กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในรากและใบของถั่วเขียวในสภาวะเครียดเกลือ

Antioxidant Enzymatic Activities in Roots and Leaves of Mungbean under Salt Stress

นิธินาถ อริยมงคลชัย ประกิจ สมท่า และ จำเนียร ชมภู *

Nitinat Ariyamongkonchai, Prakit Somta and Jamnian Chompoo*

Received: November 17, 2021
Revised: December 7, 2021
Accepted: December 14, 2021

Abstract: Soil salinity causes growth reduction and yield loss in crops. Understanding mechanism(s) of resistance to salinity in crops can be useful for breeding for salinity resistance. Ion compartmentalization, osmotic adjustment and antioxidative defense are mechanisms of plant resistance to salinity. The objective of this study was to assess resistance to NaCl in mungbean. Visual injury, protein contents and activities of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), guaiacol peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) in roots and leaves of 12 accessions and 2 commercial mungbeans grown in nutrient solution containing NaCl were evaluated. The results showed that mungbean accessions JP231216, JP240338, JP229175 and JP240379 were highly resistant to salt stress at the concentration of 100 mM NaCl close to zombie pea, TVNu240 and AusTRCF322105. Protein content and activities of GPX and SOD in leaves and roots were increased in these accessions. The resistant accessions maybe useful as genetic resource for breeding mungbeans for salt stress tolerance.

Keywords: legume, osmotic stress, reactive oxygen species

บทคัดย่อ: ดินเค็มส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชลดลง การเข้าใจถึงกลไกการต้านทานความเค็มของพืช สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานความเค็มได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือ ด้วยการประเมินอาการได้รับพิษด้วยสายตา วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), guaiacol peroxidase (GPX) และ superoxide dismutase (SOD) ในรากและใบของถั่วเขียว 12 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 2 พันธุ์ ที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือ NaCl ผลการทดลองพบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP231216, JP240338, JP229175 และ JP240379 ที่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 100 มิลลิโมลาร์ ได้ใกล้เคียงกับถั่วซอมบี้สายพันธุ์ TVNu240 และ AusTRCF322105 ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือ โดยมีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ GPX และ SOD ในรากและใบเพิ่มขึ้น ดังนั้นสายพันธุ์ที่ทนทานนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือ

คำสำคัญ: ถั่ว ความเครียดออสโมติก อนุมูลอิสระออกซิเจน

---

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140.

*Corresponding author: agrjnc@ku.ac.th

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เพื่อการบริโภคโดยตรงและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น ถั่วงอก วุ้นเส้น แป้งถั่วเขียว วุ้นเส้นกึ่งสำเร็จรูป ถั่วซีก และขนมชนิดต่างๆ ซึ่งเกษตรกรนิยมปลูกถั่วเขียวผิวมันก่อนและหลังการทำนาหรือทำไร่เพื่อเป็นการบำรุงรักษาความอุดมสมบูรณ์ในดิน เนื่องจากถั่วเขียวสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดี และเป็นพืชที่ใช้เวลาในการเพาะปลูกสั้นเพียง 60-75 วัน นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่ใช้น้ำในการผลิตน้อยกว่าพืชไร่ชนิดอื่น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) นอกจากนี้เมล็ดถั่วเขียวผิวมันนั้นมีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งและโปรตีนประมาณ 58 เปอร์เซ็นต์และ 24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Kumar and Pandey, 2020) ดังนั้นเมล็ดถั่วเขียวผิวมันจึงเป็นแหล่งของพลังงานที่มีคุณภาพให้คุณค่าทางอาหารสูง และมีคอเลสเตอรอลต่ำ เมล็ดถั่วเขียวนั้นนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารกันอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศอย่างต่อเนื่องส่งผลให้พื้นที่ปลูกถั่วเขียวของโลกขยายตัวเพิ่มขึ้นทุกปีๆ ละ 5 เปอร์เซ็นต์ (Nair *et al*., 2013) สำหรับประเทศไทยพบปัญหามีพื้นที่ดินเค็มมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และพื้นที่ชายทะเล ประมาณ 22 ล้านไร่ ส่วนใหญ่จะพบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากที่สุดประมาณ 17.8 ล้านไร่ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากน้ำชลประทานที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จากน้ำทะเล (ปราณี, 2558) ดินที่มีปริมาณเกลือมากเกินไป จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหาร รากพืชมีประสิทธิภาพในการดูดน้ำได้น้อยลง ไอออนของ Na^+ และ Cl^- ทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำ กระบวนการเผาผลาญอาหารและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของพืชลดลง หรืออาจมีการสะสมไอออนที่เป็นพิษต่อพืช ซึ่งอาจรุนแรงทำให้พืชตายได้ (Tester and Davenport, 2003)

