การค้นหาโปรตีนที่ทำหน้าที่ในความทนเค็มของข้าวด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์

Proteomics-Based Analysis during Salt Stress in Rice Seedling

สุพัตรา นราวัฒนะ[1),*] สุกัญญา ดาผา[2)] รัตนวรรณ จันทร์ศศิธร[1)] แสงระวี ปราบพาล[1)] ยอดยิ่ง ยิ่งชูตระกูล[3)]

Supatthra Narawatthana[1),*] Sukanya Dapha[2)] Rattanawan Jansasithorn[1)] Sangrawee Prabpal[1)]

Yodying Yingchootrakool[3)]

Abstract

Saline soil is one of the major challenges in rice production. Understanding changes in rice proteome in response to salt stress is important to underpin complicated molecular mechanisms underlying this important crop's growth and yield production. Recent advances in proteomics analysis using mass spectrometry can enhance the study of plant proteins function in a deeper view. In this study, we aimed to explore qualitative and quantitative changes of proteins in rice after salt stress treatment. Pokkali, KDML105, PTT1, RD85, and IR29 were used for the proteomics analysis under salt stress treatment. The experiments were conducted at the seedling stage by gradually increasing the NaCl concentration of the hydroponic solution from 8 dS/m to 12 dS/m within 3 days. After 0, 1, 2, 3, 4, and 7 days under the salinity condition, rice leaf samples were collected for protein extraction and preparation for LC-MS/MS-based shotgun proteomics analysis. Changes in Pokkali's proteome in response to salt stress since the first day after salt stress treatment revealed several differentially expressed proteins involved in photosynthesis, reactive oxygen species (ROS) scavenging, ion homeostasis, and signal transduction pathway. KDML105, PTT1, and RD85 demonstrated changes in some proteins detected in Pokkali as the up-regulated proteins, although the level of the proteins expressed in these moderate tolerance varieties was slightly lower than in Pokkali which the highly tolerance variety. Our findings lead to the identification of genes encoding for the proteins involved in salt-tolerant mechanisms in rice such as ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, glutathione-s-transferases, as well as abiotic stress responsive (ASR) protein. The development of molecular markers associated with the candidate genes identified here can be useful in salt-tolerant rice breeding using marker-assisted selection (MAS) technology.

Keywords: rice, Pokkali, KDML105, PTT1, RD85, IR29, proteomics, salt tolerance

บทคัดย่อ

ดินเค็มจัดเป็นหนึ่งในปัญหาทางการเกษตรที่สำคัญ สามารถสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตข้าวได้ การศึกษากลไกความทนเค็มในข้าวจึงเป็นสิ่งสำคัญของการพัฒนาข้าวพันธุ์ใหม่ให้ทนทานและปรับตัวได้ดีในสภาพดินเค็ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้วิธีการทางโปรตีโอมิกส์ในการวิเคราะห์โปรตีนและปริมาณสัมพัทธ์ในข้าวพันธุ์ Pokkali ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 และ IR29 ที่มีความทนเค็มแตกต่างกัน โดยปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ซึ่งได้รับ

* corresponding author E-mail: supatthra.n@rice.mail.go.th

Received: August 6, 2023/ Revised: August 16, 2023/ Accepted: August 16, 2023

[1)] สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี 72000 โทร. 0-3555-5340

Thailand Rice Science Institute, Mueang, Suphan Buri 72000 Tel. 0-3555-5340

[2)] ศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โทร. 0-2529-1185

Khlong Lunag Rice Research Center, Khlong Luang, Pathum Thani 12120 Tel. 0-2529-1185

[3)] ศูนย์โอมิกส์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โทร. 0-2564-7000

National Omics Center, National Science and Technology Development Agency, Khlong Luang, Pathum Thani 12120 Tel. 0-2564-7000

ความเค็มเริ่มต้นระดับ 8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร และปรับค่าความเค็มเป็น 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร ในวันที่ 3 ของการทดสอบ วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตัวอย่างข้าวที่ได้รับความเค็มเป็นเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วัน ด้วยวิธี LC-MS/MS-based shotgun proteomics พบว่า ข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนหลากหลายชนิดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่วันแรกจนตลอดระยะเวลาของการทดสอบ โดยโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง การสลายอนุมูลอิสระ และการธำรงดุลไอออน ในขณะที่พันธุ์ทนเค็มปานกลาง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 มีการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดเช่นเดียวกับพันธุ์ Pokkali แต่พบปริมาณน้อยกว่า ผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบชนิดของโปรตีนที่สำคัญต่อการทนเค็มของข้าว เช่น ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, glutathione เป็นต้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว พันธุ์ Pokkali ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 IR29 โปรตีโอมิกส์ ความทนเค็ม

