

## СВЯЗЬ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ТОМАТА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА С ОСОБЕННОСТЯМИ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ\*

М.А. ФИЛЮШИН<sup>1</sup> ✉, О.К. АНИСИМОВА<sup>1</sup>, Е.А. ДЖОС<sup>1, 2</sup>, А.В. ЩЕННИКОВА<sup>1</sup>,  
Е.З. КОЧИЕВА<sup>1</sup>

Солевой стресс оказывает негативное воздействие на урожайность культуры томата (*Solanum lycopersicum* L.). Одним из современных подходов к повышению солеустойчивости сортов томата может быть прайминг семян (предпосевной) или рассады растворами NaCl (цис-прайминг) или других химических агентов, способных стимулировать солеустойчивость (транс-прайминг). Известно, что прайминг способен приводить к эпигенетическим модификациям в геноме растений, необходимым для повышения эффективности ответа на повторные события засоления. Механизм, лежащий в основе солеустойчивости томата, мало изучен, однако может быть связан с содержанием фенольных соединений и активностью L-фенилаланин-аммоний-лиаз (PAL) — ферментов, катализирующих первую стадию фенилпропаноидного пути. В настоящей работе с использованием различающихся по солеустойчивости сортов томата отечественной селекции впервые определена динамика содержания фенольных соединений и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного (группа генов *PAL5*) и флавоноидного (*CHS2*) путей в процессе воздействия на растения солевого стресса. Установлено, что в качестве биомаркеров наличия у растений томата стрессовой памяти могут использоваться концентрация фенольных соединений спустя 1 ч воздействия избытком NaCl и снижение экспрессии генов группы *PAL5* спустя 24 ч воздействия. Целью нашего исследования стала оценка возможных связей между солеустойчивостью растений томата и регуляцией биосинтеза фенольных соединений. Использовали образцы четырех сортов томата *S. lycopersicum* — Отрадный (код сорта 8006741), Гном (9401318), Фонарик (9608117) и VS-342-18 (сорт в процессе разработки/регистрации) селекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО, Московская обл.). По предварительным данным ФНЦО, сорта Отрадный и Гном могли обладать повышенной устойчивостью к избытку соли в почве, тогда как сорта Фонарик и VS-342-18 чувствительны к засолению. Растения из семян урожая 2023 года получали в экспериментальной установке искусственного климата (ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия) при следующем режиме: 16 ч/8 ч (день/ночь), 23 °C/21 °C. Взрослые растения в стадии сформированных 8-10 листьев подвергали воздействию солевого стресса. Для этого опытные и контрольные образцы извлекали из почвы и переносили в воду. Спустя 1 ч опытные растения помещали в водный раствор, содержащий 100 мМ NaCl, для имитации солевого стресса; контрольные растения продолжали находиться в воде. Пробы (все листья с одного растения), отобранные через 1, 6 и 24 ч после начала стрессового воздействия, использовали для анализа содержания фенольных соединений и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного и флавоноидного путей. Целевые гены фенилпропаноидного и флавоноидного путей (гены группы *PAL* и ген *CHS2*) выбирали, основываясь на позиции генов в метаболическом пути и транскриптомных данных базы TomExpress. Экспрессию генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Последовательности праймеров подбирали, используя сравнительный структурный анализ целевых генов и их мРНК с помощью MEGA 7.0 и NCBI-Blast. Было показано, что у всех четырех сортов к 24-му ч воздействия NaCl наблюдался существенный рост содержания фенольных соединений (в зависимости от сорта в ~ 1,4-4,7 раза в сравнении с контролем), тогда как спустя 1 ч после начала воздействия стресса только наиболее солеустойчивый сорт Отрадный характеризовался активным накоплением фенольных соединений (в ~ 2 раза в сравнении с контролем). Неустойчивые к избытку соли сорта Фонарик и VS-342-18 оказались схожи по профилю изменения концентрации фенолов при стрессе. В то же время устойчивые сорта Отрадный и Гном показали сходную динамику только в период с 6-го по 24-й ч, а в точке 1 ч — прямо противоположную, где наиболее устойчивый сорт Отрадный характеризовался активным накоплением фенольных соединений (в ~ 2 раза в сравнении с контролем), сорт Фонарик — снижением их количества (в ~ 2 раза в сравнении с контролем). С помощью *in silico* анализа транскриптомов томата среди генов L-фенилаланин-аммоний-лиаз и халконсинтаз были определены целевые гены фенилпропаноидного и флавоноидного путей, наиболее высокоэкспрессирующиеся в листьях томата. Группа выбранных генов включала четыре из 16 известных генов *PAL* (Solyc09g007890, Solyc09g007900, Solyc09g007910 — *PAL5*, Solyc09g007920 — *PAL3*) и один из двух известных генов халконсинтазы *CHS2* (Solyc05g053550). Показано, что каждый из четырех

\* Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-16-00043, анализ содержания фенольных соединений и экспрессии генов) и Министерства науки и высшего образования РФ (подготовка растений, проведение воздействия солевого стресса, оценка стрессоустойчивости и сбор материала для анализа).

сортов томата характеризовался индивидуальной динамикой экспрессии целевых генов при воздействии стресса. Отличием наиболее солеустойчивого сорта Отрадный от других анализируемых сортов стало снижение содержания транскриптов генов группы *PAL5* через 24 ч после начала стресса. В случае гена *CHS2* неустойчивые сорта Фонарик и VS-342-18 показали прямо противоположную динамику экспрессии гена, тогда как устойчивые сорта Отрадный и Гном имели сходную реакцию. При этом специфических особенностей экспрессии *CHS2* у сорта Отрадный в сравнении с другими сортами не наблюдалось. На основе полученных данных сделаны предположения о возможном использовании в качестве биомаркеров наличия стрессовой памяти у растений томата следующих критериев — концентрации фенольных соединений спустя 1 ч воздействия солевого стресса и снижения экспрессионной активности генов группы *PAL5* спустя 24 ч воздействия. Полученные данные могут быть применены в селекции солеустойчивых сортов томата.

**Ключевые слова:** томат, солеустойчивость, стрессовая память, гены фенолпропаноидного пути, фенольный метаболизм, содержание фенольных соединений, селекция на устойчивость.