ความเครียดเกลือในดินมักเป็นปัญหาในพื้นที่แห้งแล้งและกึ่งแห้งแล้ง ที่ส่งผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในพืช ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง สาเหตุเบื้องต้นเกิดจากความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ซึ่งเป็นภาวะที่พืชต้องใช้พลังงานสูงในการดูดน้ำจากดินขึ้นมาใช้เมื่อเกินระดับที่พืชดูดน้ำมาใช้ได้ พืชจะแสดงอาการเหี่ยวเฉา และความเป็นพิษของธาตุอาหารบางชนิด (ion toxicity) (James *et al*., 2011; Alharby *et al*., 2019) พืชจะมีการตอบสนองต่อความเครียดเกลือได้หลายกลไกไม่ว่าจะเป็นในระดับโมเลกุล ชีวเคมี และสรีรวิทยา ได้แก่ การแยก ดูดซึมและ/หรือเคลื่อนย้ายประจุ การสังเคราะห์สารป้องกันแรงดันออสโมติก (osmoprotectants) และการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) เพื่อให้สามารถทนทานและมีชีวิตอยู่รอดในสภาพเครียดได้ (Sanoubar *et al*., 2020) เนื่องจากความเครียดจากเกลือส่งผลให้พืชเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) พบมากบริเวณคลอโรพลาสต์ (Dietz *et al*., 2016) ไมโทคอนเดรีย (Huang *et al*., 2016) และเพอรอกซิโซม (Sandalio and Romero-Puertas, 2015) ซึ่ง ROS เป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไร้คู่ ทำให้โมเลกุลไม่เสถียรและไวต่อปฏิกิริยา สามารถดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาเพื่อให้ตัวมันเองเป็นโมเลกุลที่เสถียร จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างไขมัน โปรตีนและ DNA ในเซลล์พืช และพืชอาจตายได้ (Huang *et al*., 2019) กลไกหนึ่งที่พืชสามารถกำจัดอนุมูลอิสระนี้ได้ ได้แก่ การสังเคราะห์เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GRT), glutathione peroxidase (GPX) และ glutathione S-transferase (GST) (Apel and Hirt, 2004) ซึ่งมีรายงานในพืชบางชนิดที่ทนทานในสภาวะเครียดเกลือ ตัวอย่างเช่น ข้าว (Chawla *et al*., 2012) ข้าวโพด (AbdElgaward *et al*., 2016) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือด้วยการประเมินอาการได้รับพิษด้วยสายตา วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการพัฒนาพันธุ์พืชถั่วเขียวให้ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลูกถั่วเขียวในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยวางเมล็ดถั่วเขียวบนฟองน้ำในโฟมเจาะรู วางกระบะพลาสติก ขนาด 33 x 44 x12 เซนติเมตร ในโรงเรือนในที่มีแสงสว่างส่องทั่วถึงเท่ากัน เพื่อให้พืชทดลองได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอในแต่ละชุดการทดลอง ติดตั้งระบบปั๊มออกซิเจนภายในแต่ละกระบะ เพื่อเติมออกซิเจนให้แก่ระบบ วิธีการนี้จะทำให้สารละลายธาตุอาหารไหลวนภายในกระบะได้ และ เติมออกซิเจนให้แก่รากพืช โดยที่การทดลองนี้จะทำการเปิดปั๊มทุกวันในช่วงเช้า เวลา 8.00-11.00 น. (Figure 1)

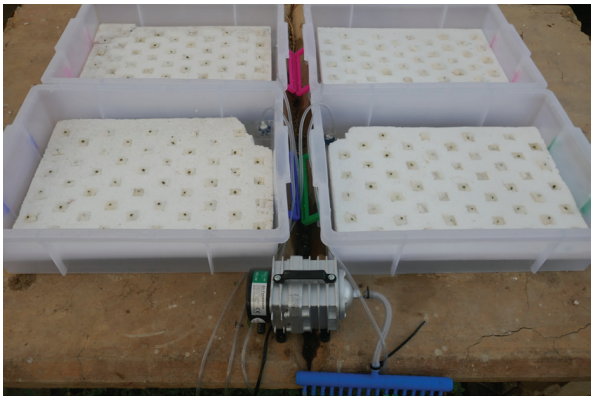

Figure 1 Setting up a hydroponic system in this study.

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ สิ่งทดลอง คือ ถั่วเขียว จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ JP240327 (ประเทศเกาหลี), JP99049 (ประเทศไต้หวัน), JP229098 และ JP231216 (ประเทศไทย), JP240338 และ JP229175 (ประเทศอินเดีย) JP103118, JP240379 และ JP240383 (ประเทศปากีสถาน) และ JP22954 (ประเทศอิหร่าน) พันธุ์การค้า 2 พันธุ์ ได้แก่ KUML8 (ประเทศไทย) และ กำแพงแสน 2 (KPS2; ประเทศไทย) และถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ TVnu240 (ประเทศสาธารณรัฐแอฟริกากลาง) และ AusTRCF322105 (ประเทศออสเตรเลีย) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ในระดับปานกลางและระดับสูงตามลำดับ (ประกิจ สมท่า, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ทดสอบการตอบสนองของถั่วเขียวต่อสภาพเค็ม โดยปลูกสิ่งทดลองในอาหารเหลวที่ดัดแปลงมาจาก Dachapak *et al*. (2019) และมี NaCl เป็นองค์ประกอบที่ระดับความเข้มข้น 0, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ NaCl จากความเข้มข้นน้อยไปมาก ซึ่งจะทำการเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของ NaCl ทุกๆ 7 วัน สังเกตอาการได้รับพิษและให้คะแนนด้วยการประเมินด้วยสายตา ตามลักษณะอาการ (Figure 2) ดังนี้ (1) คือ ใบเขียวเป็นปกติ (2) ใบเหลืองเล็กน้อย (3) ใบเหลืองปานกลาง (4) ใบเหลืองมาก และ (5) ใบเหี่ยวเฉา หลังจากอยู่ในสภาวะเครียดเกลือ 5 วัน