คำนำ

ดินเค็ม (saline soil) หมายถึง ดินที่มีเกลืออยู่ในสารละลายดินปริมาณมาก ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ จนส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของพืช เนื่องจากการละลายของเกลือภายในดิน ทำให้รากของพืชดึงน้ำจากดินมาใช้ได้ลดลง จนเกิดการขาดน้ำ และการสะสมไอออนของเกลือที่มากเกินไปนั้นยังเป็นพิษต่อเซลล์พืช พืชอาจแสดงอาการต่างๆ เช่น การชะงักการเจริญของราก ใบไหม้ ลำต้นแคระแกร็น และยังทำให้เกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารในพืชอีกด้วย ดินเค็มมีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำมากกว่า 2 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร (decisiemens per meter, dS/m) (กรมพัฒนาที่ดิน, 2558) ดินเค็มเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการสลายตัวของหินหรือแร่ เกลือที่มีอยู่ภายในชั้นดินซึ่งอาจสะสมอยู่ภายในดินหรือเคลื่อนตัวไปกับน้ำ ทำให้เกลือเคลื่อนที่เข้าใกล้ระดับผิวดินมากขึ้น และเมื่อเกิดการระเหยของน้ำเกลือจึงเกิดการตกผลึกสะสมอยู่บริเวณผิวหน้าดิน เรียกกระบวนการนี้ว่า soil salinization (Thomas and Middleton, 1993; Vengosh, 2003) ทั้งนี้การนำน้ำเค็มจากใต้ดินมาใช้ประโยชน์และการทำระบบชลประทานที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการแพร่กระจายของเกลือไปตามพื้นที่ต่างๆ ได้ ประเทศไทยมีพื้นที่ดินเค็มทั้งดินเค็มบก และดินเค็มชายทะเล ประมาณ 4.2 ล้านไร่ ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และชายทะเลแถบภาคตะวันออกและภาคใต้ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2561)

การปลูกข้าวพันธุ์ทนเค็มเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยรักษาเสถียรภาพผลผลิตข้าวได้ จึงทำให้การพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มเป็นเป้าหมายที่สำคัญของนักปรับปรุงพันธุ์ โดยในอดีตที่ผ่านมามีการใช้องค์ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะความทนเค็ม คัดเลือกพันธุ์ข้าวได้สำเร็จ ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทนเค็ม โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ในการติดตามลักษณะความทนเค็ม ได้แก่ RM140, B1.1-1 และ B1.1-11 ซึ่งครอบคลุม QTLs ที่ควบคุมลักษณะทนเค็มบนโครโมโซมที่ 1 (ดวงใจ และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีนทนเค็มจากข้าวป่าพันธุ์ Dongxiang ได้แก่ *OsHKT1* (high-affinity potassium transporter), *OsHKT7* และยีนที่ทำหน้าที่สร้าง transcription factor ต่างๆ เช่น zinc finger proteins (ZFPs), NAC (NAM, ATAF and CUC), MYB และ AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) เป็นกลุ่มของยีนที่มีรายงานว่า มีการแสดงออกของยีนสูงมากในข้าวพันธุ์ Dongxiang ที่อยู่ในภาวะเครียดเกลือ (salt stress) (Quan *et al*., 2018) ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะทนเค็มในข้าวนั้นต้องอาศัยการทำงานของยีนหลายยีนร่วมกัน และกลไกความทนเค็มในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของข้าวนั้นแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงกลไกทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มในข้าวเพื่อให้ทราบว่าการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ทนเค็มในสภาวะที่ในดินมีเกลือปริมาณสูงนั้นต้องอาศัยการทำงานของยีนใดบ้าง เพื่อให้พัฒนาข้าวพันธุ์ทนเค็มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เนื่องจากปัจจุบันข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างกลไก

ทนเค็มในข้าวที่ระดับยีนและกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องยังมีไม่เพียงพอ กลไกการทนทานต่อความเค็มในพืชนั้นเป็นกลไกที่มีความซับซ้อน เนื่องมาจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายยีน นักวิจัยจึงให้ความสำคัญกับการใช้เทคโนโลยีโอมิกส์เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของโปรตีนทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ข้าวกำลังเผชิญกับภาวะเครียดเกลือ เนื่องจากโปรตีนเป็นผลผลิตโดยตรงจากการทำงานของยีน และสามารถบ่งชี้ได้ว่า ยีนใดบ้างที่มีการทำงานในระหว่างที่ข้าวอยู่ในสภาวะต่างๆ

การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ในข้าวทนเค็มพบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ การปรับค่าความดันออสโมติก (Nounjan *et al*., 2018; Sripinyowanich *et al*., 2013) การสลายอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) (Chutimanukul *et al*., 2019; Parveen *et al*., 2021) การซ่อมแซมความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการปรับเปลี่ยนการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์แสง (Chaudhry *et al*., 2021; Chutimanukul *et al*., 2018; Lekklar *et al*., 2019; Udomchalothorn *et al*., 2017) กลไกเหล่านี้มีการทำงานเชื่อมโยงระหว่างกันผ่านกระบวนการ signal transductions pathway ที่เกิดขึ้นผ่านการทำงานของโปรตีน เช่น calcium (Ca^{2+}) signalling and Ca^{2+} binding proteins ที่ต้องทำงานร่วมกับโปรตีน calmodulin 2 (Yuenyong *et al*., 2018) และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในพืช ได้แก่ กระบวนการรักษาภาวะธำรงดุลทางไอออน (ion homeostasis) ที่เกิดขึ้นโดยอาศัย salt overly sensitive (SOS) pathway ประกอบด้วยการทำงานของยีนและโปรตีนหลายชนิด ทำหน้าที่ร่วมกันในการทำให้เกิดภาวะธำรงดุลของโซเดียมในพืช (Clarkson and Hanson, 1980; Tester and Davenport, 2003; Zhu, 2000) ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่ใน SOS pathway ในข้าวมีหลายชนิด เช่น SOS1 ทำหน้าที่เป็น Na^+/H^+ antiporter และ SOS3 ทำหน้าที่รับสัญญาณจากแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เพื่อกระตุ้นการทำงานของ SOS2 ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโซเดียมไอออน (Na^+) ออกจากเซลล์พืช (Ji *et al*., 2013)

