich roślin poddanych stresowi dotyku w odniesieniu do kontroli.

W przypadku odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' określono zawartość endogennego IAA zarówno w stożkach wzrostu pędów, jak i korzeni. Tutaj zawartość IAA różniła się zarówno w wierzchołkach pędów, jak i korzeniach, niezależnie od czasu trwania i intensywności stresu (publikacja A, B).

Rośliny poddane stresowi w stożkach wzrostu pędów, miały znacząco niższą zawartość IAA w porównaniu do roślin kontrolnych po 14, 30 i 56 dniach od rozpoczęcia skarlania (publikacja A,B – pewne indywidualne różnice mogą być uzależnione od warunków pogodowych panujących w sezonach, w których prowadzono obserwacje).

W stożkach wzrostu korzeni zawartość IAA różniła się w roślinach niezależnie od długości trwania oraz intensywności stresu (publikacja A).

W celu uzupełnienia danych uzyskanych za pomocą analizy spektrofotometrycznej, u odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', przeprowadzono immunolokalizację w wierzchołkach wzrostu pędów (SAM) i korzeni (RAM) (publikacja A). Oceniano obecność białek LAX1, AUX1 i PIN1 wspomagających w sposób aktywny polarny transport auksyn.

Obecność LAX1, AUX1 i PIN1 wykryto w komórkach merystematycznych pąków wierzchołkowych pędów oraz w pasmach prowaskularnych pędu głównego zarówno w roślinach kontrolnych, jak i w roślinach poddanych stresowi mechanicznemu (publikacja A).

Sygnał immunolokalizacji nie został wykryty w pąkach bocznych. Obserwowano bardzo dobrze widoczny sygnał w głównym pędzie powyżej i poniżej

pąków bocznych we wszystkich badanych roślinach. W wierzchołkach wzrostu korzeni detekcja auksyn i ich intensywność była podobna, niezależnie od intensywności stresu (dane niepublikowane). Wyraźny sygnał przeciwiał auksyn pochodził z części epidermalnej i tkanek przewodzących korzenia. Podsumowując, nie stwierdzono różnic w transporcie auksyn między roślinami kontrolnymi, a roślinami stymulowanymi skarlaniem mechanicznym tak w stożkach wzrostu pędów, jak i korzeni.

Zawartość GA₃

Zawartość endogennego GA₃ badano jedynie u odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor'. W korzeniach badanych roślin zawartość GA₃ była zbyt niska, aby ją zmierzyć (publikacja A). W merystemach wierzchołkowych pędów zawartość GA₃ różniła się w zależności od intensywności oraz trwania stresu mechanicznego (publikacja A).

Aktywność oksydazy IAA

W przypadku odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' aktywność oksydazy IAA, w stożkach wzrostu pędów, wzrastała w kolejnych dniach obserwacji niezależnie od intensywności skarlania (publikacja C). Średnio najwyższą aktywność IAAO obserwowano w roślinach skarłanych 80× dziennie (publikacja C).

W przypadku odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w 14. dniu eksperymentu zaobserwowano istotny wzrost aktywności IAAO w roślinach poddanych stresowi dotyku w porównaniu do roślin kontrolnych (publikacja B). W 56. dniu eksperymentu rośliny skarłane 80× dziennie miały najniższą aktywność IAAO spośród wszystkich kombinacji. 15 dni po zakończeniu eksperymentu (71. dzień) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w aktywności IAAO pomiędzy poszczególnymi traktowaniami.

Aktywność peroksydazowa (POX)

U odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' w stożkach wzrostu pędów, obserwowano najniższą aktywność POX u wszystkich stresowanych roślin średnio 7 dni po rozpoczęciu doświadczenia (publikacja C). Najwyższą aktywność peroksydazową w roślinach kontrolnych odnotowano w 7. i 65. dniu obserwacji.

W przypadku petunii 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w stożkach wzrostu pędów, w 7. dniu stresu aktywność POD była najwyższa u roślin stresowanych 120 oraz 160 razy dziennie (publikacja A). W 14. dniu stresu najwyższą aktywnością POX charakteryzowały się rośliny stresowane 160 razy dziennie. W 30. dniu stresu, aktywność peroksydazowa była najniższa u roślin skarłanych 120 i 160 × dziennie. 15 dni po zakończeniu stresu, u roślin stresowanych aktywność peroksydazowa była zdecydowanie najwyższa w roślinach kontrolnych.

U odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' w 7. i 14. dniu, w merystemach wierzchołkowych korzeni, wysoką aktywność peroksydazową obserwowano u roślin stresowanych 80 i 160 razy (7 dzień) oraz u wszystkich roślin stresowanych w 14. dniu (publikacja A).

Podsumowując, w stożkach wzrostu pędów, w roślinach stresowanych 120 i 160 razy dziennie, najwyższą aktywność peroksydazową zaobserwowano w 7. dniu, podczas gdy w stożkach wzrostu korzeni, we wszystkich badanych roślinach, w 14 dni po rozpoczęciu stresu mechanicznego.

Obserwacje histologiczne (pędów i korzeni)

Obserwacje histologiczne pędów i korzeni odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' przedstawiono w 7 dniu stresu dotyku, ze względu na najwyższą aktywność peroksydazową w merystemach wierzchołkowych pędów (publikacja A). Obserwacje prowadzono na roślinach kontrolnych oraz poddawanych stresowi mechanicznemu 160 razy dziennie. W 7. dniu aktywność peroksydazowa była najwyższa w pędach roślin poddanych stresowi 160 razy dziennie. Na przekrojach podłużnych pędów roślin kontrolnych nie stwierdzono obecności elementów trachealnych w naczyniach ksylemu (publikacja A); w przeciwieństwie do roślin poddanych stresowi 160 razy dziennie, gdzie elementy trachealne były wyraźnie widoczne w wiązkach. Obserwowano wyraźne komórki sklerenchymy w roślinach stresowanych, podczas gdy w roślinach kontrolnych ich obecność była nieznaczna (publikacja A). W budowie anatomicznej korzeni nie obserwowano różnic niezależnie od traktowania roślin (dane niepublikowane).

W konkluzji przeprowadzonych badań potwierdzono, że długotrwała stymulacja mechaniczna zatrzymuje dynamikę wzrostu oraz syntezę IAA i GA₃ w petunii. Stymulacja mechaniczna nie zatrzymuje jednak transportu auksyn w kierunku bazalnym. W badaniach udowodniono, że jednym z czynników wpływających na

wzrost petunii może być aktywność peroksydazowa, która odpowiada za lignifikację i suberynizację ścian komórkowych w łodygach.

3) *Stres mechaniczny może zmniejszać liczbę kwiatów i wpływać na zmniejszoną syntezę giberelin ogólnych skarlanych roślin*

Petunia 'Dark Red' – należąca do grupy odmian stołowych, o umiarkowanym wzroście (Publikacja C)

Liczba kwiatów była liczona po 42 oraz 65 dniach doświadczenia. W obu terminach pomiarów największą liczbą otwartych kwiatów charakteryzowały się rośliny skarlane 80 razy dziennie, natomiast najmniejszą liczbą rośliny kontrolne (publikacja C).

Petunie 'Pegasus ® Velvet Picotee' oraz 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' należące do grupy silnie rosnących (Publikacja B, C)

Liczba kwiatów

U obu odmian liczba kwiatów była liczona w 42. oraz 65. dniu doświadczenia. W przypadku odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee', w obu terminach pomiarów największą liczbą kwiatów charakteryzowały się rośliny kontrolne (publikacja C).

U odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', we wszystkich traktowaniach obserwowano pełne kwitnienie w 30. dniu eksperymentu. W 56. i 71. dniu eksperymentu zaobserwowano większą liczbę kwiatów u roślin stresowanych niż u roślin kontrolnych.

Całkowita zawartość giberelin

Całkowitą zawartość giberelin badano jedynie u odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' (publikacja B). W 14. dniu eksperymentu rośliny poddane stresowi wykazywały statystycznie wyższą zawartość giberelin ogólnych w porównaniu do roślin kontrolnych. W 56. dniu stresu rośliny kontrolne miały statystycznie najwyższą zawartość giberelin ogólnych, natomiast najniższą zawartość giberelin odnotowano u roślin stresowanych 160 razy dziennie. W 71. dniu (15 dni po zakończeniu stresu) rośliny poddane stresowi miały wyższą lub porównywalną całkowitą zawartość giberelin w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

W dynamice kwitnienia wszystkich badanych grup roślin zaobserwowano wpływ skarlania mechanicznego na liczbę kwiatów. Skarlanie mechaniczne

spowodowało zwiększenie liczby kwiatów u odmiany 'Dark Red' i 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor', natomiast zmniejszenie ich liczby zaobserwowano u odmiany 'Pegasus® Velvet Picotee', co może być indywidualną cechą danej odmiany (publikacja B,C).

4) *W zależności od intensywności i długości trwania stresu mechanicznego uruchamiane są poszczególne grupy genów TCH oraz genów związanych z homeostazą auksyn, których ekspresja może być skorelowana z odpowiedzią morfologiczną i fizjologiczną badanych roślin (publikacja B).*

Analizowano ekspresję wybranych genów TCH związanych ze stresem dotyku, w tym przypadku, skarlaniem mechanicznym roślin. Są one odpowiedzialne między innymi za:

CaM72, CaM53 i CaM81- geny kodujące syntezę kalmodulin.

GH 3.1- *Gretchen Hagen 3*, gen kodujący enzym syntetazy amidowej, który jest odpowiedzialny za sprzęganie IAA z aminokwasami (Asparagina, Alanina, Fenyloalanina), inaktywując w ten sposób wolne IAA

Obserwowano silną dynamikę w ekspresji wszystkich badanych genów w zależności od intensywności oraz długości trwania stresu dotyku. Szczegółowe dane zostały zawarte w publikacji B.

Korelacje parametrów biochemicznych i ekspresji genów w roślinach stresowanych 160 razy dziennie (dane uśrednione ze wszystkich terminów)

Zaobserwowano bardzo silne korelacje zarówno dodatnie, jak i ujemne pomiędzy parametrami biometrycznymi, a zmianami na poziomie fizjologicznym i molekularnym w roślinach stresowanych 160× dziennie. Szczegółowe dane zostały zawarte w publikacji B.

W roślinach stresowanych 160 razy dziennie zaobserwowano wysoką negatywną korelację między średnią ekspresją genu GH3.1 a zawartością IAA ($r = -0,803$; $p < 0,01$) (publikacja B, Suppl. Tab. S2). Dodatkowo, zaobserwowano bardzo wysoką dodatnią korelację między ekspresją genu GH3.1 a aktywnością oksydazy IAA ($r =$

0,861; $p < 0,01$), a także negatywną korelację między ekspresją GH3.1 a przyrostami pędów ($r = -0,969$; $p < 0,01$).

W roślinach stresowanych 160 razy dziennie zaobserwowano bardzo wysoką dodatnią korelację między genami GH3.1 a CaM81 oraz CaM53 ($r = 0,959$; $0,985$; $p < 0,001$, odpowiednio) (publikacja B, Suppl. Tab. S2). Rozważając korelację ekspresji CaM81, CaM53 i CaM72 z dynamiką wzrostu (całkowita wysokość rośliny i przyrosty pędów), stwierdzono, że w roślinach stresowanych 160 razy dziennie, ekspresja CaM53 i CaM81 nie wpływała na zahamowanie wzrostu ($r = 0,851$; $0,756$; $p < 0,01$, odpowiednio). Jednakże, zaobserwowano silną negatywną korelację między CaM81 a CaM53 a przyrostami pędów (odpowiednio $r = -0,873$; $-0,911$; $p < 0,01$).

DYSKUSJA

1. Stres mechaniczny może być stosowany jako substytut retardowania chemicznego

Czynniki środowiskowe takie silny wiatr, deszcz, przeszkody mechaniczne, mogą wywołać u roślin specyficzne reakcje (Braam 2005; Chen i in. 2005; Chehab i in. 2006; Karban i Baldwin 2007; Chehab i in. 2008). U niektórych gatunków (*Dionaea muscipula*, *Venus flytrap*, *Mimosa pudica*, *Samanea saman*) reakcja na bodźce mechaniczne jest bardzo szybka ze względu na obecność wyspecjalizowanych komórek czuciowych (włoski czuciowe) (Braam 2005). Odpowiedź roślin bez wyspecjalizowanych receptorów jest wolniejsza, jednak bardziej kompleksowa obejmująca zmiany na poziomie molekularnym, fizjologicznym, anatomicznym oraz w widocznej gołym okiem architekturze i pokroju roślin.

W badaniach pilotażowych przedstawionych w niniejszej dysertacji, największą redukcję wzrostu wybranych odmian petunii ('Dark Red', 'Pegasus ® Velvet Picotee') zaobserwowano u roślin skarłanych 80 razy dziennie w stosunku do kontroli, w 42. dniu stresu dotyku (publikacja C). W ostatnim dniu stresu, odmiana 'Dark Red' była o 39,80%, a 'Pegasus ® Velvet Picotee' o 43,50% niższa w stosunku do roślin kontrolnych. Trzy tygodnie po zaprzestaniu skarłania obie badane odmiany były niższe od roślin kontrolnych.

Po wykonaniu badań pilotażowych zaobserwowano, że odmiany należące do grupy silnie rosnących, intensywniej reagują na stres dotyku podczas zmieniającej się liczby cykli (publikacja C). Odmiana 'Dark Red' o kompaktowym charakterze wzrostu reagowała znacznie słabiej niż silnie rosnące odmiany 'Pegasus ® Velvet Picotee' i 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor'. Podobne wyniki zaobserwowano u innych gatunków. Odmiany ogórka z naturalnie krótkimi międzywęzłami wykazywały mniejszą redukcję wzrostu niż odmiany z dłuższymi międzywęzłami, w stosunku do roślin kontrolnych (Latimer i in. 1991). Podobną reakcję zaobserwowano u pomidorów (Johjima i in. 1992).

2. Zahamowanie wzrostu na skutek skarlania mechanicznego może być spowodowane zmniejszoną syntezą endogennych auksyn, GA₃, zahamowania transportu IAA, zwiększoną aktywnością peroksydazową lub oksydazy IAA

Zmiany w długości pędu w odpowiedzi na bodziec dotykowy przypisuje się głównie zaburzeniom w syntezie hormonów roślinnych, takich jak auksyny, gibereliny, cytokininy, oraz wzmożonej aktywności enzymatycznej między innymi peroksydaz i oksydaz (Takahashi i Jaffe 1984; Chehab 2009).

Synteza oraz transport auksyny jest szczególnie wrażliwy na bodźce mechaniczne, przy czym wzmożony stres mechaniczny często hamuje przepływ auksyny do obszarów wzrostu, zmniejszając wydłużenie międzywęźli, a tym samym wysokość rośliny (Sparke i Wünsche 2020; Kouhen i in. 2023). W wyniku stresu mechanicznego zaobserwowano spadek poziomu auksyn w stożkach wzrostu pędów przestępu dwupiennego (*Bryonia dioica*) oraz wzrost ich poziomu u fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) (Erner i Jaffe 1982). Wzrost ten tłumaczono spowolnionym transportem polarnym IAA z merystemów pędów w kierunku korzeni. W doświadczeniu Mitchell'a (1996) obserwowano zahamowanie transportu polarnego auksyn w łodygach grochu w wyniku stresu dotyku pędów. W obecnym doświadczeniu ujętym w dysertacji, u odmiany 'Dark Red' poziom IAA wzrastał w czasie trwania skarlania mechanicznego (publikacja C). Najwyższe poziomy auksyny obserwowano u roślin stresowanych 40 i 60 razy dziennie, a najniższe w grupie kontrolnej oraz u roślin skarlanych 80 × dziennie. Z kolei u odmiany 'Pegasus® Velvet Picotee' rośliny skarlane 40 i 60 × dziennie miały niższą zawartość IAA niż rośliny kontrolne oraz stresowane 80 razy dziennie.

W przypadku odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' wyniki niniejszego doświadczenia wyraźnie wykazały, że skarlanie mechaniczne wpływa na syntezę auksyn w stożkach wzrostu pędów badanych roślin w dłuższym okresie. W tym przypadku nawet 30 dni po rozpoczęciu stresu. W 56. dniu stresu zawartość IAA u roślin stresowanych nadal była niższa niż u roślin kontrolnych (publikacja A).

W doświadczeniu Sarmast i in. (2014) na sansewierii gwinejskiej (*S. trifasciata*), wykazano, że czas trwania stresu oraz intensywność bodźca mechanicznego mają kluczowe znaczenie dla kondycji rośliny nawet 6 miesięcy po zakończeniu stresu. Zarówno po 48h jak i 6 miesiącach po zakończeniu stresu widoczne są wyraźne różnice w biochemii oraz anatomii roślin między kombinacjami. W przypadku badań

składających się na niniejszą dysertację, również zaobserwowano wyraźny wpływ intensywności stresu na równowagę hormonalną roślin po jego zakończeniu. Dane przedstawione w publikacjach A i B, składających się na niniejszą dysertację, pokazują, że 15 dni po zakończeniu stresu mechanicznego, dochodzi do zahamowania zawartości IAA u roślin stresowanych, w stosunku do kontroli. Natomiast w doświadczeniu opisanym w publikacji z 2020 r., trzy tygodnie po zakończeniu stresu zaobserwowano statystycznie wyższą zawartość IAA u 'Pegasus ® Velvet Picotee' stresowanych najintensywniej w stosunku do roślin dotykanych 40, 60 × oraz kontrolnych (publikacja C). Rozbieżność w otrzymanych wynikach jest spowodowana różnymi testowanymi częstotliwościami stresu, terminem pomiarów oraz odmianami o różnej sile wzrostu.

Brak jest danych literaturowych dotyczących różnic w zawartości IAA między SAM a merystemem korzeniowym (RAM) (publikacja A). W bieżącym badaniu zawartość IAA była znacznie niższa w RAM niż w SAM we wszystkich badanych roślinach.

Jednym z celów badań niniejszej dysertacji było bezpośrednie udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy stres mechaniczny hamuje syntezę lub transport auksyn w petunii, wpływając na architekturę roślin. W tym celu przeprowadzono serię badań immunolokalizacyjnych. Najbardziej prawdopodobną drogą transportu auksyny z SAM do RAM (merystem korzeniowy) jest rozwijający się floem, charakteryzujący się wysoką zawartością auksyny. Obecnie wiadomo, że transport auksyn jest również wspomagany przez dedykowane białka (Reinhardt i in. 2003; Leyser 2006; Sieburth i Deyholos 2006; Vanneste i in. 2009; Wang i Estelle 2014; Lavy i Estelle 2016). W roślinach z silną dominacją wierzchołkową, wierzchołek pędu hamuje aktywność pąków bocznych, natomiast jego usunięcie inicjuje ich powstawanie. Działaniu temu towarzyszy polaryzacja nośników PIN, co umożliwia eksport auksyn z pąków bocznych do korzenia (Balla 2016). Badania przeprowadzone przez Balla (2016) na grochu, wyraźnie pokazują, że eksport auksyn z pąków bocznych jest możliwy tylko wtedy, gdy pierwotne źródło auksyn zostanie usunięte lub osłabione. W badaniach umieszczonych w niniejszej dysertacji, obserwowano obecność białek LAX1, AUX1 i PIN1 w komórkach merystematycznych pąków SAM oraz tkance przewodzącej pędu głównego, podczas gdy sygnał immunolokalizacji nie został wykryty w pąkach bocznych. Może to być wskazówką do dyskusji, czy stres mechaniczny był wystarczająco silny, aby zmniejszyć syntezę auksyn, ale zbyt słaby, by przerwać ich transport bazypetalny, lub czy inne czynniki fizjologiczne mogą być odpowiedzialne za transport auksyn i

zapobieganie inicjacji pąków bocznych. Według Tanaka i in. (2006), auksyny mogą regulować biosyntezę cytokinin odpowiedzialnych za rozwój pąków bocznych. Wykazano, że u grochu zwyczajnego synteza cytokinin może być regulowana przez auksyny, które działają poprzez represję ekspresji genów kodujących enzym biosyntetyczny cytokinin (transferazę izopentenylową adenozylo-5'-monofosforanu) w pędzie (Tanaka i in. 2006). U ciecierzycy pospolitej, po dekapitacji, zaobserwowano intensywny transport tego hormonu z korzeni do pąków oraz jego akumulację w wierzchołkowych częściach pędu (Mader i in. 2003).

Wiadomo również, że stres mechaniczny aktywuje biosyntezę cytokinin (Chehab i in. 2008). Może to wyjaśniać większą liczbę pędów bocznych w traktowanych roślinach obu odmian petunii podczas cyklu skarlania oraz ich zmniejszenie po zaprzestaniu tego zabiegu. Według danych literaturowych, czynnikiem odpowiedzialnym za aktywność pąków bocznych po ustaniu dominacji wierzchołkowej, jest poziom endogennych cukrów (Mason i in. 2014). Niewystarczający poziom cukrów rozpuszczalnych może być kluczowym czynnikiem decydującym o utrzymaniu dominacji wierzchołkowej. Hipotezy te zaprzeczają wynikom obecnych doświadczeń wskazujących na silne rozgałęzienia boczne pędów badanych odmian petunii. Nie badano zawartości cytokinin w SAM petunii, ale według Qiu i in. (2019), wysoka zawartość cytokinin w pąkach wierzchołkowych pędów może spowodować aktywność pąków bocznych.

Konieczne jest dalsze badanie wpływu stresu mechanicznego na endogenne zachowanie IAA w traktowanych roślinach, a także zależności między innymi hormonami, a ich transportem, aby w pełni wyjaśnić wpływ stresu mechanicznego na procesy fizjologiczne w roślinach poddanych temu działaniu. Zmiany te są często powiązane z modyfikacjami syntezy i dystrybucji auksyny, ponieważ hormon ten odgrywa kluczową rolę w regulacji wzrostu roślin i ich reakcji na bodźce środowiskowe. Stres dotyku może zmieniać szlaki auksynowe, prowadząc do redystrybucji hormonu, co w konsekwencji modyfikuje wzorce wzrostu, zwłaszcza w odniesieniu do wysokości i liczby pędów (Erner i Jaffe 1982; Mitchell 1996; Stepanova i Alonso 2016). Wiele badań wskazuje jednak, że wrażliwość rośliny na bodziec zależy od gatunku, wieku tkanki lub rodzaju czynnika mechanicznego (Biro i Jaffe, 1984; Moulia i Coutand 2015; Sparke i in. 2020; Sparke i in. 2021).

IAA i GAs są silnymi regulatorami wzrostu organów nadziemnych, a endogenne poziomy tych hormonów, ilościowo regulują wzrost pędów jako akceleratorzy, tzn. im

wyższy poziom endogenny danego hormonu, tym silniejszy wzrost pędów (Mori i in. 2005). Badania fizjologiczne ujawniły, że gibereliny odgrywają ważną rolę w wydłużaniu międzywęźli (Sun 2008; Prusinkiewicz i in. 2009; Tian i Jiao 2015; Rinne i in. 2016; Binenbaum i in. 2018; Serova i in. 2019). Nadal brakuje zrozumienia ścieżek transdukcji sygnałów, które prowadzą do aktywności GAs, a tym samym do wydłużania łodyg i liści w odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe.

Według Tanimoto (2007), auksyny i gibereliny są najsilniejszymi czynnikami przyspieszającymi wzrost pędów (Tanimoto i in. 2007). Sugerowano, że transport auksyn z wierzchołka pędu kontroluje wzrost korzeni, ułatwiając, dzięki pośrednictwu giberelin, destabilizację białek DELLA (Ikeda i in. 2001; Richards i in. 2001; Fu i in. 2002; Fu i Harberd 2003; Matsuoka 2003; Alvey i Harberd 2005). W obecnych badaniach stwierdzono, że 30 dzień stresu był kluczowym terminem do obserwacji wyraźnego zahamowania wzrostu u roślin poddanych SM oraz zawartości IAA i GA₃ w roślinach, które były stresowane 120 i 160 razy dziennie (publikacja A,B). Wciąż pozostaje pytanie o aktywny transport auksyn z głównego pąka pędu do korzeni. Z literatury wynika, że dekapitacja wywołuje spektakularny efekt, w którym transport auksyn z głównego pędu jest szybko hamowany, a ich transport z pędów bocznych jest aktywowany. Jedno z pytań w obecnej pracy brzmiało, czy SM może zatrzymać syntezę lub transport auksyn na wczesnym etapie stresu. W przeprowadzonym eksperymencie wyjaśniono, że w warunkach SM synteza auksyn i giberelin jest hamowana podczas długotrwałego stresu, a bazypetalny oraz aktywny transport auksyn nie jest hamowany (publikacja A). Transport auksyn może być kontrolowany przez różne typy białek i peptydów w ksylemie (Singroha i in. 2021). Szczególnie godne uwagi są białka arabinogalaktanowe (AGPs), które prawdopodobnie działają jako molekuly sygnałne podczas skarlania (Showalter 2001; Ellis i in. 2010). Biorą one udział w regulacji rozwoju roślin i wpływają na właściwości ścian komórkowych (Bossy i in. 2009; MacMillan i in. 2010; Nguema-Ona i in. 2012; Seifert 2018; Liu i in. 2020; Seifert i in. 2021). To może sugerować, że AGPs odgrywają również ważną rolę w modyfikacjach ścian komórkowych roślin poddanych SM. W obecnej pracy nie badano aktywności AGPs w SAM ani RAM petunii. W literaturze brakuje danych na temat tego, czy SM może zwiększać produkcję AGPs i wpływać na modyfikacje ścian komórkowych w roślinach.

Postuluje się, że aktywność oksydazy IAA może pomagać w regulacji zawartości IAA (Mohamed-Yasseen i Splittstoesser 1990; Li i in. 2009). IAAO jest

zwykle zaangażowana w katabolizm auksyny i wykazuje negatywną korelację z poziomami IAA, regulując tym samym stężenie tego hormonu (Li i in. 2009; Liu i in. 2018). Według wielu autorów (Jaffe i Forbes 1993; Saidi i in. 2009; Onoda i Anten 2011; Zhang i in. 2014; Markovic i in. 2016) redukcja wzrostu podczas stresu mechanicznego jest wynikiem utleniania IAA oraz wzrostu aktywności IAA oksydazy i innych enzymów (Cipollini 1998; Saidi i in. 2009).

U odmiany 'Pegasus® Velvet Picotee' (publikacja C) aktywność oksydazy IAA była wyższa w roślinach skarłanych niż w grupie roślin kontrolnych, czego efektu tego nie zaobserwowano u petunii 'Dark Red'.

W przypadku petunii 'Pegasus® Burgundy Bicolor' stymulacja mechaniczna wywołała obserwowalne zmiany zarówno w zawartości IAA, jak i aktywności IAAO, przy czym odnotowano istotną negatywną korelację między tymi dwoma parametrami (publikacja B). Zależność ta jest zgodna z wcześniejszymi badaniami, które pokazują, że stymulacja mechaniczna zwiększa aktywność IAAO, prowadząc do obniżenia poziomu auksyn i zahamowania wzrostu (Jaffe i Forbes 1993; Meng i in. 2019).

Stres mechaniczny, może być skutecznym aktywatorem peroksydaz w roślinach (Braam 2005; Saidi i in. 2009; Sarmast i in. 2014; Cook i Ross 2016). Według Normanly (1997), wzrost aktywności peroksydazowej występuje u roślin poddanych stresowi mechanicznemu. Cook i Ross (2016) twierdzą, że indukcja POX zależy od intensywności stymulacji. U pomidora zwyczajnego aktywność POX w pocieranych międzywęźlach była wyższa już po 24 godzinach stresu w porównaniu do kontroli (Saidi i in. 2009). W badaniach znajdujących się w publikacjach A i C, u obu odmian ('Pegasus® Velvet Picotee' oraz 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor') najwyższą aktywność POX zaobserwowano w 7 dniu, jednak intensywność stymulacji ogólnie nie miała wpływu na zwiększenie lub zmniejszenie aktywności peroksydazowej, co jest sprzeczne z obserwacjami Cook i Ross (2016). W badaniach przeprowadzonych u 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' aktywność peroksydazowa była zmienna w SAM, podczas gdy w RAM w 7. oraz 14. dniu skarłania mechanicznego zaobserwowano wysoką aktywność peroksydazową w roślinach stresowanych 80 i 160 razy (7 dzień) oraz we wszystkich roślinach w 14. dniu (publikacja A).

W 14. dniu w pędach roślin skarłanych 160 razy dziennie aktywność peroksydazowa była najwyższa (publikacja A). Interesującym faktem jest, że w SAM najwyższą aktywność peroksydazową zaobserwowano w 7. dniu w roślinach kontrolnych oraz skarłanych 120 i 160 razy dziennie, ale na przekrojach pędów roślin

kontrolnych nie były widoczne elementy trachealne wiązek naczyniowych, w przeciwieństwie do roślin skarłanych 160 razy dziennie, gdzie elementy trachealne były wyraźnie widoczne w wiązkach przewodzących. Oczywiste jest, że rośliny tworzą naturalną obronę przed uszkodzeniami mechanicznymi poprzez produkcję lignin i suberyn w łądych (Gładala-Kostarz 2019). W roślinach pomidora aktywność peroksydazowa znacząco wzrosła w pocieranym międzywęźlu po zastosowaniu stresu mechanicznego (Saidi i in. 2009). Wyniki obecnego badania są zgodne z wcześniejszymi badaniami na temat roli peroksydaz w odpowiedzi na skarlanie mechaniczne (Brunner i in. 2015). Zaskakujące jest, że najbardziej intensywna aktywność POX obserwowana była w korzeniach, a dostępnych jest niewiele danych na temat sygnałów chemicznych pojawiających się w nich w wyniku stresu mechanicznego. Dotychczas badania porównujące reakcję korzeni i pędów na SM koncentrowały się głównie na zmianach morfologicznych, anatomicznych i cytologicznych oraz czynnikach molekularnych aktywujących zmiany cytologiczne, jednak brakuje danych dotyczących fizjologicznej reakcji korzeni (Potocka i Szymanowska-Pułka 2018; Beier i in. 2020; Okamoto i in. 2021; Kouhen i in. 2023). W obecnym doświadczeniu nie badano, jak stres spowodowany skarlaniem mechanicznym wpływa na ROS oraz produkcję aktywności enzymatycznej przeciwutleniaczy w pędach i korzeniach stymulowanych roślin. Jedną z hipotez wyjaśniających tak dużą aktywność POX w korzeniach stymulowanych roślin na wczesnym etapie trwania stresu mechanicznego może być jej produkcja w celu ochrony rośliny przed stresem oksydacyjnym spowodowanym skarlaniem mechanicznym. Hipoteza ta może być prawdziwa w tym przypadku, zwłaszcza że nie zaobserwowano żadnych różnic w budowie anatomicznej korzeni w roślinach kontrolnych ani poddanych stresowi mechanicznemu. Z drugiej strony wyniki badań Jacobsen i in. (2021) dotyczące *Arabidopsis* pokazały, że geny sygnalizacyjne związane z etylenem i auksynami, a także aktywacja transkrypcyjna ROS, były częścią wczesnej reakcji korzeni *Arabidopsis* na stres mechaniczny, co wyraźnie pasuje do obecnej hipotezy (Jacobsen i in. 2021).

3. Stres mechaniczny może zmniejszać liczbę kwiatów i wpływać na zmniejszoną syntezę giberelin ogólnych skarłanych roślin;

Zgodnie z badaniami Morel i in. (2012) oraz Vernieri i in. (2006), rośliny dotykane produkowały więcej kwiatów, chociaż ich średnice były mniejsze. Przeciwnie, w eksperymencie przeprowadzonym w publikacji C, rośliny poddane 40, 60 i 80 cyklom skarłania dziennie prowadziły do zmniejszenia liczby kwiatów, spadając średnio z 36 do 21 szt./roślinę, w przypadku *Petunia ×atkinsiana* 'Pegasus® Velvet Picotee'. Jednak w przypadku odmian 'Dark Red' oraz 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' reakcja była odmienna: skarłanie zwiększyło średnio liczbę kwiatów z 11 w grupie kontrolnej do 22 szt./roślinę w grupie stresowanej 80 razy u petunii 'Dark Red' i z 11 na 15 szt./roślinę, u odmiany 'Pegasus® Special Burgundy Bicolor' stresowanej 160 razy w trakcie skarłania. Natomiast po 15 dniach od ustania stresu dotyku liczba kwiatów zwiększyła się z 24 na 29 szt./roślinę (publikacja B i C). Onguso i in. (2006) oraz Salehi i Salehi (2009) również donieśli o braku wpływu stresu mechanicznego na liczbę kwiatów. W obecnym eksperymencie rośliny poddane stresowi zakwitły wcześniej i wyprodukowały więcej kwiatów niż grupa kontrolna. Zjawisko to może również dowodzić indywidualnych cech rodzajów, a także odmian. Reakcję badanych petunii można częściowo przypisać roli giberelin w promowaniu kwitnienia. We wczesnych stadiach stresu poziomy giberelin wzrosły, co sprzyjało formowaniu kwiatów (publikacja B). Jednak przedłużony stres dotykowy, jak zaobserwowano w dniu 56., prowadził do znacznego zmniejszenia zawartości GAs w silnie zestresowanych roślinach. Na podstawie tych ustaleń można stwierdzić, że spadek zawartości giberelin w dotykanych roślinach jest formą obrony przed stresem dotyku.