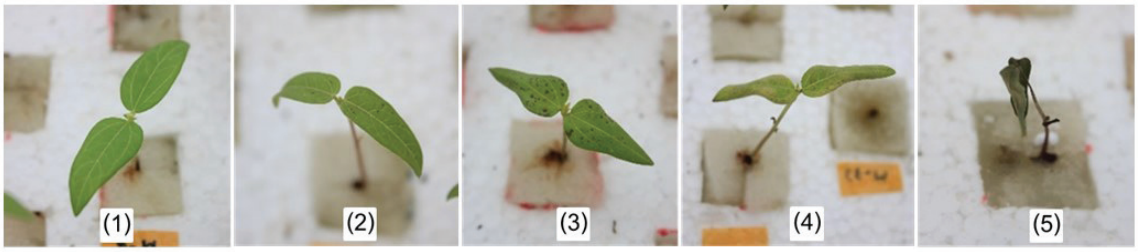

Figure 2 Scales used to assess tolerance to salinity by visualization.

เก็บตัวอย่างรากและใบของถั่วเขียวแต่ละพันธุ์ที่สามารถทนทานในระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ (เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ถั่วเขียวแสดงอาการได้รับพิษและตายในที่สุด) เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปรียบเทียบกันระหว่างถั่วเขียวที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือ NaCl กับถั่วเขียวสายพันธุ์/พันธุ์เดียวกันที่ปลูกในอาหารเหลวที่ไม่มี NaCl เป็นส่วนประกอบ (ชุดควบคุม) ต่อไป

การเตรียมตัวอย่าง

นำใบและรากถั่วเขียว 0.5 กรัม มาสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย K-phosphate buffer (100 มิลลิโมลาร์, pH 6.8) ที่มีส่วนผสมของ ethylene-1, 2-diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน ได้เป็นสารสกัดเอนไซม์ นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกันในถั่วเขียวพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของเกลือ NaCl ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ กับถั่วเขียวพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในอาหารเหลวที่ไม่มี NaCl เป็นส่วนประกอบ

วิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน

นำสารสกัดเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ที่มีส่วนประกอบของ coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ phosphoric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) วางสารผสมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (Bradford, 1976) เมื่อ $Y= 0.0034x + 0.8406$ ($R^2= 0.986$) เปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT)

นำสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (ค่า pH 7.0) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ hydrogen peroxide (20 มิลลิโมลาร์) ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มสารผสมไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อนาทีต่อน้ำหนักสดตัวอย่าง โดยที่ค่า extinction coefficient เท่ากับ 36.6 ต่อมิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร (Havir and McHale, 1987) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ CAT กับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST)

นำสารสกัดเอนไซม์ 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลาย 1-chloro-2,4-dinitrobenzene ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีสารผสมของ phosphate buffer (pH 6.5) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และสาร glutathione ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบ่มสารผสมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ GST จากการเกิด GSH-CDNB มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Buono and Ioli, 2011) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ GST กับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ guaiacol peroxidase (GPX)

นำสารสกัดเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลาย potassium phosphate buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีส่วนผสมของสาร guaiacol ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสาร hydrogen peroxide ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้น 1 นาที นำสารผสมตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ GPX จากปริมาณของสาร hydrogen peroxide ที่ลดลง มีหน่วยเป็นยูนิตต่อนาทีต่อน้ำหนักสด ตัวอย่าง โดยที่ค่า extinction coefficient เท่ากับ 26.6 ต่อมิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร (Jiang *et al*., 2016) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ GPX กับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

นำสารสกัดเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสาร reaction mixture (ที่มีส่วนผสมของ phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.8) สาร methionine ความเข้มข้น 130 มิลลิโมลาร์ สาร EDTA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สาร nitroblue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 0.75 มิลลิโมลาร์ และสาร riboflavin ความเข้มข้น 0.02 มิลลิโมลาร์) นำสารผสมตัวอย่างไปวางไว้ใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ SOD จากปฏิกิริยาการยับยั้งกระบวนการ photoreduction ของ NBT ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Giannopolitis and Ries, 1977) เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ SOD กับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) คำนวณผลต่างกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดในถั่วเขียวสายพันธุ์เดียวกัน จากสูตรดังนี้

กิจกรรมของเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) = [(Treatment – Control)/ Control] x 100

เมื่อ Control คือ กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนรากหรือใบของถั่วเขียวที่ปลูกในอาหารเหลวที่ไม่มีส่วนผสมของ NaCl และ Treatment คือ กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนรากหรือใบของถั่วเขียวที่ปลูกในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของ NaCl