Томат (*Solanum lycopersicum* L., сем. *Solanaceae*) — важная и популярная во всем мире овощная культура, на урожайность которой влияют различные стрессовые факторы. Географическим центром происхождения томата (*S. lycopersicum* и другие родственные виды секции *Lycopersicon*) считают тихоокеанское побережье западной части Южной Америки, для которого характерно сильное засоление почв (1-3). Дикорастущие виды томата обладают солеустойчивостью, однако она снизилась у культивируемого томата в процессе доместикации, поэтому засоление почв стало одним из основных абиотических стрессоров для современных сортов *S. lycopersicum* (1-3).

Избыточное содержание соли в почве создает осмотический и ионный дисбаланс в клетках растения, что приводит к оксидативному стрессу, изменениям метаболизма и, как следствие, нарушению прорастания семян и жизнеспособности растений (1). В связи с этим получение солеустойчивых сортов и гибридов остается одним из ключевых направлений селекции томата, особенно для сортов защищенного грунта.

Солеустойчивость может иметь генетические основы, а может быть следствием памяти растения о стрессе, которая возникает при первичном стрессовом событии (прайминг, или праймирование) и закрепляется повторными воздействиями стрессора на протяжении жизненного цикла (4). Прайминг изначально был известен как агротехнический прием, заключающийся в предпосевном замачивании семян в растворах с химическими или биологическими добавками для стимуляции развития и стрессоустойчивости будущих растений (5-7). В настоящее время понятие прайминга охватывает не только семена, но и растения, находящиеся на разных стадиях развития (8-10). В применении к солевому стрессу праймингом для повышения солеустойчивости растений может служить как предпосевное замачивание семян в растворе соли, так и полив таким раствором рассады (10-12). Прайминг приводит к эпигенетическим модификациям, которые при повторных воздействиях засоления инициируют в растениях необходимые транскрипционные, метаболические и другие изменения. При этом в отсутствие стресса геном способен вернуться в исходное состояние (13).

Известны две разновидности прайминга — цис-прайминг (одинаковая природа первичного и последующих стрессовых воздействий) и транс-прайминг (первичное воздействие стимулирует эффективный ответ растения на стрессовые факторы другого типа) (13, 14). Это означает, что для повышения солеустойчивости растений в качестве первичного стимула не обязательно должен использоваться избыток NaCl. Показано, что солеустойчивость растений повышается после обработки растворами CaCl<sub>2</sub>, KCl, PEG (полиэтиленгликоль), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, фитогормонов (салициловая и ацетилсалициловая кислоты, брассинолид), аскорбиновой кислоты, мелатонина, а также

при прайминге воздействием обводнения, статического магнитного поля и других факторов (15, 16). Считается, что эффект транс-прайминга становится следствием сходной реакции транскриптома на ассоциированные типы стрессоров (13, 14, 16).

Память растения о стрессе как результат прайминга может быть как краткосрочной (проявляться в течение жизни), так и долгосрочной (наследоваться мейотически) (13, 17). В последнем случае растения становятся донорами признака и могут быть использованы в селекции солеустойчивых гибридов томата. Уже существующие сорта также могут быть улучшены посредством прайминга вплоть до появления у них наследуемой стрессовой памяти.

Значительная часть генов и метаболитов, участвующих в ответе растения на стрессор, служат маркерами стрессовой памяти, для которых характерно, в первую очередь, изменение экспрессии/содержания при прайминге (18-20). Сравнение динамики содержания метаболитов и/или степени экспрессии генов памяти у образцов при стрессовом воздействии может быть полезно при селекции стрессоустойчивых сортов и гибридов, как было показано на примере отбора доноров засухоустойчивости среди образцов андского картофеля (21).

Механизм, лежащий в основе солеустойчивости томата, мало изучен, однако его рассматривают с учетом данных по другим видам растений (1). В числе прочего его связывают с содержанием фенольных соединений, которые синтезируются фенилпропаноидным путем, и активностью L-фенилаланин-аммоний-лиаз (PAL), которые катализируют первую стадию фенилпропаноидного пути, превращая фенилаланин в коричную кислоту (22). Например, у *Platycodon grandiflorus* в ответ на солевой стресс дифференциально экспрессируется около 9 тыс. генов, изменяется содержание более 400 метаболитов, при этом большинство последних представляют собой продукты флавоноидного метаболического пути (22, 23).

В настоящей работе с использованием различающихся по солеустойчивости сортов томата отечественной селекции впервые определена динамика содержания фенольных соединений и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного (группа генов *PAL5*) и флавоноидного (*CHS2*) путей в процессе воздействия на растения солевого стресса. Установлено, что в качестве биомаркеров наличия у растений томата стрессовой памяти могут использоваться концентрация фенольных соединений спустя 1 ч воздействия избытка NaCl и снижение экспрессии генов группы *PAL5* спустя 24 ч воздействия.

Целью нашего исследования стала оценка возможных связей между солеустойчивостью растений томата и регуляцией биосинтеза фенольных соединений.

**Методика.** Использовали образцы четырех сортов томата *S. lycopersicum* — Отрадный (код сорта 8006741), Гном (9401318), Фонарик (9608117) и VS-342-18 (сорт в процессе разработки/регистрации) селекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО, Московская обл.) (<https://gos-sortrf.ru/registry/gosudarstvennyu-reestr-selektionnykh-dostizheniy-dopushchenykh-k-ispolzovaniyu-tom-1-sorta-rasteni/>). По предварительным данным ФНЦО, сорта Отрадный и Гном могли обладать повышенной устойчивостью к избытку соли в почве, тогда как сорта Фонарик и VS-342-18 чувствительны к засолению. Растения из семян урожая 2023 года получали в экспериментальной установке искусственного климата (ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия) при следующем режиме: 16 ч/8 ч (день/ночь), 23 °C/21 °C.

Взрослые растения в стадии сформированных 8-10 листьев подвер-

гали воздействию солевого стресса. Для этого опытные и контрольные образцы извлекали из почвы и переносили в воду (время начала опыта — 8<sup>00</sup>). Спустя 1 ч (9<sup>00</sup>) опытные растения помещали в водный раствор, содержащий 100 мМ NaCl, для имитации солевого стресса; контрольные растения оставляли в воде.