4. W zależności od intensywności i długości trwania stresu mechanicznego uruchamiane są poszczególne grupy genów TCH oraz genów związanych z homeostazą auksyn, których ekspresja może być skorelowana z odpowiedzią morfologiczną i fizjologiczną badanych roślin.

Obok aktywności IAAO, gen GH3.1, który koduje enzym (syntetazę amidową) zaangażowany w koniugację auksyn, również uległ regulacji w odpowiedzi na stres mechaniczny. Ekspresja GH3 jest związana ze zwiększoną tolerancją na stres, szczególnie u roślin narażonych na suszę, niską temperaturę czy zasoleniem (Park i in.

2007). Rodzina enzymów GH3 jest znana z pośredniczenia reakcji roślin na różne czynniki stresowe poprzez regulację homeostazy auksyn i koniugację wolnego IAA z aminokwasami, co prowadzi do unieczynnienia auksyn (Park i in. 2007; Suza i Staswick 2008). W bieżącym eksperymencie zaobserwowano, że stres dotyku wpływał na wzrost ekspresji GH3.1, przy czym w traktowaniach ekspresja GH3.1 wykazywała negatywną korelację z zawartością IAA i przyrostem pędów (publikacja B). Obserwowano pozytywną korelację ekspresji GH3.1 z aktywnością IAAO.

Zwiększona produkcja enzymu GH3, który koniuguje IAA, była zdecydowanie związana z hamowaniem wzrostu i ściśle powiązana ze zwiększoną odpornością na stres skarłania. Ponieważ od 56. dnia eksperymentu rośliny uzyskały homeostazę w dynamice wzrostu, zmniejszona aktywność IAAO związana z niższą ekspresją GH3.1 może być wyjaśnieniem tego zjawiska (publikacja B). Sugeruje to, że połączenie zwiększonej oksydacji auksyn i koniugacji działa jako mechanizm sprzężenia zwrotnego, który moduluje poziomy auksyn w warunkach długotrwałego stresu, przyczyniając się do hamowania wzrostu.

Ciekawym zjawiskiem jest to, że 15 dni po ustaniu stresu rośliny poddane dotykowi (szczególnie te, które były stresowane 160 razy dziennie) wykazały najwyższy wzrost, co wskazuje na opóźnioną kompensacyjną reakcję, prawdopodobnie spowodowaną nadprodukcją auksyn po zaprzestaniu stresu (publikacja B). Ten efekt może być wynikiem strategii rośliny, która polega na nadprodukcji IAA w odpowiedzi na długotrwały stres, co umożliwia szybki wzrost po jego ustaniu. Stres abiotyczny, w tym stres mechaniczny, powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS) (Smirnoff 1993). Nadprodukcja ROS w tkankach roślinnych może uszkodzić błony komórkowe, makromolekuły, wpłynąć na metabolizm komórkowy oraz odegrać kluczową rolę w uszkodzeniach komórkowych (Ajithkumar i Panneerselvam 2014). Główne reaktywne formy tlenu generowane w komórkach roślinnych w warunkach stresowych to nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodniki ponadtlenkowe ($O_2^{\cdot-}$). Ich szkodliwe działanie jest zazwyczaj neutralizowane przez enzymy, takie jak katalazy i peroksydazy produkowane przez rośliny (Grellet Bournonville i Díaz-Ricci 2011). W publikacjach A i C, zaobserwowano zwiększone poziomy peroksydazy podczas stresu mechanicznego, odgrywającej rolę w hamowaniu syntezy IAA, a także w lignifikacji ścian komórkowych. Chociaż inne eliminatory wolnych rodników w petunii nie były badane w warunkach stresu mechanicznego, można przypuszczać, na podstawie danych literaturowych i wyników uzyskanych w obecnym eksperymencie, że rośliny aktywnie

bronili się przed stresem oksydacyjnym (Szabados i in. 2010; Kavi i in. 2014).

Czy ekspresja genów związanych z kalmoduliną moduluje aktywację GH3.1?

Stres inicjuje ścieżkę transdukcji sygnału, co prowadzi do zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu. Stężenie jonów Ca^{2+} stymuluje aktywność kalmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) (Al.-Quaraan i in. 2015). W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że po narażeniu rośliny na zimno lub hipoksję dochodzi do aktywacji $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Wzrost ekspresji genów związanych z kalmoduliną (CaM53, CaM72 i CaM81) podczas stresu mechanicznego podkreśla kluczową rolę sygnalizacji wapniowej w adaptacji roślin do bodźców środowiskowych (publikacja B). Kalmoduliny działają jako czujniki wapnia i mediatory, odgrywając zasadniczą rolę w regulacji procesów komórkowych w warunkach stresu (Al.-Quaraan i in. 2015). W obecnym eksperymencie wszystkie trzy geny CaM wykazały zwiększoną ekspresję do 56. dnia skarłania, co wskazuje, że rośliny doświadczały znaczącego stresu, niezależnie od intensywności stymulacji mechanicznej (publikacja B). Jest to zgodne z badaniami, które pokazują aktywację szlaków kalmoduliny w odpowiedzi na różne stresy abiotyczne (Cholewa i in. 1997).

W bieżącym eksperymencie zaobserwowano silną korelację między ekspresją genu GH3.1 a niektórymi genami CaM, w zależności od intensywności stymulacji mechanicznej (publikacja B). Zmiana w korelacjach kalmodulina-GH3.1 w zależności od intensywności stresu sugeruje, że różne geny związane z kalmoduliną mogą być aktywowane w odpowiedzi na różne poziomy stresu mechanicznego. Może to sugerować hierarchiczny mechanizm odpowiedzi, w którym CaM72 jest wystarczająca do regulacji homeostazy auksyn w umiarkowanym stresie, podczas gdy w warunkach silniejszego stresu konieczne jest zaangażowanie innych kalmodulin, takich jak CaM53 i CaM81 w celu utrzymania równowagi auksyn i zapobieżenia zahamowaniu wzrostu. Wzrost ekspresji kalmodulin w warunkach silnego stresu może być konieczny do zarządzania podwyższonymi poziomami jonów wapnia wywołanymi silniejszym bodźcem mechanicznym.

Interesujące jest to, że nawet 15 dni po ustaniu stresu mechanicznego nadal obserwowano wzrost ekspresji CaM53 i CaM72, co sugeruje, że rośliny nadal radziły sobie z pozostałymi efektami stresu (publikacja B). To przedłużone zwiększenie

ekspresji może wskazywać na rozpoczęcie procesu adaptacji po stresie, w którym sygnalizacja wapniowa pozostaje aktywna, aby pomóc roślinie w regeneracji i utrzymaniu homeostazy. Zgodnie z badaniami Brenya i in. (2022), w przypadku braku stresu mechanicznego większość transkryptów wraca do podstawowego poziomu ekspresji, chociaż niektóre mogą utrzymywać się, wykazując zmienioną ekspresję genów przez kilka dni po stymulacji. Konieczne są dalsze badania, aby zrozumieć, jak długo geny związane z kalmoduliną pozostają w stanie wzmożonej ekspresji po stresie i czy przyczynia się to do długoterminowej odporności roślin.

Siła stresu dotyku wyraźnie wpłynęła na ekspresję zarówno genów związanych z kalmoduliną, jak i GH3.1 (publikacja B). Rośliny poddane 160 dotknięciom dziennie wykazały wyższy poziom ekspresji GH3.1 oraz genów kalmodulin CaM53 i CaM81 w porównaniu do tych dotkniętych 80 razy dziennie. Sugeruje to, że intensywność bodźca mechanicznego odgrywa kluczową rolę w określaniu stopnia reakcji na stres, a bardziej intensywny stres prowadzi do większej aktywacji zarówno szlaków sygnalizacji wapniowej, jak i regulacji auksyn.

WNIOSKI

W oparciu o przeprowadzone badania przedstawione w niniejszej pracy można sformułować następujące wnioski, które stanowią odpowiedź na postawione hipotezy badawcze:

1. Stres mechaniczny wpływa na dynamikę wzrostu i może być stosowany jako substytut retardowania chemicznego.

– Stres mechaniczny znacząco spowalnia wzrost traktowanych roślin, wraz z intensywnością stresu dotyku. Dynamika zahamowania wzrostu w trakcie skarłania oraz przyspieszenia wzrostu po zakończeniu stresu, różni się w zależności od odmiany.

2. Zahamowanie wzrostu na skutek skarłania mechanicznego może być spowodowane zmniejszoną syntezą endogennych auksyn, GA_3 , zahamowaniem transportu IAA, zwiększoną aktywnością peroksydazową lub oksydazy IAA.

– Długotrwała stymulacja mechaniczna zahamowuje dynamikę wzrostu oraz syntezę IAA i GA_3 w petunii. Stymulacja mechaniczna nie hamuje jednak transportu auksyn w kierunku bazypetalnym.

– Jednym z czynników wpływających na wzrost petunii może być aktywność peroksydazowa, która odpowiada za lignifikację i suberynizację ścian komórkowych w łodygach.

3. Stres mechaniczny może zmniejszać liczbę kwiatów i wpływać na zmniejszoną syntezę giberelin ogólnych skarłanych roślin.

– Mechaniczne stymulowanie zwiększa liczbę kwiatów u stresowanych roślin, co niekoniecznie jest związane z ogólną zawartością giberelin, natomiast może zależeć od odmiany.

4. W zależności od intensywności i długości trwania stresu mechanicznego uruchamiane są poszczególne grupy genów TCH oraz genów związanych z homeostazą auksyn, których ekspresja może być skorelowana z odpowiedzią morfologiczną i fizjologiczną badanych roślin.

- Ekspresja badanych genów TCH nie jest istotnie skorelowana z odpowiedzią fizjologiczną petunii na stres dotyku. Zależy ona między innymi od intensywności stresu.

- Aktywacja genów TCH takich jak kalmoduliny, może modulować szlaki związane z syntezą auksyn, co prawdopodobnie wpływa równocześnie na ekspresję GH3.1 ściśle powiązanego z dezaktywacją IAA.

5. Skarłanie mechaniczne może być wykorzystywane w komercyjnym ogrodnictwie do kontrolowania wzrostu pędów roślin ozdobnych w sposób przyjazny dla środowiska.

BIBLIOGRAFIA

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., ... & Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757), 91-94.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., ... & Harberd, N. P. (2008a). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 19(14), 1188–1193.
- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., & Genschik, P. (2008b). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, 18(9), 656-660.
- Ajithkumar, I. P., & Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 587-595.
- Al.-Quaraan, S., Cholewa, E., & Zhu, X. (2015). Calcium signaling in response to stress in plants. *Plant Physiology Reports*, 27(1), 3–18.
- Alvey, L., & Harberd, N. P. (2005). DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs?. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 153-160.
- Andersson, N. E. (2011). The influence of water stress and air velocity on growth of *Impatiens walleriana* and *Petunia* × *hybrid*. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 146-151.
- Anten, N. P. R., Casado-Garcia, R., & Nagashima, H. (2005). Effects of mechanical stress and plant density on mechanical characteristics, growth, and lifetime reproduction of tobacco plants. *The American Naturalist*, 166(5), 650–660.
- Anten, N. P., Alcalá-Herrera, R., Schieving, F., & Onoda, Y. (2010). Wind and mechanical stimuli differentially affect leaf traits in *Plantago major*. *New Phytologist*, 188(2), 554-564.
- Anten, N. P., Casado-Garcia, R., Pierik, R., & Pons, T. L. (2006). Ethylene sensitivity affects changes in growth patterns, but not stem properties, in response to mechanical stress in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 128(2), 274-282.
- Antosiewicz, D. M., Polisensky, D. H., & Braam, J. (1995). Cellular localization of the Ca²⁺ binding TCH3 protein of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 8(5), 623–636.
- Autio, J., Esala, A., & Heinonen-Tanski, H. (1994). Mechanical and chemical stress effects on plants. *Journal of Plant Physiology*, 144(1), 79–83.
- Badel, E., Ewers, F. W., Cochard, H., & Telewski, F. W. (2015). Hydraulic adaptation to mechanical stress in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Tree Physiology*, 35(6), 637–648.
- Balla, J. (2016). Auxin transport and lateral organ initiation. *The Plant Journal*, 88(5), 706–718.
- Bañón, S., Fernández, J. A., Ochoa, J., & Sánchez-Blanco, M. J. (2005). Paclobutrazol as an aid to reduce some effects of salt stress in oleander seedlings. *European Journal of Horticultural Science*, 70(1), 43-49.
- Beier, M. P., Tsugawa, S., Demura, T., & Fujiwara, T. (2020). Root shape adaptation to mechanical stress derived from unidirectional vibrations in *Populus nigra*. *Plant Biotechnology*, 37(4), 423-428.
- Bergstrand, K. J. I. (2017). Methods for growth regulation of greenhouse produced ornamental pot-and bedding plants—a current review. *Folia Horticulturae*, 29(1), 63-74.
- Beyl, C. A., & Mitchell, C. A. (1977). Characterization of Mechanical Stress Dwarfing in *Chrysanthemum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102(5), 591-594.
- Beyl, C. A., & Mitchell, C. A. (1983). Alteration of Growth, Exudation Rate, and Endogenous Hormone Profiles in Mechanically Dwarfed Sunflower. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108(2), 257-262.
- Biddington, N. L. (1986). The effects of mechanically induced stress on the growth of plants. *Plant Growth Regulation*, 4(1), 103–110.

- Biddington, N. L., & Dearman, A. S. (1985). The effects of mechanically induced stress on the growth of cauliflower, lettuce and celery seedlings. *Annals of Botany*, 55(6), 109–119.
- Binenbaum, J., Weinstain, R., & Shani, E. (2018). Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science*, 23(5), 410–421.
- Biro, R. L., & Jaffe, M. J. (1984). Thigmomorphogenesis: Changes in the morphology and chemical composition induced by mechanical perturbation in soybean seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 62(11), 2013–2016.
- Biro, R. L., Hunt Jr, E. R., Erner, Y., & Jaffe, M. J. (1980). Thigmomorphogenesis: changes in cell division and elongation in the internodes of mechanically-perturbed or ethrel-treated bean plants. *Annals of Botany*, 45(6), 655–664.
- Björkman, T. (1999). Dose and timing of brushing to control excessive hypocotyl elongation in cucumber transplants.
- Blanvillain, R., Wei, S., Wei, P., Kim, J. H., & Ow, D. W. (2011). Stress tolerance to stress escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family. *The EMBO journal*, 30(18), 3812–3822.
- Börnke, F., & Rocks, T. (2018). Thigmomorphogenesis in plants: Mechanisms and potential applications. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9718-1>
- Bosch, E., Cuquel, F. L., & Tognon, G. B. (2016). Physalis size reduction for potted ornamental plant use. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(5), 555–564.
- Bossy, A., Blaschek, W., & Classen, B. (2009). Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*. *Planta Medica*, 75(14), 1526–1533.
- Braam, J. (1992). Gene expression triggered by environmental signals. *Nature*, 356(6368), 710–711.
- Braam, J. (2000). The Arabidopsis TCH genes: Regulated in expression by mechanotransduction?. In Plant tolerance to abiotic stresses in agriculture: role of genetic engineering (pp. 29–37). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Braam, J. (2005). In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*, 165(2), 373–389.
- Braam, J., & Davis, R. W. (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60(3), 357–364.
- Braam, J., Sistrunk, M. L., Polisensky, D. H., Xu, W., Purugganan, M. M., Antosiewicz, D. M., ... & Johnson, K. A. (1996). Life in a changing world: TCH gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 909–916.
- Brenya, E., Pervin, M., Chen, Z. H., Tissue, D. T., Johnson, S., Braam, J., & Cazzonelli, C. I. (2022). Mechanical stress acclimation in plants: Linking hormones and somatic memory to thigmomorphogenesis. *Plant, Cell & Environment*, 45(4), 989–1010.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., & Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6, 547.
- Chehab, E. W., Kaspi, R., Savchenko, T., Rowe, H., Negre-Zakharov, F., Kliebenstein, D., & Dehesh, K. (2008). Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PloS one*, 3(4), e1904.
- Chehab, E. W., Raman, G., Walley, J. W., Perea, J. V., Banu, G., Theg, S., & Dehesh, K. (2006). Rice hydroperoxide lyases with unique expression patterns generate distinct aldehyde signatures in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 141(1), 121–134.
- Chehab, E. W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S., & Braam, J. (2009). *Arabidopsis* touch-induced morphogenesis. *The Plant Cell*, 21(10), 3229–3246.
- Chehab, E. W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S., & Braam, J. (2012). Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Current Biology*, 22(8), 701–706.

- Chen, H., Wilkerson, C. G., Kuchar, J. A., Phinney, B. S., & Howe, G. A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 19237-19242.
- Cholewa, E., Bown, A. W., Cholewinski, A. J., Shelp, B. J., & Snedden, W. A. (1997). Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^{+} . *Canadian Journal of Botany*, 75(3), 375-382.
- Cipollini, D. F. (1998). Induced responses to simulated herbivory in wild radish: Effects on several herbivores and plant fitness. *Oecologia*, 113(2), 252-258.
- Cook, S. D., & Ross, J. J. (2016). The auxins, IAA and PAA, are synthesized by similar steps catalyzed by different enzymes. *Plant signaling & behavior*, 11(11), e1250993.
- Coutand, C. (2010). Mechanosensing and thigmomorphogenesis, a physiological and biomechanical point of view. *Plant Science*, 179(3), 168-182.
- Coutand, C., & Moulia, B. (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany*, 51(352), 1825-1842.
- Coutand, C., Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Decourteix, M., Julien, J.-L., & Moulia, B. (2000). Thigmomorphogenesis: An example of mechanical acclimation in plants. *Plant Science*, 160(4), 475-483.
- Darwin, C., & Darwin, F. (1880). *The Power of Movement in Plants*. London: John Murray.
- de Jaegher, G., Boyer, N., Bon, M. C., & Gaspar, T. (1987). Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: early events in ethylene biosynthesis pathway. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 182(1), 49-56.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J., & Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?. *Plant Physiology*, 153(2), 403-419.
- Ennos, A. R., Crook, M. J., & Grimshaw, C. (1993). A comparative study of the anchorage systems of Himalayan balsam *Impatiens glandulifera* and mature sunflower *Helianthus annuus*. *Journal of Experimental Botany*, 44(1), 133-146.
- Erner, Y., & Jaffe, M. J. (1982). Thigmomorphogenesis: the involvement of auxin and abscisic acid in growth retardation due to mechanical perturbation. *Plant and Cell Physiology*, 23(6), 935-941.
- Esmon, C. A., Tinsley, A. G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L. B., & Liscum, E. (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 236-241.
- European Commission. (2020). A farm to fork strategy for a fair, healthy, and environmentally-friendly food system. *Brussels: European Commission*.
- Fleet, C. M., & Sun, T. P. (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current opinion in plant biology*, 8(1), 77-85.
- Fletcher, W. W., & Kirkwood, R. C. (1982). Herbicides and plant growth regulators.
- Fu, X., & Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes the degradation of DELLAs: A novel mechanism regulating plant growth. *The Plant Cell*, 15(7), 1591-1603.
- Fu, X., Richards, D. E., Ait-Ali, T., Hynes, L. W., Ougham, H., Peng, J., & Harberd, N. P. (2002). Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *The Plant Cell*, 14(12), 3191-3200.
- Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2008). Ethylene—a key regulator of submergence responses in rice. *Plant Science*, 175(1-2), 43-51.
- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*, 9(9), e3230-e3230.
- Gao, X. H., Xiao, S. L., Yao, Q. F., Wang, Y. J., & Fu, X. D. (2011). An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Molecular Plant*, 4(4), 601-606.

- Gardiner, B., Berry, P., & Moulia, B. (2016). Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. *Plant Science*, 245, 94-118.
- Garner, L., Allen Langton, F., & Björkman, T. (1996). Commercial adaptations of mechanical stimulation for the control of transplant growth. In *II Workshop on Environmental Regulation of Plant Morphogenesis* 435 (pp. 219-230).
- Gartner, B. L. (1994). Root biomechanics and whole-plant allocation patterns: responses of tomato plants to stem flexure. *Journal of Experimental Botany*, 45(11), 1647-1654.
- Gladala-Kostarz, A. (2019). The impact of wind and mechanical stress on growth and development of *Brachypodium distachyon* stems (Doctoral dissertation, Aberystwyth University).
- Goodman, A. M., & Ennos, A. R. (1998). Responses of the root systems of sunflower and maize to unidirectional stem flexure. *Annals of Botany*, 82(3), 347-357.
- Graham, H. D., & Thomas, L. B. (1961). Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 44-48.
- Graham, T., & Wheeler, R. (2017). Mechanical stimulation modifies canopy architecture and improves volume utilization efficiency in bell pepper: implications for bioregenerative life-support and vertical farming. *Open agriculture*, 2(1), 42-51.
- Grellet Bournonville, C. F., & Díaz-Ricci, J. C. (2011). Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 268-271.
- Hamant, O. (2013). Widespread mechanosensing controls the structure behind the architecture in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(5), 654-660.
- Hamant, O., & Haswell, E. S. (2017). Life behind the wall: sensing mechanical cues in plants. *BMC biology*, 15, 1-9.
- Hammer, P. A., Mitchell, C. A., & Weiler, T. C. (1974). Height control in greenhouse chrysanthemum by mechanical stress. *Plant Physiol*, 21, 499-536.
- Hamza, A., El-Kafie, A., Omaina, M., & Mohei, A. M. (2007). Improving growth quality of *Pelargonium zonale*, l. by using some growth retardants. *Journal of Plant Production*, 32(10), 8399-8411.
- Harberd, N. P., Belfield, E., & Yasumura, Y. (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *The Plant Cell*, 21(5), 1328-1339.
- He, Y., Zhang, J., Yao, W., Li, D., & Teng, X. (2009). Effect of temperature on residual stress and mechanical properties of Ti films prepared by both ion implantation and ion beam assisted deposition. *Applied Surface Science*, 255(8), 4484-4490.
- Henschke, M., & Pankowska, K. (2013). Demand for Pot Plants for Interior Decoration in View Of the Survey Carried Out in Poznań. *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 30(4), 47-57.
- Hwang, H. S., Jeong, H. W., Kim, H. M., & Hwang, S. J. (2019). Application of mechanical stimulation for overgrowth retardation to tomato grafted seedlings using air circulation fans in greenhouse. In *International Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovative Greenhouses: GreenSys2019* 1296, 241-24.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., ... & Yamaguchi, J. (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell*, 13(5), 999-1010.
- Jacobsen, S. E., et al. (2021). Early root response to mechanical stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 308, 110913.
- Jaffe, M. J. (1973). Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation: with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta*, 114(2), 143-157.
- Jaffe, M. J. (1976). Thigmomorphogenesis: a detailed characterization of the response of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to mechanical stimulation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(5), 437-453.

- Jaffe, M. J., & Forbes, S. (1993). Thigmomorphogenesis: the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regulation*, 12, 313-324.
- Jaffe, M. J., Leopold, A. C., & Staples, R. C. (2002). Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany*, 89(3), 375-382.
- Jaffe, M. J., Wakefield, A. H., Telewski, F., Gulley, E., & Biro, R. (1985). Computer-assisted image analysis of plant growth, thigmomorphogenesis, and gravitropism. *Plant Physiology*, 77(3), 722-730.
- Johjima, T., Latimer, J. G., & Wakita, H. (1992). Brushing influences transplant growth and subsequent yield of four cultivars of tomato and their hybrid lines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(3), 384-388.
- Johnson, K. A., Sistrunk, M. L., Polisensky, D. H., & Braam, J. (1998). *Arabidopsis thaliana* responses to mechanical stimulation do not require ETR1 or EIN2. *Plant Physiology*, 116(2), 643-649.
- Jones, R. S., & Mitchell, C. A. (1989). Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 76(4), 598-602.
- Karami, O., & Saidi, A. (2010). The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, 37, 2493-2507.
- Karban, R., & Baldwin, I. T. (2007). Induced responses to herbivory. *University of Chicago Press*
- Kasem, M. M., & Abd El-Baset, M. M. (2015). Studying the influence of some growth retardants as a chemical mower on ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Plant Sciences*, 3(5), 255-258.
- Kashirskaya, N., Kuzin, A., & Kochkina, A. (2021). Effect of prohexadione calcium on vegetative growth, yield and scab development on 'Sinap Orlovskii' apple trees. In *E3S Web of Conferences*, 254, p. 02011.
- Kavi Kishor, P. B., & Sreenivasulu, N. E. S. E. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant, cell & environment*, 37(2), 300-311.
- Kazan, K., & Lyons, R. (2016). The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 67(1), 47-60.
- Keller, E., & Steffen, K. L. (1995). Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. *Physiologia plantarum*, 93(3), 519-525.
- Keshishian, E. A., Hallmark, H. T., Ramaraj, T., Plačková, L., Sundararajan, A., Schilkey, F., ... & Rashotte, A. M. (2018). Salt and oxidative stresses uniquely regulate tomato cytokinin levels and transcriptomic response. *Plant Direct*, 2(7), e00071.
- Kimbrough, J. M., Salinas-Mondragon, R., Boss, W. F., Brown, C. S., & Sederoff, H. W. (2004). The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiology*, 136(1), 2790-2805.
- Ko, J. H., Han, K. H., Park, S., & Yang, J. (2004). Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant physiology*, 135(2), 1069-1083.
- Kouhen, M., Dimitrova, A., Scippa, G. S., & Trupiano, D. (2023). The course of mechanical stress: types, perception, and plant response. *Biology*, 12(2), 217.
- Koutroubas, S. D., & Damalas, C. A. (2016). Morpho-physiological responses of sunflower to foliar applications of chlormequat chloride (CCC). *Biosci. j.(Online)*, 1493-1501.
- Lange, M. J. P., & Lange, T. (2015). Touch-induced changes in *Arabidopsis* morphology dependent on gibberellin breakdown. *Nature Plants*, 1(3), 1-5.
- Larson, P. R. (1965). Stem form of young *Larix* as influenced by wind and pruning. *Forest Science*, 11(4), 412-424.
- Latimer, J. G. (1990). Drought or mechanical stress affects broccoli transplant growth and establishment but not yield. *HortScience*, 25(10), 1233-1235.
- Latimer, J. G., & Thomas, P. A. (1991). Application of brushing for growth control of tomato transplants in a commercial setting. *HortTechnology*, 1(1), 109-110.

- Latimer, J. G., & Whipker, B. (2019). Selecting and using plant growth regulators on floricultural crops.
- Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Auxin signaling and its integration with other signaling pathways. *Plant Physiology*, 171(3), 1209–1215.
- Lee, B. H., Henderson, D. A., & Zhu, J. K. (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17(11), 3155–3175.
- Leyser, O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology*, 16(10), R424–R433.
- Li, X. M., He, X. Y., Zhang, L. H., Chen, W., & Chen, Q. (2009). Influence of elevated CO₂ and O₃ on IAA, IAA oxidase and peroxidase in the leaves of Ginkgo trees. *Biologia plantarum*, 53, 339–342.
- Li, Y., Li, J., Wu, G., Li, Y., Shen, A., Ma, D., & Li, S. (2020). Design of an air blowing device above seedbed: The effect of air disturbance on the microenvironment and growth of tomato seedlings. *HortScience*, 55(8), 1308–1314.
- Liu, C. Y., Zhang, F., Zhang, D. J., Srivastava, A. K., Wu, Q. S., & Zou, Y. N. (2018). Mycorrhiza stimulates root-hair growth and IAA synthesis and transport in trifoliate orange under drought stress. *Scientific reports*, 8(1), 1978.
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications. *Stem cell reviews and reports*, 16(1), 3–32.
- Liu, X. P., Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Hashino, E., & Holt, J. R. (2016). Functional development of mechanosensitive hair cells in stem cell-derived organoids parallels native vestibular hair cells. *Nature communications*, 7(1), 11508.
- Liu, Z., Yang, P., Fadji, T., Li, Z., & Ni, J. (2023). Biomechanical response of the above-ground organs in tomato seedling at different age levels under wind-flow disturbance. *Scientia Horticulturae*, 312, 111835.
- Louveaux, M., Julien, J. D., Mirabet, V., Boudaoud, A., & Hamant, O. (2016). Cell division plane orientation based on tensile stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30), E4294–E4303.
- Lubovská, Z., Dobrá, J., Štorchová, H., Wilhelmová, N., & Vanková, R. (2014). Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression modifies antioxidant defense against heat, drought and their combination in *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Plant Physiology*, 171(17), 1625–1633.
- MacMillan, C. P., Mansfield, S. D., Stachurski, Z. H., Evans, R., & Southerton, S. G. (2010). Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal*, 62(4), 689–703.
- Mader, J. C., Emery, R. N., & Turnbull, C. G. N. (2003). Spatial and temporal changes in multiple hormone groups during lateral bud release shortly following apex decapitation of chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 119(2), 295–308.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., & Oda, K. (2004). dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*, 37(5), 720–729.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., & Oda, K. (2008). The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 56(4), 613–626.
- Markin, V. S., & Volkov, A. G. (2012). Morphing structures in the *Venus flytrap*. In *Plant Electrophysiology: Signaling and Responses* (pp. 1–31). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Markovic, D., Nikolic, N., Glinwood, R., Seisenbaeva, G., & Ninkovic, V. (2016). Plant responses to brief touching: a mechanism for early neighbour detection?. *PLoS One*, 11(11), e0165742.
- Marler, T. E. (2019). Thigmomorphogenesis and biomechanical responses of shade-grown *Serianthes nelsonii* plants to stem flexure. *Plant signaling & behavior*, 14(7), 1601953.

- Mason, M. G., Ross, J. J., Babst, B. A., Wienclaw, B. N., & Beveridge, C. A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 6092-6097.
- Matsumura, M., Nomoto, M., Itaya, T., Aratani, Y., Iwamoto, M., Matsuura, T., ... & Tada, Y. (2022). Mechanosensory trichome cells evoke a mechanical stimuli-induced immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Nature communications*, 13(1), 1216.
- Matsuoka, M. (2003). Gibberellin signaling and DELLA proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134911>
- Meng, X., Wang, Z., He, S., Shi, L., Song, Y., Lou, X., & He, D. (2019). Endogenous hormone levels and activities of IAA-modifying enzymes during adventitious rooting of tree peony cuttings and grafted scions. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60, 187-197.
- Mihaylov, B. (2024). Response of winter canola (*Brassica napus* L.) to treatment with growth regulators and biostimulators-a review. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 67(1).
- Miliuviene, L., Novickiene, L., Gaveliene, V., Brazauskiene, I., & Pakalniskyte, L. (2004). Possibilities to use growth regulators in winter oilseed rape growing technology. 1. The effect of retardant analogues on oilseed rape growth. *Agronomy Research*, 2(2004), 207-215.
- Mitchell, C. A. (1977). Influence of mechanical stress on auxin-stimulated growth of excised pea stem sections. *Physiologia Plantarum*, 41(2), 129-134.
- Mitchell, C. A. (1996). Recent advances in plant response to mechanical stress: theory and application.
- Mitchell, C. A., & Myers, P. N. (2010). Mechanical stress regulation of plant growth and development. *Horticultural Reviews*, 17, 1-42.
- Mohamed-Yasseen, Y., & Splittstoesser, W. E. (1990). The relationship of several enzymes with IAA and phenols on flower induction in endive.
- Monshausen, G. B., & Gilroy, S. (2009). Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends in cell biology*, 19(5), 228-235.
- Monshausen, G. B., & Haswell, E. S. (2013). A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *Journal of experimental botany*, 64(15), 4663-4680.
- Monshausen, G. B., Messerli, M. A., & Gilroy, S. (2008). Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 147(4), 1690-1698.
- Montgomery, J. A., Bressan, R. A., & Mitchell, C. A. (2004). Optimizing environmental conditions for mass application of mechano-dwarfing stimuli to *Arabidopsis*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(3), 339-343.
- Morel, P., Crespel, L., Galopin, G., & Moulia, B. (2012). Effect of mechanical stimulation on the growth and branching of garden rose. *Scientia Horticulturae*, 135, 59-64.
- Mori, Y., Nishimura, T., & Koshiba, T. (2005). Vigorous synthesis of indole-3-acetic acid in the apical very tip leads to a constant basipetal flow of the hormone in maize coleoptiles. *Plant Science*, 168(2), 467-473.
- Morita, M. T., & Tasaka, M. (2004). Gravity sensing and signaling. *Current opinion in plant biology*, 7(6), 712-718.
- Mortensen, L. M., & Gislerød, H. R. (1997). Effects of air humidity and air movement on the growth and keeping quality of roses.
- Moulia, B., Coutand, C., & Julien, J. L. (2015). Mechanosensitive control of plant growth: Bearing the load, sensing, transducing, and responding. *Frontiers in Plant Science*, 6, 52.
- Moulia, B., Coutand, C., & Lenne, C. (2006). Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: implications for mechanical modeling of plant architecture. *American Journal of Botany*, 93(10), 1477-1489.
- Mousavi, S. A., Dubin, A. E., Zeng, W. Z., Coombs, A. M., Do, K., Ghadiri, D. A., ... & Patapoutian, A. (2021). PIEZO ion channel is required for root mechanotransduction in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(20), e2102188118.