โดยที่ ผลเป็นลบ (-) แสดงว่า กิจกรรมของเอนไซม์ในถั่วเขียวพันธุ์นั้นลดลงเมื่อเจริญเติบโตในสภาพเครียดเกลือ

ผลเป็นบวก (+) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ในถั่วเขียวพันธุ์นั้นเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญเติบโตในสภาพเครียดเกลือ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

จากการสังเกตอาการได้รับพิษของถั่วเขียวที่แสดงออกเมื่ออยู่ภายใต้สภาพเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ แล้วให้คะแนนด้วยการประเมินด้วยสายตา พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ที่สามารถทนทานต่อสภาพเครียดเกลือ ที่ระดับคะแนน 1 ได้แก่ AusTRCF322105 และ TVnu240 ที่ระดับคะแนน 2 ได้แก่ JP231216, JP240338, JP229175, JP103118, JP240379 และ JP299254 ที่ระดับคะแนน 3 ได้แก่ JP229098 ส่วนที่ระดับคะแนน 4 ได้แก่ JP240327, JP99049 และ JP240383 โดยที่พันธุ์การค้า KUML8 และ KPS2 แสดงอาการเหี่ยวเฉา มีระดับคะแนน 5

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในรากและใบของถั่วเขียว ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) พบว่า ถั่วเขียวมีการสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้นในส่วนรากมากกว่าส่วนใบเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ซึ่งปริมาณโปรตีนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl เพิ่มมากขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP229098 มีการสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้นมากที่สุดเท่ากับ 87.27 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม รองลงมาได้แก่ TVnu240, AusTRCF322105 และ JP231216 เท่ากับ 71.04, 61.16 และ 57.06 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ KUML8 และ KPS2 มีการสะสมโปรตีนที่บริเวณรากน้อยเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เท่ากับ 40.80 และ 59.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์ KUML8 และ KPS2 ตายไม่สามารถเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl 75 มิลลิโมลาร์ได้ จึงส่งผลให้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl

100 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลการทดลองของถั่วเขียวทั้งสองพันธุ์นี้ โดยที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า ถั่วเขียวทุกสายพันธุ์/พันธุ์ยังคงมีการสะสมโปรตีนที่บริเวณรากมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเขียวสายพันธุ์/พันธุ์เดียวกันในชุดควบคุม ยกเว้น สายพันธุ์ JP299175, JP103118, JP240385 และ JP22954 สำหรับปริมาณโปรตีนที่ส่วนใบของถั่วเขียว พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ AusTRCF322105, TVnu240, JP229098 และ JP240379 ยังคงมีการสะสมโปรตีนที่บริเวณใบมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือเปรียบกับชุดควบคุม

Table 1 Protein content (% of control) in roots and leaves of mungbeans grown under salt stress (75 and 100 mM).

Accessions	Roots		Leaves	
	75 mM	100 mM	75 mM	100 mM
JP240327	25.23±1.12 e[1/] e[2/]	15.51±5.25 d	-32.05±1.80 f	44.60±4.35 b
JP99049	18.89±3.27ef	2.57±1.32 e	-25.31±5.06 f	-46.87±6.64 h
JP229098	84.27±3.91 a	31.29±2.93 c	-64.34±4.09 h	26.85±1.49 c
JP231216	57.09±6.84 c	56.07±6.34 a	-38.94±3.69 g	-26.35±6.10 f
JP240338	13.51±3.51 f	27.53±3.17 c	-5.30±0.30 d	-12.40±2.15 e
JP229175	26.01±5.46 e	-25.81±5.15 g	-25.81±5.59 f	-68.56±8.31 i
JP103118	24.86±4.41 e	-2.54±1.58 e	-13.73±3.48 e	-44.42±4.17 h
JP240379	10.10±0.74 f	13.11±2.75 d	13.11±0.75 c	54.20±3.84 a
JP240383	48.45±8.20 d	-3.75±2.50 e	-3.75±2.50 d	-34.00±1.42 g
JP22954	25.93±5.58 e	-15.79±5.53 f	-15.79±5.54 e	-42.96±2.71 h
TVNu240	71.04±5.79 b	46.82±6.46 b	47.47±6.78 a	48.23±2.97 ab
AusTRCF322105	61.16±0.91 c	19.93±4.57 d	33.26±3.01 b	7.14±0.08 d
KUML8	-40.81±5.12 g	nd[3/]	27.13±3.44 b	nd
KPS2	-59.01±8.76 h	nd	-6.16±1.91 d	nd

[1/]The data are presented as the mean ± standard deviation of five replications.