Пробы (все листья с одного растения) отбирали в 10<sup>00</sup> (1 ч стресса), 15<sup>00</sup> (6 ч стресса) и 9<sup>00</sup> следующего дня (24 ч стресса) и хранили при –80 °С. Для каждой временной точки использовали по два индивидуальных растения (два биологических повтора) в контроле и опыте. Все листья с растения собирали, чтобы нивелировать эффект разной стадии физиологического развития. Для этого материал тщательно растирали и перемешивали в фарфоровой ступке пестиком с использованием жидкого азота, и для последующих анализов брали навеску. Пробы использовали для анализа содержания фенольных соединений и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного и флавоноидного путей.

Содержание фенольных соединений определяли по Е.А. Ainsworth с соавт. (24). Собранные с одного растения целые листья измельчали растиранием в фарфоровой ступке пестиком с использованием жидкого азота. К навеске массой 20 мг добавляли 2 мл 95 % метанола, предварительно охлажденного при –20 °С, перемешивали встряхиванием на вортексе и выдерживали в темноте в течение 48 ч. Затем образец центрифугировали (центрифуга MiniSpin, «Eppendorf», Германия) в течение 5 мин при комнатной температуре и 14000 об/мин, надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку. После этого 100 мкл надосадочной жидкости смешивали (вортекс V-32, «Biosan», Латвия) с 200 мкл 10 % реактива Фолина-Чокалтеу и оставляли на 3-4 мин. Полученную смесь смешивали (вортекс V-32, «Biosan», Латвия) с 800 мкл 700 мМ раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, выдерживали в темноте 2 ч при комнатной температуре и центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре (14000 об/мин).

Надосадочную жидкость (1 мл) использовали для измерения поглощения при  $\lambda = 765$  нм (A<sub>765</sub>) на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic («Eppendorf», Германия). Концентрацию фенольных соединений (С) представляли как мг-экв. галловой кислоты (GAE) на 1 г сырой массы образца. Использовали последовательно две расчетные формулы:  $X = (A_{765} - b)/a$ , где а и b — коэффициенты из уравнения регрессии калибровочного графика;  $C = (X \cdot V \cdot d)/m$ , где С — содержание фенольных соединений, мг GAE/г сырой массы, V — объем экстрагента (95 % метанол, 2 мл), d — разведение образца (обычно не требуется, тогда 1), m — масса навески образца, мг.

Экспрессию генов анализировали в тех же листовых пробах, которые использовали для определения содержания фенольных соединений.

Целевые гены фенилпропаноидного и флавоноидного путей (группа генов *PAL* и ген *CHS2*) выбирали, основываясь на позиции генов в метаболическом пути и транскриптомных данных (Fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments; FPKM) базы TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>). Экспрессию генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Последовательности праймеров подбирали, используя сравнительный структурный анализ целевых генов и их мРНК (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <https://solgenomics.net/>) с помощью MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>) и NCBI-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): для генов группы *PAL5* 5'-cctggtcagattgaggctg-3' и 5'-ccactgtggagatgttcgga-3'; для гена *CHS2* 5'-ggatgaaatgagaaggcctca-3' и 5'-tggagacaacaactctcaac-3'.

Подготовка проб для ПЦР-РВ включала выделение из 0,5 г листовой

пробы и очистку суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase set, «QIAGEN N.V.», Германия), синтез кДНК (GoScript Reverse Transcription System, «Promega», США) и определение их качества (по присутствию полос, соответствующих 18S и 26S рРНК, и соотношению их интенсивности в геле — высокое качество при  $26S:18S \geq 2,0$ ; электрофорез в 1,5 % агарозном геле) и концентрации (Qubit® Fluorometer, «Thermo Fisher Scientific», США; Qubit RNA HS Assay Kit, «Invitrogen», США).

Экспрессию целевых генов нормализовали, используя референсные гены *Expressed* (SGN-U346908) и *actin-41* (NM\_001330119.1) (25). Для проведения ПЦР-РВ использовали набор «Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX» (ООО «Синтол», Россия), по 3 нг каждого препарата кДНК, соответствующие праймеры, систему CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad Laboratories», США). Программа амплификации была следующей: 5 мин при 95 °С; 15 с при 95 °С, 40 с при 60 °С (40 циклов).

Анализ экспрессии генов и содержания фенольных соединений проводили в двух биологических и трех технических повторах. Результаты обрабатывали статистически (GraphPad Prism v. 8, <https://www.graphpad.com/>). Данные выражали как средние значения ( $M$ ) со стандартными отклонениями ( $\pm SD$ ). Значимость ( $p < 0,05$ ) различий между показателями, полученными для разных временных точек, определяли, используя Two-way ANOVA (multiple comparisons, corrected with Bonferroni test).

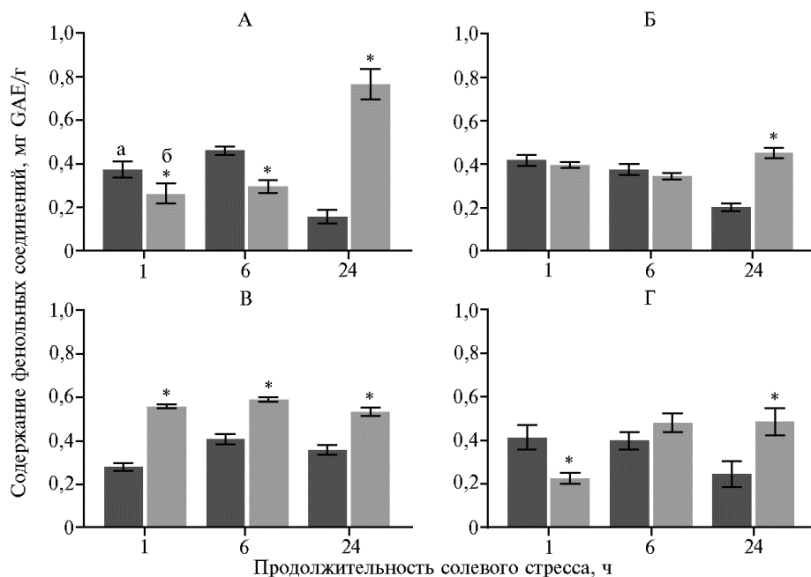
*Результаты.* Предполагается, что солеустойчивость растений томата может быть связана, в числе прочего, с активностью генов/ферментов фенолпропаноидного (ФАЛ) и флавоноидного (халконсинтаза) пути и содержанием фенольных соединений (23). В нашем опыте по воздействию солевого стресса на взрослые растения четырех сортов томата у двух сортов (Фонарик и VS-342-18) наблюдалось значительное увядание листьев и стебля через 24 ч воздействия стрессора, тогда как два других сорта сохраняли жизнеспособность и демонстрировали визуальную слабую реакцию (сорт Гном) или ее отсутствие (сорт Отрадный). Мы предположили, что солеустойчивость сортов Гном и Отрадный может быть следствием вариабельности генома или унаследованной эпигенетической памяти о солевом стрессе, дающей возможность эффективно приспосабливаться к неблагоприятным условиям.