- Neel, P. L., & Harris, R. W. (1971). Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in Liquidambar. *Science*, 173(3991), 58-59.
- Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vicré-Gibouin, M., Mollet, J. C., & Driouich, A. (2012). Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany*, 110(2), 383-404.
- Niklas, K. J. (1996). Differences between *Acer saccharum* leaves from open and wind-protected sites. *Annals of Botany*, 78(1), 61-66.
- Niklas, K. J. (1998). Effects of vibration on mechanical properties and biomass allocation pattern of *Capsella bursa-pastoris* (Cruciferae). *Annals of Botany*, 82(2), 147-156.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., ... & Tran, L. S. P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6), 2169-2183.
- Normanly, J. (1997). Auxin metabolism. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 431-442.
- Okamoto, T., Takatani, S., Motose, H., Iida, H., & Takahashi, T. (2021). The root growth reduction in response to mechanical stress involves ethylene-mediated microtubule reorganization and transmembrane receptor-mediated signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 40, 575-582.
- Onguso, J. M. A., Mizutani, F., & Hossain, A. S. (2006). The effect of trunk electric vibration on the growth, yield and fruit quality of peach trees (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Scientia Horticulturae*, 108(4), 359-363.
- Onoda, Y., & Anten, N. P. (2011). Challenges to understand plant responses to wind. *Plant Signaling & Behavior*, 6(7), 1057-1059.
- Park, J. E., Park, J. Y., Kim, Y. S., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., ... & Park, C. M. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 10036-10046.
- Pateliya, C. K., Parmar, B. R., Kacha, H. L., & Patel, S. K. (2014). Effectiveness of various growth retardants on growth and yield of Okra. *Journal of Agriculture and Crop Science*, 1(2), 32-35.
- Paul-Victor, C., & Rowe, N. (2011). Effect of mechanical perturbation on the biomechanics, primary growth and secondary tissue development of inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany*, 107(2), 209-218.
- Peacock, K., & Berg, A. R. (1994). Effect of mechanical stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyl growth. *Annals of Botany*, 74(6), 661-666.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28(1), 489-521.
- Pobudkiewicz, A. (2014). Effect of growth retardant on some morphological and physiological traits of chrysanthemum. *Polish Journal of Natural Sciences*, 29(4), 291-306.
- Pobudkiewicz, A. K., & Nowak, J. (1994). The influence of flurprimidol and uniconazole on growth of the CMM dwarf *Dianthus caryophyllus* L. cv. Snowmass.
- Pobudkiewicz, A., & Maciorowski, R. (2015). Growth retardant influence on transpiration and morphological traits of *Pelargonium x hortorum* LH Bailey. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 14(5), 133-144.
- Polisensky, D. H., & Braam, J. (1996). Cold-shock regulation of the Arabidopsis TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology*, 111(4), 1271-1279.
- Pöntinen, V., & Voipio, I. (1992). Different methods of mechanical stress in controlling the growth of lettuce and cauliflower seedlings. *Acta Agriculturae Scandinavica B-Plant Soil Sciences*, 42(4), 246-250.

- Potocka, I., & Szymanowska-Pułka, J. (2018). Morphological responses of plant roots to mechanical stress. *Annals of Botany*, 122(5), 711-723.
- Prerostova, S., Dobrev, P. I., Gaudinova, A., Knirsch, V., Körber, N., Pieruschka, R., ... & Vankova, R. (2018). Cytokinins: Their impact on molecular and growth responses to drought stress and recovery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 655.
- Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R. S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., & Leyser, O. (2009). Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17431-17436.
- Qianyu, Z. H. A. O., Anwar, A., Zhang, H., Zhang, S., Lilong, H. E., Fengde, W. A. N. G., & Jianwei, G. A. O. (2021). The fundamental role of DELLA protein and regulatory mechanism during plant growth and development. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(4), 12561-12561.
- Qiu, Y., Guan, S. C., Wen, C., Li, P., Gao, Z., & Chen, X. (2019). Auxin and cytokinin coordinate the dormancy and outgrowth of axillary bud in strawberry runner. *BMC plant biology*, 19, 1-16.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant physiology*, 122(4), 1119-1128.
- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual review of plant biology*, 51(1), 501-531.
- Rademacher, W. (2016). Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. *Annual Plant Reviews, Volume 49: Gibberellins*, The, 359-404.
- Rademacher, W., & Bucci, T. (2002). New plant growth regulators: high risk investment?. *HortTechnology*, 12(1), 64-67.
- Rademacher, W., Van Saarloos, K., Garuz Porte, J. A., Riera Forcades, F., Senechal, Y., Andreotti, C., ... & Costa, G. (2004). Impact of prohexadione-Ca on the vegetative and reproductive performance of apple and pear trees. *European Journal of Horticultural Science*, 69(6), 221-228.
- Rasool, S., Latef, A. A. H. A., & Ahmad, P. (2015). Chickpea: Role and responses under abiotic and biotic stress. *Legumes under environmental stress: yield, improvement and adaptations*, 67-79.
- Reinhardt, D., & Kuhlemeier, C. (2003). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 15(6), 1148-1162.
- Retuerto, R., & Woodward, F. I. (2001). Compensatory responses in growth and fecundity traits of *Sinapis alba* L. following release from wind and density stress. *International Journal of Plant Sciences*, 162(1), 171-179.
- Reubens, B. (2010). Woody vegetation for gully rehabilitation in northern Ethiopia.
- Riboni, M., Robustelli Test, A., Galbiati, M., Tonelli, C., & Conti, L. (2014). Environmental stress and flowering time: the photoperiodic connection. *Plant Signaling & Behavior*, 9(7), e29036.
- Richards, D. E., King, K. E., Ait-Ali, T., & Harberd, N. P. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual review of plant biology*, 52(1), 67-88.
- Richter, G. L., Monshausen, G. B., Krol, A., & Gilroy, S. (2009). Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant physiology*, 151(4), 1855-1866.
- Rinne, P. L., Paul, L. K., Vahala, J., Kangasjärvi, J., & van der Schoot, C. (2016). Axillary buds are dwarfed shoots that tightly regulate GA pathway and GA-inducible 1, 3- β -glucanase genes during branching in hybrid aspen. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 5975-5991.
- Robinson, D., & Rorison, I. H. (1987). Root hairs and plant growth at low nitrogen availabilities. *New Phytologist*, 107(4), 681-693.
- Safaei Far, A., Rezaei Nejad, A., Shahbazi, F., & Mousavi-Fard, S. (2019). The effects of simulated vibration stress on plant height and some physical and mechanical properties of *Coleus blumei* Benth. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 6(2), 273-282.

- Saidi, I., Ammar, S., Demont-Caulet, N., Thévenin, J., Lapierre, C., Bouzid, S., & Jouanin, L. (2009). Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. *Plant Science*, 177(1), 1-6.
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological research*, 208, 85-98.
- Salehi, H., & Salehi, M. (2009). Effects of two methods of mechanical stress on snapdragon and wallflower plants growth responses. *Advances in Environmental Biology*, 3(2), 157-161.
- Sanyal, D., & Bangerth, F. (1998). Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees. *Plant Growth Regulation*, 24, 127-134.
- Sarmast, M. K., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2014). Seismomorphogenesis: a novel approach to acclimatization of tissue culture regenerated plants. *3 Biotech*, 4, 599-604.
- Schnelle, M. A., McCraw, B. D., & Schmoll, T. J. (1994). A brushing apparatus for height control of bedding plants.
- Sehr, E. M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., & Greb, T. (2010). Analysis of secondary growth in the *Arabidopsis* shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal*, 63(5), 811-822.
- Seifert, G. J. (2018). Fascinating fasciclins: a surprisingly widespread family of proteins that mediate interactions between the cell exterior and the cell surface. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1628.
- Seifert, J., Kirchhelle, C., Moore, I., & Contera, S. (2021). Mapping cellular nanoscale viscoelasticity and relaxation times relevant to growth of living *Arabidopsis thaliana* plants using multifrequency AFM. *Acta Biomaterialia*, 121, 371-382.
- Serova, T. A., Tsyganova, A. V., Tikhonovich, I. A., & Tsyganov, V. E. (2019). Gibberellins inhibit nodule senescence and stimulate nodule meristem bifurcation in pea (*Pisum sativum* L.). *Frontiers in plant science*, 10, 285.
- Sharma, N., Kaur, N., & Gupta, A. K. (1998). Effects of gibberellic acid and chlorocholine chloride on tuberisation and growth of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(4), 466-470.
- Showalter, A. M. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58, 1399-1417.
- Sieburth, L. E., & Deyholos, M. K. (2006). Vascular development: the long and winding road. *Current opinion in plant biology*, 9(1), 48-54.
- Silva, J. V., Lacerda, C. F. D., Costa, P. H. A. D., Enéas Filho, J., Gomes Filho, E., & Prisco, J. T. (2003). Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15, 99-105.
- Singh, D. K., & Ram, S. (2000). Level of paclobutrazol residues in shoot and fruit of mango.
- Singroha, G., Sharma, P., & Sunkur, R. (2021). Current status of microRNA-mediated regulation of drought stress responses in cereals. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1808-1821.
- Skalák, J., Černý, M., Jedelský, P., Dobrá, J., Ge, E., Novák, J., ... & Brzobohatý, B. (2016). Stimulation of ipt overexpression as a tool to elucidate the role of cytokinins in high temperature responses of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(9), 2861-2873.
- Smirnoff, N. (1993). Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 27-58.
- Smith, V. C., & Ennos, A. R. (2003). The effects of air flow and stem flexure on the mechanical and hydraulic properties of the stems of sunflowers *Helianthus annuus* L. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), 845-849.
- Sparke, M. A., & Wünsche, J. N. (2020). Mechanosensing of plants. *Horticultural reviews*, 47, 43-83.

- Sparke, M. A., Müller, J., Ruttensperger, U., Heesch, F., & Wünsche, J. N. (2022). Growth regulation by air stream-based mechanical stimulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)—Part I: optimization of application frequency and intensity. *Scientia Horticulturae*, 304, 111252.
- Sparke, M. A., Wegscheider, A., Winterhagen, P., Ruttensperger, U., Hegele, M., & Wünsche, J. N. (2021). Air-based mechanical stimulation controls plant height of ornamental plants and vegetable crops under greenhouse conditions. *HortTechnology*, 31(4), 405-416.
- Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2016). Auxin catabolism unplugged: Role of IAA oxidation in auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 10742-10744.
- Suge, H. (1978). Growth and gibberellin production in *Phaseolus vulgaris* as affected by mechanical stress. *Plant and Cell Physiology*, 19(8), 1557-1560.
- Sun, T. P. (2008). Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 6.
- Šutevski, I., Krmpotić, K., Vitko, S., Bauer, N., Fancev, E., Cifrek, M., & Vidaković-Cifrek, Ž. (2023). Biochemical and Physiological Responses of Arabidopsis thaliana Leaves to Moderate Mechanical Stimulation. *Phyton* (0031-9457), 92(3).
- Suza, W. P., & Staswick, P. E. (2008). The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta*, 227, 1221-1232.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Taherpazir, S., & Hashemabadi, D. (2016). The effect of cycocel and pot size on vegetative growth and flowering of Zinnia (*Zinnia elegans*). *Journal of Ornamental Plants*, Volume 6, Number 2: 107-114.
- Takahashi, H., & Jaffe, M. J. (1984). Thigmomorphogenesis: the relationship of mechanical perturbation to elicitor-like activity and ethylene production. *Physiologia Plantarum*, 61(3), 405-411.
- Takahashi, H., & Suge, H. (1980). Sex expression in cucumber plants as affected by mechanical stress. *Plant and cell physiology*, 21(2), 303-310.
- Takaki, A. (1977). The effects of mechanical stimulation on the seedling growth of sugar beet. In *Processing Sugar Beet Resources Association*, 19, 203-212.
- Takano, M., Takahashi, H., & Suge, H. (1995). Mechanical stress and gibberellin: regulation of hollowing induction in the stem of a bean plant, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Cell physiology*, 36(1), 101-108.
- Takeno, K. (2012). Stress-induced flowering. Abiotic stress responses in plants: Metabolism, productivity and sustainability, 331-345.
- Takeno, K. (2016). Stress-induced flowering: the third category of flowering response. *Journal of experimental botany*, 67(17), 4925-4934.
- Tanaka, K., et al. (2006). The role of auxin in plant development: Advances and applications. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-251.
- Tanimoto, M., Jowett, J., Stirnberg, P., Rouse, D., & Leyser, O. (2007). pax1-1 partially suppresses gain-of-function mutations in Arabidopsis AXR3/IAA17. *BMC Plant Biology*, 7, 1-13.
- Tatineni, A., Rajapakse, N. C., Fernandez, R. T., & Rieck, J. R. (2000). Effectiveness of plant growth regulators under photoselective greenhouse covers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(6), 673-678.
- Telewski, F. W. (2012). Is windswept tree growth negative thigmotropism?. *Plant science*, 184, 20-28.
- Telewski, F. W. (2021). Mechanosensing and plant growth regulators elicited during the thigmomorphogenetic response. *Frontiers in Forests and Global Change*, 3, 574096.
- Telewski, F. W., & Jaffe, M. J. (1986). Thigmomorphogenesis: anatomical, morphological and mechanical analysis of genetically different sibs of *Pinus taeda* in response to mechanical perturbation. *Physiologia Plantarum*, 66(2), 219-226.
- Telewski, F. W., & Pruyn, M. L. (1998). Thigmomorphogenesis: a dose response to flexing in *Ulmus americana* seedlings. *Tree physiology*, 18(1), 65-68.

- Telewski, F. W., Aloni, R., & Sauter, J. J. (1996). Physiology of secondary tissues of *Populus*. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, 301-329.
- Tian, C., & Jiao, Y. (2015). A systems approach to understand shoot branching. *Current Plant Biology*, 3, 13-19.
- Turgeon, R., & Webb, J. A. (1971). Growth inhibition by mechanical stress. *Science*, 174(4012), 961-962.
- Uchida, A., & Yamamoto, K. T. (2002). Effects of mechanical vibration on seed germination of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant and cell physiology*, 43(6), 647-651.
- Ullah, A., Manghwar, H., Shaban, M., Khan, A. H., Akbar, A., Ali, U., ... & Fahad, S. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 33103-33118.
- Van Gaal, T., & Erwin, J. E. (2005). Diurnal variation in thigmotropic inhibition of stem elongation. *HortTechnology*, 15(2), 291-294.
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.
- Verherbruggen, Y., Marcus, S. E., Chen, J., & Knox, J. P. (2013). Cell wall pectic arabinans influence the mechanical properties of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems and their response to mechanical stress. *Plant and cell physiology*, 54(8), 1278-1288.
- Vernieri, P., Mugnai, S., Borghesi, E., Petrognani, L., & Serra, G. (2006). Non-chemical growth control of potted *Callistemon laevis*. *Agricoltura Mediterranea*, 160, 85-90.
- Wada, K. C., & Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Plant signaling & behavior*, 5(8), 944-947.
- Wallner, E. S., López-Salmerón, V., Greb, T. (2016). Strigolactone versus gibberellin signaling: reemerging concepts?. *Planta*, 243, 1339-1350.
- Wang, L., Ma, C., Wang, S., Yang, F., Sun, Y., Tang, J., ... & Wu, J. (2024a). Ethylene and jasmonate signaling converge on gibberellin catabolism during thigmomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 194(2), 758-773.
- Wang, R., & Estelle, M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current opinion in plant biology*, 21, 51-58.
- Wang, Y. H., He, W. M., Dong, M., Yu, F. H., Zhang, L. L., Cui, Q. G., & Chu, Y. (2008). Effects of shaking on the growth and mechanical properties of *Hedysarum laeve* may be independent of water regimes. *International Journal of Plant Sciences*, 169(4), 503-508.
- Wang, Y., Zhang, J., & Lu, X. (2024b). Interplay between jasmonic acid and gibberellins during thigmomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 315, 111116.
- Warner, R. M., & Erwin, J. E. (2005). Prolonged high temperature exposure and daily light integral impact growth and flowering of five herbaceous ornamental species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3), 319-325.
- Watt, M. S., Moore, J. R., & McKinlay, B. (2005). The influence of wind on branch characteristics of *Pinus radiata*. *Trees*, 19(1), 58-65.
- Wheeler, R. M., & Salisbury, F. B. (1979). Water spray as a convenient means of imparting mechanical stimulation to plants.
- Whitehead, F. H. and Luti, R. (1962). Experimental studies of the effect of wind on plant growth and anatomy I. *Zea mays*. *New Phytology* 61: 56-58.
- Wu, G. Q., Feng, R. J., & Shui, Q. Z. (2016). Effect of osmotic stress on growth and osmolytes accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Plant, Soil and Environment*, 62(4), 189-194.
- Xu, W., Purugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., & Braam, J. (1995). *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *The Plant Cell*, 7(10), 1555-1567.

- Xu, Y., Burgess, P., Zhang, X., & Huang, B. (2016). Enhancing cytokinin synthesis by overexpressing ipt alleviated drought inhibition of root growth through activating ROS-scavenging systems in *Agrostis stolonifera*. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1979-1992.
- Yang, P., Hao, J., Li, Z., Tchienbou-Magaia, F., & Ni, J. (2024). Wind disturbance-based tomato seedlings growth control. *Biosystems Engineering*, 243, 82-92.
- Young, I. M., Montagu, K., Conroy, J., & Bengough, A. G. (1997). Mechanical impedance of root growth directly reduces leaf elongation rates of cereals. *The New Phytologist*, 135(4), 613-619.
- Zajączkowska, U., Dmitruk, D., Sekulska-Nalewajko, J., Gocławski, J., Dołkin-Lewko, A., & Łotocka, B. (2024). The impact of mechanical stress on anatomy, morphology, and gene expression in *Urtica dioica* L. *Planta*, 260(2), 46.
- Zavaleta-Mancera, H. A., López-Delgado, H., Loza-Tavera, H., Mora-Herrera, M., Trevilla-García, C., Vargas-Suárez, M., & Ougham, H. (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of plant physiology*, 164(12), 1572-1582.
- Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., ... & Sun, T. P. (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(10), 3037-3057.
- Zhang, D., Ren, L., Yue, J. H., Wang, L., Zhuo, L. H., & Shen, X. H. (2014). GA4 and IAA were involved in the morphogenesis and development of flowers in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*. *Journal of plant physiology*, 171(11), 966-976.
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S. Q., Zhang, Z. H., Shen, B., ... & Shen, Q. R. (2011). A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant and soil*, 344, 87-97.
- Zhdanov, O., Blatt, M. R., Zare-Behtash, H., & Busse, A. (2022). Unidirectional versus bidirectional brushing: Simulating wind influence on *Arabidopsis thaliana*. *Quantitative Plant Biology*, 3, 7.
- Zhou, L. H., Liu, S. B., Wang, P. F., Lu, T. J., Xu, F., Genin, G. M., & Pickard, B. G. (2017). The Arabidopsis trichome is an active mechanosensory switch. *Plant, Cell & Environment*, 40(5), 611-621.

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY
DOKTORSKIEJ ORAZ OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW**

PUBLIKACJA A

Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis but does not affect auxin transport in axillary buds; it also stimulates peroxidase activity in *Petunia* × *atkinsiana*.

Jędrzejuk, A., Kuźma, N., Orłowski, A., Budzyński, R., Gehl, C., & Serek, M.

Molecules, (2023). 28(6), 2714.

Article

Mechanical Stimulation Decreases Auxin and Gibberellic Acid Synthesis but Does Not Affect Auxin Transport in Axillary Buds; It Also Stimulates Peroxidase Activity in *Petunia × atkinsiana*

Agata Jędrzejuk ^{1,*}, Natalia Kuźma ¹, Arkadiusz Orłowski ², Robert Budzyński ², Christian Gehl ³ and Margrethe Serek ³

¹ Institute of Horticultural Sciences, Department of Environmental Protection and Dendrology,

Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-787 Warsaw, Poland

² Institute of Information Technology, Department of Artificial Intelligence, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-787 Warsaw, Poland

³ Faculty of Natural Sciences, Institute of Horticulture Production Systems, Floriculture, Leibniz University of Hannover, Herrenhäuser 2, 30167 Hannover, Germany

* Correspondence: agata_jedrzejuk@sggw.edu.pl



Citation: Jędrzejuk, A.; Kuźma, N.; Orłowski, A.; Budzyński, R.; Gehl, C.; Serek, M. Mechanical Stimulation Decreases Auxin and Gibberellic Acid Synthesis but Does Not Affect Auxin Transport in Axillary Buds; It Also Stimulates Peroxidase Activity in *Petunia × atkinsiana*. *Molecules* **2023**, *28*, 2714. <https://doi.org/10.3390/molecules28062714>

Academic Editors: Mercedes Bonfill and John C. D'Auria

Received: 4 January 2023

Revised: 24 February 2023

Accepted: 13 March 2023

Published: 17 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Thigmomorphogenesis (or mechanical stimulation-MS) is a term created by Jaffe and means plant response to natural stimuli such as the blow of the wind, strong rain, or touch, resulting in a decrease in length and an increase of branching as well as an increase in the activity of axillary buds. MS is very well known in plant morphology, but physiological processes controlling plant growth are not well discovered yet. In the current study, we tried to find an answer to the question if MS truly may affect auxin synthesis or transport in the early stage of plant growth, and which physiological factors may be responsible for growth arrest in *petunia*. According to the results of current research, we noticed that MS affects plant growth but does not block auxin transport from the apical bud. MS arrests IAA and GA₃ synthesis in MS-treated plants over the longer term. The main factor responsible for the thickening of cell walls and the same strengthening of vascular tissues and growth arrestment, in this case, is peroxidase (POX) activity, but special attention should be also paid to AGPs as signaling molecules which also are directly involved in growth regulation as well as in cell wall modifications.

Keywords: thigmomorphogenesis; plant architecture; plant hormone synthesis; cell wall lignification

1. Introduction

Mechanical stimulation-MS is a term created by Jaffe (1973), and means plant response to natural stimuli such as wind blow, strong rain, or touch, resulting in a decrease in length and an increase in branching and in the activity of axillary buds [1]. Except for a few plant species (e.g., *Mimosa pudica* and *Dionaea muscipula*), plants used to have a slow response time to MS [2]. It has already been discovered that the youngest tissues are the most responsible for MS. It is worth noting that differences in cultivar responses to touch are also discussed [3]. Several hypotheses claim that MS causes an increase in radial expansion and decreases plant growth on the cellular level by the arrest of auxin synthesis or transport, decrease of gibberellin synthesis, and increase in peroxidase activity [4–8].

MS is very well known in plant morphology, but physiological processes controlling plant growth are not well described yet. MS inducing a reduction in stem elongation of young plants is the result of increases in the activity of indoleacetic acid (IAA) oxidase and other enzymes such as phenylalanine ammonia-lyase or cinnamyl alcohol dehydrogenase [9–11]. It is suggested that mechanical stimulation may reduce auxin synthesis in a shoot apex and young leaves and/or its basipetal transport [12–15]. According to

Jedrzejuk et al. [11], in petunia subjected to mechanical stimulation, auxin synthesis was not arrested, but it was hypothesized that auxin transport may be interrupted [11]. Basipetal auxin transport may be facilitated by auxin influx carriers (AUX1/LAX proteins) and by efflux PIN and PGP protein families [16–18]. MS, as moderate stress, also may increase peroxidase activity and decrease endogenous gibberellin content [19–27]. On the contrary, peroxidases are responsible for cell wall lignification and suberization, which leads to an arrestment of cell elongation [28–30].

In the current study, we try to find an answer to the question if MS truly may affect auxin synthesis or transport in the early stage of plant growth as well as which physiological factors may be responsible for growth arrest in petunia.

2. Results

2.1. Shoot Growth

The most significant differences in shoot growth of studied plants were visible on T₃ (30 days after the experiment started) and T₄ (56 days). The most intensive shoot growth was observed in control plants (5.63 and 5.67 cm, respectively) and the least intensive in plants stroked 160 times per day (3.82 cm in both terms). Shoot growth varied according to the intensity of mechanical stress (Figure 1). On T₅ (15 days after MS was turned off) the most intense shoot growths were observed in plants stroked 120 and 160 times per day (Figure 1).

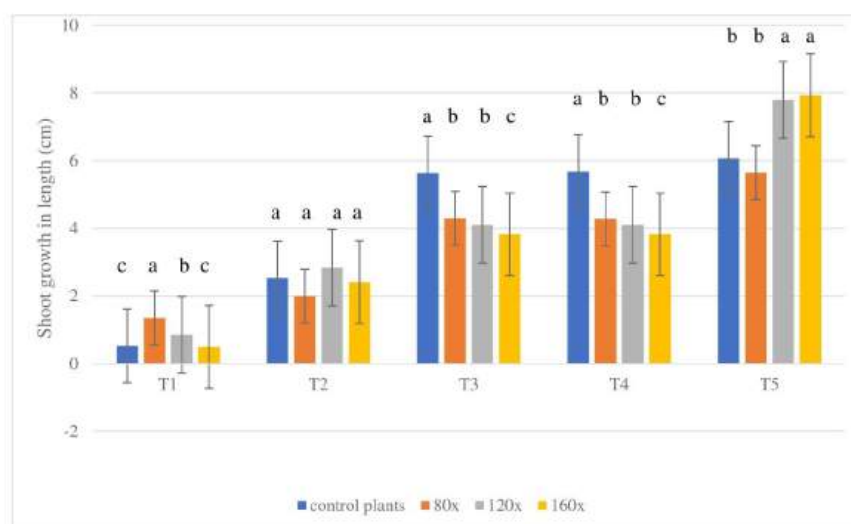
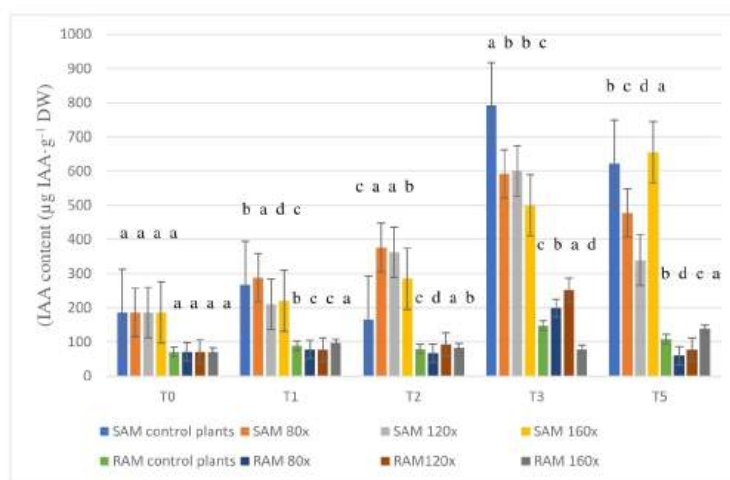


Figure 1. Shoot growth in petunia subjected to MS depending on stress intensity. Statistical analysis was made in each term separately. A total of 15 plants in each block from each treatment were measured in each of the five terms ($\alpha = 0.05$). The lowercase letters present statistical differences ($\alpha = 0.05$) between the treatments.

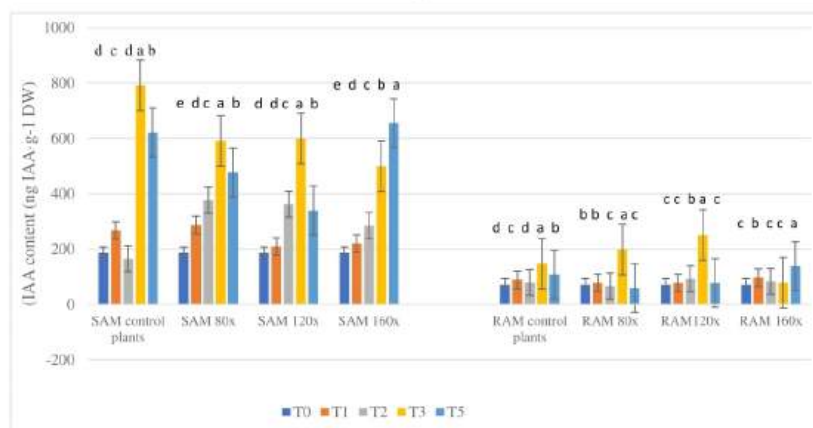
2.2. IAA Content

IAA content varied in the shoot as well as root apices regardless of timing and intensity of stress (Figure 2a,b). In SAM (shoot apical meristem), the lowest IAA content was observed on T₀ (start of the experiment). On T₁ and T₂ (7 and 14 days after the experiment started), the IAA content varied depending on the intensity of stroking (Figure 2a), but it is worth noticing that IAA content in plants treated with MS was always higher than in the

control plants in T₂ (Figure 2a). On T₃ (30 days after the experiment started), the highest IAA content was observed in control plants, while the lowest content was evident in plants stroked 160 times per day. On the last day of the experiment (15 days after MS was turned off), the highest IAA content was observed in control plants that were stroked 160 times per day.



(a)



(b)

Figure 2. (a) IAA content ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) in the apical meristem of stems [SAM] and roots [RAM], analyzed separately, of petunias subjected to MS depending on stress intensity. The specimen was collected from 15 plants in each block from each treatment in each of the five terms ($\alpha = 0.05$). (b) IAA content ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) in the apical meristem of stems [SAM] and roots [RAM], analyzed separately, of petunias subjected to MS depending on stress duration. The specimen was collected from 15 plants in each block from each treatment in each of the five terms ($\alpha = 0.05$). The lowercase letters present statistical differences ($\alpha = 0.05$) between the treatments.

In RAM (root apical meristem), IAA content varied in plants regardless of MS length as well as stress intensity (Figure 2a,b). On T_0 , T_1 , and T_2 , there were no significant differences between IAA content in control and plants subjected to MS. On T_3 , IAA content in plants stroked 80 and 120 times per day was significantly higher than in control plants and those stroked 160 times per day. The highest IAA content in control plants and those stroked 80 and 120 times per day, in SAM and RAM, was observed on T_3 (Figure 2b).

2.3. Immunohistochemistry of Auxin Carriers

To complement the data obtained by spectrophotometric analysis, immunolocalization was carried out in apical meristems of stems (SAM) and roots (RAM) of the studied plant. Due to the most significant differences in auxin content between control and plants subjected to MS on T_3 (plants subjected to MS 120 and 160 times per day), and no differences in auxin transport between both terms, immunodetection results were presented on T_3 . On T_3 , LAX1, AUX1, and PIN1 labeling was detected in meristematic cells of SAM buds as well as provascular strands of the main stem in control plants as well as in plants subjected to MS (Figure 3A,C,E,G,I,K). The immunolocalization signal was not detected in axillary buds (Figure 3B,D,E,H,J). The immunolocalization signal was very well detected in the main axis above and below dormant buds in all studied plants. In root apical meristems (RAM), auxin detection and intensity were similar regardless of the treatment and labeling and regardless of stress duration and intensity (data not presented). Clear auxin carriers signal was coming from the epidermis part and vascular tissues of the root. To conclude, there were no differences in auxin transport in control as well as MS-stimulated plants.