[2/]Means followed by a same letter within each column are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

[3/]not determined

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP99049, JP240338, JP229175, JP103118 และ JP240379 มีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นที่บริเวณรากเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ถั่วซอมบี้ทั้งสองสายพันธุ์ คือ AusTRCF322105 และ TVnu240 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ลดลง (Figure 3A) ส่วนที่บริเวณใบ พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP99049, JP231216, JP240338, JP229175, JP103118, JP240379 และ JP22954 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือความเข้มข้นของเกลือ NaCl 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยที่ถั่วเขียวพันธุ์ KUML8 และ KPS2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเช่นกันที่ระดับความเข้มข้นของความเครียดเกลือ 75 มิลลิโมลาร์ ในทางกลับกัน พบว่า ถั่วซอมบี้สายพันธุ์ AusTRCF322105 มีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ลดลง เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ (Figure 3B)

สำหรับผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GST พบว่า ถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในส่วนรากและใบลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ถั่วซอมบี้สายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVnu240 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ GST เพิ่มขึ้นทั้งที่ส่วนรากและใบ (Figure 3C และ 3D)

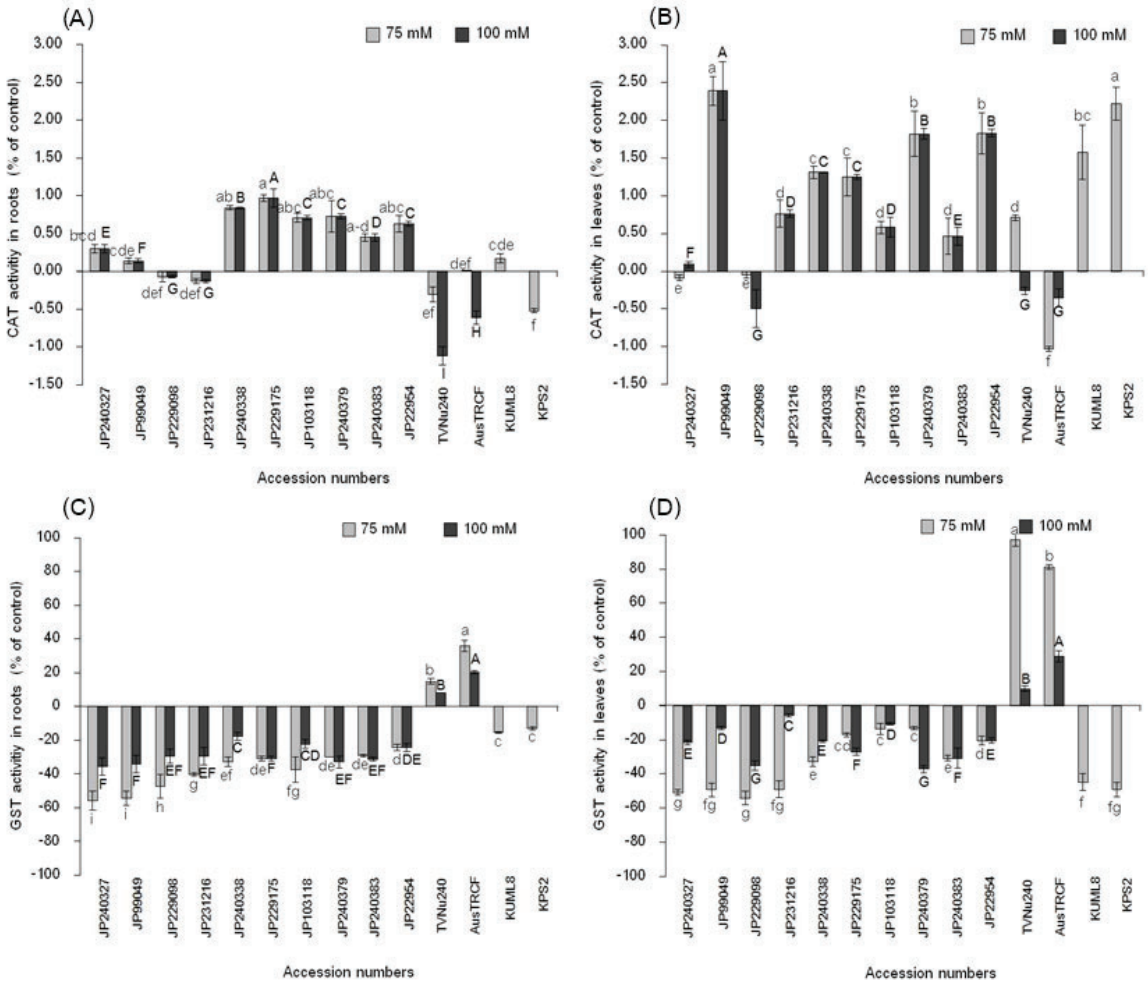

Figure 3 The activity of catalase (A,B) and glutathione S-transferase (C,D) in root and leaves of mungbean seedlings grown under salt stress. The data are presented as the mean and bar is standard deviation. Different lower-case letters indicate significant difference of means at 75 mM NaCl and the capital letters indicate significant difference of means at 100 mM NaCl.