Несмотря на межсортовые различия, у всех четырех сортов к 24-му ч эксперимента наблюдался существенный рост содержания фенольных соединений в листьях (рис. 1), что подтверждает участие последних в приспособлении растения к повышенным концентрациям NaCl.

Неустойчивые к избытку соли сорта Фонарик и VS-342-18, изначально имевшие сходное количество фенольных соединений в листьях, оказались схожи и по профилю изменения концентрации этих веществ при стрессе (см. рис. 1). В то же время устойчивые сорта Отрадный и Гном показали сходную динамику только в период с 6-го по 24-й ч, а через 1 ч — прямо противоположную, где наиболее устойчивый сорт Отрадный характеризовался активным накоплением фенольных соединений, а сорт Фонарик — снижением их количества (см. рис. 1). Такое различие может быть следствием эпигенетической памяти о стрессе у сорта Отрадный. Поэтому концентрация фенольных соединений спустя 1 ч воздействия солевого стресса может быть использована в качестве биомаркера стрессовой памяти.

На концентрацию фенольных соединений непосредственное влияние оказывает активность генов фенольного метаболизма (26). Проведенный *in silico* анализ экспрессии генов томата (TomExpress) позволил опре-

делить целевые гены для дальнейшего анализа среди известных 16 генов L-фенилаланин-аммоний-лиаз (*PAL*) и двух генов халконсинтаз (*CHS*). Как критерий отбора генов использовался наибольший уровень экспрессии в листьях томата, то есть для исследования выбирали гены, которые высоко экспрессировались в листьях; гены с низким уровнем экспрессии в анализ не брали.



**Рис. 1.** Содержание фенольных соединений в листьях контрольных (а) и опытных (б) растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) разных сортов в зависимости от продолжительности солевого стресса: А — Фонарик, Б — VS-342-18, В — Отрадный, Г — Гном ( $M \pm SD$ ,  $n = 2$ ,  $N = 3$ ).

\* Различия между контролем и опытом статистически значимы при  $p < 0,05$ .

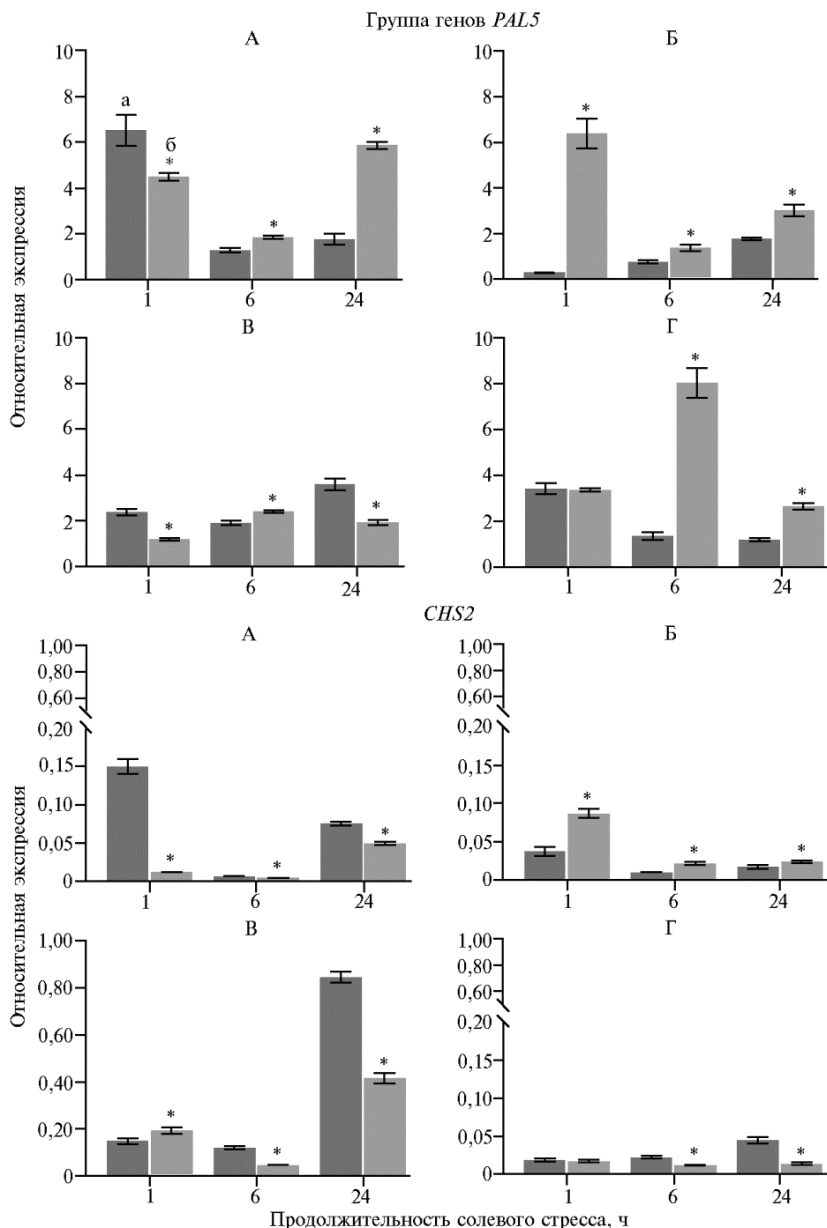
Четыре гена *PAL* (Solyc09g007890, Solyc09g007900, Solyc09g007910, Solyc09g007920) вошли в целевую группу. Значения FPKM для них составили соответственно 0,7507; 0,7685; 2,757 и 2,6883, что было существенно выше, чем для других 12 генов (0-0,1358 для 11 генов и 0,501 для *PAL6*, Solyc10g086180) (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>). Все четыре выбранных гена *PAL* расположены на 9-й хромосоме и высокогомологичны (<https://www.sol-genomics.net/>), что предполагает происхождение этих паралогов в результате тандемной дупликации одного из них и, как следствие, сходство их функции и активности. Поэтому праймеры к генам *PAL* были подобраны таким образом, чтобы анализировать общую экспрессию всех четырех паралогичных генов.