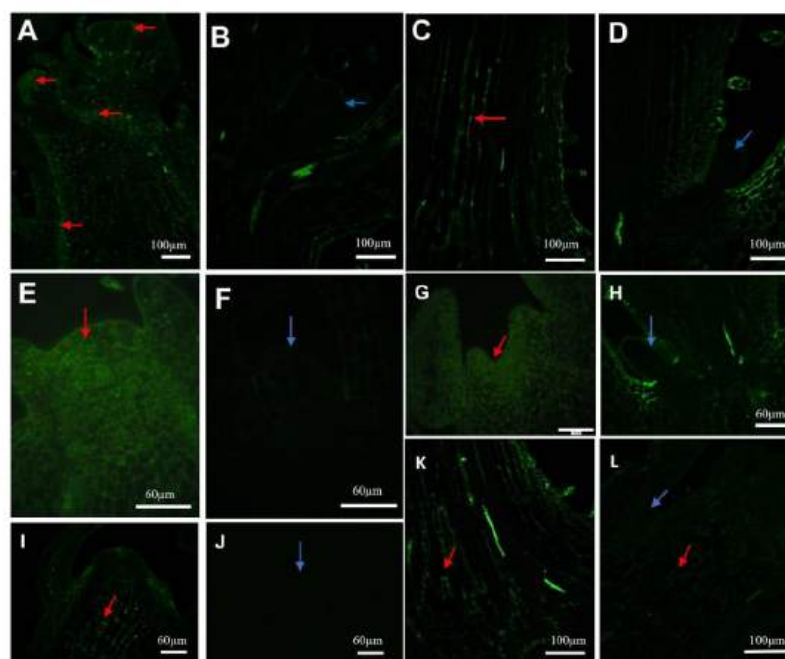


Figure 3. Auxin influx (LAX1 and AUX1) and efflux (PIN1) carriers immunoanalysis in stems of control (A,B,E,F,I,J) and stroked 160 times per day (C,D,G,H,K,L) plants. Red arrows present LAX1, AUX1, and PIN1 antibody signals in SAM buds and provascular strands of the main stem (A,C,E,G,I,K) and no signal (blue arrow) in the axillary bud (B,D,F,H,J,L).

2.4. Gibberellic Acid (GA_3) Content

In roots, GA_3 content was too low to be measured. In SAM, GA_3 content varied depending on MS intensity and the duration of the stress (Figure 4a,b). On T_2 , GA_3 content was the highest in plants subjected to MS 80 times per day. On T_3 , the highest GA_3 content was observed in control plants and those subjected to MS 80 times per day. The lowest GA_3 content was observed in plants subjected to stroking 120 and 160 times per day. On T_5 , GA_3 content increased in plants stroked 120 and 160 times per day compared with T_3 , but it was still significantly lower than in control plants. An interesting fact is that in plants stroked 80 times per day, GA_3 was the lowest on this term. When taking into consideration the duration of MS stress, the highest GA_3 content was observed on T_3 in controls and plants stroked 80 times per day, whereas was observed on T_1 in plants stroked 120 and 160 times per day.

2.5. Peroxidase Activity

In SAM, on T_1 and T_2 , peroxidase activity was fairly high in plants brushed 120 and 160 times (T_1) or only 160 times (T_2) versus peroxidase activity in control plants. On T_3 , peroxidase activity was the lowest in plants stroked 120 and 160 times per day. On T_5 , peroxidase activity was higher in all brushed plants than in controls (Figure 5a). On T_1 and T_{2s} , in RAM, high peroxidase activity was observed in plants brushed 80 and 160 times (T_1) and in all brushed plants on T_2 . On this term, the highest POD activity was 631.5 U, which was two times higher than in control plants (Figure 5a,b). In SAMs, in plants brushed 120 and 160 times per day, the highest peroxidase activity was observed on T_1 , while in RAMs, in all studied plants, on T_2 —14 days after MS started (Figure 5b).

2.6. Histological Determination of Cell Wall Lignification in Vascular Bundles of Stems and Roots

Histological observations of stems and roots of examined plants were presented on T_1 , because of the highest POX activity in SAMs. Control and plants subjected to MS 160 times per day were examined. On T_1 , POX activity was the highest in stems of plants subjected to MS 160 times per day. No tracheary elements of vascular bundles were detected on longitudinal sections of stems in control plants (Figure 6A–D); in contrast to plants subjected to MS 160 times per day, where tracheary elements were clearly visible in vascular bundles (Figure 6E–H). We also checked the differences in collenchyma and sclerenchyma cells in control and MS-subjected plants. We observed clear sclerenchyma cells in treated plants, whereas this was not the case in the control plants (Figure 6I,J). There was no difference in root anatomy regardless of plant treatment (data not presented).

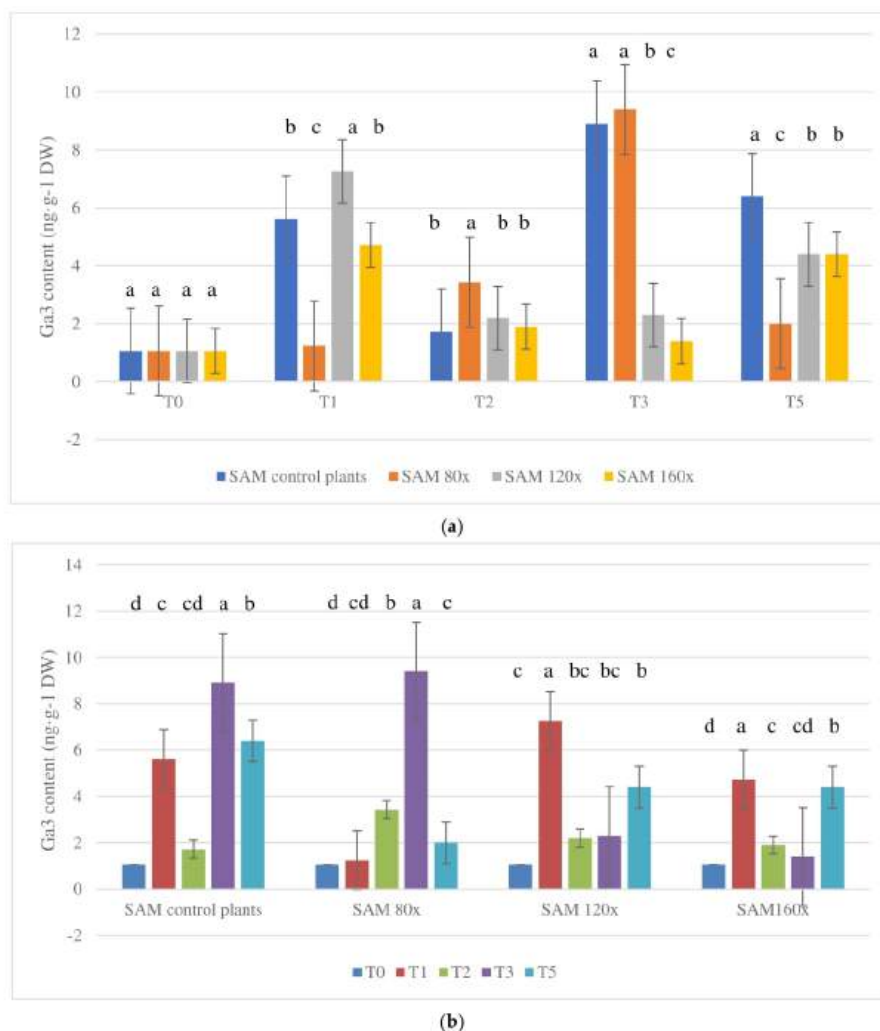


Figure 4. (a) Gibberellic acid (GA_3) content ($ng \cdot g^{-1}$ DW) in the apical meristem of stems [SAM], analyzed separately, of petunias subjected to MS depending on stress intensity. The specimen was collected from 15 plants in each block from each treatment in each of the five terms ($\alpha = 0.05$). (b) Gibberellic acid (GA_3) content ($ng \cdot g^{-1}$ DW) in the apical meristem of stems [SAM], analyzed separately, of petunias subjected to MS depending on stress duration. The specimen was collected from 15 plants in each block from each treatment in each of the five terms ($\alpha = 0.05$). The lowercase letters present statistical differences ($\alpha = 0.05$) between the treatments.

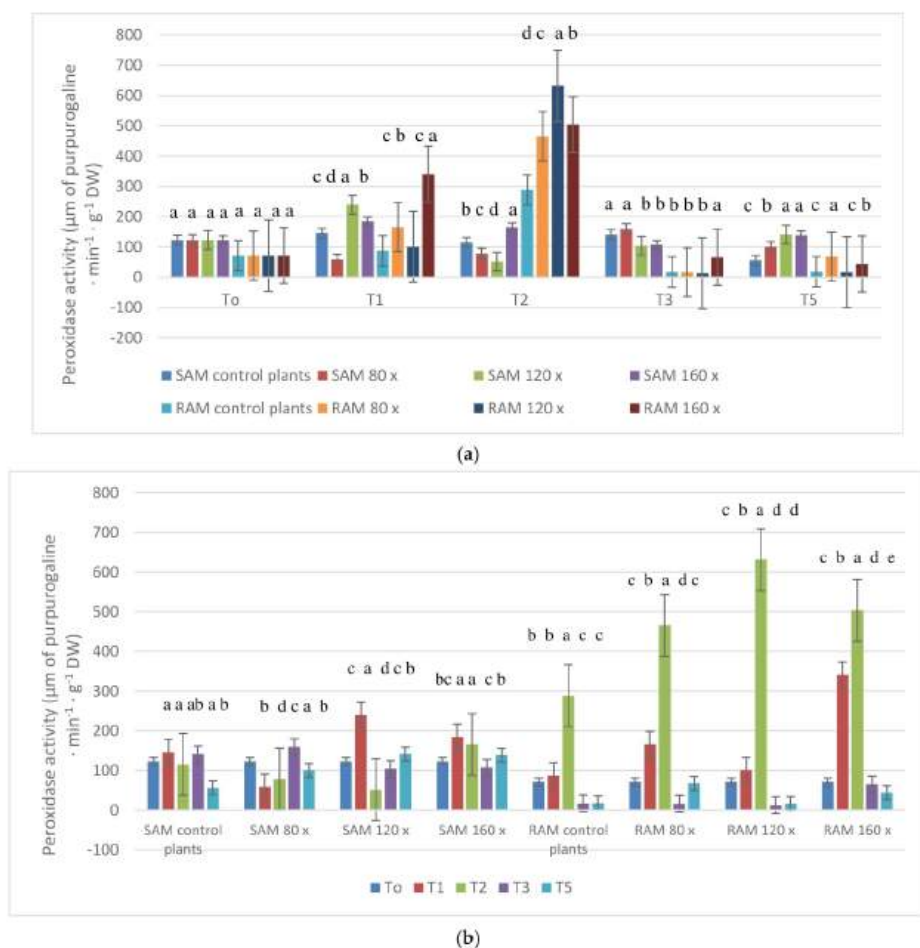


Figure 5. (a) POX activity ($\mu\text{g purpurogallin}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) in the apical meristem of stems [SAM] and roots [RAM] of petunias subjected to MS depending on stress intensity. The specimen was collected from 15 plants from each treatment in each of the five terms; $\alpha = 0.05$. (b) POX activity ($\mu\text{g purpurogallin}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) in the apical meristem of stems [SAM] and roots [RAM] of petunias subjected to MS depending on stress duration. The specimen was collected from 15 plants from each treatment in each of the five terms; $\alpha = 0.05$. The lowercase letters present statistical differences ($\alpha = 0.05$) between the treatments.

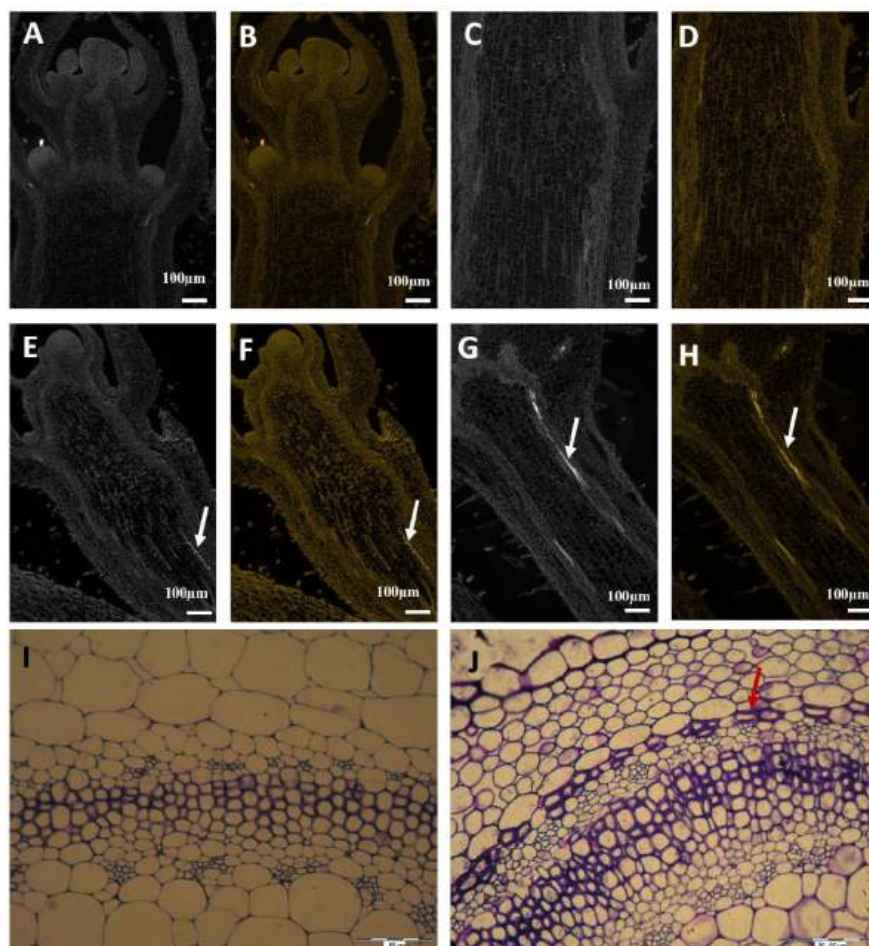


Figure 6. Histological determination of cell wall lignification in vascular bundles of stems of *P. atkinsiana*. (A–D)—longitudinal section of the stem of control plants. Tracheary elements are not visible in vascular bundles. (E–H)—longitudinal section of the stem of plants subjected to MS 160 times. Tracheary elements are clearly visible in vascular bundles. Arrow—tracheary elements. (I,J)—cross-section of the stems of control (I) and subjected to MS 160 times (J). Usually, plants subjected to stress develop reinforcing tissue, such as collenchyma or sclerenchyma, resulting in the arrest of developing growth. (I)—cross-section of the stem of control plants. Sclerenchyma cells are not visible. (J)—cross-section of the stem of plants subjected to MS 160 times. Sclerenchyma cells are clearly visible. Arrow—sclerenchyma cells.

3. Discussion

Plants may be sensitive to environmental factors such as strong wind and rain, ranging from very rapid and intense to more moderate and slow [31–36]. Some responses of plants to mechanical stimuli are very rapid due to the presence of specialized cells [33]. Plants

without specialized sensory cells react slowly by changing morphology. According to Biddington (1986), the most common feature of MS is a decrease in the elongation of shoot growth and an increase in radial expansion [37]. These changes enable plants to withstand mechanical stresses [38]. In the current study, petunias subjected to regular mechanical stimulation 30 days after stroking started were 23 to 32% smaller. A previous study on petunia also demonstrated a higher number of branching in two petunia cultivars exposed to MS [11]. The phenomenon of an increase in the diameter of plants subjected to MS was confirmed by the series of time-lapse photography series (Video S1).

The main factors taking part during the MS process are auxins, gibberellins, cytokinins, peroxidases, and oxidases [39–44]. According to former research, mechanical stimulation of soybean and pea plants reversed auxin-promoted shoot elongation [45,46]. Hofinger et al. (1979) demonstrated that auxin, under natural conditions present in the lower internodes of the wild cucumber, was absent after the MS of the plants [47]. In the current research, on T₂ (14 DAS-days after MS), IAA content in SAM, in all plants subjected to MS, was higher than in unbrushed plants from 72 to 127.8%, while on T₃ (30 DAS), IAA content was lower in all brushed plants versus controls. The difference in IAA content varied between 200 and 292 µg IAA·g⁻¹ DW. The current experiment clearly demonstrated that MS affected auxin synthesis in the SAM of studied plants as late as 30 days after MS started. There is no data confronting the difference in IAA content between SAM and RAM. In the current study, much lower IAA content was observed in RAM than in SAM in all studied plants. The auxin content in roots varied from 71 on T₀ in all collected plants to 199 µg IAA·g⁻¹ DW on T₃ from plants stroked 80 times per day.

The main purpose of the current study was to directly answer the question of whether MS arrests the auxin synthesis or transport in petunia, affecting the same plant architecture. In this case, we decided to conduct a series of immunolocalization studies. The most probable route of auxin transport to the RAM is the developing vascular tissue, which is high auxin content reach. It is now well established that auxin transport is facilitated by auxin influx and efflux carriers [48–53]. In the current study, we made a series of observations on auxin transport through the LAX, AUX, and PIN protein groups. The observations of active auxin transport were made on the specimen collected in the same terms as for quantitative auxin measurements. At 30 days after the start of MS, we noticed a much lower auxin content in SAM in all treated plants than in control plants, but we did not observe a similar event in roots.

In plants with strong apical dominance, the shoot apex inhibits the activity of axillary buds. Removal of the shoot apex initiates the activity of axillary buds. This activity is accompanied by PIN carrier polarization, enabling auxin export from the axillary buds [14]. Research conducted by Balla (2016) on pea clearly presented that auxin export from axillary buds are only possible if the primary source of auxin is removed or weakened.

In the current study, on all terms of observations, LAX1, AUX1, and PIN1 labeling were detected in meristematic cells of SAM buds as well as provascular strands of the main stem in all studied plants, while the immunolocalization signal was not detected in axillary buds. The immunolocalization signal was very well detected in the main axis above and below dormant buds in all studied plants, but it was not detectable in stems below dormant buds. This may be the clue to discuss if MS was enough strong to decrease auxin synthesis but too weak to interrupt its basipetal transport. Or whether other physiological factors may be responsible for auxin transport and prevention of axillary bud release. According to Mason et al. (2014), the dogma of auxin-mediated apical dominance has persisted largely that auxin is typically capable of inhibiting the later stages of bud outgrowth after decapitation, and because it regulates the levels of other hormones known to affect shoot branching [54]. However, by observing the earliest stages of bud release, it appeared that auxin depletion was not sufficient to induce bud release after decapitation. The factor responsible for axillary bud release from apical dominance was the level of endogenous sugars. A non-sufficient level of soluble sugars may be a central point to the maintenance of apical dominance. These hypotheses deny the results of the current experiment presenting

an increase in plant diameter (see Video S1). We did not study cytokinin content in petunia SAMs; but according to Qiu et al. (2019), high cytokinin content in apical buds may trigger the burst of non-dormant bud [55].

IAA and GA are strong growth regulators of aerial organs, and the endogenous levels of these hormones quantitatively regulate the shoot growth as accelerators, i.e., the higher the endogenous level the greater the shoot growth [56]. Physiological studies revealed that GA plays an important role in internode elongation [12,15,27,57–59]. There is still a lack of understanding of the signal transduction pathways that lead to GA activity and thus to the elongation of stems and leaves in response to different environmental factors. According to Tanimoto (2007), auxin and gibberellins are the strongest accelerators of shoot growth [60]. It has been suggested that auxin transport from the shoot controls root growth by facilitating the GA-mediated destabilization of DELLA proteins [61–67]. In the current study, we noticed that T₃ was the critical date to observe clear growth arrestment in plants subjected to MS as well as IAA and GA₃ content in plants stroked 120 and 160 times per day. There is still a question about the active transport of auxins from the shoot main bud to the roots. According to the literature, decapitation produces a spectacular effect in which the transport of auxins from the main shoot is rapidly inhibited and their transport from lateral shoots is activated. In the current experiment, the effect of reduced synthesis of auxins and gibberellins occurred after 30 days of stress. The main question we wanted to answer in this study was whether MS may arrest auxin synthesis or transport at an early stage of stress. The present experiment yielded a clear answer: under MS, auxin and gibberellin synthesis is inhibited during prolonged stress, while basipetal auxin transport is not inhibited.

Peroxidase-mediated oxidative decarboxylation is crucial for auxin arrest in plant stems [68,69]. An increase in peroxidase activity that occurred in mechanically perturbed plants was noticed by Hofinger et al. (1980) and Boyer et al. (1980) [47,70]. The results of the research made in 2020 on petunia also showed higher activity of peroxidase in plants subjected to MS reverse to controls. In the current study, peroxidase activity was variable in SAM, while in RAM on T₁ and T₂, high peroxidase activity was observed in plants brushed 80 and 160 times (T₁) and in all plants on T₂. Histological observations of stems and roots of examined plants were presented on T₁ because of the highest POX activity in SAMs. On T₂, in stems of plants subjected to MS 160 times per day, peroxidase activity was the highest. An interesting fact is that in SAMs the highest peroxidase activity was observed on T₁, but no tracheal elements of the vascular bundles were visible on longitudinal sections of the stems in the control plants, opposite to plants subjected to MS 160 times per day, where tracheary elements were clearly visible in vascular bundles and sclerenchyma cells. It is obvious that plants create a natural defense against mechanical damage through the production of lignins and suberins in stems [30]. In tomato plants, peroxidase activities significantly increased in the rubbed internode after mechanical stress application [10]. The results of the current study are consistent with previous studies on the role of peroxidases in the MS response of *B. dioica* and *B. pilosa* as well as in tomato plants [10,71]. In the current study, an increase in POX levels in roots resulted in the development of tracheary elements in petunia shoots. It is quite new that the most intense POX activity was observed in roots, and there is not much data about chemical signals appearing in roots caused by MS that have their effects on the stem. According to Potocka et al. (2018), surprisingly, mechanical stimulation seems to have greater effects on root growth than on shoot growth, which has been mainly studied [1,72–74].

Results of the previous studies suggest that roots may have a larger response to MS than shoots. One possibility is that the response to mechanical stimulation is a whole plant response, but that the roots have a higher sensitivity to mechanical stimulation [72]. Until now, research comparing root and shoot response to MS focused mainly on morphological, anatomical, and cytological changes in roots or molecular factors activating cytological changes, but there are not much data concerning physiological root response [72,75–77]. In the current study, we did not examine how stress caused by MS affects ROS as well as

antioxidant enzymatic activity production in stems and roots of stimulated plants. One of the hypotheses explaining such a large POD activity in roots of stimulated plants in the early stage of MS duration may be its production to prevent the plant against oxidative stress caused by MS. This hypothesis may be true in this case, especially since we did not observe any differences in root anatomy in either control or MS-subjected plants. On the other side, the results of Jacobsen et al. (2021) on *Arabidopsis* showed that the signaling genes linked to ethylene and auxin differential gradients, and transcriptional activation of ROS, were all part of the early response of *Arabidopsis* roots to MS, which clearly fits our hypothesis [78].

Basipetal auxin transport may be controlled by different types of proteins and peptides in xylem sap [79]. Especially noteworthy are arabinogalactan proteins (AGPs), which are probably active as signaling molecules during MS [80,81]. They are involved in the regulation of plant development and affect cell wall properties [82–90]. In roots, AGPs regulate their elongation and differentiation and may regulate the deposition of cellulose microfibrils in shoots [91–94]. This may be a clue that AGPs, besides POX activity, also play an important role in cell wall modifications of MS-subjected plants. In the current study, we did not study the activity of AGPs in SAM or RAM of petunia. In any case, there are no data in the literature on whether MS may increase AGPs production and affect cell wall modifications in plants.

4. Conclusions

1. In the current research, we confirmed, that over a longer period of time, mechanical stimulation arrests growth dynamics and auxin as well as gibberellins synthesis in petunia.
2. Mechanical stimulation does not arrest basipetal auxin transport.
3. In the current research, we proved that one of the factors affecting the growth of petunia may be peroxidase activity, which is responsible for cell wall lignification and suberization in stems.
4. In the current research, we proved that petunia plants subjected to mechanical stress 160 times a day clearly reduced their growth while they increased their diameter, which is an asset for the production of bedding plants such as petunia.
5. The increase in growth dynamics in petunias after the cessation of mechanical stress is a clear physiological response of plants to return to a state of homeostasis.
6. Besides POX activity, AGPs may also play an important role in cell wall modifications of MS-subjected plants.
7. In the current study, we did not study the activity of AGPs in the SAM or RAM of petunia. In any case, there are no data in the literature on whether MS may increase AGPs production and has the same effect on cell wall modifications in plants, so it could be the next step to understand the physiological reaction of plants to MS.

5. Material and Methods

The experiments were conducted in 2019–2022. The plant material, *Petunia × atkinsiana*, ‘Pegasus® Special Burgundy Bicolor’ with purple–white rays on the petals, was obtained from the Volmary Polska Company, central Poland, Mazovia) as 4-week-old plantlets at the beginning of February. The plants were placed in a greenhouse at the Warsaw University of Life Sciences, Poland.

5.1. Experimental Design

MS of plants started on 22 February and stopped on 20 April. The whole experiment started on 22 February and finished on 5 May. Between 20 April and 5 May, plants were growing without MS to observe the dynamics of their growth without the stressor. MS was provided by the brushing apparatus described in detail by Jedrzejuk et al. (2020) [11], and constructed by University workers. Only shoot apices were subjected to mechanical stimulation, but both shoot and root tips were subjected to biochemical analysis. This

decision was dictated by the fact that roots may respond to stress faster and stronger than shoot apices (according to Potocka et al. (2018)).

5.2. Biometric Measurements and Biochemical Analyses

There were 90 plants in each treatment. The average increase of studied plants was measured between 22 February and 5 May in 5 terms: T₀—experiment beginning, T₁—7 days after MS started, T₂—14 days after experiment started, T₃—30 days after experiment started T₄—56 days after experiment started (end of MS process), and T₅—71 days after experiment started (15 days after MS was turned off, to check plant behavior). For biometric measurements, plants were divided into three blocks of 15 plants each. The same plants were examined in each term. Between T₂ and T₃, for 10 days the growth habit of control and plants subjected to MS 160 times per day was examined by using the time-lapse photography method (Supplementary Materials).

For biochemical analyses, 1.5 cm stem apical meristem (SAM) or root fragments (RAM) were collected from nine plants divided into three blocks of three plants in each treatment and each term (total 180 plants) (three apices per plant per each replication) on the dates as given above, excluding term 0 for roots (too low amount of plant material) and term 4 (56 days after experiment started in both). The exclusion of material collection on term 4, was dictated by plants being too large and flowering, which would have disturbed the analyses. The specimen for all analyses were collected immediately after brushing was stopped.

All analyses were made in nine replicates per treatment. The dry weight was determined by drying three 1-g samples at 105 °C until the weight was constant.

5.3. IAA Content

Free IAA was extracted with 80% methanol and assayed spectrophotometrically with the Salkowski reagent [82] at 520 nm (AOE Instruments UV-1600, Taiwan) and expressed as µg IAA per g DW [82].

5.4. GA₃ Content

Gibberellic acid was determined according to the method of Graham and Thomas (1961) and modified for petunia tissues in the presence of absorbance measured spectrophotometrically at 430 nm according to the standard curve for GA₃ [83]. Total gibberellins content was expressed in ng of GA₃·g^{−1} DW.

5.5. Peroxidase (POD) Activity

Peroxidase activity was determined as previously described by Jędrzejuk et al. (2020) [11]. The peroxidase activity was determined as follows: 500 mg of tissue was homogenized in 3 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) (Merck, Germany), and centrifuged at 20,000 rpm for 15 min at 4 °C. The assay mixture consisted of 3 mL of 0.5 M pyrogallol (Warchem, Poland), 0.1 mL of enzyme extract, and 0.5 mL of 1% H₂O₂ (Warchem, Poland). The activity was estimated spectrophotometrically at 430 nm (AOE Instruments UV-1600, Taiwan) and expressed as units (U) per g^{−1} DW.

5.6. Immunohistochemistry of Auxin Carriers

Immunolocalization of AUX1, LAX1, and PIN1 proteins, was performed on longitudinal stem segments of the apex (SAM) and axillary buds 1 cm below SAM as well as apical parts of roots (RAM). The anti-Arabidopsis-PIN1, AUX1, and LAX1 antibodies (AGRISERA, Sweden) also recognized the homologous protein in petunia, which is presumed to be functional orthologs based on expression similarity and localization signal to Arabidopsis. The following antibodies and dilutions were used 1:100 and anti-rabbit secondary FITC (excitation wavelength 490 nm) conjugated antibody (1:500, AGRISERA, Sweden). Samples were viewed under an epifluorescence microscope Zeiss AxioScope A. Images

were acquired using a Zeiss Axio Cam MRm digital camera with the AxioVision Software (Version 4.8.2).

5.7. Safranin and Crystal Violet Staining

Longitudinal sections of SAM and RAM samples were prepared at 10 µm thickness using a rotary microtome. Samples were stained in 0.1% aqueous safranin (safranin O, Merck, Germany) for 30 min and rinsed three times for 10 min each in warm water at 37 °C. Sections were then oven dried and mounted in immersion oil (Merck, Germany) for fluorescence microscopy. Sections stained with safranin were excited at 488 nm.

For anatomical observations of collenchyma and sclerenchyma cells, samples were handled according to the methods of preparation for electron microscopy [84]. Semi-thin (3 µm) sections were stained with 0.1% aqueous solution of crystal violet (Earchem, Poland) and dried at 70 °C.

5.8. Statistical Analysis

Data were analyzed with the general linear model program Statgraphics Centurion XIX 2019 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA). ANOVA 1 was used for measurements of shoot growth and biochemical analyses, and means were compared by the LSD or Tukey–Kramer multiple range test at the significance level $\alpha = 0.05$.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28062714/s1>, Video S1: Supplementary material 1.