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ GPX พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP231216, JP240338, JP229175, JP103118, JP240379 และ JP22954 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในส่วนรากเพิ่มขึ้น โดยที่สายพันธุ์ JP229175 และ JP240379 มีกิจกรรมของเอนไซม์ GPX เพิ่มขึ้น 21.76 และ 25.24 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่ถั่วซอมบี้สายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVnu240 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้น 11.81 และ 30.09 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือ ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ โดยที่ในสภาวะเครียดเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP231216, JP240338, JP229175, JP103118, JP240379 และ JP22954 มีกิจกรรมของ

เอนไซม์ชนิดนี้ในส่วนของรากเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่ลดลง ส่วนถั่วซอมบี้ทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ GPX เพิ่มมากขึ้นมากกว่าในสภาวะความเครียดเกลือความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ (Figure 4 A) ในขณะที่ส่วนใบของถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้มากกว่าส่วนราก ยกเว้นสายพันธุ์ JP240327, JP99049 และพันธุ์ KUML8 และ KPS2 โดยที่ถั่วซอมบี้ AusTRCF 322105 และ TVnu240 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้น 60.45 และ 4.37 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 75 มิลลิโมลาร์ และกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 77.25 และ 34.28 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 100 มิลลิโมลาร์ (Figure 4B)

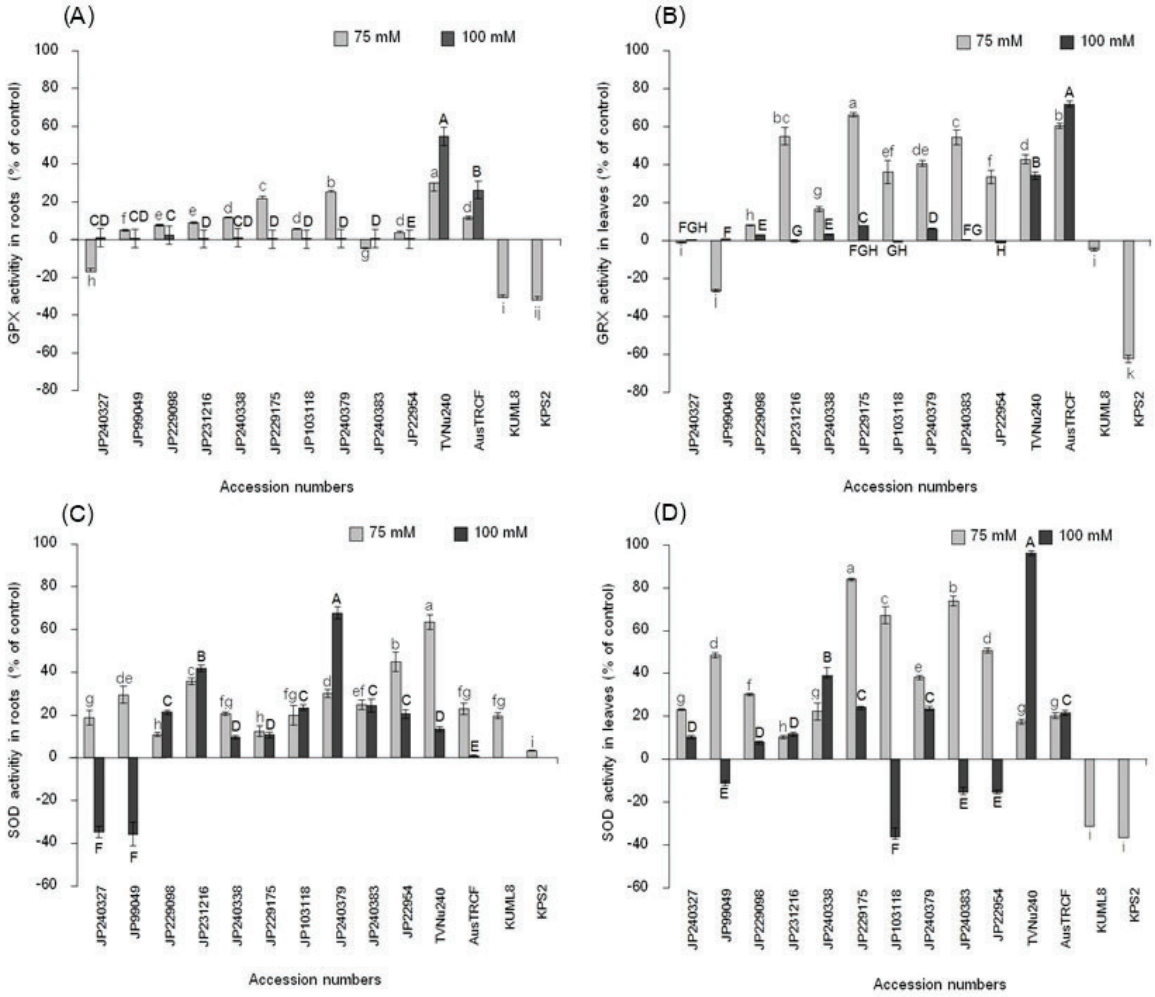

Figure 4 The activity of guaiacol peroxidase (A,B) and superoxide dismutase (C,D) in root and leaves of mungbean seedlings under salt stress. The data are presented as the mean and bar is standard deviation. Different lower-case letters indicate significant difference of means at 75 mM NaCl and the capital letters indicate significant difference of means at 100 mM NaCl.