อุปกรณ์และวิธีการ

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลที่มี 2 ปัจจัย ออกแบบการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design (RCB)) (5x3 factorial in RCB) ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ข้าว 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Pokkali (พันธุ์ทนเค็ม) พันธุ์ทนเค็มปานกลาง ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 และพันธุ์อ่อนแอต่อความเค็ม (IR29)

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ทดสอบมีค่าการนำไฟฟ้า 3 ระดับ คือ ระดับ 0 8 และ 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร (dS/m) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1. การทดสอบความทนเค็มระยะกล้าในระบบไฮโดรโปนิกส์ (hydroponic)

การปลูกข้าวทดสอบเริ่มจากแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในคลอร็อกซ์ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 30 นาที ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นก่อนทำการเพาะข้าว จากนั้น 2 วัน นำเมล็ดข้าวที่เพาะงอกแล้วใส่ลงในช่องแผ่นโฟมขนาด 1x1 เซนติเมตร ช่องละ 1 ต้น โดยมีตาข่ายรองด้านล่าง แผ่นโฟมมีขนาด 1x1.25 เมตร นำไปวางในกระบะขนาด 1x1.25 เมตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารตามสูตรของ Yoshida (Yoshida *et al*., 1976) เมื่อต้นข้าวอายุ 21 วัน เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปรับระดับความเค็มที่ค่าการนำไฟฟ้า 8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้อยู่ที่ระดับ 5-5.5 ทุก 2 วัน เมื่อต้นข้าวอายุ 23 วัน ปรับระดับความเค็มที่ค่าการนำไฟฟ้า 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ที่ระดับ 5-5.5 ทุก 2 วัน ทำการเก็บตัวอย่างใบข้าวเพื่อวิเคราะห์โปรตีน ภายหลังจากได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 1 2 3 4 และ 7 วัน (ข้าวอายุ 22 23 24 25 และ 28 วัน) จำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกลักษณะของข้าวเพื่อประเมินความทนต่อความเค็มตามหลักการ standard evaluation system (SES) (IRRI, 2002) โดยให้ระดับความทนต่อความเค็มตามระบบคะแนน 1 ถึง 9 (1 = ทนเค็มมากที่สุด และ 9 = อ่อนแอมากที่สุด) (Table 1)

2. การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์

2.1 การสกัดและเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากตัวอย่างใบข้าว

- บดตัวอย่างใบข้าว (น้ำหนัก 5 กรัม) ในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผง นำไปสกัดโปรตีนทั้งหมดด้วย

Table 1 Scale of salt tolerance in rice standard evaluation system for rice (SES)

Score	Observation	Tolerance level
1	Normal growth	Highly tolerant (HT)
3	Nearly normal growth	Tolerant (T)
	(leaf tips or few leaves whitish and rolled)	
5	Growth severely retarded	Moderately tolerant (MT)
	(most leaves rolled; only a few are elongating)	
7	Complete cessation of growth	Susceptible (S)
	(most leaves are dry; some plants dying)	
9	Almost all plants are dead or dying	Highly susceptible (HS)

extraction buffer (ประกอบด้วย 0.5 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% v/v NP-40, 20 mM $MgCl_2$, 2% v/v 2-mercaptoethanol, 1% w/v PVPP, 1 mM PMSF, 40 mM NaF และ 15 µl of cocktail) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- แยกชั้นของสารละลายด้วย PEG 4000 ก่อนจะทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย ice-cold acetone 4 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- ละลายตะกอนด้วย incubation buffer (IB) (ประกอบไปด้วย 30 mM MES, 30 mM imidazole, 8 M urea, 0.1 M potassium aspartate, 0.1 M sodium glutamate และ 0.25% w/v CHAPS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดปริมาณโปรตีนที่ได้โดยใช้วิธี Bradford Assay (Bradford, 1976)

- นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี label-free shotgun proteomics

- ตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 2.1 ทำการเจือจางด้วย 50 mM NH_4HCO_3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม 100 มิลลิโมลต่อลิตร dithiothreitol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10 มิลลิโมลต่อลิตร บ่มโปรตีนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนเจือจาง 10 เท่าด้วย 250 มิลลิโมลต่อลิตร 2-iodoacetamide บ่มในที่มืด เป็นเวลา 60 นาที

- ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin อัตราส่วน 1:50 (เอนไซม์:โปรตีน) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โปรตีนที่ย่อยแล้วทำให้แห้งและเก็บรักษาไว้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

- การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ระบบ nanoLC-system high resolution 5600 TripleTOFTM (AB-Sciex, Concord, Canada) นำตัวอย่างโปรตีนที่ตัดย่อยเป็นสายเปปไทด์แล้วข้างต้นมาละลายด้วย 0.1% formic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปฉีดเข้าสู่ระบบ nanoLC-system โดยใช้ mobile phase A (0.1% formic acid in water) และ mobile phase B (95% acetonitrile with 0.1% formic acid) ตัวอย่างโปรตีนจะถูกแยกด้วยคอลัมน์ Acclaim™ PepMap™ 100 C18-LC Columns (Thermo Scientific) โดยใช้วิธี linear gradient และ constant flow rate ที่ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

- การวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry ใช้ระบบ data-independent acquisition (DIA) mode ค่า mass range เท่ากับ 350-1800 m/z

- วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจาก raw MS-Spectra ที่ได้ด้วยโปรแกรม ProteinPilotTM software 5.0.2 โดยใช้ paragon algorithm ร่วมกับฐานข้อมูลข้าว *Oryza sativa* จาก UniProt

- นำผลชนิดและปริมาณของโปรตีนที่ได้มาทำการวิเคราะห์กลไกทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับความทนต่อความเค็ม

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบหาชนิดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (differentially expressed protein (DEP)) ระหว่างพันธุ์ข้าวทนเค็ม (Pokkali) และพันธุ์

อ่อนแอต่อความเค็ม (IR29) โดยใช้วิธี two sample t-test และ Bonferroni correction แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย heatmap และ volcano plot โดยใช้โปรแกรม R (R Core Team, 2022)

การแปรผล โปรตีนชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเพิ่มขึ้นหรือลดลงมากกว่า 2 เท่า (fold change > 2) และมีค่า adjusted P value < 0.05 จะจัดเป็นโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณอย่างมีนัยสำคัญ

ดำเนินการทดลองที่ สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ และศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวง ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการประเมินความทนเค็มของข้าวทั้ง 5 พันธุ์ พบว่า ข้าวทุกพันธุ์มีความสามารถในการทนต่อความเค็มได้ในระยะเวลา 1-4 วันของการทดสอบ และ 7 วันหลังจากการทดสอบ โดยพันธุ์ IR29 แสดงอาการขาดน้ำ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่สามารถทนต่อความเค็มในการทดสอบได้ ในขณะที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 มีความทนเค็มปานกลาง ส่วนพันธุ์ Pokkali มีความทนทานตลอดการทดสอบ (Table 2)

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทดสอบในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายเกลือระดับ 8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 1 วัน ระหว่างข้าวพันธุ์ Pokkali และ IR29 (Fig. 1) พบชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (differentially expressed proteins (DEPs)) จำนวน 112 ชนิด โดยโปรตีนสำคัญที่ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในพันธุ์ Pokkali ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เช่น photosystem II (PS II) protein D1, PS II protein D2, chlorophyll a/b binding protein, glutaredoxin, thioredoxin สอดคล้องกับผลจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาว่า การที่พืชสามารถคงประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์แสงและการขนส่งอิเล็กตรอนเอาไว้ได้นั้น เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้สามารถทนต่อความเค็มได้ (Sudhir and Murthy, 2004; Yang *et al*., 2020) รวมทั้งพบโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมความเสียหายของสารพันธุกรรม (DNA repair) ในข้าว และการตอบสนองต่อไอออนของเกลือในปริมาณสูง ได้แก่ ATP-dependent DNA helicase และ von Willebrand factor A protein ซึ่งการซ่อมแซมความเสียหายของสารพันธุกรรม เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้พืชทนต่อความเค็มได้ (Karkute *et al*., 2022; Macovei *et al*., 2014; Tuteja *et al*., 2013)

พันธุ์ Pokkali พบโปรตีน Bowman-Birk inhibitor 1-2 (BBI) ในปริมาณสูงมากตั้งแต่วันแรกของการทดสอบ ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีนในกลุ่ม Bowman-Birk protease inhibitor ทำหน้าที่ในกลไกความทนแล้ง และทนเค็มในพืชผ่านทางกลไกการสลายอนุมูลอิสระ (Malefo *et al.,* 2020; Shan *et al*., 2008) ผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า พันธุ์ปทุมธานี 1 มี BBI ปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบโปรตีน peptidyl-prolyl cis-trans isomerase เป็นโปรตีนกลุ่ม cyclophilin ในพันธุ์ Pokkali ปริมาณสูงมาก ซึ่งมีรายงานว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มจะมีการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้เพิ่มขึ้นเมื่อต้องเผชิญกับภาวะเครียดเกลือ (Ruan *et al*., 2011; Trivedi *et al.,* 2013)

Table 2 Salt tolerant level of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105, Pathum Thani 1 and RD85 after salt stress treatment

Rice variety	Score - tolerant level					
	0 DAS	1 DAS	2 DAS	3 DAS	4 DAS	7 DAS
Pokkali (tolerant)	1 - HT	1 - HT	1 - HT	1 - HT	3 - T	3 - T
IR29 (susceptible)	1 - HT	1 - HT	1 - HT	3 - T	3 - T	7 - S
Khao Dawk Mali 105	1 - HT	1 - HT	1 - HT	3 - T	3 - T	5 - MT
Pathum Thani 1	1 - HT	1 - HT	1 - HT	3 - T	3 - T	5 - MT
RD85	1 - HT	1 - HT	1 - HT	3 - T	3 - T	5 - MT

DAS = Days after salt stress treatment

Fig. 1 Heatmap demonstrated significant changes in protein abundance in Pokkali, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1), RD85 and IR29 after 1 day of salt stress treatment