Целевая группа генов *PAL* включала *PAL5* (Solyc09g007910) (далее по тексту — группа генов *PAL5*), который известен участием в ответах на различные стрессовые факторы, включая избыток NaCl (27, 28). В группу также вошел *PAL3* (Solyc09g007920); ранее показано, что сверхэкспрессия гомологичного ему гена *GmPAL1.1* у *Arabidopsis thaliana* повышает солеустойчивость прорастающих семян (29). Помимо группы генов *PAL5*, для другого гена L-фенилаланин-аммоний-лиаз *PAL6* (10-я хромосома) ранее показано повышение экспрессии в ответ на солевой стресс (30, 31). Однако в целевую группу *PAL6* не вошел, поскольку его экспрессия в листьях в нормальных условиях была в ~ 5 раз ниже, чем у *PAL5* или *PAL3*.

В случае халконсинтаз был выбран ген *CHS2* (Solyc05g053550). Хотя оба гена *CHS* активируются при прайминге семян томата метилжасмонатом (28), содержание транскриптов *CHS2* в листе в ~ 1,4 раза (FPKM

0,1656 vs 0,118) превышает таковой *CHS1* (Solyc09g091510) (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>).

Анализ экспрессии целевых генов методом ПЦР-РВ показал, что каждый из четырех сортов томата характеризовался индивидуальной динамикой ответа на солевой стресс (рис. 2).



**Рис. 2.** Дифференциальная экспрессия группы генов *PAL5* и гена *CHS2* в листьях у сортов томата (*Solanum lycopersicum* L.) в зависимости от продолжительности солевого стресса: А — Фонарик, Б — VS-342-18, В — Отрадный, Г — Гном; а — контроль, б — опыт ( $M \pm SD$ ,  $n = 2$ ,  $N = 3$ ). \* Различия между контролем и опытом статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Только у сорта VS-342-18 экспрессия *PAL5* сильно выросла через 1 ч после переноса растений в раствор, содержащий NaCl, и опустилась почти до значений контроля через 6 ч (см. рис. 2), как это было показано для образца томата с неизвестной чувствительностью к избытку соли в исследовании J. Guo с соавт. (27). Неустойчивые сорта Фонарик и VS-342-18

показали схожий профиль экспрессии генов группы *PAL5* в период 6-24 ч, а через 1 ч после начала воздействия стресса — прямо противоположный: снижение экспрессии (Фонарик) или ее повышение (VS-342-18) (см. рис. 2).

Устойчивые сорта Отрадный и Гном также имели различия в стрессовой реакции генов группы *PAL5*: наблюдалась контрастная динамика через 1 и 24 ч и сходная через 6 ч. Однако к 6-му ч содержание транскриптов *PAL5* у сорта Отрадный оказалось почти в 3 раза ниже, чем у сорта Гном, и за счет разнонаправленной динамики к 24-му ч экспрессия *PAL5* у этих сортов почти сравнялась. Единственное отличие сорта Отрадный, предположительно имеющего стрессовую память, от других сортов — снижение активности *PAL5* через 24 ч (см. рис. 2).

В случае *CHS2* неустойчивые сорта Фонарик и VS-342-18 показали прямо противоположную динамику экспрессии гена, тогда как устойчивые сорта Отрадный и Гном имели сходную реакцию (см. рис. 2). При этом профиль *CHS2* был противоположен профилю генов *PAL5* у сортов, за исключением сорта VS-342-18, у которого динамика экспрессии *CHS2* и *PAL5* совпадала (см. рис. 2). Каких-либо специфических особенностей экспрессии *CHS2* у сорта Отрадный не наблюдалось.

Повышенное накопление фенольных соединений к 24-му ч стрессового воздействия у всех сортов (см. рис. 1) никак не коррелировало с профилем экспрессии генов *PAL5* и *CHS2* (см. рис. 2), что предполагает генотип-специфичную регуляцию биосинтеза фенольных соединений при ответе на стрессор. Следовательно, с учетом полученных нами данных в сочетании с разной солеустойчивостью анализируемых сортов профиль экспрессии *CHS2* не подходит для оценки степени проявления признака, тогда как снижение экспрессии генов группы *PAL5* через 24 ч (см. рис. 2) может быть использовано как биомаркер памяти.

В пользу последнего свидетельствует участие генов группы *PAL5* в ответе на осмотические (включая засоление) и биотические стрессоры (27, 28) и повышение солеустойчивости растения при сверхэкспрессии генов группы *PAL5* (29).

В частности, J. Guo с соавт. (27) продемонстрировали присутствие в геноме томата семейства генов *SIPAL5* и их сильную экспрессию в молодых и зрелых листьях (27), что соответствовало нашему выбору целевых генов группы *PAL5*. Авторы показали, что экспрессия *SIPAL5* стимулируется не только воздействием NaCl, но и другими видами стресса (засуха, симулированная маннитолом, и холод) (27). В отличие от наших данных, резкий рост экспрессии гена в ответ на засоление происходил спустя 1 ч после начала воздействия и далее постепенно снижался к 24 ч (27). В нашем исследовании экспрессия *SIPAL5* резко выросла к 1-му ч стресса только у солечувствительного сорта VS-342-18 и в целом оказалась генотип-специфичной, снизившись к 24-му ч только у сорта Отрадный (см. рис. 2). Подобный контраст может объясняться, во-первых, тем, что авторы (27) использовали вдвое большую концентрацию соли (200 мМ), чем в нашей работе (100 мМ), и ответ растения ожидаемо должен быть более быстрым и выраженным. Во-вторых, в статье J. Guo с соавт. (27) отсутствуют данные о солеустойчивости использованного сорта томата. Тем не менее эти результаты подкрепляют наше предположение о возможном статусе генов группы *PAL5* как биомаркера стрессовой памяти.