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่ส่วนรากและใบของถั่วเขียว พบว่า ส่วนรากของถั่วเขียวทุกสายพันธุ์/พันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ ส่วนในสภาวะเครียดเกลือ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า ส่วนรากของถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้น สายพันธุ์ JP240327 และ JP99049

(Figure 4C) ในส่วนใบ พบว่า ถั่วซอมบี้ทั้งสองสายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVnu240 มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP240327, JP229098, JP231216, JP240338, JP229175 และ JP240379 มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นที่สภาวะเครียดเกลือ NaCl 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เช่นกัน ส่วนถั่วเขียวพันธุ์ KUML8 และ KPS2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ (Figure 4D)

วิจารณ์

จากผลวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนรากและใบของถั่วเขียวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับถั่วเขียวพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในสภาพปกติ (ชุดควบคุม) จะเห็นได้ว่าส่วนรากของถั่วเขียวทุกสายพันธุ์มีการสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้นในสภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 75 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่พันธุ์การค้า KUML8 และ KPS2 มีการสะสมโปรตีนลดลง ซึ่งการสะสมโปรตีนที่ส่วนรากมากกว่าส่วนใบ Cheng *et al*. (2014) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่รากของต้นกล้าข้าวโพดที่ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือ รายงานว่าภายใต้ความเครียดเกลือ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระและการสังเคราะห์ลิกนินที่บริเวณรากของข้าวโพดพันธุ์ Nongda 1145 เพิ่มขึ้น ส่วน Parvaiz and Satyawati (2008) รายงานว่า พืชที่ทนทานต่อเกลือจะมีกลไกทางชีวเคมีหลายอย่างที่เอื้อต่อการกักเก็บหรือให้ได้น้ำมาในเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์ด้วยการรักษาสมดุลไอออน โดยการสังเคราะห์สารรักษาสมดุลออสโมซิส โปรตีนจำเพาะและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเพื่อควบคุมไอออน การไหลของน้ำ และกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งถั่วเขียวสายพันธุ์ JP231216, JP240338, JP229175 และ JP240379 และถั่วซอมบี้สายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVNu240 มีกิจกรรมของเอนไซม์ GPX และ SOD เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันโดยที่ Jebara *et al.* (2005) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX), CAT, peroxidase (POX) และ SOD ที่บริเวณรากถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris*) ภายใต้ความเครียดเกลือ NaCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่า เอนไซม์ SOD และ POX มีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณปมราก และมีส่วนเกี่ยวข้องในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระที่บริเวณดังกล่าว ทำให้ถั่วสามารถเจริญเติบโตและตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากเกลือ ส่วน Cavalcanti *et al.* (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GPX, SOD และ CAT ที่บริเวณใบของถั่ว cowpea (*Vigna unguiculata*) ที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือ NaCl ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT จะลดลงเป็น 2 เท่า หลังจากอยู่ภายใต้สภาพเครียดเกลือ 1 วัน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ SOD ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในทางตรงกันข้ามพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ GPX เพิ่มขึ้น และยังพบว่าถั่วสามารถฟื้นตัวกลับมาเจริญเติบโตได้เป็นปกติ Sarker and Oba (2020) ยังพบว่า เอนไซม์ SOD และ APX เป็นเอนไซม์หลักในการกำจัดอนุมูลของ H_2O_2 ใน *Amaranthus tricolor* พันธุ์ VA14 ที่ทนทานในสภาพเค็ม (salinity stress)นอกจากนี้ Uarrota *et al*. (2016) รายงานว่า เอนไซม์ APX และ GPX เป็นเปอร์ออกซิเดสที่สำคัญที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระ H_2O_2 ให้เปลี่ยนเป็น H_2O เป็นเอนไซม์ที่ พบใน cytosol, vacuole, cell wall และ apoplast มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในการลดความเสื่อมของเซลล์พืชที่อยู่ในสภาพเครียดเกลือ นอกจากนี้สายพันธุ์ถั่วซอมบี้ทั้งสองสายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVnu240 ที่มีความทนทานต่อสภาพเครียดเกลือสูงยังพบมีการสังเคราะห์เอนไซม์ GST เพิ่มขึ้น ซึ่ง GSTs มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายเซลล์พืชจากสภาพเครียดสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abenavoli *et al*., 2001) จากการศึกษาผลของความเครียดเกลือต่อกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs ในข้าวโพดของ Remme *et al*. (2013) รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ GSTs จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น 4, 8 และ 12 เดซิซีเมนต่อเมตร ในช่วงเวลา 3 และ 5 วัน

หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อได้รับความเครียดเกลือเข้มข้น 16 เดซิซีเมนต่อเมตร ช่วงเวลานาน 7 วัน แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ GSTs นี้ก็ยังมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม

สรุป

ถั่วเขียวสายพันธุ์ JP231216, JP240338, JP229175 และ JP240379 และถั่วซอมบี้สายพันธุ์ AusTRCF322105 และ TVNu240 ทนทานหรือเจริญเติบโตได้เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเกลือที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ guaiacol peroxide (GPX) และ superoxide dismutase (SOD) ที่ส่วนรากและใบเพิ่มขึ้น ซึ่งสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือนี้อาจนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวทานทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานสภานโยบายการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมแห่งชาติ (สอวช.) ผ่านหน่วยบริหารและจัดการทุนด้านการพัฒนากำลังคน และทุนด้านการพัฒนาสถาบันอุดมศึกษา การวิจัยและการสร้างนวัตกรรม (บพค.) (สัญญาเลขที่ 5826)

เอกสารอ้างอิง

ปราณี สีหบัณฑ์. 2558. เอกสารวิชาการ แนวทางการจัดทำระบบอนุรักษ์ดินและน้ำในพื้นที่ดินเค็ม. สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 5 กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถิติการเกษตรของไทย ปีเพาะปลูก 2559. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/download/download_journal/yearbook2559.pdf/ (20 สิงหาคม 2564).