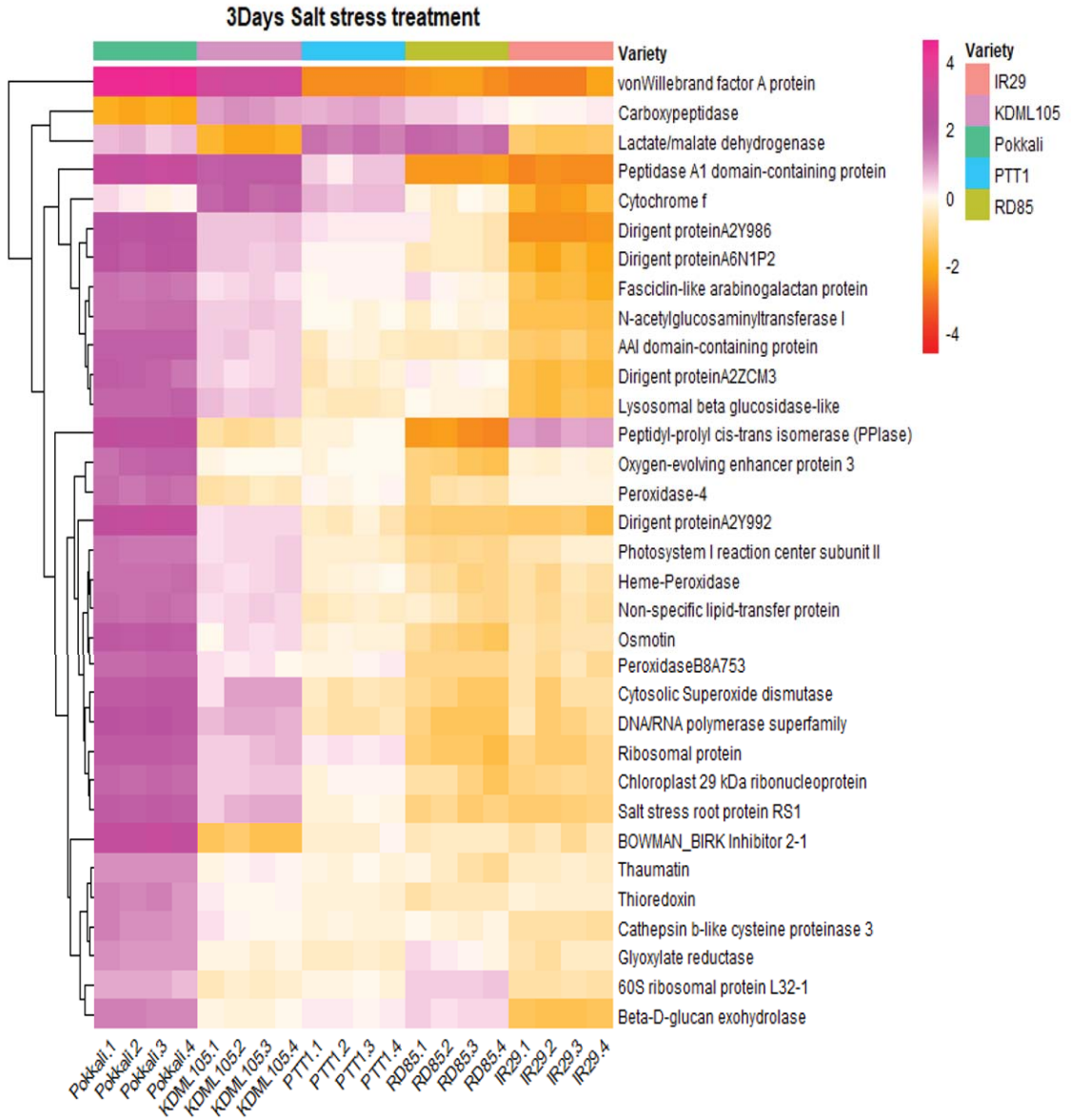

Fig. 2 Heatmap demonstrates significant changes in protein abundance in Pokkali, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1), RD85 and IR29 after 3 days of salt stress treatment

นอกจากนี้พันธุ์ Pokkali ยังมีการสังเคราะห์กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสลายอนุมูลอิสระ ได้แก่ cytosolic superoxide dismutase, ascorbate peroxidase และ peroxidase ชนิดต่างๆ หลายชนิด ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกลไกความทนเค็มในพืชด้วยการสลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากการมีไอออนของเกลือในปริมาณที่สูงจนเกินไป (Kim *et al*., 2018; Rossatto *et al*., 2017; Sanyal *et al*., 2022; Tsai *et al*., 2005; Wang *et al*., 2020) และที่สำคัญพบว่า พันธุ์ Pokkali ผลิตโปรตีน salt stress root protein (RS1) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม developmentally regulated plasma membrane polypeptides (DREPPs) ที่ทำหน้าที่หลักในระบบส่งสัญญาณ (signal transduction) ในพืชผ่านทางการรวมตัวกับ Ca^{2+} และ calmodulin (Yamada *et al*., 2015)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 พบโปรตีนหลายชนิดมีปริมาณสูงขึ้น หลังการทดสอบเป็นเวลา 1 วัน โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สลายอนุมูลอิสระ การธำรงดุลไอออนและโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับที่พบในพันธุ์ Pokkali โดยผลการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