Author Contributions: A.J. conceived this project and designed the experiments; N.K., R.B., C.G. and A.O. carried out the experiments and analyzed the data; M.S. partially supported project financing within the frames of the DAAD grant. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partly supported by the Incubator of Innovation 4.0 (grant supported by the Ministry of Higher Education, Poland) and DAAD grant no. 57552347.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data in this study are provided in the article and its supplementary file.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Jaffe, M.J. Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* **1973**, *114*, 143–157. [CrossRef]
2. Chehab, E.W.; Eich, E.; Braam, J. Thigmomorphogenesis: A complex plant response to mechano-stimulation. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 43–56. [CrossRef] [PubMed]
3. Bauerle, W.L. Internode elongation and strobili production of *Humulus lupulus* cultivars in response to local strain sensing. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9017. [CrossRef] [PubMed]
4. Brewer, P.B.; Dun, E.A.; Ferguson, B.J.; Rameau, C.; Beveridge, C.A. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 482–493. [CrossRef] [PubMed]
5. Li, Z.G.; Gong, M. Mechanical stimulation-induced cross-adaptation in plants: An overview. *J. Plant Biol.* **2011**, *54*, 358–364. [CrossRef]
6. Müller, D.; Leyser, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.* **2011**, *107*, 1203–1212. [CrossRef] [PubMed]
7. Wang, T.; Li, C.; Wu, Z.; Jia, Y.; Wang, H.; Sun, S.; Wang, X. Absciscic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1121. [CrossRef]
8. Lin, C.; Sauter, M. Polar auxin transport determines adventitious root emergence and growth in rice. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 444. [CrossRef]
9. Cipollini, D.F., Jr. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* **1998**, *85*, 1586–1591. [CrossRef]

10. Saidi, I.; Ammar, S.; Demont-Caulet, N.; Thévenin, J.; Lapierre, C.; Bouzid, S.; Jouanin, L. Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: Morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5*, 122–125. [\[CrossRef\]](#)
11. Jędrzejuk, A.; Kuźma, N.; Nawrot, K.; Budzyński, R.; Orłowski, A. Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia × atkinsiana*. *Sci. Hortic.* **2020**, *274*, 109661. [\[CrossRef\]](#)
12. Prusinkiewicz, P.; Crawford, S.; Smith, R.S.; Ljung, K.; Bennett, T.; Ongaro, V.; Leyser, O. Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17431–17436. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Balla, J.; Kalousek, P.; Reinöhl, V.; Friml, J.; Procházka, S. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J.* **2011**, *65*, 571–577. [\[CrossRef\]](#)
14. Balla, J.; Medved'ová, Z.; Kalousek, P.; Matiješuková, N.; Friml, J.; Reinöhl, V.; Procházka, S. Auxin flow-mediated competition between axillary buds to restore apical dominance. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35955. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tian, C.; Jiao, Y. A systems approach to understand shoot branching. *Curr. Plant Biol.* **2015**, *3*, 13–19. [\[CrossRef\]](#)
16. Leyser, O. Plant hormones: Ins and outs of auxin transport. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 8–10. [\[CrossRef\]](#)
17. Vieten, A.; Sauer, M.; Brewer, P.B.; Friml, J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *LTWA* **2007**, *12*, 160–168. [\[CrossRef\]](#)
18. Telewski, F.W. Mechanosensing and plant growth regulators elicited during the thigmomorphogenetic response. *Front. For. Glob.* **2021**, *3*, 147. [\[CrossRef\]](#)
19. Suge, H. Growth and gibberellin production in *Phaseolus vulgaris* as affected by mechanical stress. *Plant Cell Physiol.* **1978**, *19*, 1557–1560.
20. Takahashi, H.; Suge, H. Sex expression in cucumber plants as affected by mechanical stress. *Plant Cell Physiol.* **1980**, *21*, 303–310. [\[CrossRef\]](#)
21. Barley, R.; Waites, R. Plant meristems: The interplay of KNOX and gibberellins. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 696–698. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Kim, S.K.; Lee, S.C.; Shin, D.H.; Jang, S.W.; Nam, J.W.; Park, T.S.; Lee, I.J. Quantification of endogenous gibberellins in leaves and tubers of Chinese yam, *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tsukune during tuber enlargement. *Plant Growth Regul.* **2003**, *39*, 125–130. [\[CrossRef\]](#)
23. Hedden, P.; Thomas, S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 11–25. [\[CrossRef\]](#)
24. Gupta, R.; Chakrabarty, S.K. Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signal. Behav.* **2013**, *8*, 25504. [\[CrossRef\]](#)
25. Hedden, P.; Sponsel, V. A century of gibberellin research. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34*, 740–760. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang, X.; Fang, G.; Yang, J.; Li, Y. A thioredoxin-dependent glutathione peroxidase (OsGPX5) is required for rice normal development and salt stress tolerance. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2017**, *35*, 333–342. [\[CrossRef\]](#)
27. Binenbaum, J.; Weinstein, R.; Shani, E. Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 410–421. [\[CrossRef\]](#)
28. Mohan, R.; Vijayan, P.; Kolattukudy, P.E. Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (tap1) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant Mol. Biol.* **1993**, *22*, 475–490. [\[CrossRef\]](#)
29. Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M.A.; Barceló, A.; Amaya, I.; Medina, M.I.; Valpuesta, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 1119–1128. [\[CrossRef\]](#)
30. Gladala-Kostarz, A. The Impact of Wind and Mechanical Stress on Growth and Development of Brachypodium Distachyon Stems. Ph.D. Thesis, Aberystwyth University, Aberystwyth, UK, 2019.
31. Green, T.R.; Ryan, C.A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* **1972**, *175*, 776–777. [\[CrossRef\]](#)
32. Karban, R.; Baldwin, I.T. *Induced Responses to Herbivory*; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 1997; p. 319.
33. Braam, J. In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol.* **2005**, *165*, 373–389. [\[CrossRef\]](#)
34. Chen, H.; Wilkerson, C.G.; Kuchar, J.A.; Phinney, B.S.; Howe, G.A. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 19237–19242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Chehab, E.W.; Kaspi, R.; Savchenko, T.; Rowe, H.; Negre-Zakharov, F.; Kliebenstein, D.; Dehesh, K. Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1904. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Chehab, E.W.; Raman, G.; Walley, J.W.; Perea, J.V.; Banu, G.; Theg, S.; Dehesh, K. Rice Hydroperoxide lyases with unique expression patterns generate distinct aldehyde signatures in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 121–134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Biddington, N.L. The effects of mechanically-induced stress in plants—A review. *J. Plant Growth Regul.* **1986**, *4*, 103–123. [\[CrossRef\]](#)
38. Telewski, F.W.; Jaffe, M.J. Thigmomorphogenesis: Anatomical, morphological and mechanical analysis of genetically different sibs of *Pinus taeda* in response to mechanical perturbation. *Physiol. Plant.* **1986**, *66*, 219–226. [\[CrossRef\]](#)
39. Komatsu, K.; Maekawa, M.; Ujiie, S.; Satake, Y.; Furutani, I.; Okamoto, H.; Kyojuka, J. LAX and SPA: Major regulators of shoot branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11765–11770. [\[CrossRef\]](#)
40. Shimizu-Sato, S.; Tanaka, M.; Mori, H. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* **2009**, *69*, 429–435. [\[CrossRef\]](#)
41. Péret, B.; Swarup, K.; Ferguson, A.; Seth, M.; Yang, Y.; Dhondt, S.; Swarup, R. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell Rep.* **2012**, *24*, 2874–2885. [\[CrossRef\]](#)
42. Telewski, F.W. Thigmomorphogenesis: The response of plants to mechanical perturbation. *Italus Hortus* **2016**, *23*, 1–16.

43. Swarup, R.; Bhosale, R. Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1306. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhang, H.; Zhu, J.; Gong, Z.; Zhu, J.K. Abiotic stress responses in plants. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 104–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Victor, T.S.; Vanderhoef, L.N. Mechanical inhibition of hypocotyl elongation induces radial enlargement: Implications for cytokinin action. *Plant Physiol.* **1975**, *56*, 845–846. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Mitchell, C.A. Influence of mechanical stress on auxin-stimulated growth of excised pea stem sections. *Physiol. Plant.* **1977**, *41*, 129–134. [\[CrossRef\]](#)
47. Hofinger, M.; Chappelle, B.; Boyer, N.; Gaspar, T. GCMS identification and titration of IAA in mechanically perturbed *Bryonia dioica*. *Plant Physiol.* **1979**, *63*, 52.
48. Reinhardt, D.; Pesce, E.R.; Stieger, P.; Mandel, T.; Baltensperger, K.; Bennett, M.; Kuhlemeier, C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **2003**, *426*, 255–260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Leyser, O. Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 424–433. [\[CrossRef\]](#)
50. Sieburth, L.E.; Deyholos, M.K. Vascular development: The long and winding road. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 48–54. [\[CrossRef\]](#)
51. Vanneste, S.; Friml, J. Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* **2009**, *136*, 1005–1016. [\[CrossRef\]](#)
52. Wang, R.; Estelle, M. Diversity and specificity: Auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2014**, *21*, 51–58. [\[CrossRef\]](#)
53. Lavy, M.; Estelle, M. Mechanisms of auxin signaling. *Development* **2016**, *143*, 3226–3229. [\[CrossRef\]](#)
54. Mason, M.G.; Ross, J.J.; Babst, B.A.; Wienclaw, B.N.; Beveridge, C.A. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6092–6097. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Qiu, Y.; Guan, S.C.; Wen, C.; Li, P.; Gao, Z.; Chen, X. Auxin and cytokinin coordinate the dormancy and outgrowth of axillary bud in strawberry runner. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Mori, Y.; Nishimura, T.; Koshiba, T. Vigorous synthesis of indole-3-acetic acid in the apical very tip leads to a constant basipetal flow of the hormone in maize coleoptiles. *Plant Sci.* **2005**, *168*, 467–473. [\[CrossRef\]](#)
57. Sun, T.P. Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. *Arab. Book/Am. Soc. Plant Biol.* **2008**, *6*, e01003. [\[CrossRef\]](#)
58. Rinne, P.L.; Paul, L.K.; Vahala, J.; Kangasjärvi, J.; van der Schoot, C. Axillary buds are dwarfed shoots that tightly regulate GA pathway and GA-inducible 1,3- β -glucanase genes during branching in hybrid aspen. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 5975–5991. [\[CrossRef\]](#)
59. Serova, T.A.; Tsyganova, A.V.; Tikhonovich, I.A.; Tsyganov, V.E. Gibberellins inhibit nodule senescence and stimulate nodule meristem bifurcation in pea (*Pisum sativum* L.). *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 285. [\[CrossRef\]](#)
60. Tanimoto, M.; Jowett, J.; Stimberg, P.; Rouse, D.; Leyser, O. pax1-1 partially suppresses gain-of-function mutations in *Arabidopsis* AXR3/IAA17. *BMC Plant Biol.* **2007**, *7*, 20. [\[CrossRef\]](#)
61. Ikeda, A.; Ueguchi-Tanaka, M.; Sonoda, Y.; Kitano, H.; Koshioka, M.; Futsuhara, Y.; Yamaguchi, J. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell Rep.* **2001**, *13*, 999–1010. [\[CrossRef\]](#)
62. Richards, D.E.; King, K.E.; Ait-Ali, T.; Harberd, N.P. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2001**, *52*, 67–88. [\[CrossRef\]](#)
63. Fu, X.; Harberd, N.P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **2003**, *421*, 740–743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Fu, X.; Richards, D.E.; Ait-Ali, T.; Hynes, L.W.; Ougham, H.; Peng, J.; Harberd, N.P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell Rep.* **2002**, *14*, 3191–3200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Matsuoka, M. Gibberellin signaling: How do plant cells respond to GA signals? *J. Plant Growth Regul.* **2003**, *22*, 123–125. [\[CrossRef\]](#)
66. Moore, R.; Dickey, K. Growth and graviresponsiveness of primary roots of *Zea mays* seedlings deficient in abscisic acid and gibberellic acid. *J. Exp. Bot.* **1985**, *36*, 1793–1798. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Alvey, L.; Harberd, N.P. DELLA proteins: Integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol. Plant.* **2005**, *123*, 153–160. [\[CrossRef\]](#)
68. Normanly, J.; Grisafi, P.; Fink, G.R.; Bartel, B. *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *Plant Cell Rep.* **1997**, *9*, 1781–1790.
69. Ostin, A.; Kowalczyk, M.; Bhalerao, R.P.; Sandberg, G. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 285–296. [\[CrossRef\]](#)
70. Boyer, N.; Gaspar, T. Redistribution cellulaire des peroxydases de la Bryone à la suite d'une irritation tactile et d'un traitement. *C. R. Acad. Sci. D* **1980**, *291*, 577–580.
71. Brunner, I.; Herzog, C.; Dawes, M.A.; Arend, M.; Sperisen, C. How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 547. [\[CrossRef\]](#)
72. Potocka, I.; Szymanowska-Pułka, J. Morphological responses of plant roots to mechanical stress. *Ann. Bot.* **2018**, *122*, 711–723. [\[CrossRef\]](#)
73. Jaffe, M.J.; Leopold, A.C. Callose deposition during gravitropism of *Zea mays* and *Pisum sativum* and its inhibition by 2-deoxy-D-glucose. *Planta* **1985**, *161*, 20–26. [\[CrossRef\]](#)

74. Patterson, D.T. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproductive development of goatsrue. *J. Range Manag. Arch.* **1992**, *45*, 449–453. [\[CrossRef\]](#)
75. Beier, M.P.; Tsugawa, S.; Demura, T.; Fujiwara, T. Root shape adaptation to mechanical stress derived from unidirectional vibrations in *Populus nigra*. *Plant Biotechnol.* **2020**, *37*, 423–428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Okamoto, T.; Takatani, S.; Motose, H.; Iida, H.; Takahashi, T. The root growth reduction in response to mechanical stress involves ethylene-mediated microtubule reorganization and transmembrane receptor-mediated signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **2021**, *40*, 575–582. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Kouhen, M.; Dimitrova, A.; Scippa, G.S.; Trupiano, D. The Course of Mechanical Stress: Types, Perception, and Plant Response. *Biology* **2023**, *12*, 217. [\[CrossRef\]](#)
78. Jacobsen, A.G.; Jervis, G.; Xu, J.; Topping, J.F.; Lindsey, K. Root growth responses to mechanical impedance are regulated by a network of ROS, ethylene and auxin signalling in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **2021**, *231*, 225–242. [\[CrossRef\]](#)
79. Singroha, G.; Sharma, P.; Sunkur, R. Current status of microRNA-mediated regulation of drought stress responses in cereals. *Physiol. Plant.* **2021**, *172*, 1808–1821. [\[CrossRef\]](#)
80. Ellis, M.; Egelund, J.; Schultz, C.J.; Bacic, A. Arabinogalactan-proteins: Key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 403–419. [\[CrossRef\]](#)
81. Showalter, A.M. Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1399–1417. [\[CrossRef\]](#)
82. Dolan, L.; Roberts, K. The development of cell pattern in the root epidermis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1995**, *350*, 95–99.
83. Itoh, J.I.; Nonomura, K.I.; Ikeda, K.; Yamaki, S.; Inukai, Y.; Yamagishi, H.; Nagato, Y. Rice plant development: From zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 23–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Bossy, A.; Blaschek, W.; Classen, B. Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1526–1533. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. MacMillan, C.P.; Mansfield, S.D.; Stachurski, Z.H.; Evans, R.; Southerton, S.G. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: Specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant J.* **2010**, *62*, 689–703. [\[CrossRef\]](#)
86. Nguema-Ona, E.; Coimbra, S.; Vicré-Gibouin, M.; Mollet, J.C.; Driouich, A. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: Distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* **2012**, *110*, 383–404. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Seifert, G.J. Fascinating fasciclins: A surprisingly widespread family of proteins that mediate interactions between the cell exterior and the cell surface. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1628. [\[CrossRef\]](#)
88. Seifert, J.; Kirchhelle, C.; Moore, I.; Contera, S. Mapping cellular nanoscale viscoelasticity and relaxation times relevant to growth of living *Arabidopsis thaliana* plants using multifrequency AFM. *Acta Biomater.* **2021**, *121*, 371–382. [\[CrossRef\]](#)
89. Tucker, M.R.; Lou, H.; Aubert, M.K.; Wilkinson, L.G.; Little, A.; Houston, K.; Shirley, N.J. Exploring the role of cell wall-related genes and polysaccharides during plant development. *Plants* **2018**, *7*, 42. [\[CrossRef\]](#)
90. Liu, G.; David, B.T.; Trawczynski, M.; Fessler, R.G. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 3–32. [\[CrossRef\]](#)
91. Shi, H.; Kim, Y.S.; Guo, Y.; Stevenson, B.; Zhu, J.K. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell Rep.* **2003**, *15*, 19–32. [\[CrossRef\]](#)
92. Gang, S.; Sharma, S.; Saraf, M.; Buck, M.; Schumacher, J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-Protocol* **2019**, *9*, 3230. [\[CrossRef\]](#)
93. Graham, H.D.; Thomas, L.B. Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 44–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Robinson, D.; Rorison, I.H. Root hairs and plant growth at low nitrogen availabilities. *New Phytol.* **1987**, *107*, 681–693. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Warszawa, 27.01.2025

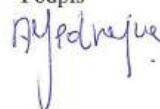
dr hab. Agata Jędrzejuk (prof. SGGW)
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
agata_jedrzejuk@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orłowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellin acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu eksperymentu, korekcie finalnej wersji manuskryptu, co stanowi 25% całej pracy.

Podpis



Warszawa, 27.01.2025

Mgr inż. Natalia Kuźma
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
natalia_kuzma@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orlowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pielęgnacji roślin w szklarni, wykonaniu analiz biochemicznych i pomiarów biometrycznych, wykonaniu części analiz statystycznych oraz przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu, co stanowi 55% całej pracy.

Podpis

Natalia Kuźma

Warszawa, 27.01.2025

Dr hab. Arkadiusz Orłowski (prof. SGGW)
Katedra Sztucznej Inteligencji
Instytut Informatyki Technicznej
SGGW w Warszawie
arkadiusz_orlowski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orłowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na konsultacjach związanych z analizą statystyczną otrzymanych danych, co stanowi 5% całej pracy.

Podpis



Warszawa, 27.01.2025

Mgr Robert Budzyński
Laboratorium Pomiarów Akustycznych
Instytut Informatyki Technicznej
SGGW w Warszawie
robert_budzynski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orłowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu technicznym związanym z pracą maszyny generującej stres, co stanowi 5% całej pracy.



Podpis

Department of Natural Sciences
Floriculture

Dr. Christian Gehl

To the Council of the Discipline of
Agriculture and Horticulture
Warsaw University of Life Sciences



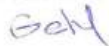
Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover
serek@zier.uni-hannover.de

Hannover, 29th January 2025

Statement of co-authorship

I hereby declare that in the paper by Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orłowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, my individual contribution consisted of consultations during the writing of the article, which is 5% of the entire paper.

Yours sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gehl".

Christian Gehl

Department of Natural Sciences
Floriculture

Prof.emeritus, Dr. Margrethe Serek



Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover
serek@zier.uni-hannover.de

To the Council of the Discipline of
Agriculture and Horticulture
Warsaw University of Life Sciences

Frederiksberg, 29th January 2025

Statement of co-authorship

I hereby declare that in the paper by Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Orłowski A., Budzyński R., Gehl C., Serek M. (2023) Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis, but does not affect auxin transport in axillary buds, as well as stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*, *Molecules*, 28(6), 2714, my individual contribution consisted of consultations during the writing of the article, which is 5% of the entire paper.

Yours sincerely,

Margrethe Serek
Professor emeritus of Floriculture

PUBLIKACJA B

The response of *Petunia ×atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors.

Kuźma, N., Klimek-Chodacka, M., Budzyński, R., Barański, R., Jędrzejuk, A.
Scientific Reports, (2025). 15,1583.



OPEN

The response of *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors

Natalia Kuźma^{1✉}, Magdalena Klimek-Chodacka², Robert Budzyński³, Rafał Barański² & Agata Jędrzejuk^{1✉}

In 1973, Jaffe identified and characterized the phenomenon of thigmomorphogenesis, also referred to as mechanical stress (MS) or mechanical stimulation in plants. Previous studies on petunia plants demonstrated that MS significantly affects growth dynamics. As a response to MS, petunias exhibit increased levels of indole-3-acetic acid (IAA) oxidase and peroxidase, although the active transport of endogenous IAA remains unaffected. Furthermore, earlier research has shown that MS inhibits the synthesis of IAA and gibberellin (GA₃), with noticeable effects on the 14th day of mechanical stimulation. The current experiment made on *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' focused on evaluating the morphological and physiological responses to MS, along with the expression of specific touch-responsive genes such as GH3.1, which is involved in auxin metabolism, and calmodulins (CaMs), playing an important role in stress responses. GH3.1 expression was found to be negatively correlated with IAA synthesis while positively correlated with GAs synthesis and IAA oxidase activity. Variable expression patterns were observed in the calmodulins: CAM53 and CAM81 expression positively correlated with IAA synthesis and plant height, whereas CAM72 expression was positively associated with GAs levels and IAA oxidase activity in plants touched 80× per day, but all of them were negatively related to IAA content and shoot increment, while positively related to GAs synthesis and IAA oxidase activity.

Keywords Touch stress, Thigmomorphogenesis, Auxin synthesis, Calmodulin, Gene expression

Under natural conditions, plants are exposed to touch stress caused by wind, rainfall, snowfall, and contact with neighbouring plants¹. The phenomenon of plant responses to such mechanical stresses was first described by Jaffe², and named thigmomorphogenesis. This refers to the ways in which plants adapt their growth and development in response to mechanical stimuli, including touch stress, encompassing alterations in shoot elongation, root development and their mechanical reinforcement, branching patterns, flowering etc.^{3–9}.

Plants subjected to prolonged touch stress undergo changes in their growth characteristics such as a reduction in growth rate leading to compact growth, inhibition of internode elongation, and increased diameter^{1,3,5,10–14}. However, the plant's response depends the type of touch stimulus (wind, brushing, pressure, vibration, or shaking), its frequency and duration, and its species, or even variety, specific^{2,5,12,13,15}. Moreover, the age of the tissue or organ on which mechanical stress acts is crucial. The younger the tissue or organ and the shorter the

¹Department of Environmental Protection and Dendrology, Institute of Horticultural Sciences, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland. ²Department of Plant Biology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Horticulture, University of Agriculture in Krakow, Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, Poland. ³Department of Artificial Intelligence, Warsaw, Institute of Information Technology, University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland. ✉email: natalia_kuzma@sggw.edu.pl; agata_jedrzejuk@sggw.edu.pl

terminal internode, the greater the potential for growth inhibition under touch stress¹⁶. Young plants respond more quickly, and when exposed to touch stress, they become more resistant to physical stimulus through shortening and thickening their stems^{17–19}. In the experiment by Jędrzejuk et al.⁵, touching *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Velvet Picotee' 80 times a day for a month resulted in a 43.2% reduction in plant size compared to the control. According to^{13–15}, tomato growth under touch (wind) stress was stunted, and plants were 26–36% shorter than controls. Growth inhibition in tomatoes under brushing was also observed in the experiments of Duman and Düzyaman⁴.

Growth inhibition is primarily associated with auxin synthesis^{3,12,20–23}. Auxins play crucial roles in various growth and developmental processes, including cell elongation, differentiation, and regulating plant responses to biotic and abiotic stresses²⁴. Particularly, Indole-3-acetic acid (IAA), serves as a common substrate for Gretchen Hagen 3 proteins (GH3)²⁵. The GH3 protein family, including GH3.1, possesses auxin amino acid synthase activity, converting active IAA into an inactive state by binding free IAA to amino acids^{26,27}. Through the treatments and degradation of the amino acid molecule and IAA, the plant can maintain homeostasis²⁸. The GH3.1 gene is responsible for the negative feedback regulation of IAA concentration²⁹. Excessive IAA levels lead to an upregulation of GH3 expression, resulting in the storage or degradation of amino acid-bound IAA. Upregulation of GH3 genes was observed in plants subjected to salt, heavy metal, cold, and drought stresses^{30–37}. The decreased free IAA content and plant dwarfing was observed in transgenic rice plants upregulating the OsGH3.1 gene of transgenic rice plants³⁸. Upregulation of the GH3-13 gene in rice subjected to drought stress reduced the level of free IAA and was an indicator of increased plant tolerance to stress^{39,40}. The effect of touch stress on GH3 gene expression has not yet been shown.

The inhibited plant growth is associated also with disruption of auxin synthesis and activation of IAA oxidase (IAAO) and peroxidase (POD)^{9,12,41}. IAAO activity might play a pivotal role in controlling endogenous IAA levels, and the relationship between the levels of IAA and IAAO activity is negatively correlated^{42–44}.

The interaction between IAA and gibberellins (GAs) has been also extensively studied^{45–48}. It was shown that auxins regulate GAs biosynthesis and signalling and both together, IAA and GAs, are responsible for regulating the elongation of the shoot while GAs are mainly responsible for flowering^{48–50}. Touch stress can lead to delayed flowering and a fewer flowers, thereby impacting the adjustment of flowering dates and flower intensity^{5,51–53}. Auxins likely mediate the floral transition through a positive interaction with GAs signalling by modulating GA levels or promoting DELLA protein degradation^{46,48,54}. In the recent experiment by Jędrzejuk¹², it was also observed that prolonged touch stress caused by 120 and 160 touches a day resulted in the arrest of IAA and gibberellic acid (GA₃) in plants.

One of the first measurable changes under touch stress involves an elevation in intracellular Ca²⁺ ions, serving as a secondary transmitter of mechanical signals in plants responding to various abiotic factors^{55–59}. Alterations in Ca²⁺ levels are thought to establish a connection between the mechanical stimulus and plant growth responses. Mechanical stimuli prompt the expression of diverse genes, including those encoding the CALcium MODULating protein (calmodulin; CaM) and CaM-related proteins^{10,60,61}. There is a common agreement that calmodulins play crucial roles in plant adaptation to stress and contribute significantly to plant defense^{62–64}.

Braam et al.¹⁰ discovered the existence of touch-induced genes (TCH), which encode for various proteins, including CaM, CaM-related, and a xyloglucan endotransglycosylase. TCH1 encodes CaM, TCH2 and TCH3 encode CaM-related proteins^{10,65,66}. An increased expression of these genes was observed 10–30 min after the onset of touch stress, but the expression was not suppressed after 1 h¹⁰. The expression levels of TCH2 and TCH4, encoding xyloglucan endotransglycosylase increased in inflorescence stems when increased weight was applied at the apex, resulting in enhanced secondary growth⁶⁵. Consequently, TCH regulation takes place not solely in response to mechanical stimuli but can also be triggered by mechanical strains potentially produced during morphogenesis^{67,68}. The unique regulatory property of the TCH proteins may elicit physiological and morphological adaptations in plants in response to environmental factors⁶⁷.

The purpose of the present work was to determine how touch stress affects the expression of selected touch stress-related genes, responsible for the plant reaction, especially the growth and flowering dynamics of *Petunia × atkinsiana*. Additionally, the study was designed to explore how touch stress affects these parameters over time and with varying levels of intensity.

Materials and methods

Four-week-old seedlings of *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor', with purple–white rays on the petals, were obtained from Volmary Polska Company. In early February, the plants were planted into 11 cm diameter pots into substrate dedicated for bedding plants and composed of high peat and wood fibers Ecofibrex, pH 5.5 (Kronen, Poland). The plants were placed on a table with an ebb and a flow bench (95 × 480 cm), in a greenhouse at the Warsaw University of Life Sciences, Poland.

The average temperature during the day was 22 °C and at night 18 °C. The relative air humidity was 75%. Conditions in the greenhouse were controlled by the HortiMax (Synopta software) climate computer.

Experimental design

Touch stress (mechanical stimulation) was applied to plants by brushing them 80 or 160 times a day, using a brushing instrument described in details previously⁵, for 56 days, from February 22nd till April 20th when the brushing instrument was turned off. Plants were further evaluated for the next 15 days until the 71st day of the experiment. The control plants were growing at the same time without brushing also for 71 days.

Evaluation of plant growth and flowering and sampling for biochemical analyses and determination of gene expression were done five times during the experiment, at the beginning (day 0) and 7, 14, 56 and 71 days after experiment started. Due to small size of the terminal shoot fragments at the beginning of experiments, IAA

content, IAAO activity and gene expression were not determined at day 0. In one vegetation season 90 plants were used, 30 plants in each of three treatments (control, 80× and 160× touching a day). The frequency of 80 and 160 touches per day was selected based on previous studies by Jędrzejuk et al.^{5,12}. In earlier research, plants subjected to 80 touches per day exhibited the most pronounced response to the treatment compared to those receiving 40 or 60 touches (see⁵). To further investigate the effect of touch intensity, subsequent experiments applied 80, 120, and 160 touches per day. The 120-touch treatment was excluded due to inconsistent plant responses, whereas plants exposed to 80 and 160 touches per day demonstrated clear and measurable reactions to stress.

In each treatment, 15 random plants were labeled by consecutive numbers and consistently evaluated for their growth and flowering in each of the indicated above five dates during the experiment, while the remaining 15 plants were sampled for analyses.

The experiments were conducted for 3 seasons (2020–2022) considered as independent replications. The results of biometric measurements and analyses of IAA content and IAAO activity are means from 3 seasons. The GAs content was determined in one season.

Biometric evaluation

The length of the main shoots of the plant was measured at each evaluation date and the increments between consecutive dates were calculated. The mean shoot increment per plant was then calculated.

The number of fully open flowers was counted at the beginning of flowering e.g. in the 30th day of the experiment, at the end of brushing (day 56), and at the end of the experiment (day 71).

Number of branches

Lateral shoots (side branches) were defined as shoots emerging from leaf axils along the main stem. Only shoots exceeding [e.g., 1 cm in length] were considered for counting. Each plant was inspected visually, and the number of lateral shoots on the main stem was recorded manually. The counting was performed from the base of the stem upwards, ensuring that no lateral shoots were missed. The count was done using a hand-held counter to maintain accuracy. The process was repeated for 15 plants per treatment, and the average number of lateral shoots per plant was calculated. Replications were carried out to ensure statistical reliability.

Biochemical analyses

For biochemical analyses, 1.5 cm shoot terminal fragments of 1.5 cm in length, including the apical meristems, were taken from three random selected plants at each observation date. The samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until analysis.

The dry weight (DW) was determined by drying samples at 105°C until a constant weight was obtained.

IAA content

The content of free IAA was determined according to a method with the Salkowski reagent Gang et al.⁶⁹ and by measuring absorbance at 520 nm using the Shimadzu UV-1280 (Shimadzu, Japan) spectrophotometer. The IAA content was expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.

IAAO activity

The IAA oxidase activity was determined according to Zhang⁷⁰. Absorbance was measured at 530 nm using the UV1600 spectrophotometer (AOE Instruments, Shanghai). Three replicates were performed for each treatment. Results were expressed in μg IAA per g^{-1} DW per hour. It is assumed that 1 unit [IU] of IAA oxidase degrades in 1 h.

General gibberellins content

Total GAs content was determined according to the method of Graham and Thomas⁷¹. The method is effective in determining endogenous GA_1 , GA_4 , and GA potassium salts. The method does not determine auxins and cytokinins. Absorbance was measured spectrophotometrically at 430 nm by using the UV1600 instrument (AOE Instruments, Shanghai). The blank sample was distilled water. The content of total GAs was determined according to the curve for GA_1 and expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the General Linear Model program Statgraphics Centurion XIX 2019. ANOVA1 was used for biometric and biochemical analyses, and means were compared using the LSD test. Statistical analysis was made in each term separately. The significance level was $\alpha=0.05$.

Correlations between variables were assessed using Pearson's correlation coefficient (r). Correlation analysis were performed using Statgraphics Centurion XIX 2019, with a significance level set at $p<0.05$. The results of the correlation have been included in the supplementary (supplementary Table S1 and S2).

Gene expression

Gene expression was determined by real-time quantitative PCR. Plant material was collected on 4 dates: 7 and 14 days after the experiment started, 56 days after experiment started (end of MS process) and 71 days after the experiment started (15 days after MS was turned off, to check plant behaviour). 1.5 cm stem apical meristems were taken. Material was collected from 9 plants (divided into three blocks of three plants in each treatment) into sterile cryoprobes. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen. The analysis was carried out in 2022.

Total RNA was isolated using the Direct-zol RNA MiniPrep Plus kit with TRI Reagent (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and followed by DNase I treatment (Thermo Fisher Scientific). RNA purity were estimated on the NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). RNA purity was checked by PCR and

qPCR on the RT⁺ control. cDNA was synthesized using the NG dART RT kit (EURx). Quantitative RT-PCR was performed in triplicate using the QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) with the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), with the primers listed in Supplementary Figure (Table S3). Primers were validated for single product specificity and their effectiveness to range between 90 and 105%.

Real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min denaturation at 95 °C and 40 cycles of amplification (10 s at 95 °C, 45 s at 55 °C). Product melting curves were generated following PCR to ensure purity of the amplification products.

Normalization was done to the expression of the *PhCYP* gene. The Pfaffl method was applied to calculate the relative gene expression and the randomization test with default 10,000 random reallocations to test the statistical significance of calculated expression ratios of the sample to the control was performed using the REST 2009 (Qiagen) software⁷². The difference between mean expressions was considered significant at $p < 0.05$.

Results

Touch stress affected shoot growth but did not arrest a number of flowers

Touch stress significantly affected plant architecture and number of flowers (Figs. 1 and 2). The habitat of stressed plants was more compact, with a higher number of later shoots compared to control. The shoots of stressed plants were thicker (unpublish data).

In this study, the *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' plants of all treatments reached full flowering on the 30th day of the experiment. On this date, plants stressed with 160× had statistically the highest number of flowers (ca. 3 flowers/plant) (Fig. 2). On the 56th day of the experiment, the differences in flowering between the stressed and control plants was more significant. Plants stressed 80 and 160 times a day had significantly more flowers (12.67 and 16.27, respectively) than control plants. At the last measurement date (71st day of the experiment), there were also more flowers in stressed plants (ca. 29 flowers in both treatments) than control plants (24 flowers/plant).

The effect of mechanical stress (MS) on the number of branches was observed (Fig. 3). Thirty days after the onset of MS, the highest number of branches was recorded in plants subjected to 160 touches per day, with an average of 13.53 branches. Fifty-six days after the experiment began, plants exposed to touch stress exhibited a significantly higher number of branches compared to the control group (Fig. 3). However, fifteen days after the cessation of MS, no significant differences in branch numbers were observed across all treatment groups.

The effect of mechanical stress on plant growth dynamics was observed (Fig. 4). The first differences in plant height were visible from the 7th day of the experiment (Fig. 4). On the 7th day of stress, plants touched 80 times a day were shorter than the control, which was not seen in plants stressed 160 times a day. The increase in height for plants touched 80 times a day was 1.66 cm, while in plants stressed most intensively (160 times) the increase was almost twice as much (3.02 cm) (Fig. 5).