AbdElgawad, H., G. Zinta, M.M. Hegab, R. Pandey, H. Asard and W. Abuelsoud. 2016. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. Frontiers in Plant Science 7: 276. doi: 10.3389/fpls.2016.00276.

Abenavoli, M.R., D. Santis, C.M. Sidari, A. Sorgona, M. Badiani and G. Cacco. 2001. Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat. New Phytologist 150(3): 619-627.

Alharby, H., H. Al-Zahrani, K.R. Hakeem, R. Rehman and M. Iqbal. 2019. Salinity-induced antioxidant enzyme system in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek cv.) genotypes. Pakistan Journal of Botany 51(4): 1-8.

Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Buono, D.D. and G. Loli. 2011. Glutathione S-transferases of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*): activity toward some chemicals, safener modulation and persistence of atrazine and fluorodifen in the shoots. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(4): 1324-1329.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 7(72): 248-254.

Cavalcanti, F.R., J.T.A. Oliveira, A.S. Martins-Miranda, R.A. Viégas and J.A.G. Silveira. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. New Phytologist 163: 563-571.

Chawla, S., S. Jain and V. Jain. 2012. Salinity

salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 22(1): 27-34.

Cheng, Y., G. Chen, D. Hao, H. Lu, M. Shi, Y. Mao, X. Huang, Z. Zhang and L. Xue. 2014. Salt-induced root protein profile change in seedling of maize inbred lines with differing salt tolerances. Chilen Journal of Agricultural Research 74(4): 468-476.

Dachapak, S., P. Somta, K. Naito, N. Tomooka, A. Kaga and P. Srinives. 2019. Detection of quantitative trait loci for salt tolerance in zombie pea [*Vigna vexillata* (L.) A. Rich]. Euphytica 215: 208.

Dietz, K.J., I. Turkan and A. Krieger-Liszkay. 2016. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. Plant Physiology 171(3): 1541-1550.

Giannopolitis, C.N. and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutase: I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59(2): 309-314.

Havir, E.A. and N.A. McHale. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiology 84(2): 450-455.

Huang, L., L.J. Yu, X. Zhang, B. Fan, F.Z. Wang, Y.S. Dai, H. Qi, Y. Zhou, L.J. Xie and S. Xiao. 2019. Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. Autophagy 15(3): 407-422.

Huang, S., O. Van Aken, M. Schwarzlander, K. Belt and A.H. Millar. 2016. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. Plant Physiology 171(3): 1551-1559.

James, J.A., C. Blake, C.S. Byrt and R. Munns. 2011. Major genes for Na^+ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. Journal of Experimental Botany 62: 2939-2947

Jebara, S., M. Jebara, F. Limam and M.E. Aouani. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. Journal of Plant Physiology 162(8): 929-936.

Jiang, Z., B. Ma, K.O. Erinle, B. Cao, X. Liu, S. Ye and Y. Zhang. 2016. Enzymatic antioxidant defense in resistant plant: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum during long-term atrazine exposure. Pesticide Biochemistry and Physiology 133: 59-66.

Kumar, S. and G. Pandey. 2020. Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. Heliyon 6(3): e03682.

Nair, R.M., R.Y. Yang, W.J. Easdown, D. Thavarajah, P. Thavarajah, J.A. Hughes and J.D.H. Keatinge. 2013. Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(8): 1805-1813.

Parvaiz, A. and S. Satyawati. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil Environment 54(3) 89-99.

Remme, R.N., N.A. Ivy, M.A.K. Mian and M. Rohman. 2013. Effect of salinity stress on glutathione-S-transferase (GSTs) of maize. Journal of Agriculture and Veterinary Science 4(4): 42-52.

Sandalio, L.M. and M.C. Romero-Puertas. 2015. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signaling networks. Annals of Botany 116(4): 475-485.

Sanoubar, R., A. Cellini, G. Gianfranco and F. Spinelli. 2020. Osmoprotectants and antioxidative enzymes as screening tools for salinity tolerance in radish (*Raphanus sativus*). Horticultural Plant Journal 6(1): 14-24.

Sarker, U. and S. Oba. 2020. The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. Frontiers in Plant Science 11: 559876. doi: 10.3389/fpls.2020.559876.

Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 92: 503-527.

Uarrota, V.G., R. Moresco, E.C. Schmidt, Z.L. Bouzon, E.C. Nunes, E.O. Neubert, L.A.M. Peruch, M. Rocha and M. Maraschin. 2016. The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. Food Chemistry 197: 737-746.