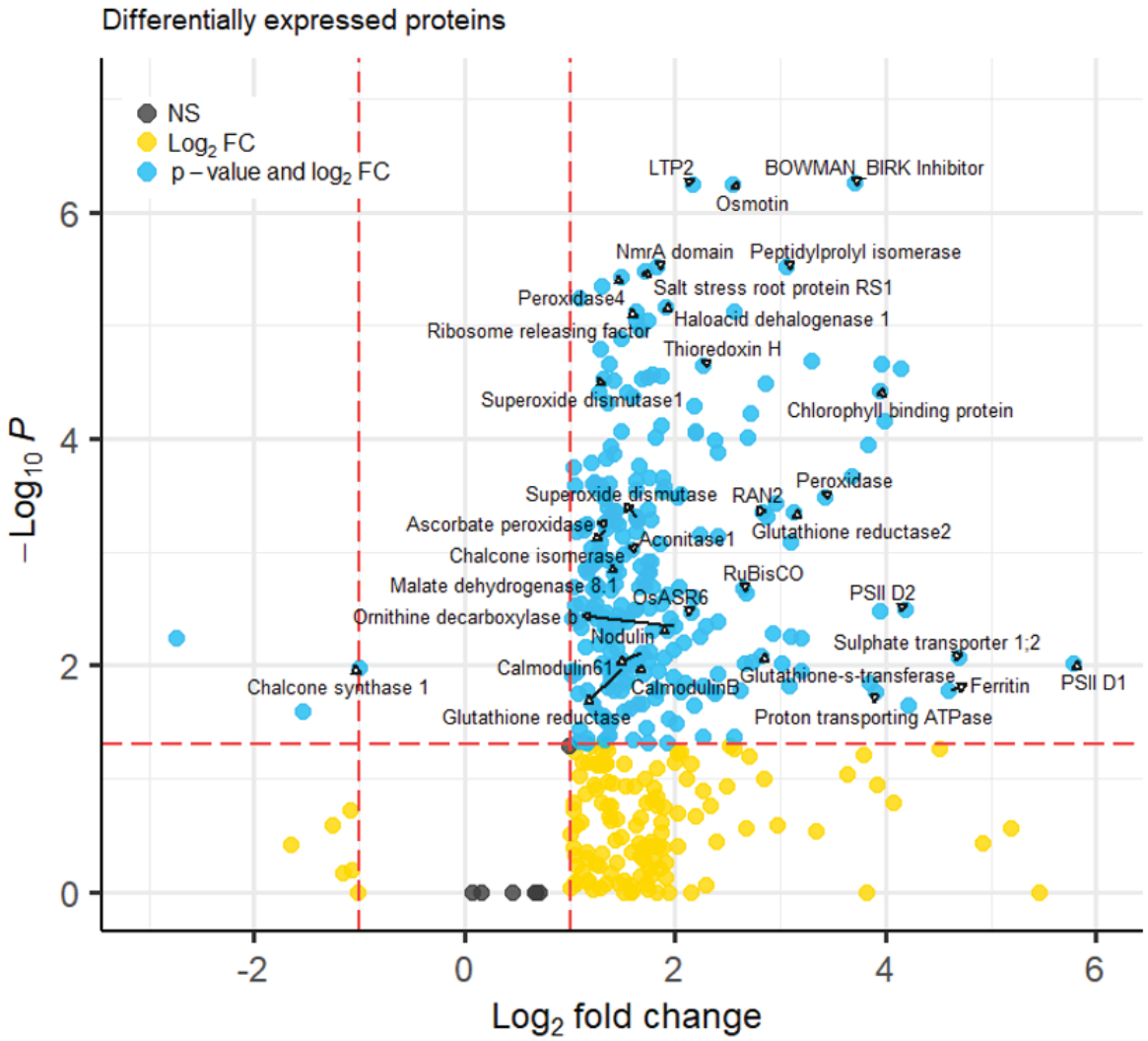

Fig. 3 The volcano plot illustrates differentially expressed proteins (DEPs) in Pokkali versus IR29 after 7 days of salt stress treatment (7DAS). The blue points represent 112 significant DEPs with both fold change (FC) greater than 2 and Bonferroni's adjusted P value lower than 0.05. The dashed horizontal line shows $-\log_{10}$ of the adjusted P values cut-off ($-\log_{10}(0.05) = 1.3$), and the two dashed vertical lines indicate the fold change cut-off ($\log_2 FC > 1$). NS = non-significant DEP

Table 3 Top differentially expressed proteins in Pokkali during the salt stress treatment