Еще одним подтверждением статуса генов *PAL5* как биомаркеров стало исследование Р. Król с соавт. (28), где было продемонстрировано повышение экспрессии *PAL5* в ответ на прайминг метилжасмонатом, использованный в целях защиты рассады томата от фузариозного увядания (28).



Авторы показали, что такой прайминг повышает устойчивость рассады к грибам *Fusarium*, и в ответ на инфекцию патогеном в листьях рассады значительно увеличивается содержание фенольных соединений и экспрессия *PAL5* (28). Следовательно, гены группы *PAL5* участвуют в защитном ответе растений томата не только на абиотические, но и на биотические стрессоры.

Наконец, важным свидетельством ключевой роли генов группы *PAL5* в стрессовом ответе растений и, как следствие, в запоминании стресса стало получение и анализ растений *Arabidopsis* со сверхэкспрессией гена *GmPAL1.1* сои (*Glycine max*) (29), продукт которого высокоомологичен белкам томата группы *PAL5*. Такие трансгенные растения накапливали повышенное количество флавоноидов в листьях, и их семена обладали повышенной устойчивостью к засолению и засухе при прорастании (29).

С учетом имеющихся данных (27-29) выдвинутое нами предположение о генах группы *PAL5* как биомаркерах стрессовой памяти требует дополнительных экспериментов по оценке экспрессии этих генов с имитацией повторяющихся (многоцикловых) воздействий солевого стресса и с варьированием условий воздействия (например, продолжительности обработки или концентрации NaCl).

Таким образом, в настоящем исследовании был определен профиль изменения содержания фенольных соединений и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного и флавоноидного пути (группы генов *PAL5* и гена *CHS2*) в процессе воздействия избытка NaCl на растения сортов томата Отрадный, Гном, Фонарик и VS-342-18. Подтверждены данные Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО) о солеустойчивости сортов Отрадный (наиболее устойчив) и Гном (менее устойчив), а также о чувствительности к засолению сортов Фонарик и VS-342-18. Наибольшей устойчивости сорта Отрадный сопутствовало активное (в ~ 2 раза) повышение содержание фенольных соединений в начале стрессового воздействия (1 ч), тогда как три других сорта характеризовались снижением (Фонарик, Гном) или отсутствием изменений (VS-342-18) количества фенолов. При этом к 24-му ч стресса все четыре сорта демонстрировали существенный рост содержания фенольных соединений (в ~ 1,4-4,7 раза). Определены целевые (для анализа экспрессии в динамике стрессового воздействия) гены фенилпропаноидного (четыре гена *PAL* Solyc09g007890, Solyc09g007900, Solyc09g007910 — *PAL5*, Solyc09g007920 — *PAL3*) и флавоноидного (ген *CHS2*) путей с наибольшей экспрессией в листьях томата (согласно *in silico* данным). Каждый из четырех сортов томата характеризовался индивидуальной динамикой экспрессии целевых генов в ответ на засоление. Наиболее устойчивый сорт Отрадный отличался от трех других сортов снижением экспрессии генов группы *PAL5* в конце стрессового воздействия (24 ч), тогда как в случае гена *CHS2* специфики не обнаружено. На основе результатов исследования выдвинуто предположение, что в качестве биомаркеров наличия у растений томата стрессовой памяти могут использоваться концентрация фенольных соединений спустя 1 ч воздействия солевого стресса и снижение экспрессионной активности генов *PAL5* спустя 24 ч воздействия. Полученные данные могут быть применены в селекции солеустойчивых сортов томата.

<sup>1</sup>Институт биоинженерии,  
ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,  
119071 Россия, г. Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2,  
e-mail: michel7753@mail.ru ✉, lelikanis@yandex.ru, elenadzhos@mail.ru,  
shchennikova@yandex.ru, ekochieva@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства,  
143080 Россия, Московская обл., пос. ВНИИССОК,  
ул. Селекционная, 14

Поступила в редакцию  
5 сентября 2024 года  
Принята к публикации  
6 октября 2024 года

## RELATIONSHIP BETWEEN THE RESPONSE OF TOMATO PLANTS TO SALT STRESS AND THE FEATURES OF REGULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BIOSYNTHESIS

M.A. Filyushin<sup>1</sup> ✉, O.K. Anisimova<sup>1</sup>, E.A. Dzos<sup>1, 2</sup>, A.V. Shchennikova<sup>1</sup>, E.Z. Kochieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioengineering, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology RAS, 33/2, Leninskii prospect, Moscow, 119071 Russia, e-mail michel7753@mail.ru (✉ corresponding author), lelikanis@yandex.ru, elenadzhos@mail.ru, shchennikova@yandex.ru, ekochieva@yandex.ru;

<sup>2</sup>Federal Research Center for Vegetable Growing, 14, ul. Selektionnaya, pos. VNISSOK, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143080 Russia

ORCID:

Filyushin M.A. orcid.org/0000-0003-3668-7601

Shchennikova A.V. orcid.org/0000-0003-4692-3727

Anisimova O.K. orcid.org/0000-0001-7693-8714

Kochieva E.Z. orcid.org/0000-0002-6091-0765

Dzos E.A. orcid.org/0000-0002-2216-0094

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-16-00043, analysis of the content of phenolic compounds and gene expression) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (growing plants, exposure to salt stress, assessment of stress resistance and collection of material for analysis)