On the 14th day of stress, plants touched 80 times a day were the shortest compared to the other treatments (Fig. 4). There were statistically significant differences in shoot increment between treatments (Fig. 5). The smallest increment was observed in plants treated 160× per day (4.5 cm), while the increment in control plants was the highest (5.21 cm).

On the 56th day of stress, the stressed plants were statistically shorter (ca. 22 cm) than the control plants (26.9 cm) (Fig. 4). In addition, there were no statistically significant differences between those stressed 80 and 160 times a day. When analyzing the shoot increment, there was a statistically significant difference between all examined plants (Fig. 5).



Fig. 1. *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' subjected to mechanical stimulation, on the 30th day of the experiment (beginning of full flowering). From left: control (without touch stress), 80 and 160 touches per day.

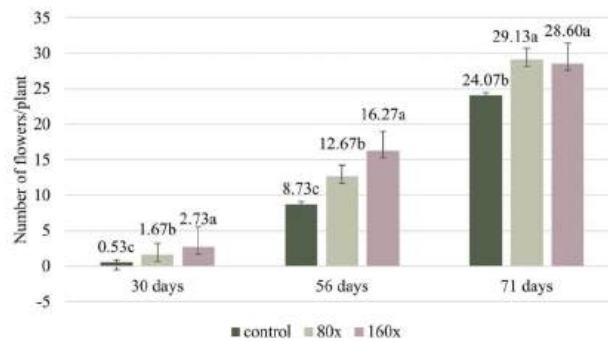


Fig. 2. Effect of mechanical stress on flowering dynamics. Number of petunia flowers subjected to mechanical stimulation (MS) depending on the intensity of stress; subjected to control, 80 and 160 cycles per day of mechanical stimulation, 30th day of the experiment (beginning of full flowering). 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

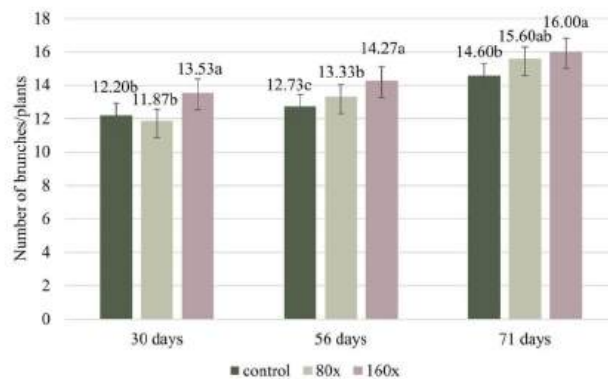


Fig. 3. Effect of mechanical stress on the number of branches. 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons the data trends were consistent.

On the 71st day of the experiment, plants stressed 160 times a day were the tallest among all treatments (37 cm), while those touched 80 times a day were the shortest (30.1 cm). At the same time, there were also statistically significant differences in shoot growth dynamics (Fig. 5).

IAA content, IAA oxidase activity, and GH3.1 gene expression

IAA content varied irrespective of stress duration and the intensity of stimulation (Fig. 6). Significant statistical differences were observed on day 14 of the experiment. Stressed plants had significantly lower IAA content relative to the control. Plants stressed 80 times a day had the lowest IAA content of all treatments (190.38 ng·g⁻¹ DW). Fifteen days after the end of the experiment (71th day), no statistically significant differences were observed between all treatments.

On day 14 of the experiment, a significant increase in IAAO activity was observed in stressed plants compared to the control (Fig. 7). On the 56th day of the experiment, plants touched 80 times a day had the lowest IAAO

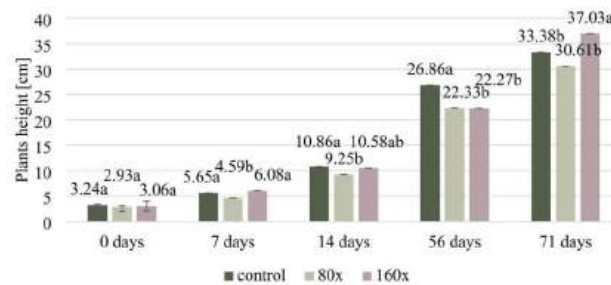


Fig. 4. Growth dynamics of stressed plants- Plant height [cm]. 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P=0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

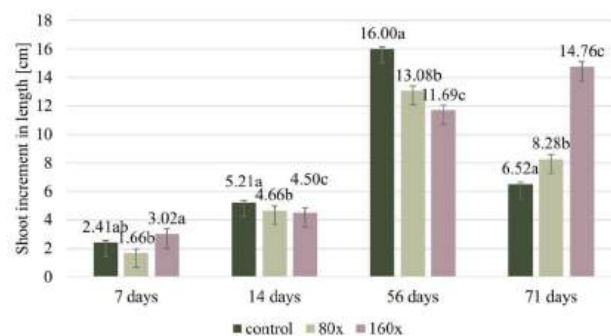


Fig. 5. Growth dynamics of stressed plants- Shoot increment [cm]. 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P=0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

activity of all the treatments and at the same time low IAA content (Fig. 6). Fifteen days after the end of the experiment (71th day), no statistically significant differences were observed between the treatments.

On the 14th day of the experiment, GH 3.1 was up-regulated under stress in each treatment (Fig. 8). Simultaneously, on this date, plants subjected to 80 and 160 stress cycles per day exhibited higher IAA oxidase activity than control plants (Fig. 7). On day 56 of the experiment, plants stressed 160 times a day showed up-regulation of the GH3.1 gene. On day 71 of the experiment, plants stressed 160 times a day were characterized by upregulation of the GH3.1, despite similar IAA oxidase activity as in the other treatments (Fig. 7) and a marked difference in growth compared to the control (Fig. 4).

Total gibberellins content

The total content of gibberellins exhibited variations based on the duration of stress and the treatment (Fig. 9). On day 14 of the experiment, the stressed plants also showed a statistically higher total gibberellins content. Plants stressed 80 per day had the statistically highest content of total gibberellins ($11.04 \text{ ng g s.m.}^{-1}$) (Fig. 10).

However, on day 56 of stress, an inverse relationship was observed. The control plants had the statistically highest content of total gibberellins ($9.64 \text{ ng g s.m.}^{-1}$). The lowest content was recorded in plants stressed 160 times daily ($5.48 \text{ ng g s.m.}^{-1}$). On day 71 (after the stress), the stressed plants had higher or comparable total gibberellins content (8.93 and $7.61 \text{ ng g s.m.}^{-1}$, respectively) compared to the control ($7.86 \text{ ng g s.m.}^{-1}$).

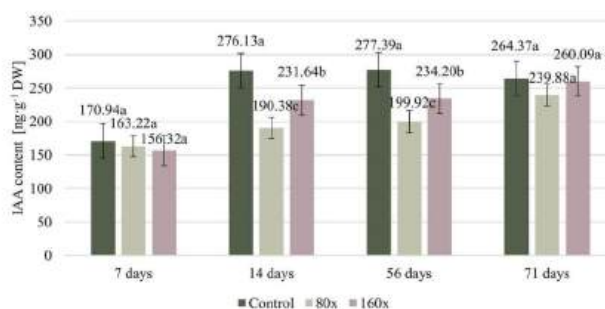


Fig. 6. IAA content (ng g^{-1} DW), analyzed separately, of petunias subjected to MS depending on stress intensity duration. 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

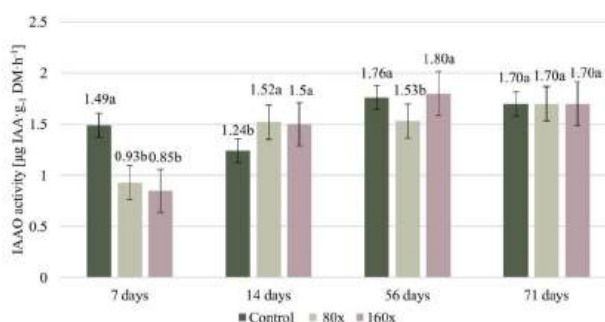


Fig. 7. IAAO activity ($\mu\text{g IAA g}^{-1} \text{DM h}^{-1}$) of petunias subjected to MS depending on stress intensity duration (analyzed separately). 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

Calmodulin-encoding genes (CaM72, CaM53 and CaM81)

In the current experiment, the expression of three genes (CaM72, CaM53 and CaM81) encoding calmodulin synthases was investigated. On the 7th day of stress, an increase in the expression of CaM53 and CaM81 was observed in plants touched 80 times per day (Figs. 11, 12). In contrast, no expression of the CaMs tested was observed in plants stressed 160 times a day.

After next 7 days, upregulation of the CaM72 and CaM53 gene was observed in all treatments (Figs. 10, 11). Moreover, plants subjected to 160 touches per day showed an upregulation in CaM81 gene expression.

Following the 56th day of touch stress, all the examined calmodulin-encoding genes in all treatments displayed upregulation (Figs. 10, 11, 12). Fifteen days after the machine was turned off, both the CaM72 and CaM53 genes in all treatments were also observed to be upregulated (Figs. 10, 11).

III Correlation of biochemical parameters and gene expression in plants stressed 160 times a day

A strong correlation was observed between plant appearance and changes at the physiological and molecular levels in plants stressed 160 times a day.

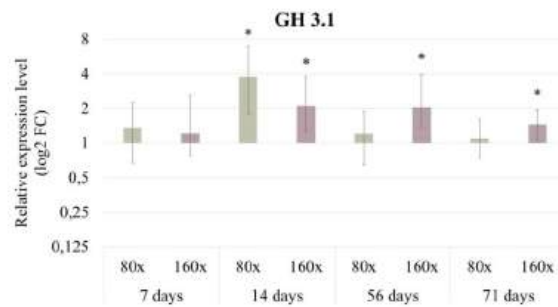


Fig. 8. Relative expression of the GH 3.1-synthetase gene IAA (EST884899). The fold change (FC) in relative expression level was normalized to nontreated samples (control). Error bars represent mean $\pm$ standard deviation (SD) with three biological replicates and three technical replicates. Values are the mean $\pm$ SD. * $P < 0.01$.

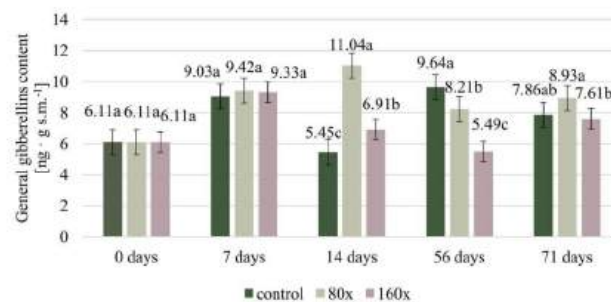


Fig. 9. General gibberellins content (ng · g s.m.⁻¹) of petunias subjected to MS depending on stress intensity duration. 15 plants in each block from each treatment were measured. The letters represent the statistical differences ($\alpha \leq 0.05$) between the treatments; means labeled with the same letter do not differ significantly ($P = 0.05$); a represents the highest value. Data and standard error bars are representative of three independent replications, where each replication is an average from each season (2020, 2021, 2022). Across all seasons, the data trends were consistent.

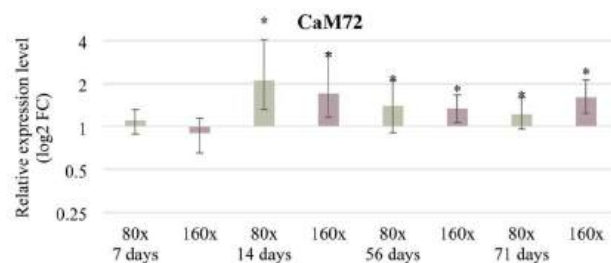


Fig. 10. Relative expression of calmodulin-encoding gene (CaM72). The fold change in relative expression level was normalized to nontreated samples (control). Error bars represent mean $\pm$ SD with three biological replicates and three technical replicates. Values are the mean $\pm$ SD. * $P < 0.01$.

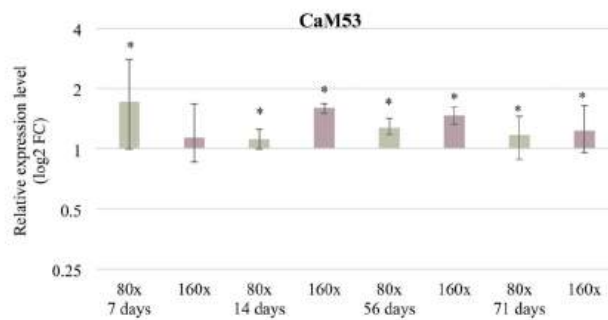


Fig. 11. Relative expression of calmodulin-encoding gene (CaM53). The fold change in relative expression level was normalized to nontreated samples (control). Error bars represent mean $\pm$ SD with three biological replicates and three technical replicates. Values are the mean $\pm$ SD. * $P < 0.01$.

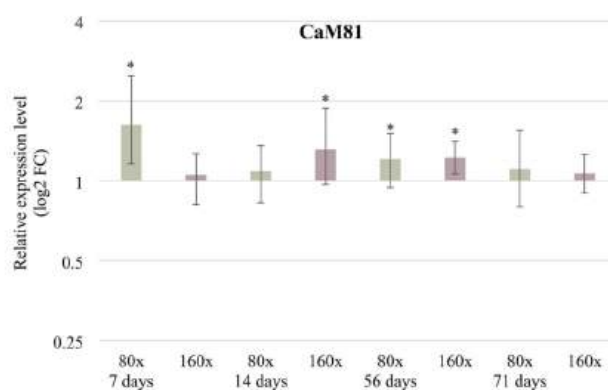


Fig. 12. Relative expression of calmodulin-encoding gene (CaM81). The fold change in relative expression level was normalized to nontreated samples (control). Error bars represent mean $\pm$ SD with three biological replicates and three technical replicates. Values are the mean $\pm$ SD. * $P < 0.01$.

GH3.1

In plants stressed 160 times a day, a high negative correlation was observed between GH3.1 and IAA content (-0.803 ; $p < 0.01$) (Suppl. Tab. S2). Additionally, a very high correlation was observed in the GH3.1 gene and IAA oxidase activity (0.861 ; $P < 0.01$), as well as a negative correlation between GH3.1 and shoot increments (-0.969 ; $P < 0.01$).

Calmodulins

In plants stressed 160 times a day, a very high positive correlation was observed between GH3.1 and CaM81 as well as CaM53 (0.959 ; 0.985 ; $p < 0.001$, respectively) (Suppl. Tab. S2). Considering the correlation of CaM81, CaM53, and CaM72 expression with growth dynamics (total plant height and shoot increments), it was found that in plants stressed 160 times a day, CaM53 and CaM81 expression did not affect growth inhibition (0.851 ; 0.756 ; $P < 0.01$, respectively). However, a strong negative correlation was observed between CaM81 and CaM53 and shoot increments (-0.873 ; -0.911 ; $P < 0.01$, respectively).

Discussion

Touch stress affects shoot growth but does not arrest the number of flowers

In response to the touch stimuli, there is an inhibition of growth rate, reduction in internode length, radial growth and more compact growth habits^{1,3,5,11–15,73,74}. According to Autio et al.⁷⁵, stroking plants for as little as 60 min/day allows for a significant reduction in height. *Petunia* (*Petunia $\times$ atkinsiana*) growth was reduced by

18%, while Aster (*Aster dumosus*) by 25%. No such effect was noted in the dusty miller (*Jacobaea maritima*). In the current experiment, after 56 days of stress, a reduction in petunia growth of 16.86% and 17.09% was observed in plants subjected to 80 and 160 touches a day, respectively compared to the control. The experiment by Autio et al.⁷⁵ also indicated that the rate of plant response varied among species.

These changes are often linked to alterations in auxin synthesis and distribution, as auxin is crucial in regulating plant growth and response to environmental stimuli. Touch stress can alter auxin pathways, leading to a redistribution of the hormone and consequently modifying growth patterns, especially in height and number of branches^{5,76–78}. Several research indicates that the susceptibility of a plant to a stimulus, however, depends on the species, the age of the tissue or the type of mechanical factor^{14,16,79,80}. Auxin synthesis and transport are particularly sensitive to these mechanical cues, with increased mechanical stress often inhibiting auxin flow to growing regions, thereby reducing internode elongation and plant height^{16,81}. There was a decrease in auxin levels in *Bryonia dioica* as a result of mechanical stress (brushing), and an increase was observed in *Phaseolus vulgaris* as a result of brushing⁷⁶. The increase in auxin levels was explained by slowed transport of IAA in internodes and accumulation of IAA in the stem. In an experiment by Mitchell⁷⁷, inhibition of polar auxin transport in stems due to stem rubbing was observed in peas. In an experiment by Jędrzejuk et al.³, Petunia cv. 'Pegasus Velvet Picotee' stressed 80 times a day showed a high increase in endogenous IAA, and a concomitant inhibition of elongation growth, which was explained by a disruption of polar auxin transport rather than IAA synthesis. In the current experiment, it was observed that the first differences in growth were visible as early as 7 days after the onset of stress. On the 7th day of stress, plants touched 80 times a day were shorter than the control. Interestingly, the growth dynamics of the most intensively stressed plants were twice as much as those stressed 80 times. However, reduction in plant height as a result of mechanical stress and differences in growth dynamics compared to unstressed plants were evident throughout the experiment (except on the 14th and 71st days). On the 14th day of the experiment, no statistically significant differences were observed between the stressed and control plants. However, differences in growth dynamics were apparent. Stressed plants exhibited the smallest growth rates compared to the control. Jędrzejuk et al.¹² reported similar findings, indicating no differences in shoot growth for plants stressed on day 14th. The absence of statistically significant differences in growth on the 14th day of the experiment, despite visible differences in growth dynamics, can likely be attributed to changes in endogenous auxin content and its regulation. According to the findings, IAA levels were significantly lower in stressed plants, particularly in those touched 80 times a day, by day 14. This decrease in IAA could inhibit elongation growth, but the reduction may not have been large enough to produce statistically significant differences in overall plant height at that point. However, the growth dynamics differ because the plants were still responding to mechanical stress by altering their hormonal balance. During mechanical stress increased activity of IAA oxidase, which degrades IAA, slowing the growth of stressed plants was visible, compared to controls. This disruption in auxin homeostasis may explain why stressed plants had reduced growth increments without showing clear height differences by day 14. Over time, these dynamics would become more pronounced, leading to more significant growth differences later in the experiment.

The number of branches, flowers, and total gibberellin content were closely related and dependent on the duration and intensity of touch stress stimulus, as indicated in the literature^{5,12,51,82,83}. According to Fu and Harberd⁴⁷ and Paponov et al.⁸⁴, gibberellins and auxins, in response to stress conditions, work together to stimulate DELLA accumulation and subsequently increase ROS uptake capacity and abiotic resistance. Touch stress typically stimulates the production of lateral shoots while simultaneously inhibiting the elongation of the main shoot. In the present experiment, by day 56, it was observed that stressed plants exhibited an increase in the number of lateral shoots alongside a reduction in shoot elongation and a slowdown in growth dynamics. This relationship can be explained by the interaction between auxins and gibberellins. On day 56, stressed plants showed an increase in IAA synthesis (compared to day 14), while the content of total gibberellins decreased over time (analyzing data from day 14 and day 56).

An increase in the number of lateral shoots often correlates with an increased number of flowers in stressed plants^{85,86}. According to Morel et al.⁸⁵ and Vernieri et al.⁸⁶, touched plants produced more flowers, although their diameters were smaller. Conversely, in the experiment by Jędrzejuk et al.³, plants subjected to 40, 60, and 80 touches per day, led to a reduction in flower numbers, decreasing from 36 to 21 in *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Velvet Picotee'. However, in the same experiment, the 'Dark Red' variety responded differently: stroking increased the number of flowers from 11 in the control group to 22 in the group touched 80 times. In both varieties, no significant impact of stress on flower diameter was observed (unpublished data). Onguso et al.⁵³ and Salehi and Salehi⁸³ also reported no impact of mechanical stress on flower number. In the current experiment, stressed plants flowered earlier and produced more flowers than the control group. This phenomenon may also prove the individual characteristics of genera, but also a variety. The response of studied petunias can be partly attributed to the role of gibberellins in promoting flowering. In the early stages of stress, gibberellin levels increased, promoting flower formation. However, prolonged touch stress, as observed on day 56, led to a significant reduction in GA content in severely stressed plants. According to Colebrook et al.⁸² and Castro-Camba et al.⁸⁷, reduced GA content enhances abiotic stress tolerance, while increased GA content diminishes it. In current experiment increased GA content leading to increased number of flowers, may be positively found in commercial horticulture.

According to Achard et al.⁸⁸, DELLA proteins, key components of GA signalling, contribute to the growth inhibition of stressed plants and enhance stress tolerance through a shared mechanism. Based on the findings of Jędrzejuk et al.¹², growth inhibition and reduced GA₁ content under touch stress are already evident by day 30.

In the current experiment, the content of total GAs was also decreasing alongside touch stress duration, that was evident on day 56. Based on these findings, it may be claimed that decrease of GAs in stroked flowers is a defence against touch stress. Therefore, future investigations should focus on tracking changes in DELLA

protein content under touch stress at higher frequencies, and assessing the levels of free proline, and other osmoprotectants involved in regulating cellular homeostasis.

What are the relations between IAA content, IAA oxidase activity and GH3.1 gene expression in plants subjected to mechanical stimulation?

The alterations in shoot length in response to a touch stimulus are primarily attributed to disruptions in the synthesis of plant hormones, such as auxins^{89,90}. Stress conditions can affect both IAA oxidase activity and IAA gene expression^{91–93}. It has been proposed that IAA oxidase (IAAO) activities may help regulate IAA content^{94,95}. IAAO is usually involved in auxin catabolism and negatively correlated with IAA levels, thereby regulating the concentration of IAA^{94,96}. Several authors^{97–101}, claim that growth reduction during MS is a consequence of the IAA oxidation and an increase in the IAA oxidase, as well as other enzymes activities^{101,102}.

In the current experiment, mechanical stimulation led to observable changes in both IAA content and IAAO activity, with a significant negative correlation between these two parameters. On the 14th day of the experiment, IAA content was reduced in stressed plants, particularly in those touched 80 times per day, and this reduction was associated with an increase in IAAO activity, indicating that auxin catabolism was actively contributing to the regulation of growth under stress conditions. This relationship aligns with previous studies showing that mechanical stimulation increases IAAO activity, resulting in reduced auxin levels and growth inhibition^{97,103,104}. In research made by Jędrzejuk et al.⁵ in petunia 'Pegasus Velvet Picotee' the IAA oxidase activity was higher in brushed plants than in the controls during touch stress duration. This effect was not observed in petunia 'Dark Red'.

Alongside IAAO activity, the GH3.1 gene, which encodes an enzyme involved in auxin conjugation, was also upregulated in response to mechanical stress. GH3 expression is associated with enhanced stress tolerance, particularly in plants exposed to drought, cold, or salinity stress^{32,33,40}. The GH3 family of enzymes is known to mediate plant responses to various stress factors by regulating auxin homeostasis through conjugation of free IAA to amino acids, thus rendering it inactive^{32,35,105}. In the current experiment, it was observed that touch stress affected GH3.1 upregulation, with both treatments yielding a negative correlation with IAA content and shoot increment and a positive correlation with IAAO activity. On the 14th day of MS, the negative correlation between IAA synthesis and IAAO activity as well as GH3.1 upregulation, was observed. On the 56th day of the experiment, upregulation of GH3.1 was observed only in plants subjected to 160 strokes per day. There was significant difference in IAAO activity and IAA synthesis between control and plants stroked 160× per day. Increased production of an IAA-conjugating GH3 enzyme was definitely associated with growth inhibition, closely linked to increased stress resistance. Since 56 day of the experiment plants obtained homeostasis in growth dynamics and thus, decreased IAAO activity connected with lower GH3.1 expression may be an explanation. This suggests that the combination of increased auxin oxidation and conjugation serves as a feedback mechanism to modulate auxin levels under prolonged stress, contributing to growth inhibition.

Interestingly, 15 days after stress cessation, touched plants (especially those stroked 160 times per day) showed the highest growth, indicating a delayed compensatory response, likely caused by overproduction of auxin after stress removal. This rebound effect may result from the plant's strategy of overproducing IAA in response to long-term stress, allowing for rapid growth after stress is removed. Abiotic stress including MS, causes overproduction of reactive oxygen species (ROS), detrimental to cell components¹⁰⁶. ROS overproduction in plant tissues may damage membranes, macromolecules, affect cellular metabolism and play a crucial role in cellular damage¹⁰⁷. The main ROS generated in plant cells under stress conditions are hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide ($O_2^{\cdot -}$) radicals. Their deleterious effects are usually neutralized by enzymes such as catalases and peroxidases produced by plants¹⁰⁸. The main role of plant biostimulants in plant production is to improve plant metabolic processes without changing their natural pathway and also by interacting with plant signaling cascades thereby reducing negative plant reactions to stress¹⁰⁹. In previous experiments made by Jędrzejuk et al.^{5,12} on petunia, increased peroxidase levels, during MS were observed, playing the role in arrestment of IAA synthesis, but also defending leading to cellular walls lignification. Although other free radicals scavengers in petunia were not tested in MS, it can be assumed, based on the literature data and the results obtained in the current experiment, that the plants actively defended themselves against oxidative stress^{110,111}.

Does calmodulin related genes expression modulate GH3.1 activation?

Stresses initiate a signal-transduction pathway, which contributes to increased cytosolic Ca^{2+} that stimulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent activity (Ca^{2+} /CaM)¹¹². In the experiment of Cholewa et al.¹¹³, it was observed that after exposure of the plant to cold or hypoxia, activation of Ca^{2+} /CaM occurs. The upregulation of calmodulin-related genes (CaM53, CaM72, and CaM81) during mechanical stress highlights the critical role of calcium signaling in plant adaptation to environmental stimuli. Calmodulins act as calcium sensors and mediators, playing a pivotal role in regulating cellular processes during stress¹¹². In this experiment, all three calmodulin-related genes showed increased expression by day 56, indicating that the plants experienced significant stress, regardless of the intensity of the mechanical stimulation. This finding aligns with studies that demonstrate the activation of calmodulin pathways in response to various abiotic stresses, such as cold and hypoxia¹¹³.

In the present experiment, a strong correlation was observed between GH3.1 gene expression and some calmodulin genes, with patterns dependent on the intensity of mechanical stimulation. At 80 touches per day, GH3.1 expression was significantly correlated with CaM72, suggesting that this calmodulin plays a critical role in regulating GH3.1 under moderate stress. In contrast, under more intense stress (160 touches per day), GH3.1 expression was correlated with CaM53 and CaM81, indicating that these calmodulins are more active in plants subjected to higher stress levels. The variation in calmodulin-GH3.1 correlations based on stress intensity suggests that different calmodulin-related genes may be activated in response to varying levels of mechanical stress. This could imply a hierarchical response mechanism, where CaM72 is sufficient to regulate auxin homeostasis under

moderate stress, while more severe stress conditions require the involvement of CaM53 and CaM81 to maintain auxin balance and prevent growth inhibition. The upregulation of these calmodulins under severe stress could be necessary to manage the elevated levels of calcium ions triggered by the stronger mechanical stimulus.

Interestingly, even 15 days after the cessation of mechanical stress, upregulation of CaM53 and CaM72 was still observed, suggesting that the plants continued to cope with the residual effects of the stress. This prolonged upregulation may indicate the initiation of a post-stress adaptation process, where calcium signaling remains active to help the plant recover and maintain homeostasis. According to Brenya et al.¹¹⁴ in the absence of mechanical stress, most transcripts return to abasal expression level, although some can persist to show a modified gene expression for several days poststimulation. Further investigation is required to understand how long calmodulin-related genes remain upregulated after stress and whether this contributes to long-term resilience in plants.

The strength of touch stress clearly influenced the expression of both calmodulin-related genes and GH3.1. Plants subjected to 160 touches per day showed higher levels of GH3.1 and calmodulin gene expression compared to those touched 80 times per day. This suggests that the intensity of the mechanical stimulus plays a crucial role in determining the degree of stress response, with more severe stress leading to greater activation of both calcium signaling and auxin regulation pathways.

Conclusions

- Mechanical stimulation (MS) influences the morphology and physiological responses of *Petunia 'Pegasus Special Burgundy Bicolor'*, including growth, branching, and flowering dynamics. In this study, flowering presents an unexpected outcome. Contrary to most literature, plants exposed to MS exhibited an increase in both the number of branches and flowers. Indole-3-acetic acid (IAA) content was positively correlated with growth dynamics; however, no significant correlation was observed between total gibberellin (GA) content and flowering.
- The expression of studied TCH genes is not significantly correlated with *petunia* physiological data as a response to touch stress. It also depends on stress impact.
- Calmodulin expression is mostly convergent with GH3.1 beginning of the 14th day of the experiment; the correlation between GH3.1 and subsequent CaMs may differ depending on stress impact. It confirms the thesis that calmodulin activation may modulate auxin-related pathways, which include the expression of genes like GH3.1.

Data availability

Data is provided within the manuscript or supplementary information files (Supplementary Table S4).

Received: 18 April 2024; Accepted: 4 December 2024

Published online: 10 January 2025

References

1. Gardiner, B., Berry, P. & Moulia, B. Review: Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. *Plant Sci.* **245**, 94–118 (2016).
2. Jaffe, M. J. Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation: with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta*. **114**, 143–157 (1973).
3. Biddington, N. L. & Dearman, A. S. The effect of mechanically induced stress on the growth of cauliflower, lettuce and celery seedlings. *Ann. Bot.* **55**, 109–119 (1985).
4. Düzyaman, E., Duman, I. Dried tomato as a new potential in export and domestic market diversification in Turkey. In *VIII Int Symp on the Processing Tomato*, **613**: 433–436 (2002).
5. Jędrzejuk, A., Kuźma, N., Nawrot, K., Budzyński, R. & Orłowski, A. Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content, and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*. *Sci. Hortic.* **274**, 109661 (2020).
6. Jia, Y., Wang, B., Wang, X., Duan, C. & Yang, X. Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H⁺-ATPase activity of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). *Colloids Surface B* **27**, 65–69 (2003).
7. Li, H., Zhang, X., Meng, W. & Ge, L. Visualization of tomato growth based on dry matter flow. *Int. J. Comput. Games Tech.* **230**, 27–31 (2017).
8. Liu, Z., Fadiji, T., Yang, J., Li, Z. & Tchuente-Magaia, F. Impact of mechanical stimulation on the life cycle of horticultural plant. *Hortic. Plant J.* **9**(3), 381–394 (2023).
9. Zhao, H., Zhao, H., Wang, J., Wang, B. & Wang, Y. Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids Surf B Biointerfaces* **43**(3–4), 174–178 (2005).
10. Braam, J. & Davis, R. W. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*. **60**(3), 357–364 (1990).
11. Hamant, O. Widespread mechanosensing controls the structure behind the architecture in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**(5), 654–660 (2013).
12. Jędrzejuk, A. et al. Mechanical stimulation decreases auxin and gibberellic acid synthesis but does not affect auxin transport in axillary buds: it also stimulates peroxidase activity in *Petunia x atkinsiana*. *Molecules*. **28**(6), 2714 (2023).
13. Sparke, M. A., Müller, J., Rüttensperger, U., Heesch, F. & Wünsche, J. N. Growth regulation by air stream-based mechanical stimulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)-Part I: Optimization of application frequency and intensity. *Sci. Hortic.* **304**, 111–252 (2022).
14. Sparke, M. A. et al. Air-based mechanical stimulation controls plant height of ornamental plants and vegetable crops under greenhouse conditions. *HortTech*. **31**(4), 405–416 (2021).
15. Sparke, M. A. et al. Growth regulation by air stream-based mechanical stimulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)-Part II: Phenotypic and physiological responses. *Sci. Hortic.* **305**, 111–359 (2022).
16. Sparke, M. A. & Wünsche, J. N. Mechanosensing of plants. *Hortic. Rev.* **47**, 43–83 (2020).
17. Jeong, H., Lee, H., Hwang, H., Kim, E. & Hwang, S. Growth suppression of tomato plug seedlings as affected by material type for brushing stimulation. *J. Bio-Env. Con.* **29**, 313–319 (2020).
18. Kim, Y. et al. Regulation of reactive oxygen and nitrogen species by salicylic acid in rice plants under salinity stress conditions. *PLoS one*. **13**(3), 0192650 (2018).