Uniprot ID	Protein name	MSU ID	Gene name	Biological function
B8ATR4	Abiotic Stress Responsive2	LOC_Os04g34600	*OsASR6*	Salt tolerance (Pérez-Díaz *et al.,* 2014; Zhang *et al.* 2022a)
A2WK53	BOWMAN-BIRK Inhibitor1-2	LOC_Os01g03390	*RBBI1-2*	Protease inhibitor/salt stress response
B8ACM2	Peptidylprolyl isomerase	LOC_Os01g19680	*OsI_01440*	Salt tolerance (Razzaque *et al.,* 2019)
B8ADD5	ATP-dependent DNA helicase	LOC_Os01g49680	*OsXPB2*	Salt tolerance (Macovei *et al.,* 2014; Tuteja *et al.,* 2013)
B8AVP8	Von Willebrand factor A protein	-	*OsvWA*	DNA repair/salt stress response (Karkute *et al.,* 2022b)
A2WTL3	Fasciclin-like arabinogalactan protein	LOC_Os08g39270	*FLA5*	Salt tolerance (Ma and Zhao, 2010; Olmos *et al.*, 2017)
A2Y992	Allene oxide cyclase	LOC_Os03g32314	*AOC*	Salt tolerance (Zhao *et al.,* 2014)
B8B9L3	Malate dehydrogenase 8.1	LOC_Os08g33720	*MDH8.1*	Maintain cellular homeostasis/salt tolerance (Zhang *et al.,* 2022b)
A2XDI5	Sulfate transporter 1;2	LOC_Os03g09980	*SULTR1;2*	Salt tolerance (Banerjee, 2021; Gallardo *et al.,* 2014)
A2XGP6	Cytosolic superoxidase dismutase	LOC_Os03g22810	*SODCC1*	Oxidative stress tolerance (Sanyal *et al.,* 2022)
A2Y7R5	Ras-relate nuclear protein2	LOC_Os05g49890	*RAN2*	Salt tolerance (Zang *et al.,* 2010)
A2ZJ03	Glutathione-s-transferaseT3	LOC_Os12g07180	*OsGSTU4*	Oxidative stress response/salt tolerance (Sharma *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2020)
A2XAX5	Glutathione-disulfide reductase	LOC_Os02g56850	*GR2*	Salt tolerance (Rossatto *et al.,* 2017)
A2XFC7	L-ascorbate peroxidase 1	LOC_Os03g17690	*APX1*	Oxidative stress response/salt tolerance (Kim *et al.,* 2018; Tsai *et al.,* 2005)
A2WMG6	Salt stress root protein RS1	LOC_Os01g14160	*RS1/DREPP1*	Signal transduction/Ca^{2+} and calmodulin binding/salt tolerance (Yamada *et al.,* 2015)
B8ACJ8	Calmodulin61	LOC_Os01g59530	*CAM61*	Oxidative stress/salt tolerance (Asif *et al.,* 2022)
B8AH93	Ornithine decarboxylase b	LOC_Os02g28110	*ODCB*	Polyamine biosynthesis/salt tolerance (Quinet *et al.,* 2010; Saha and Giri, 2017)
A2YIW7	Thioredoxin H-type	LOC_Os07g08840	*TRXH*	Cell redox homeostasis (Zhang and Guo, 2012)
B8AMU2	Aconitate hydratase	LOC_Os03g04410	*ACO1*	Salt tolerance (Yuenyong *et al.,* 2018)
A2XCU8	Glutathione reductase1	LOC_Os03g06740	*GR1*	Cell redox homeostasis/salt tolerance (Wu *et al.,* 2013)

ในข้าวที่ปลูกทดสอบในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ระดับ 8 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร เป็นเวลา 2 วันหลังการทดสอบ พบความเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของโปรตีนเช่นเดียวกับความเค็มที่ระดับเดียวกันเป็นเวลา 1 วัน และ 3 วันหลังการทดสอบ ที่มีการปรับค่าความเค็มเป็น 12 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร โดยพบว่าพันธุ์ Pokkali และ IR29 มีโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน จำนวน 33 ชนิด (Fig. 2) ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในพันธุ์ Pokkali เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการสลายอนุมูลอิสระ กลไกการธำรงดุลไอออน กระบวนการสังเคราะห์แสงและการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนเช่นเดียวกับที่พบในช่วง 1-2 วันแรกของการทดสอบ และที่น่าสนใจคือ พบโปรตีน fasciclin arabinogalactan ซึ่งเป็นโปรตีนทนเค็มที่สำคัญในพืชเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในพันธุ์ Pokkali หลังจากการทดสอบความเค็มเป็นเวลา 3 วัน (Ma and Zhao, 2010; Olmos *et al*., 2017)

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทดสอบในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายเกลือสูงเป็นเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ Pokkali และ IR29 (Fig. 3) พบมีโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน จำนวน 262 ชนิด โดยพันธุ์ Pokkali พบโปรตีน abiotic stress responsive 2 หรือ ABA-, stress- and ripening-induced (ASR) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสง การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน การธำรงดุลไอออน และสลายอนุมูลอิสระปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ภายใต้ภาวะเครียดเกลือเป็นเวลา 7 วันหลังการทดสอบ และเป็นโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน *OsASR6* ที่มีการศึกษาว่าเป็นโปรตีนที่ทำให้ข้าวมีความทนต่อทั้งภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และภาวะเครียดเกลือ โดยข้าวที่มีการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้นจะมีปริมาณของ malondialdehyde (MDA), H_2O_2 และ Na^+/K^+ ratio ลดลง และทนทานต่อความเค็มได้ (Zhang *et al*., 2022a) นอกจากนี้พันธุ์ Pokkali ยังมีการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่สลายอนุมูลอิสระและสร้างความต้านทานต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน เพิ่มขึ้นหลายชนิดหลังการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งหนึ่งในโปรตีนเหล่านี้ได้แก่ glutathione-s-transferase T3 ทำหน้าที่สลายอนุมูลอิสระ และทำให้พืชอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของสารละลายเกลือสูงได้ (Sharma *et al*., 2014; Wang *et al*., 2020) รวมทั้งโปรตีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สาร spermidine โปรตีนชนิดต่างๆ ที่สำคัญต่อความสามารถในความทนเค็มของข้าวแสดงใน Table 3