Final revision received September 05, 2024

doi: 10.15389/agrobiology.2025.1.21eng

Accepted October 06, 2024

### Abstract

Salt stress has a negative impact on the yield of tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.). Excessive salt content in the soil results in an osmotic and ionic imbalance in plant cells, which leads to oxidative stress, metabolic changes and, thus, impaired seed germination and plant viability. One of the modern approaches to increasing the salt tolerance of tomato varieties can be priming of seeds (pre-sowing) or seedlings with NaCl solutions (cis-priming) or other chemical agents capable of stimulating salt tolerance (trans-priming). It is known that priming can lead to epigenetic modifications in the plant genome, which are necessary to increase the effectiveness of the response to repeated salinity events. Such modifications can be preserved throughout the life of the plant or inherited in subsequent generations which is called the stress memory of the plant. The mechanism underlying tomato salt tolerance is poorly understood; however, given data on other plant species, it may be related to the content of phenolic compounds and the activity of L-phenylalanine ammonia lyases (PAL), enzymes that catalyze the first stage of the phenylpropanoid pathway. In this work, for the first time, using tomato varieties of domestic selection with different salt tolerance, the dynamics of the content of phenolic compounds and the expression of key genes of the phenylpropanoid (*PAL5* gene group) and flavonoid (*CHS2*) pathways during the process of exposure of plants to salt stress were determined. It was found that the concentration of phenolic compounds after 1 h of exposure to NaCl and a decrease in the expression of *PAL5* group genes after 24 h of exposure could be used as biomarkers of the presence of stress memory in tomato plants. The aim of our study was to assess possible links between tomato salt tolerance and the regulation of phenolic compound biosynthesis. Accessions of four tomato *S. lycopersicum* varieties were used: Otradny (variety code 8006741), Gnom (9401318), Fonarik (9608117) and VS-342-18 (variety under development/registration) bred at the Federal Scientific Vegetable Center (FSVC, Moscow Province). According to preliminary data from the FSVC, the Otradny and Gnom varieties could have increased resistance to excess salt in the soil, while the Fonarik and VS-342-18 varieties are sensitive to salinity. Plants from seeds of the 2023 harvest were grown in an experimental climate control facility (Federal Research Center of Biotechnology RAS) under the following regime: 16 h/8 h (day/night), 23 °C/21 °C. Adult plants at the stage of formed 8-10 leaves were exposed to salt stress. For this purpose, experimental and control plants were removed from the soil and transferred to water. After 1 h, experimental plants were placed in an aqueous solution containing 100 mM NaCl to simulate salt stress; control plants continued to be kept in water. Probes (all leaves from one plant) collected 1, 6, and 24 h after the beginning of stress exposure were used to analyze the content of phenolic compounds and the expression of key genes of the phenylpropanoid and flavonoid pathways. The target genes of the phenylpropanoid and flavonoid pathways (*PAL* group genes and the *CHS2* gene) were selected based on the position of the genes in the metabolic pathways and transcriptome data from the TomExpress database. Gene expression was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Primer sequences were selected based on the comparative structural analysis of the target genes and their mRNA using MEGA 7.0 and NCBI-Blast. It was observed that all four varieties showed a significant increase in the content of phenolic compounds by the 24th h of NaCl exposure (depending on the variety, ~ 1.4-4.7 times compared to the control), whereas 1 h after the beginning of stress exposure, only the most salt-tolerant Otradny variety was characterized by active accumulation of phenolic compounds (~ 2 times compared to the control). The salt-sensitive varieties Fonarik and VS-342-18 turned out to be similar in the profile of phenols concentration changes under stress. The resistant varieties Otradny and Gnome showed similar dynamics only in the period from

the 6th h to the 24th h, and at the point of 1 h the opposite dynamics, where the most resistant variety Otradny was characterized by active accumulation of phenolic compounds (by ~ 2 times in comparison with the control), the variety Fonarik by a decrease in their amount (by ~ 2 times in comparison with the control). Using *in silico* analysis of tomato transcriptomes, the target genes of the phenylpropanoid and flavonoid pathways that are most highly expressed in tomato leaves were identified among the genes encoding L-phenylalanine ammonia lyases and chalcone synthases. The group of selected genes included four (out of 16 known) *PAL* genes (Solyc09g007890, Solyc09g007900, Solyc09g007910 — *PAL5*, Solyc09g007920 — *PAL3*) and a gene (one of two known) encoding chalcone synthase *CHS2* (Solyc05g053550). It was shown that each of the four tomato varieties was characterized by individual dynamics of target gene expression under stress. The most salt-tolerant variety Otradny differed from the other analyzed varieties in the decrease in the content of *PAL5* group gene transcripts 24 h after the onset of stress. In the case of the *CHS2* gene, the salt-sensitive varieties Fonarik and VS-342-18 showed directly opposite dynamics of gene expression, while the resistant varieties Otradny and Gnom had a similar response. At the same time, no specific features of *CHS2* expression were observed in the Otradny variety in comparison with other varieties. Based on the data obtained, we assumed about the possible use of the concentration of phenolic compounds after 1 h of exposure to salt stress and a decrease in the expression activity of the *PAL5* group genes after 24 h of exposure as biomarkers of the presence of stress memory in tomato plants. The obtained data can be used in the breeding of salt-tolerant tomato varieties.

Keywords: tomato, salt tolerance, stress memory, phenylpropanoid pathway genes, phenolic metabolism, phenolic compound content, tomato breeding for resistance.