19. Monshausen, G. B. & Gilroy, S. Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol.* **19**(5), 228–235 (2009).
20. Hwang, H., Jeong, H., Kim, H. & Hwang, S. Application of mechanical stimulation for overgrowth retardation to tomato grafted seedlings using air circulation fans in greenhouse. *Int. Soc. for Hortic. Sci.* **1296**, 241–246 (2019).
21. Li, W., Pang, S., Lu, Z. & Jin, B. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants. *Plants* **9**(11), 1515 (2020).
22. Safaei Far, A., Rezaei Nejad, A., Shahbazi, F. & Mousavi-Fard, S. The effects of simulated vibration stress on plant height and some physical and mechanical properties of *Coleus blumei* Benth. *Int. J. Hortic. Sci.* **6**(2), 273–282 (2019).
23. Wang, Y. et al. Effects of shaking on the growth and mechanical properties of *Hedysarum laeve* may be independent of water regimes. *Int. J. Plant Sci.* **169**, 503–508 (2008).
24. Sauer, M., Robert, S. & Kleine-Vehn, J. Auxin: Simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**(9), 2565–2577 (2013).
25. Westfall, C. S. et al. Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Sci.* **336**(6089), 1708–1711 (2012).
26. Bernales, M. et al. Expression of two indole-3-acetic acid (IAA)-amido synthetase (GH3) genes during fruit development of raspberry (*Rubus idaeus* Heritage). *Sci. hortic.* **246**, 168–175 (2019).
27. Peat, T. S. et al. Crystal structure of an indole-3-acetic acid amido synthetase from grapevine involved in auxin homeostasis. *Plant Cell* **24**(11), 4525–4538 (2012).
28. Staswick, P. E. et al. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616–627 (2005).
29. Franco, A. R., Gee, M. A. & Guilfoyle, T. J. Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.* **265**(26), 15845–15849 (1990).
30. Feng, S. et al. Genome-wide identification, expression analysis of auxin-responsive GH3 family genes in maize (*Zea mays* L.) under abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **57**(9), 783–795 (2015).
31. Jain, M. & Khurana, J. P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J.* **276**(11), 3148–3162 (2009).
32. Park, J. E. et al. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **282**(13), 10036–10046 (2007).
33. Singh, V. K., Jain, M. & Garg, R. Genome-wide analysis and expression profiling suggest diverse roles of GH3 genes during development and abiotic stress responses in legumes. *Front. Plant Sci.* **5**, 789 (2015).
34. Suza, W. P. et al. Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* **48**(5), 337–350 (2010).
35. Suza, W. P. & Staswick, P. E. The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**, 1221–1232 (2008).
36. Yuan, H. et al. Genome-wide analysis of the GH3 family in apple (*Malus domestica*). *BMC Genomics* **14**, 1–14 (2013).
37. Jiang, W. et al. Genome-wide identification, characterization analysis and expression profiling of auxin-responsive GH3 family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Biol. Rep.* **47**, 3885–3907 (2020).
38. Domingo, C., Andres, F., Tharreau, D., Iglesias, D. J. & Talon, M. Constitutive expression of OsGH31 reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *Mol. Plant* **22**, 201–210 (2009).
39. Zhang, Q., Gong, M., Xu, X., Li, H. & Deng, W. Roles of auxin in the growth, development, and stress tolerance of horticultural plants. *Cells* **11**(17), 2761 (2022).
40. Zhang, S. W. et al. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiol.* **151**, 1889–1901 (2009).
41. Nag, S., Saha, K. & Choudhuri, M. A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J. Plant Growth Regul.* **20**(2), 182 (2001).
42. Rout, G. R. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regul.* **48**, 111–117 (2006).
43. Yan, Y. H. et al. Effect of naphthalene acetic acid on adventitious root development and associated physiological changes in stem cutting of *Hamarhria compressa*. *PLoS One* **9**(3), e9700 (2014).
44. Zhou, J. et al. Gibberellin and auxin signaling genes RGA1 and ARF8 repress accessory fruit initiation in diploid strawberry. *Plant Physiol.* **185**(3), 1059–1075 (2021).
45. Bao, S., Hua, C., Shen, L. & Yu, H. New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **62**(1), 118–131 (2020).
46. Davière, J. M. & Achard, P. Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**(6), 1147–1151 (2013).
47. Fu, X. & Harberd, N. P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nat.* **421**(6924), 740–743 (2003).
48. Yang, R. J. & Chen, C. J. Stress-based topology optimization. *Struct. Optim.* **12**, 98–105 (1996).
49. Achard, P. et al. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **19**(14), 1188–1193 (2009).
50. Kou, E. et al. Crosstalk between auxin and gibberellin during stalk elongation in flowering Chinese cabbage. *Sci. Rep.* **11**, 3976 (2021).
51. Graham, T. & Wheeler, R. Mechanical stimulation modifies canopy architecture and improves volume utilization efficiency in bell pepper: Implications for bioregenerative life-support and vertical farming. *Open Agric.* **2**(1), 42–51 (2017).
52. Hussain, A. & Peng, J. DELLA proteins and GA signalling in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.* **22**, 134–140 (2003).
53. Onguso, J. M. A., Mizutani, F. & Hossain, A. S. The effect of trunk electric vibration on the growth, yield, and fruit quality of peach trees (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Sci. Hortic.* **108**(4), 359–363 (2006).
54. Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. & Scheel, D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**(8), 1425–1440 (2000).
55. Choi, W. G., Hilleary, R., Swanson, S. J., Kim, S. H. & Gilroy, S. Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 287–307 (2016).
56. Monshausen, G. B., Bibikova, T. N. & Weisenseel-Gilroy, M. H. S. Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **21**, 2341–2356 (2009).
57. Telewski, F. W. Mechanosensing and plant growth regulators elicited during the thigmomorphogenetic response. *Front. For. Global Change* **3**, 574096 (2021).
58. Telewski, F. W. Thigmomorphogenesis: The response of plants to mechanical perturbation. *Italus Hortus* **23**(1), 1–16 (2016).
59. Walley, J. W. & Dehesh, K. Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 354–359 (2010).
60. Means, A. R. & Dedman, J. R. Calmodulin—an intracellular calcium receptor. *Nature* **285**, 73–77 (1980).
61. Ranty, B., Aldon, D. & Galaud, J. P. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: Multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal Behav.* **1**(3), 96–104 (2006).
62. Heo, W. D. et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 766–771 (1999).
63. Park, C. Y. et al. Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance. *Mol. Cells* **18**(2), 207–213 (2004).

64. Yin, Y., Yang, R. & Gu, Z. Calcium regulating growth and GABA metabolism pathways in germinating soybean (*Glycine max* L.) under NaCl stress. *Eur. Food Res. Technol.* **239**, 149–156 (2014).
65. Ko, I. H., Han, K. H., Park, S. & Yang, J. Plant body weight-induced secondary growth in Arabidopsis and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol.* **135**(2), 1069–1083 (2004).
66. Sistrunk, M. L. I. Identification of the cis-regulatory elements of the Arabidopsis thaliana TCH3 gene. II. Developmental and molecular responses to touch stimulation in Arabidopsis mutants defective in ethylene responses. *Rice University*. (1996).
67. Braam, J. The Arabidopsis TCH genes: Regulated in expression by mechanotransduction? In Plant tolerance to abiotic stresses in agriculture: role of genetic engineering, *Springer Netherlands*. 29–37 (2000).
68. Xu, W. et al. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555–1567 (1995).
69. Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M. & Schumacher, J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol* **9**(9), 3230–3230 (2019).
70. Zhang, Z. L. *Plant Physiology Experiment Guidance* 2nd edn, 210–212 (Higher Education Press, 1990).
71. Graham, H. D. & Thomas, L. B. Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. *J. Pharm. Sci.* **50**(1), 44–48 (1961).
72. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucl. Acid Res.* **30**, e36 (2002).
73. Braam, J. In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol.* **165**(2), 373–389 (2005).
74. Börnke, F. & Rocks, T. Thigmomorphogenesis—Control of plant growth by mechanical stimulation. *Sci. Hortic.* **234**, 344–353 (2018).
75. Autio, J., Voipio, I. & Koivunen, T. Responses of aster, dusty miller, and petunia seedlings to daily exposure to mechanical stress. *Hortic. Sci.* **29**(12), 1449–1452 (1995).
76. Erner, Y. & Jaffe, M. J. Thigmomorphogenesis: The involvement of auxin and abscisic acid in growth retardation due to mechanical perturbation. *PCP* **23**(6), 935–941 (1982).
77. Mitchell, C. A. Recent advances in plant response to mechanical stress: Theory and application (1996).
78. Stepanova, A. N. & Alonso, J. M. Auxin catabolism unplugged: Role of IAA oxidation in auxin homeostasis. *PNAS* **113**(39), 10742–10744 (2016).
79. Biro, R. L. & Jaffe, M. Thigmomorphogenesis: Ethylene evolution and its role in the changes observed in mechanically perturbed bean plants. *Physiol. Plant.* **62**(3), 289–296 (1984).
80. Moulia, B., Coutand, C. & Julien, J. L. Mechanosensitive control of plant growth: Bearing the load, sensing, transducing, and responding. *Front. Plant Sci.* **6**, 52 (2015).
81. Kouhen, M., Dimitrova, A., Scippa, G. S. & Trupiano, D. The course of mechanical stress: types, perception, and plant response. *Biology* **12**(2), 217 (2023).
82. Colbrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L. & Hedden, P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* **217**(1), 67–73 (2014).
83. Salehi, H. & Salehi, M. Effects of two methods of mechanical stress on snapdragon and wallflower plants growth responses. *Adv. Environ. Biol.* **3**(2), 157–161 (2009).
84. Paponov, I. A. et al. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol. Plant.* **1**(2), 321–337 (2008).
85. Morel, P., Crespel, L., Galopin, G. & Moulia, B. Effect of mechanical stimulation on the growth and branching of garden rose. *Sci. Hortic.* **135**, 59–64 (2012).
86. Vernieri, P., Mugnai, S., Borghesi, E., Petrognani, L. & Serra, G. Non-chemical growth control of potted *Callistemon laevis*. *Anon. Edit. Agric. Sci.* **136**(2), 85 (2006).
87. Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N. & Vielba, J. M. Interactions of gibberellins with phytohormones and their role in stress responses. *Hortic.* **8**(3), 241 (2022).
88. Achard, P. et al. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**(8), 2117–2129 (2008).
89. Chehab, E. W., Eich, E. & Braam, J. Thigmomorphogenesis: A complex plant response to mechano-stimulation. *J. Exp. Bot.* **60**(1), 43–56 (2009).
90. Takahashi, H. & Jaffe, M. J. Thigmomorphogenesis: The relationship of mechanical perturbation to elicitor-like activity and ethylene production. *Physiol. Plant.* **61**(3), 405–411 (1984).
91. Ekin, M. et al. Determination of cadmium and/or drought stress effects on some plant phytohormone contents and hormone gene expressions in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turk. J. Agric. For.* **47**(3), 402–411 (2023).
92. Li, S. W., Leng, Y., Feng, L. & Zeng, X. Y. Involvement of abscisic acid in regulating antioxidative defense systems and IAA-oxidase activity and improving adventitious rooting in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seedlings under cadmium stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 525–537 (2014).
93. Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y. & Jansen, M. A. Different stresses, similar morphogenic responses: Integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ.* **32**(2), 158–169 (2009).
94. Li, X. M., He, X. Y., Zhang, L. H., Chen, W. & Chen, Q. Influence of elevated CO₂ and O₃ on IAA, IAA oxidase and peroxidase in the leaves of ginkgo trees. *Biologia plantarum* **53**, 339–342 (2009).
95. Mohamed-Yasseen, Y. A. S. S. E. N., Splittstoesser, W. E. Phenolic compounds, oxidative enzymes and their relationship with discoloration in endive (*Cichorium intybus* L.). (1990).
96. Liu, C. Y. et al. Mycorrhiza stimulates root-hair growth and IAA synthesis and transport in trifoliate orange under drought stress. *Sci. Rep.* **8**(1), 1978 (2018).
97. Jaffe, M. J. & Forbes, S. Thigmomorphogenesis: The effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regul.* **12**, 313–324 (1993).
98. Markovic, D., Nikolic, N., Glinwood, R. & Seisenbaeva, G. Ninkovic V plant responses to brief touching: A mechanism for early neighbour detection? *PLoS ONE* **11**(11), e0165742 (2016).
99. Onoda, Y. & Anten, N. P. Challenges to understand plant responses to wind. *Plant Signal. Behav.* **6**(7), 1057–1059 (2011).
100. Zhang, D. et al. GA4 and IAA were involved in the morphogenesis and development of flowers in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*. *J. Plant Physiol.* **171**(11), 966–976 (2014).
101. Saidi, I. et al. Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. *Plant Sci.* **177**(1), 1–6 (2009).
102. Cipollini, D. F. Jr. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* **85**(11), 1586–1591 (1998).
103. Meng, X. Y., Wang, Z., He, S. L., Shi, L. Y. & Song, Y. L. Endogenous hormone levels and activities of IAA-modifying enzymes during adventitious rooting of tree peony cuttings and grafted scions. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **60**, 187–197 (2019).
104. Wang, Q. et al. A phosphorylation-based switch controls TAA1-mediated auxin biosynthesis in plants. *Nat. Commun.* **11**(1), 679 (2020).
105. Zhang, Z. et al. Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae interaction. *Plant Physiol.* **145**(2), 450–464 (2007).
106. Smirnov, N. Tansley review no 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**, 27–58 (1993).

107. Ajithkumar, I. P. & Panneerselvam, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. under drought stress. *Cell Biochem. Biophys.* **68**, 587–595 (2014).
108. Grellier Bournonville, C. F. & Diaz-Ricci, J. C. Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *PCA* **22**(3), 268–271 (2011).
109. Brown, P. & Saa, S. Biostimulants in agriculture. *Front. Plant Sci.* **6**, 671 (2015).
110. Kavi Kishor, P. B. & Sreenivasulu, N. E. S. E. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.* **37**(2), 300–311 (2014).
111. Szabados, L. & Savouré, A. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**(2), 89–97 (2010).
112. AL-Quraan, N. A. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen species under UV treatments: insight from *Arabidopsis thaliana* calmodulin mutants. *Acta Physiol. Plant* **37**, 1–11 (2015).
113. Cholewa, E., Bown, A. W., Cholewinski, A. J., Shelp, B. J. & Snedden, W. A. Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^{+} . *Can. J. Bot.* **75**(3), 375–382 (1997).
114. Brenya, E. et al. Mechanical stress acclimation in plants: Linking hormones and somatic memory to thigmomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* **45**(4), 989–1010. <https://doi.org/10.1111/pce.14252> (2022).

Acknowledgements

This work was supported by the Incubator of Innovation 4.0 (grant supported by Ministry of Higher Education, Poland). The publication was financed by Science development fund of the Warsaw University of Life Sciences—SGGW

Author contributions

N. Kuźma—wrote the research paper, made biometrical, biochemical and RT-qPCR analyses, made statistic M. Klimek-Chodacka- bioinformatics and RT-qPCR, analyzed data. R. Budzyński—constructed the brushing apparatus and was responsible for its work during the experiment. R. Barański—qPCR experiment support, data analysis and manuscript correction. A. Jędrzejuk—designed the experiment, analyzed data. A. Jędrzejuk—designed the experiment, analyzed data.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82364-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.K. or A.J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2025

Supplementary Information 1.

	IAA content	Gas	IAA Oxidase Activity	Height	Shoot increment	GH 3.1	CAM81	CAM72	CAM53
IAA content	1								
Gas	-0.466	1							
IAA Oxidase Activity	-0.694*	0.803**	1						
Height	0.655*	-0.648*	-0.971**	1					
Shoot increment	0.540	-0.481	-0.137	-0.066	1				
GH 3.1	-0.627*	0.950**	0.743**	-0.564	-0.701*	1			
CAM81	0.634*	-0.452	-0.892**	0.972**	-0.215	-0.372	1		
CAM72	-0.823**	0.885**	0.857**	-0.728**	-0.627*	0.950**	-0.588*	1	
CAM53	0.658*	-0.496	-0.914**	0.982**	-0.168	-0.421	0.998**	-0.630*	1

Table 1. Correlation of biochemical parameters and gene expression in plants stressed 80 times a day.

*, ** Significant at 0.05 and 0.01 P levels, respectively; others are non-significant

Supplementary Information 2

	IAA content	Gas	IAA Oxidase Activity	Height	Shoot increment	GH 3.1	CAM81	CAM72	CAM53
IAA content	1								
Gas	-0.203*	1							
IAA Oxidase Activity	-0.414*	0.334*	1						
Height	-0.920**	0.560*	0.399*	1					
Shoot increment	0.791**	0.047*	-0.772**	-0.593	1				
GH 3.1	-0.803**	0.198*	0.861**	0.696	-0.969**	1			
CAM81	-0.859**	0.437*	0.806**	0.851**	-0.873**	0.959**	1		
CAM72	-0.0718*	0.405*	0.931**	0.133*	-0.497*	0.616	0.568*	1	
CAM53	-0.793**	0.366*	0.882**	0.756**	-0.911**	0.985**	0.987**	0.663	1

Table 2. Correlation of biochemical parameters and gene expression in plants stressed 160 times a day. *, ** Significant at 0.05 and 0.01 P levels, respectively; others are non-significant

Warszawa, 27.01.2025

Mgr inż. Natalia Kuźma
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
natalia_kuzma@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Kuźma N.**, Klimek-Chodacka M., Budzyński R., Barański R., Jędrzejuk A. (2025) The response of *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Research*, 15,1–15, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pielęgnacji roślin w szklarni, wykonaniu analiz biochemicznych i pomiarów biometrycznych, napisaniu manuskryptu, wykonaniu analizy RT-qPCR oraz wykonaniu analiz statystycznych, co stanowi 55% całej pracy.

Podpis

Natalia Kuźma

Warszawa, 27.01.2025

Dr inż. Magdalena Klimek-Chodacka (prof. URK)
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
magdalena.klimek-chodacka@urk.edu.pl

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kuźma N., Klimek-Chodacka M., Budzyński R., Barański R., Jędrzejuk A. (2025) The response of *Petunia × atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Research*, 15,1–15, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w zaprojektowaniu doświadczenia RT-qPCR, zaprojektowaniu starterów oraz analizie otrzymanych danych, co stanowi 15% całej pracy.

Podpis



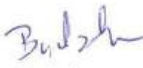
Warszawa, 27.01.2025

Mgr Robert Budzyński
Laboratorium Pomiarów Akustycznych
Instytut Informatyki Technicznej
SGGW w Warszawie
robert_budzynski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Kuźma N.**, Klimek-Chodacka M., Budzyński R., Barański R., Jędrzejuk A. (2025) The response of *Petunia* × *atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Research*, 15,1–15, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na optymalizacji oprogramowania związanego z działaniem maszyny generującej stres mechaniczny, co stanowi 5% całej pracy.


Podpis

Warszawa, 27.01.2025

prof. dr hab. inż. Rafał Barański
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
rafal.baraniski@urk.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Kuźma N., Klimek-Chodacka M., Budzyński R., Barański R., Jędrzejuk A. (2025) The response of *Petunia* × *atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Research*, 15,1–15**, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na korekcie manuskryptu, wsparciu merytorycznym wykonywanych analiz qPCR oraz analizie danych, co stanowi 15% całej pracy.



Podpis

Warszawa, 27.01.2025

dr hab. Agata Jędrzejuk (prof. SGGW)
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
agata_jedrzejuk@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Kuźma N.**, Klimek-Chodacka M., Budzyński R., Barański R., Jędrzejuk A. (2025) The response of *Petunia* × *atkinsiana* 'Pegasus Special Burgundy Bicolor' to mechanical stress encompassing morphological changes as well as physiological and molecular factors. *Scientific Research*, 15, 1–15, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu doświadczenia oraz analizie otrzymanych danych, co stanowi 10% całej pracy.

Podpis


PUBLIKACJA C

Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia ×atkinsiana*.

Jędrzejuk, A., Kuźma, N., Nawrot, K., Budzyński, R., & Orłowski, A.

Scientia Horticulturae, (2020). 274, 109661.



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*

Agata Jędrzejuk^{a,*}, Natalia Kuźma^a, Kamil Nawrot^a, Robert Budzyński^b, Arkadiusz Orlowski^b

^a Section of Ornamental Plants, Faculty of Horticulture and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences - SGGW, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland
^b Institute of Information Technology, Warsaw University of Life Sciences - SGGW, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Thigmomorphism
Bedding plants
Mechanical stress
Growth dynamics

ABSTRACT

Ornamental plants are bred and purchased for their aesthetical features such as colorful flowers and leaves, as well as compact and elegant stature. *Petunia* is one of the most popular bedding plants for urban areas and gardens, therefore, control of its growth and branching is essential. In commercial horticulture, the most common method to control growth dynamics is via growth regulators. Mechanical stimulation is proposed as an environmentally friendly alternative to chemical regulators. In this study, the efficiency of MS was tested on two cultivars of *Petunia x atkinsiana*. A brushing apparatus was set to stroke apical parts of young plants 40, 60 or 80 times per day between 14 March and 25 April. Several parameters, such as stem length, the number of branches, mature leaf area, the number of open flowers, were measured four times during the whole experiment: three times during the stimulation period, on 20 March, 4 and 25 April, and the last time on 18 May, three weeks after the stimulation stopped. For biochemical analyses, 1 cm apical stem fragments were collected on 20 March, 25 April and 18 May. The results show that MS affects the growth dynamics in *petunia*, but the response appears to be cultivar specific. In both cultivars, brushing with 80 strokes per day produced the most spectacular effects in growth reduction. On the last day of brushing the POD and IAA oxidase activities in the strongly reacting cultivar were the highest in plants rubbed 80 x per day. The results indicate that MS can be very effective in controlling stem growth in at least some cultivars of *petunia*, replacing hormonal treatments.

1. Introduction

A potential consumer of ornamentals requires a rather compact, thus more esthetically pleasing product (Morel et al., 2012; Börnke and Rocks, 2018). In the last decades, plant growth regulators (PGRs) have been widely used in floriculture to control plant stature (Rademacher, 2015). The main purpose of PGRs application is to reduce plant size in a controlled fashion (Grossmann et al., 1987; Bergstrand, 2017; Börnke and Rocks, 2018). While PGRs are easy to apply, their extensive use runs against the global trend toward sustainable farming, with as few chemical treatments as possible.

A simple and environmentally friendly method of growth control in plants is the focus of scientists and plant producers. For many years now it has been recognized that MS, such as touching, bending and shaking, affects growth and development of plants (Jaffe, 1973; Jaffe and Galston, 1968; Mitchell, 1996; Jaffe et al., 2002; Telewski, 2006).

According to Salisbury (1963), repeated touching of young plant leaves reduced growth by 30 %. Jaffe (1973) introduced the term 'thigmomorphogenesis' to describe these mechanically induced plant responses. However, in order to make MS acceptable in horticultural production, an understanding of the physiological response to the treatment is required. Currently, for research and commercial application, several different devices are available. These include brushing contraptions with soft fabric touching the apical parts of plants without causing any injury, movable devices with an air stream, artificial seismic stimuli such as automated mechanical oscillatory shaking machines (Mitchell, 1996) or vibrating greenhouse tables (Rocks et al., 2013; Börnke and Rocks, 2018). All these methods caused significant growth reduction in plants: 12 % for *Petunia*, 21 % for *Pelargonium*, 14 % for *Helianthus*, 11 % for *Euphorbia pulcherrima*, 39 % for *Scaevola*, 24 % for *Calibrachoa* and 31 % for *Ocimum basilikum* (Helbig et al., 2013, 2014; Börnke and Rocks, 2018). Although laboratory studies clearly show that MS

Abbreviations: IAA, indole-3-acetic acid; IAAO, indole-3-acetic acid oxidase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; MS, mechanical stimulation; PAL, phenylalanine ammonia lyase; POD, peroxidase.

* Corresponding author.

E-mail address: agata_jedrzejuk@sggw.pl (A. Jędrzejuk).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109661>

Received 9 December 2019; Received in revised form 3 August 2020; Accepted 14 August 2020

0304-4238/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

affects the growth dynamics in plants (Takashi and Jaffe, 1984), stimulation frequency, the choice of the most suitable method or apparatus are still being tested and compared, both by plant researchers and growers before firm recommendations for commercial production can be made.

Prolonged exposure to MS induces physiological, morphological and anatomical changes in plants (Garner et al., 1997; Vernieri et al., 2003; Graham and Wheeler, 2017). On the physiological and biochemical level, a reduction in the IAA content is detectable in the rubbed internodes (Saidi et al., 2010; Onoda and Anten, 2011; Markovic et al., 2016). According to several authors (Jaffe and Forbes, 1993; Saidi et al., 2010; Onoda and Anten, 2011; Wang et al., 2014; Markovic et al., 2016) a reduction in a rubbed internode length is a consequence of the IAA oxidation and an increase in the IAA oxidase, PAL, CAD or POD activities (Cipollini, 1998; Saidi et al., 2010). MS of plants induces production of such reactive oxygen species as H_2O_2 (Legendre et al., 1993; Yahraes et al., 1995), thus the POD activity induced by MS serves an indicator of the antioxidant system activity. The enzyme also plays an important role in the oxidation of endogenous IAA (Cipollini, 1998).

In this study, the effects of MS and its frequency on growth dynamics, the IAA content and the activity of POD and IAA oxidase were studied in two cultivars of petunia grown under greenhouse conditions similar to those in commercial production.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The experiments were carried out in 2018 and 2019. The plant material was *Petunia x atkinsiana*, a compact red-flowering cultivar 'Dark Red' and a strongly growing 'Pegasus' Velvet Picotee' with deep purple flowers highlighted by white outer edges. The plants were obtained from the Volmarty Polska Company in Gwarantowa Wola (Central Poland) as 4-week old rooted cuttings in the beginning of March. The plants were transferred to production pots P11 (11 cm in diameter) into a substrate composed of high peat (50 %), wood fibers Ecofibrex® (20 %) and bark (30 %), with pH 5.5 (Lasland, Poland) and placed in a greenhouse at the Warsaw University of Life Sciences (WULS), Poland on a greenhouse table with an ebb and a flow bench (95 × 480 cm), at a density of 15 plants per m². The average night/ day temperatures were 18 °C and 22 °C, respectively, and the relative air humidity was 75 %, controlled by a HortiMax climate computer with a Synopta – HortiMax software.

2.2. Crop management

During experiments plants were regularly fertilized with 0.2 % liquid fertilizer Cristalon™ Gena (EC 1.2 mS cm⁻¹), dedicated to bedding plants fertilized with water rich in Ca and Mg ions, and containing 12 % N (including 9.5 % N-NO₃ and 2.5 % N-NH₄), 24 % P₂O₅, 36 % K₂O, 2 % S, 0.07 % Fe, 0.04 % Mn, 0.025 % Zn, 0.01 % Cu, 0.025 % B, 0.004 % Mo (provided by the company Yara, Poland), pH 5.2, by using Dosatron D25RE2 (Royal Brinkman, Poland). The pH and EC of the medium and the soil substrate were monitored twice a week, by using a pH – meter HI 99,121 (Hanna Instruments, Poland) and a conductometer Gro Line HI 98,331 (Hanna Instruments, Poland). An average substrate pH and EC values of both cultivars ranged between 5.42–5.57 for pH and 0.87–2.07 for EC. To avoid iron deficiency in apical parts of plants, 0.02 % Rexolin X 60 according to manufacturer recommendations (Yara, Poland) was applied bi-weekly as foliar application.

In early March, the average day length in Central Poland is 11.5 h (ca 6:00 AM sunrise and 5:30 PM sunset) with the maximum global solar irradiance of 347.7 W·m⁻²; in April the day length is ca. 13 h (ca. 6:00 AM sunrise and 7:10 PM sunset) with the maximum irradiance of 444.8 W·m⁻². To extend the daylength to 16 h (6:00 am – 10:00 pm), 600 W high-pressure sodium lamps (ca. 110 µmol m⁻²s⁻¹) was used; supplemental light was added when the global solar radiation level was below

400 W·m⁻² (constantly for 16 h in March and as needed in April). The day length and the irradiance levels were controlled by the same HortiMax climate computer with Synopta – HortiMax software, as above.

2.3. Experimental design

MS of plants started on 14 March and stopped on 25 April. The brushing apparatus was regularly passing back and forth over the apical parts of plants. It consisted of four bars with soft fabric mounted on a frame driven by an electric motor (Supplementary material 1). The system was programmed for a frequency of 40, 60 or 80 strokes per day, at the same time. The whole brushing cycle was ca. 80 min. The travelling speed of the apparatus was 25 cm·s⁻¹. The greenhouse table was divided onto 3 sections for ca. 3.3 m. The brushing apparatus was stroking all plants 40 x for 53 min (the whole table length – 10 m), next 20 x for 18 min (table length – 6.6 m, for plants brushed 60 x), and last 20 x for 9 min (table length 3.3 m for plants brushed 80 x). The base of the fabric was set to reach 5 cm below the apex, and was adjusted regularly during the plant growth to maintain the distance. There were 30 plants in each of 4 treatments (i.e. plants brushed 40, 60 and 80 times per day and not treated control plants) in three replications (10 plants in each).

2.4. Biometric measurements

The following biometric measurements were made: stem length measured from the media level to the top of plant, number of branches, mature leaf area (one mature leaf, from the middle part of each plant was picked up and measured by using Leaf Area Meter AM100 (ADC Bioscientific LTD), number of open flowers. The measurements were made on four dates: 20 March (D1), 4 April (D2), 25 April (D3) and on 18 May, three weeks after the last stimulation (D4).

2.5. Biochemical analyses

For biochemical analyses as well as for dry weight tests (DW), 1 cm apical stem fragments from six randomly chosen plants in each treatment (six apices per each replication) were collected on 20 March, 25 April and 18 May. All analyses were made in nine replications per treatment. The dry weight was determined by drying three 1 g samples at 105 °C until the constant weight.

2.5.1. IAA content

Free IAA was extracted with 80 % methanol and assayed spectrophotometrically with the Salkowski reagent at 520 nm (Schimadzu UV-1280, Shimadzu, Japan), and expressed as µg IAA per g⁻¹ DW.

2.5.2. IAAO activity

The activity of IAAO was measured according to Zhang (1990): of crude extract (500 mg of tissue was homogenized in 3 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0), 2 ml of 1 mM aqueous MnCl₂, 1 ml of 1 mM aqueous 2,4-dichlorophenol, 2 ml of 1 mM aqueous IAA, and 5 ml of phosphate buffer (pH 7.0) were mixed and incubated at 30 °C for 30 min in a water bath. 2 ml of this mixture and 4 ml of the reaction solution containing 1.0 ml 0.5 M FeCl₃ + 50 ml 35 % perchloric acid were mixed and incubated for 30 min in the dark at 30 °C and absorbance was measured at 530 nm (Schimadzu UV-1280, Shimadzu, Japan). One unit of IAAO activity was defined as the amount of the enzyme degrading 1 µg IAA per g⁻¹ DW per hour.

2.5.3. Peroxidase (POD) activity

The peroxidase activity was determined as follows: 500 mg of tissue was homogenized in 3 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and centrifuged at 20,000 rpm for 15 min at 4 °C. The assay mixture consisted of 3 ml of 0.5 M pyrogallol, 0.1 ml of enzyme extract and 0.5 ml of 1 % H₂O₂. The activity was estimated spectrophotometrically at 430 nm (Schimadzu UV-1280, Shimadzu, Japan) and expressed as units (U) per

g^{-1} dry weight (DW).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by the General Linear Model program of the IBM SPSS Statistics Data Editor (Softonic, Poland) ANOVA 1 for biometrical measurements with LSD test and ANOVA 2 for biochemical analyses with Tukey-Kramer multiple range test to compare means.

3. Results

3.1. *Petunia* 'Dark Red'

On D1, D3 and D4 the control plants were the tallest, and the shortest were the plants brushed 80 x per day (Fig. 1 a). On D3, plants brushed 40 x were lower by 20 %, 60 x – 24 % and 80 x – 39.8 % than the control unbrushed plants (Table 1). On 18 May, three weeks after brushing was stopped, the brushed plants were still lower than the controls: those brushed 40 x – by 9 %, 60 x – 10.48 %, 80 x – 16 %. After brushing was stopped, control plants gained additional 4.74 cm, while brushed plants gained 8.12, 8.62 and 11.44 cm, for 40, 60 and 80 strokes, respectively.