## REFERENCES

1. Guo M., Wang X.-S., Guo H.-D., Bai S.-Y., Khan A., Wang X.-M., Gao Y.-M., Li J.-S. Tomato salt tolerance mechanisms and their potential applications for fighting salinity: a review. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 949541 (doi: 10.3389/fpls.2022.949541).
2. Gálvez F.J., Baghour M., Hao G., Cagnac O., Rodríguez-Rosales M.P., Venema K. Expression of *LeNHX* isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 51: 109-115 (doi: 10.1016/j.plaphy.2011.10.012).
3. Pailles Y., Awlia M., Julkowska M., Passone L., Zemmouri K., Negrão S., Schmöckel S.M., Tester M. Diverse traits contribute to salinity tolerance of wild tomato seedlings from the Galapagos Islands. *Plant Physiology*, 2020, 182(1): 534-546 (doi: 10.1104/pp.19.00700).
4. Jacques C., Salon C., Barnard R.L., Vernoud V., Prudent M. Drought stress memory at the plant cycle level: a review. *Plants*, 2021, 10(9): 1873 (doi: 10.3390/plants10091873).
5. Yanchenko A.V., Bukharov A.F., Fedosov A.Yu. *Ovoshchi Rossii*, 2023, 5: 28-36 (doi: 10.18619/2072-9146-2023-05-28-36) (in Russ.).
6. Bera K., Dutta P., Sadhukhan S. Seed priming with non-ionizing physical agents: plant responses and underlying physiological mechanisms. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(1): 53-73 (doi: 10.1007/s00299-021-02798-y).
7. Nile S.H., Thiruvengadam M., Wang Y., Samynathan R., Shariati M.A., Rebezov M., Nile A., Sun M., Venkidasamy B., Xiao J., Kai G. Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture-recent developments and future perspectives. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 254 (doi: 10.1186/s12951-022-01423-8).
8. Pazzaglia J., Badalamenti F., Bernardeau-Esteller J., Ruiz J.M., Giacalone V.M., Procaccini G., Marín-Guirao L. Thermo-priming increases heat-stress tolerance in seedlings of the Mediterranean seagrass *P. oceanica*. *The Marine Pollution Bulletin*, 2022, 174: 113164 (doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.113164).
9. Provera I., Martinez M., Zenone A., Giacalone V.M., D'Anna G., Badalamenti F., Marín-Guirao L., Procaccini G. Exploring priming strategies to improve stress resilience of *Posidonia oceanica* seedlings. *The Marine Pollution Bulletin*, 2024, 200: 116057 (doi: 10.1016/j.marpolbul.2024.116057).
10. Zulfiqar F., Nafees M., Chen J., Darras A., Ferrante A., Hancock J.T., Ashraf M., Zaid A., Latif N., Corpas F.J., Altaf M.A., Siddique K.H.M. Chemical priming enhances plant tolerance to salt stress. *Frontiers of Plant Sciences*, 2022, 13: 946922 (doi: 10.3389/fpls.2022.946922).
11. Leuendorf J.E., Frank M., Schmölling T. Acclimation, priming and memory in the response of *Arabidopsis thaliana* seedlings to cold stress. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 689 (doi: 10.1038/s41598-019-56797-x).
12. Genkel' P.A. *Fiziologiya zharo- i zasukhoustoychivosti rasteniy* [Physiology of heat and drought resistance in plants]. Moscow, 1982 (in Russ.).
13. Hilker M., Schwachtje J., Baier M., Balazadeh S., Bäurle I., Geiselhardt S., Hinch D.K., Kunze R., Mueller-Roeber B., Rillig M.C., Rolff J., Romeis T., Schmölling T., Steppuhn A., van Dongen J., Whitcomb S.J., Wurst S., Zuther E., Kopka J. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2016, 91(4): 1118-1133 (doi: 10.1111/brv.12215).

14. Nair A.U., Bhukya D.P.N., Sunkar R., Chavali S., Allu A.D. Molecular basis of priming-induced acquired tolerance to multiple abiotic stresses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(11): 3355-3371 (doi: 10.1093/jxb/erac089).
15. Gohari G., Alavi Z., Esfandiari E., Panahirad S., Hajihoseinlou S., Fotopoulos V. Interaction between hydrogen peroxide and sodium nitroprusside following chemical priming of *Ocimum basilicum* L. against salt stress. *Physiologia Plantarum*, 2020, 168(2): 361-373 (doi: 10.1111/ppl.13020).
16. Johnson R., Puthur J.T. Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 162: 247-257 (doi: 10.1016/j.plaphy.2021.02.034).
17. Lämke J., Bäurle I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, 2017, 18: 124 (doi: 10.1186/s13059-017-1263-6).
18. Aina O., Bakare O.O., Fadaka A.O., Keyster M., Klein A. Plant biomarkers as early detection tools in stress management in food crops: a review. *Planta*, 2024, 259(3): 60 (doi: 10.1007/s00425-024-04333-1).
19. Ding Y., Virilouvet L., Liu N., Riethoven J.J., Fromm M., Avramova Z. Dehydration stress memory genes of *Zea mays*; comparison with *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 141 (doi: 10.1186/1471-2229-14-141).
20. Avramova Z. Transcriptional 'memory' of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant Journal*, 2015, 83(1): 149-159 (doi: 10.1111/tpj.12832).
21. Vasquez-Robinet C., Mane S.P., Ulanov A.V., Watkinson J.I., Stromberg V.K., De Koeyer D., Schafleitner R., Willmot D.B., Bonierbale M., Bohnert H.J., Grene R. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(8): 2109-2123 (doi: 10.1093/jxb/ern073).
22. Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y.H., Yu J.Q., Chen Z. Functional analysis of the *Arabidopsis PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1526-1538 (doi: 10.1104/pp.110.157370).
23. Zhang M., Xing Y., Ma J., Zhang Y., Yu J., Wang X., Jia X. Investigation of the response of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC to salt stress using combined transcriptomics and metabolomics. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 589 (doi: 10.1186/s12870-023-04536-w).
24. Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 875-877 (doi: 10.1038/nprot.2007.102).
25. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Plants*, 2020, 9(9): 1169 (doi: 10.3390/plants9091169).
26. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12824 (doi: 10.3390/ijms222312824).
27. Guo J., Wang M.H. Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*SIPAL5*) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Molecular Biology Reports*, 2009, 36: 1579-1585 (doi: 10.1007/s11033-008-9354-9).
28. Król P., Igielski R., Pollmann S., Kępczyńska E. Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemi-biotroph *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 179: 122-132 (doi: 10.1016/j.jplph.2015.01.018).
29. Zhang X., Shen Y., Mu K., Cai W., Zhao Y., Shen H., Wang X., Ma H. Phenylalanine ammonia lyase GmPAL1.1 promotes seed vigor under high-temperature and -humidity stress and enhances seed germination under salt and drought stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plants*, 2022, 11(23): 3239 (doi: 10.3390/plants11233239).
30. Roşca M., Mihalache G., Stoleru V. Tomato responses to salinity stress: from morphological traits to genetic changes. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1118383 (doi: 10.3389/fpls.2023.1118383).
31. Hoffmann J., Berni R., Suter F.M., Gutsch A., Hausman J.F., Saffie-Siebert S., Guerriero G. The effects of salinity on the anatomy and gene expression patterns in leaflets of tomato cv. Micro-Tom. *Genes*, 2021, 12(8): 1165 (doi: 10.3390/genes12081165).