The number of branches varied on each date of observations (Table 1). On D3, brushed plants were shorter than the unbrushed control plants: by 20 % after 40 strokes, by 24 % after 60 strokes and by 40 % after 80 strokes (Table 1). On May 18, three weeks after brushing was discontinued, treated plants were still shorter, by 9 % after 40 strokes, by 10.5 % after 60 strokes and by 16 % after 80 strokes compared to control plants. On the first day of experiment (D1) the number of mature leaves was too low for the leaf area measurements. On D2 and D3, there were no significant differences in the leaf area irrespective of the treatment (Table 1). On D4 the largest leaf area was in plants brushed 60 x (17.2 cm^2).

The number of flowers per plant were counted on D3 and D4. On both dates, the highest number of open flowers was in plants brushed 80 x and the lowest was in the controls (Table 1).

3.2. *Petunia* 'Pegasus R Velvet Picotee'

On all dates (D1 – D4), plants subjected to MS were significantly shorter than controls with the exception on D2, when plants brushed 60 x were as tall as the controls (Table 1). On D3, plants brushed 40 x were shorter by 13 %, brushed 60 x by 21 % and brushed 80 x by 43.5 % than the controls (Fig. 1 b). Three weeks after the MS was stopped, brushed plants were still significantly shorter than controls: by 11 %, 18.6 % and 28.3 % for 40, 60 and 80 strokes, respectively.

On D1 and D2, the number of branches was similar in all treatments (Table 1). On the last day of treatment (D3) control plants and those after 80 strokes were less branched than plants brushed 40 x and 60 x. On D4 the lowest number of branches was observed in plants brushed 80 x.

Similarly to cv. 'Dark Red', the leaf area was measured three times, on D2, D3, D4. On the first date there were no significant differences among plants from all treatments (Table 1). On D3 all plants subjected to MS had smaller leaves than control. On D4, the biggest leaf area was in plants brushed 40 x, while those brushed 60 x and 80 x had leaf area similar to controls.

As above, the number of flowers were counted on D3 and D4. On both dates the highest number of flowers was in control plants (Table 2). On 18 May the lowest number of open flowers was found in petunias brushed 80 x per day.

3.3. Biochemical analyses

3.3.1. *Petunia* 'Dark Red'

The endogenous IAA content levels depended on the date of observations, and less so on the treatment (Table 2). The lowest IAA content in apical parts was observed in plants after seven days of brushing, (20 March) and the highest on 18 May, three weeks after brushing was stopped. The IAA oxidase activity was the lowest on D1 (7 days after brushing started) and increased for on the next two dates (D2 and D3). The IAA oxidase activity did not depend on the number of brushing



Fig. 1. *Petunia x aksinsiana* subjected to 0, 40, 60 and 80 cycles per day of mechanical stimulation.

(a) 'Dark Red'.

(b) 'Pegasus R Velvet Picotee'.

Table 1

The effect of mechanical stimulation on selected morphological features in petunia 'Dark Red' and 'Pegasus® Velvet Picotee'.

Petunia 'Dark Red'					Petunia 'Pegasus® Velvet Picotee'			
Number of cycles	Stem length (cm)				D1	D2	D3	D4
	D1	D2	D3	D4				
0x	8.7 a*	10.2 b	30.5 a	35.3 a	12.0 a	15.5 a	37.3 a	43.1 a
40x	7.6 b	11.9 a	24.2 b	32.3 b	9.8 b	12.2 b	32.5 b	38.2 b
60x	5.9 c	10.0 b	23.2 b	31.8 b	8.6 c	14.4 a	29.4 c	35.0 c
80x	5.5 d	9.1 b	18.4 c	29.8 c	6.1 d	8.5 c	21.1 d	30.9 d
Number of branchings								
0x	4.8 a	5.6 a	15.0 c	34.4 ab	3.2 a	6.0 a	16.1 b	67.3 a
40x	4.9 a	5.3 a	21.5 b	40.4 a	3.5 a	6.5 a	25.8 a	65.0 a
60x	4.2 b	4.9 a	27.1 a	38.7 ab	3.4 a	6.5 a	25.1 a	66.4 a
80x	4.4 b	4.7 a	22.0 b	31.4 b	4.2 a	6.1 a	17.7 b	42.0 b
Leaf area (cm ²)								
0x	–	10.7 a	10.9 a	14.26 bc	–	11.4 a	14.2 a	16.5 b
40x	–	10.3 a	11.1 a	11.2 c	–	10.8 a	12.8 b	21.1 a
60x	–	9.9 a	10.3 a	17.2 a	–	10.9 a	11.9 c	17.6 b
80x	–	10.1 a	10.8 a	16.7 b	–	11.4 a	12.9 b	16.8 b
Number of flowers								
0x	–	–	6.0 c	11.4 d	–	–	33.4 a	36.3 a
40x	–	–	10.2 b	14.0 c	–	–	18.6 b	29.2 ab
60x	–	–	9.2 b	19.8 b	–	–	22.2 b	27.9 ab
80x	–	–	12.6 a	22.4 a	–	–	22.2 b	21.0 b

D1 – March 20; D2 – April 4; D3 – April 25; D4 – May 18.

*Each date of measurements in each cultivar was analyzed separately.

† Means followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0.05$. (0 x – control plants, 40x, 60, 80x per day).

cycles on any date of observations (Table 2).

In all treatments the POD activity kept increasing with the duration of MS (Table 2), but the rate of increase appeared to depend on the number of strokes. On D2, the control plants had a lower POD activity than those after 40, 60 and 80 strokes per day. This phenomenon was not observed on 18 May, three weeks after brushing was stopped.

Table 2

Chosen biochemical parameters in apical part of stems in petunia 'Dark Red'.

IAA content ($\mu\text{g IAA g}^{-1}$ DW)				
Number of cycles	D1	D2	D3	Mean
40x	170.5 a B	114.6 c C	492.8 a A	259.3 a
60x	169.9 a C	236.9 a B	375.8 b A	260.9 a
80x	153.5 b C	173.6 b B	277.6 c A	201.6 b
Mean	157.1 c	171.4 b	366.1 a	
IAAO activity ($\mu\text{g IAA g}^{-1}$ DW h ⁻¹)				
0x	1.9 b B	2.3 b A	2.3 c A	2.2 b
40x	2.2 a B	2.5 a B	2.7 a A	2.5 a
60x	2.2 a B	2.5 a A	2.6 b A	2.4 a
80x	2.1 ab B	2.3 b A	2.1 d A	2.2 b
Mean	2.1 b	2.4 a	2.4 a	
POD activity (U g^{-1} DW)				
Number of cycles	D1	D2	D3	Mean
0x	1005.0 c C	1165.4 b B	1990.4 a A	1386.9 a
40x	1042.0 a C	1139.3 b B	1588.1 b A	1256.6 b
60x	1049.1 a C	1481.5 a B	1581.9 b A	1370.8 a
80x	1033.8 b C	1427.6 a B	1587.4 b A	1349.6 a
Mean	1032.5 c	1303.5 b	1686.9 a	

*Means followed by the same small letter in each column and a capital letter in each row do not differ significantly at $\alpha = 0.05$. Capital letters describe the effect of the date of measurements and small letters describe the effect of the number of cycles.

IAA content: SE for date of measurements – 0.47; SE for number of cycles – 0.54; SE for interaction – 0.94.

IAAO activity: SE for date of measurements – 0.02; SE for number of cycles – 0.02; SE for interaction – 0.04.

POD activity: SE for date of measurements – 0.288; SE for number of cycles – 0.33; SE for interaction – 0.57.

D1 – March 20; D2 – April 25; D3 – May 18.

3.3.2. Petunia 'Pegasus® velvet picotee'

The endogenous IAA content varied in different treatments on all observation dates. It was significantly higher on D1 in all brushed plants than in the controls (Table 3). The IAA oxidase activity kept increasing on successive observation dates (Table 3). On D3 it was significantly higher than on D2, and the highest activity was observed on D4, three weeks after brushing was stopped. In plants brushed 60 x and 80 x per

Table 3

Chosen biochemical parameters in apical part of stems in P. 'Pegasus® Velvet Picotee'.

IAA content ($\mu\text{g IAA g}^{-1}$ DW)				
Number of cycles	D1	D2	D3	Mean
40x	162.5 a B	118.3 c C	211.0 c A	163.9 c
60x	165.2 a C	173.1 b B	200.6 c A	179.6 b
80x	167.2 a B	271.2 a A	266.7 b A	235.0 a
Mean	155.9 c	199.3 b	254.8 a	
IAAO activity ($\mu\text{g IAA g}^{-1}$ DW h ⁻¹)				
0x	1.7 b B	2.4 c A	2.9 a A	2.3 b
40x	1.3 b C	2.7 b A	2.1 c B	2.0 c
60x	2.3 a A	2.7 b A	1.5 d B	2.2 bc
80x	2.4 a B	2.9 a A	2.3 b B	2.6 a
Mean	1.9 c	2.2 b	2.7 a	
POD activity (U g^{-1} DW)				
0x	905.7 a B	742.5 c C	2049.2 a A	1232.5 a
40x	885.5 b C	1106.9 b B	1325.9 c A	1106.1 b
60x	774.6 c C	1013.8 b B	1300.7 c A	1007.6 c
80x	652.3 d C	1393.7 a B	1851.9 b A	1299.3 a
Mean	787.9 c	1064.2 b	1631.9 a	

*Means followed by the same small letter in each column and a capital letter in each row do not differ significantly at $\alpha = 0.05$. Capital letters describe the effect of the date of measurements and small letters describe the effect of the number of cycles.

IAA content: SE for date of measurements – 0.52; SE for number of cycles – 0.61; SE for interaction – 0.10.

IAAO activity: SE for date of measurements – 0.06; SE for number of cycles – 0.06; SE for interaction – 0.11.

POD activity: SE for date of measurements – 0.28; SE for number of cycles – 0.32; SE for interaction – 0.56.

D1 – 20.03; D2 – 25.05; D3 – 18.05.

day on D1 and 40 x – 80 x on D2, the IAA oxidase activity was higher than in control plants.

In all brushed plants the lowest POD activity was determined on 20 March, and it increased on D2 and D3. On D1 and D3, the POD activity was the highest in controls (Table 3). On 25 April in all treated plants the POD activity was higher than in the control plants (Table 3).

4. Discussion

According to several authors (Autio et al., 1994; Biddington and Dearman, 1985; Graham and Wheeler, 2017; Kläring, 1999; Latimer and Thomas, 1991; Mensuali-Sodi et al., 2006; Liu et al., 2007; Onguso et al., 2006; Börnke and Rocks, 2018), MS has a significant effect on the stem growth dynamics and results in stem growth reduction. Brushing/stroking for even 1 h per day may reduce plant height in aster by 25 % (Autio et al., 1994), by 18 % in petunia (Autio et al., 1994), by 16 % in *Quercus* (Reubens et al., 2013) and by 34 % in *Robinia* (Reubens et al., 2013). Brushing of garden roses reduced the length of the 1th internode by 13 % without reducing the number of internodes (Morel et al., 2012). In garden rose only one movement back and forth in early spring and five such movements in summer, reduced stem length (Morel et al., 2012). In tomato, 10 strokes per day reduced length by 20 % in spring, while 40 strokes reduced growth dynamics by 12 % in summer (Garner et al., 1997). According to Koch et al. (2011), several species of herbs showed significantly reduced elongation growth after brushing with 108 strokes per day. In petunia (Autio et al., 1994) 60, 120 and 180 strokes per day were recommended as the most efficient treatments to reduce the stem length, while Reubens et al. (2013) reported as sufficient only 29 strokes per day for *Quercus*. In this study, the greatest growth reduction in both petunia cultivars was observed in plants brushed 80 x per day (ca. 80 min. of stroking per day). On D3, cv. 'Dark Red' was 39.8 % and 'Pegasus ® Velvet Picotee' – 43.5 % shorter than control plants. On D4 (three weeks after brushing stopped) both tested cultivars were shorter than control plants only by 15.6 % and 28.3 %, respectively. Similar effects were obtained in *Sansevieria trifasciata* (Khoshhal et al., 2014), where the height of plants decreased during treatments, but opposite results were observed 6 months after brushing arrestment. The explanation may be that MS usually affects plant growth only during the period of treatment, plus about a 3-day recovery period (Akers and Mitchell, 1985). An interesting fact is that the two cultivars tested here differed in their response to MS. The compact cv. 'Dark Red' had significantly weaker reaction than the strongly growing cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee'. Similar results were observed in other plants. For example, cucumber cultivars with naturally short internodes showed less growth reduction than cultivars with longer internodes, relative to their respective untreated controls (Latimer et al., 1991). The same reaction was observed in tomato (Johjima et al., 1992).

Garner et al. (1997) observed a significant reduction in the diameter in tomato plants – by nearly 7 % – that may have been associated with a lower number of branches. In garden roses (Morel et al., 2012), MS doubled the number of side branches. In this study, the number of branches depended on the cultivar: on the last day of stimulation all treated plants in cv. 'Dark Red' were more branched than the controls. However, three weeks after the end of stimulation there was no difference in the number of branches between the treated and control plants. In cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' the numbers of branches in treated plants and control were the same on D1 and D2, but on D4 plants brushed 80 x were significantly less branched than plants in any other treatment. That might have been due to the intensive plant growth after brushing was stopped. Strong growth of plants stroked 80 x observed after brushing was stopped was probably initiated by the intensive IAA synthesis in stem apical parts during the whole brushing cycle (see Table 3), and its fast basal transport made possible just after brushing was stopped. According to Tanaka et al. (2006), there is a good evidence that auxins may regulate biosynthesis of cytokinins responsible for the axillary shoot development. It was reported that in pea, cytokinin

synthesis may be reduced by auxins, which act by repressing the expression of genes encoding the cytokinin biosynthetic enzyme adenosine-phosphate-isopentenyl transferase in the stem (Tanaka et al., 2006). In chickpea, after decapitation, which means removal of the cytokinins source, intensive cytokinin transport from root to bud, and their accumulation in apical stem parts, was observed (Mader et al., 2003). It is also known that MS activates the cytokinin biosynthesis (Chehab et al., 2008). This may be the answer for a higher number of branches in treated plants of both petunia cultivars during the brushing cycle and its decrease when brushing was stopped.

There is a hypothesis about an influence of thigmomorphogenesis on perturbations in the GA synthesis and delayed flowering of the MS – treated plants (Radi et al., 2009; Suge, 1978). Johjima et al. (1992); Morel et al. (2012), and Vernieri et al. (2003) observed, that MS may affect the number and diameter of flowers. Usually, treated plants have more but smaller leaves and flowers. In this study we did not observe the effect of MS on the flowering time of treated plants, but the treatment affected the number of flowers. Brushing significantly reduced the number of flowers in cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee', but not in cv. 'Dark Red', where all brushed plants had significantly more flowers than the controls. No flowering delay was observed in snapdragon subjected to MS (Salehi and Salehi, 2009).

According to Latimer and Mitchell (1988), mechanical stress might also reduce leaf area due to changes in the endogenous auxin levels of treated plants (Biddington and Dearman, 1985). According to Suge (1978) and Beyl and Mitchell (1983), reduction in gibberellin-like promoters in shaken bean and sunflower may be also responsible for a decrease of leaf expansion. In cv. 'Dark Red' MS did not affect the leaf area relative to the controls while on the last day of brushing, leaves in all treated plants of cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' had smaller area than in the controls. However, this effect disappeared within three weeks after the experiment termination.

In the current study we estimated the levels of endogenous IAA in apical parts of treated plants. In cv. 'Dark Red' it kept increasing during the period of MS. Generally, the highest auxin levels were observed in plants brushed 40 and 60 x per day, and the lowest in controls and those brushed 80 x per day. On the other hand, in cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' plants brushed 40 and 60 x per day had lower IAA amounts than the controls and plants brushed 80 x per day. In *Bryonia dioica*, the auxin level decreased after brushing (Erner and Jaffe, 1982), but in *Phaseolus vulgaris* it significantly increased. This increase was explained by reduced polar transport of IAA at the rubbed internode, causing an IAA buildup in the stem tissue. In tomato, rubbing caused an increase in the IAA content in the youngest internodes (Saidi et al., 2010; Stepanova and Alonso, 2016). On the other hand, rubbing inhibited polar auxin transport in pea stems (Mitchell, 1996). In petunia cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' brushed 80 x per day, a high endogenous IAA level might have been an effect of interrupted IAA polar transport and not the auxin synthesis, what resulted in stem growth arrest and reduced leaf area during brushing.

There are no data on the IAA oxidase activity in the youngest internodes of plants subjected to MS. It is claimed that the peroxidase and IAA oxidase activities are involved in the regulation of the endogenous levels of auxins (Müller and Leyser, 2011). In this study in cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' the IAA oxidase activity was higher in brushed plants than in the controls on D1 and D2, while on D3 it was the highest in plants rubbed 80 x per day. This effect was not observed in cv. 'Dark Red'. On D2 and D3 in plants brushed 40 and 60 x per day the IAA oxidase activity was higher than in control plants and those brushed 80 x per day.

MS such as brushing, wind or vibrations can be effective inducers of the POD activity in plants (Braam, 2005; Saidi et al., 2010; Sarmast et al., 2014; Cook and Ross, 2016). According to Normanly (1997) and Ostin et al. (2015), an increase in the peroxidase activity occurs in mechanically perturbed plants. Cook and Ross (2016) claim that the POD induction depends on the intensity of stimulation. In tomato, the

POD activity in rubbed internodes was already higher after 24 h of stress when compared to controls (Saidi et al., 2016). In the current study, in both cultivars, the highest POD activity was observed on D4, but the intensity of stimulation generally did not affect its activity, which is opposite to the observations of Cook and Ross (2016). Anyway, in both cultivars the POD activity increased on D2 with the stimulation intensity.

In spite of the enhanced activities of both enzymes, the high auxin content in apical stem parts was maintained during stress, probably as a consequence of arrested basal transport of the hormone.

Further search for an explanation of the effect of MS on the endogenous IAA behavior in treated plants as well as the relationships between the endogenous hormones and their transport, is necessary to fully explain the effect of mechanical conditioning on physiological processes in treated plants.

5. Conclusions

Our experiment shows, that MS affects growth dynamics in petunia, but the reaction appears to be cultivar specific. The more vigorous cv. 'Pegasus ® Velvet Picotee' showed a stronger reaction to MS than cv. 'Dark Red' in the reduction of stem length, leaf area and the flower number. In both cultivars, brushing of plants 80 x per day gave the most spectacular effects. These results show that the method used here can be applied in commercial horticulture to control stem growth in ornamental plants in an environmentally friendly way.

Credit author statement

1. Agata Jędrzejuk – designed the experiment, wrote the research paper, was responsible for the management of all analyses.
2. Kamil Nawrot – made biometrical and biochemical analyses.
3. Natalia Kuźma – made biochemical analyses.
4. Robert Budzinski – constructed the brushing apparatus and was responsible for its work during the experiment.
5. Arkadiusz Orlowski – designed the statistical part of the experiment.

Declaration of competing interest

None.

Funding

This research was supported was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, Poland.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Adam J. Lukaszewski (University of California, Riverside, Department of Botany and Plant Sciences) for editorial assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109661>.

References

- Akers, S.W., Mitchell, C.A., 1985. Seismic stress effects on reproductive structures of tomato, potato and marigold. *HortSci.* 20, 684–686.

- Autio, J., Voipio, I., Koivunen, T., 1994. Responses of aster, dusty miller, and petunia seedlings to daily exposure to mechanical stress. *HortSci.* 29 (12), 1449–1452. <https://doi.org/10.21273/hortsci.29.12.1449>.
- Bergstrand, K.J.I., 2017. Methods for growth regulation of greenhouse produced ornamental pot- and bedding plants-A current review. *Folia Hort.* 29, 63–74. <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0007>.
- Beyl, C.A., Mitchell, C.A., 1983. Alteration of growth, exudation rate, and endogenous hormone profiles in mechanically dwarfed sunflower. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108, 257–262.
- Biddington, N.L., Dearman, A.S., 1985. The effect of mechanically induced stress on the growth of cauliflower, lettuce and celery seedlings. *Ann. Bot.* 55 (1), 109–119. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086866>.
- Biddington, N.L., Dearman, A.S., 1986. A comparison of the effects of mechanically-induced stress, ethephon and silver thiosulphate on the growth of cauliflower seedlings. *Plant Growth Regul.* 4 (1), 103–123. <https://doi.org/10.1007/BF00025347>.
- Börnke, F., Rocks, T., 2018. Thigmomorphogenesis – control of plant growth by mechanical stimulation. *Sci. Hort.* 234, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.059>.
- Braam, J., 2005. In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol.* 165, 37–389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01263.x>.
- Chelhab, E.W., Eich, E., Braam, J., 2008. Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *J. Exp. Bot.* 1–14. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern315>.
- Cipollini, D.F., 1998. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* 85 (11), 1586–1591. <https://doi.org/10.2307/2446485>.
- Cook, S.D., Ross, J.J., 2016. The auxins, IAA and PAA, are synthesized by similar steps catalyzed by different enzymes. *Plant Signal. Behav.* 11 (11) <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1250993>.
- Erner, Y., Jaffe, M.J., 1982. Thigmomorphogenesis: the involvement of auxin and abscisic acid in growth retardation due to mechanical perturbation. *Plant Cell Physiol.* 23, 935–941.
- Garner, L., Allen Langton, F., Björkman, T., 1997. Commercial adaptations of mechanical stimulation for the control of transplant growth. *Acta Hort.* 435, 219–230. <https://doi.org/10.17660/ActaHort.1997.435.21>.
- Graham, T., Wheeler, R., 2017. Mechanical stimulation modifies canopy architecture and improves volume utilization efficiency in bell pepper: implications for bioregenerative life-support and vertical farming. *Open Agric.* 2 (1), 42–51. <https://doi.org/10.1515/opus-2017-0004>.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J., Siebeck, H., Jung, J., 1987. Regulation of plant morphology by growth retardants: effects on phytohormone levels in soybean seedlings determined by immunoassay. *Plant Physiol.* 84 (4), 1018–1021. <https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1018>.
- Helbig, D., Rocks, T., Gräbe, H., 2013. Alternative wachstumsregulierung von pflanzen mittels gesteuerter vibrationstechnik – pflanzenbauliche untersuchungen, 48. In: *Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung DGG & BHGL*. Bonn, p. 33.
- Helbig, D., Rocks, T., Gräbe, H., 2014. Alternative wachstumsregulierung bei zierpflanzen, 49. *Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung DGG & BHGL*.
- Jaffe, M.J., 1973. Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation – with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta* 114 (2), 143–157. <https://doi.org/10.1007/BF00387472>.
- Jaffe, M.J., Forbes, S., 1993. Thigmomorphogenesis: the effect of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regul.* 12 (3), 313–324. <https://doi.org/10.1007/BF00027213>.
- Jaffe, M.J., Galston, A.W., 1968. The physiology of tendrils. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19 (1), 417–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.19.060168.002221>.
- Jaffe, M.J., Leopold, A.C., Staples, R.C., 2002. Thigmo responses in plants and fungi. *Am. J. Bot.* 89 (3), 375–382. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.3.375>.
- Johjima, T., Latimer, J.G., Wakita, H., 1992. Brushing influences transplant growth and subsequent yield of four cultivars of tomato and their hybrid lines. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117 (3), 384–388. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(91\)90005-J](https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90005-J).
- Khoshtal, M., Salehi, H., Khosh-Khui, M., 2014. Seismomorphogenesis: a novel approach to acclimatization of tissue culture regenerated plants. *Biotech.* 4, 599–604. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0191-8>.
- Klaring, H.P., 1999. Effects of non-destructive mechanical measurements on plant growth: a study with sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci. Hort.* 81 (3), 369–375. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00022-9).
- Koch, R., Sauer, H., Rutenfranz, U., 2011. Einfluss von mechanischen Berührungseizen auf das Wachstum von Küchenkräutern im Topf. *Gesunde Pflanz.* 63, 199–204.
- Latimer, J.C., Mitchell, C.A., 1988. Effects of mechanical stress or abscisic acid on growth, water status and leaf abscisic acid content of eggplant seedlings. *Sci. Hort.* 36, 37–46. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90005-2).
- Latimer, J.G., Thomas, P.A., 1991. Application of brushing for growth control of tomato transplants in a commercial setting. *HortTech* 1 (1), 109–110. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH1.1.109>.
- Legendre, L., Yueh, Y.G., Grain, R., Haddock, N., Heinlein, P.F., Low, P.S., 1993. Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J. Biol. Chem.* 268 (33), 24559–24563.
- Liu, J., Liu, X., Dai, L., Wang, G., 2007. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *J. Genet. Genomics* 34 (9), 765–776. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60087-3](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60087-3).
- Mader, J.C., Emery, R.J.N., Turnbull, C.G.N., 2003. Spatial and temporal changes in multiple hormone groups during lateral bud release shortly following apex decapitation of chickpea (*Cicer arvense*) seedlings. *Phys. Plant.* 19, 293–308.

- Marković, D., Nikolic, N., Glinwood, R., Seisenbaeva, G., Ninkovic, V., 2016. Plant responses to brief touching: a mechanism for early neighbour detection? *PLoS One* 11 (11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165742>.
- Mensuali-Sodi, A., Serra, G., Veiga De Vincenzo, M.C., Ferrante, A., Tognoni, F., 2006. Ethylene response to mechanical stress perturbation of *Salvia splendens* L. Potted plants. *Acta Hort.* 723, 421–426. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.723.59>.
- Mitchell, C.A., 1996. Recent advances in plant response to mechanical stress: theory and application. *HortScience* 31 (1), 31–35. <https://doi.org/10.21273/hortsci.29.5.571a>.
- Morel, P., Crespel, L., Galopin, G., Moulla, B., 2012. Effect of mechanical stimulation on the growth and branching of garden rose. *Sci. Hortic.* 135, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.007>.
- Müller, D., Leyser, O., 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.* 107, 1203–1212. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr069>.
- Normanly, J., 1997. Auxin metabolism. *Physiol. Plant.* 100, 431–442.
- Onguo, J.M., Mizutani, F., Hossain, A.B.M.S., 2006. The effect of trunk electric vibration on the growth, yield and fruit quality of peach trees (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Sci. Hortic.* 108 (4), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.013>.
- Onoda, Y., Anten, N.P.R., 2011. Challenges to understand plant responses to wind. *Plant Signal. Behav.* 6 (7), 1057–1059. <https://doi.org/10.4161/psb.6.7.15635>.
- Ostín, A., Kowalczyk, M., Rhalero, R.P., Sandberg, G., Rademacher, W., 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J. Plant Growth Regul.* 34 (4), 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>.
- Radi, A., Lange, T., Niki, T., Koshicka, M., Pimenta, M.J., Reubens, L., Pannemans, B., Danjon, F., de Proft, M., de Baets, S., de Baerdemaeker, J., Poessen, J., Muys, B., 2009. The effect of mechanical stimulation on root and shoot development of young containerised *Quercus robur* and *Rubus pseudococcia* trees. *Trees-Struct. Funct.* 23, 1213–1228. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0360-x>.
- Rademacher, W., 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *J. Plant Growth Regul.* 34 (4), 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>.
- Reubens, B., Pannemans, B., Danjon, F., De Proft, M., De Baets, S., De Baerdemaeker, J., Poessen, J., Rocksach, B.M., Helbig, T., Grüneberg, H., 2013. Alternative wachstumsregulierung von pflanzen mittels gesteuerter vibrationstechnik - versuchsaufbau und erfassung technischer parameter, 48. In: *Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung DGG & BHGL*. Bonn., p. 32.
- Rocksach, T., Helbig, D., Grüneberg, H., 2013. Alternative Wachstumsregulierung von Pflanzen mittels gesteuerter Vibrationstechnik - Versuchsaufbau und Erfassung technischer Parameter, 48. In: *Gartenbau wissenschaftliche Jahrestagung DGG & BHGL*. Bonn. 32.
- Saidi, I., Ammar, S., Demont-Gaulet, N., Thévenin, J., Lepierre, C., Bouzid, S., Jouanin, L., 2010. Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. *Plant Signal. Behav.* 5 (2), 122–125. <https://doi.org/10.4161/psb.5.2.10302>.
- Salehi, H., Salehi, M., 2009. Effects of two methods of mechanical stress on snapdragon and wallflower plants growth responses. *Adv. Environ. Biol.* 3 (2), 157–161.
- Salisbury, F.B., 1963. The movement and action of the flowering hormone. *The Flowering Process*. Elsevier, pp. 184–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-013611-0.50016-6>.
- Sarmast, M.K., Salehi, H., Khosh-Khail, M., 2014. Seismomorphogenesis: a novel approach to acclimatization of tissue culture regenerated plants. *3 Biotech* 4 (6), 599–604. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0191-8>.
- Stepanova, A.N., Alonso, J.M., 2016. Auxin catabolism unplugged: role of IAA oxidation in auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (39), 10742–10744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613506113>.
- Suge, H., 1978. The genetic control of gibberellin production in rice. *Jpn. J. Genet.* 53, 199–207.
- Takashi, H., Jaffe, M.J., 1984. Thigmomorphogenesis: the relationship of mechanical perturbation to elicitor-like activity and ethylene production. *Physiol. Plant.* 61 (3), 405–411. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb08347.x>.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, S., Mori, H., 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02656.x> <https://doi.org/10.1029-1036>.
- Telewski, F.W., 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *Am. J. Bot.* 93 (10), 1466–1476. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.10.1466>.
- Vernieri, P., Mugnai, S., Tognoni, F., Serra, G., 2003. Growth control by mechanical conditioning in *Salvia splendens* sellow ex schult. *Acta Hort.* 614, 307–312. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.614.46>.
- Wang, C.Q., Guthrie, C., Sarmast, M.K., Dehesh, K., 2014. BBX19 interacts with constants to repress flowering locus T transcription, defining a flowering time checkpoint in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26 (9), 3589–3602. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130252>.
- Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L., Low, P.S., 1995. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol.* 109 (4), 1259–1266. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1259>.
- Zhang, N., 1990. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344, 87–97.

Warszawa, 27.01.2025

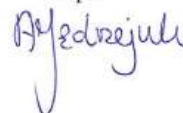
dr hab. Agata Jędrzejuk (prof. SGGW)
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
agata_jedrzejuk@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., Kuźma N., Nawrot K., Budzyński R., Orłowski A. (2020) Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*, *Scientia Horticulturae*, 274, 109661, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu doświadczenia oraz napisaniu manuskryptu, co stanowi 25% całej pracy.

Podpis



Warszawa, 27.01.2025

Mgr inż. Natalia Kuźma
Katedra Ochrony Środowiska i Dendrologii,
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie
natalia_kuzma@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Nawrot K., Budzyński R., Orłowski A., 2020, Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*, *Scientia Horticulturae*, 274, 109661, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu analiz biochemicznych, pomiarów biometrycznych oraz korekcy manuskryptu, co stanowi 50% całej pracy.

Podpis

Natalia Kuźma

Warszawa, 27.01.2025

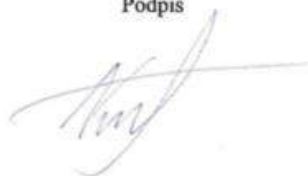
inż. Kamil Nawrot
Samodzielny Zakład Roślin Ozdobnych
Instytut Nauk Ogrodniczych,
SGGW w Warszawie

**Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Nawrot K., Budzyński R., Orłowski A., 2020, Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*, *Scientia Horticulturae*, 274, 109661, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu części analiz biochemicznych oraz pomiarów biometrycznych, co stanowi 10% całej pracy.

Podpis



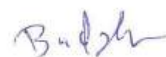
Warszawa, 27.01.2025

Mgr Robert Budzyński
Laboratorium Pomiarów Akustycznych
Instytut Informatyki Technicznej
SGGW w Warszawie
robert_budzynski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., Kuźma N., Nawrot K., Budzyński R., Orłowski A., 2020, Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*, *Scientia Horticulturae*, 274, 109661, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na skonstruowaniu maszyny generującej stres mechaniczny, co stanowi 10% całej pracy.



Podpis

Warszawa, 27.01.2025

Dr hab. Arkadiusz Orłowski (prof. SGGW)
Katedra Sztucznej Inteligencji
Instytut Informatyki Technicznej
SGGW w Warszawie
arkadiusz_orlowski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Rolnictwo i ogrodnictwo
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Jędrzejuk A., **Kuźma N.**, Nawrot K., Budzyński R., Orłowski A., 2020, Mechanical stimulation affects growth dynamics, IAA content and activity of POD and IAA oxidase in *Petunia x atkinsiana*, *Scientia Horticulturae*, 274, 109661, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu części statystycznej, co stanowi 5% całej pracy.

Podpis