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์เพื่อค้นหาโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกลไกทนต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ Pokkali (พันธุ์ทนเค็ม) พันธุ์ทนเค็มปานกลาง (ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85) และพันธุ์อ่อนแอต่อความเค็ม (IR29) ที่ปลูกทดสอบในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่า ข้าวจะสามารถทนเค็มได้ หากสามารถควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แสงให้เกิดขึ้นได้ตามปกติ ควบคู่ไปกับการสลายอนุมูลอิสระ การรักษาภาวะธำรงดุลไอออน และกำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ตั้งแต่เริ่มต้นเผชิญกับภาวะเครียดเกลือ และจากการเชื่อมโยงชนิดของโปรตีนต่างๆ ที่ได้จากการวิจัยนี้ไปสู่ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนดังกล่าวได้ สามารถนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ร่วมดำเนินงานวิจัย และเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติและศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวงทุกท่าน ที่ปฏิบัติงานทั้งในแปลงทดลองและห้องปฏิบัติการ และอำนวยความสะดวกในงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2558. สภาพทรัพยากรดินและที่ดินของประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 340 หน้า.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2561. แผนบริหารจัดการทรัพยากรดินปัญหาของประเทศไทยระยะ 20 ปี (2561-2580). กรุงเทพฯ. 266 หน้า.

ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์, อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงศ์ ตระกูลรุ่งและธีรยุทธ์ ตู้จินดา. 2550. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็มและมีคุณภาพหุงต้มดี. วารสารวิชาการข้าว 1(1): 29-43.

Asif, S., E. Kim, Y. Hee. Jang, R. Jan, N. Kim, S. Asaf, L.

Muhammad Farooq and K.M. Kim. 2022. Identification of the *OsCML4* gene in rice related to salt stress using QTL analysis. Plants 11(19): 2467.

Banerjee, S. 2021. Plant sulfate transporters dealing with drought and salinity stress. pp. 77-87. *In*: Transporters and Plant Osmotic Stress. Elsevier.

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 72: 248-254.

Chaudhry, U.K., Z.N.Ö. Gökçe and A.F. Gökçe. 2021. Drought and salt stress effects on biochemical changes and gene expression of photosystem II and catalase genes in selected onion cultivars. Biologia 76(10): 3107-3121.

Chutimanukul, P., B. Kositsup, K. Plaimas, T. Buaboocha, M. Siangliw, T. Toojinda, L. Comai and S. Chadchawan. 2018. Photosynthetic responses and identification of salt tolerance genes in a chromosome segment substitution line of 'Khao Dawk Mali 105' rice. Environmental and Experimental Botany 155: 497-508.

Chutimanukul, P., B. Kositsup, K. Plaimas, M. Siangliw, T. Toojinda and S. Chadchawan. 2019. Effect of salt stress on antioxidant enzyme activity and hydrogen peroxide content in chromosome segment substitution line of 'Khao Dawk Mali 105' rice. Agriculture and Natural Resources 53(5): 465-471.

Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Annual Review of Plant Physiology 31(1): 239-298.

Gallardo, K., P.E. Courty, C.L. Signor, D. Wipf and V. Vernoud. 2014. Sulfate transporters in the plant's response to drought and salinity: regulation and possible functions. Frontiers in Plant Science 5: 1-7.

IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice (SES). International Rice Research Institute, Los Baños, Manila, Phillippines. 56 p.

Ji, H., J.M. Pardo, G.B., M.J.V. Oosten, R.A. Bressan and X. Li. 2013. The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Molecular Plant 6(2): 275-86.

Karkute, S.G., V. Kumar, M. Tasleem, D.C. Mishra, K.K. Chaturvedi, A. Rai, A.M. Sevanthi, K. Gaikwad, T.R. Sharma and A.U. Solanke. 2022. Genome-wide analysis of von Willebrand factor A gene family in rice for its role in imparting biotic stress resistance with emphasis on rice blast disease. Rice Science 29(4): 375-384.

Kim, Y., B. Mun, A.L. Khan, M. Waqas, H.K. Kim, R. Shahzad, M. Imran, B.W. Yun and I.J. Lee. 2018. Regulation of reactive oxygen and nitrogen species by salicylic acid in rice plants under salinity stress conditions. PLoS ONE 13(3): e0192650.

Lekklar, C., D. Suriya-arunroj, M. Pongpanich, L. Comai, K. Kositsup, S. Chadchawan and T. Buaboocha. 2019. Comparative genomic analysis of rice with contrasting photosynthesis and grain production under salt stress. Genes 10(8): 562.

Ma, H. and J. Zhao. 2010. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Experimental Botany 61(10): 2647-2668.

Macovei, A., B. Garg, S. Raikwar, A. Balestrazzi, D. Carbonera, A. Buttafava, J.F.J. Bremont, S.S. Gill and N. Tuteja. 2014. Synergistic exposure of rice seeds to different doses of γ-ray and salinity stress resulted in increased antioxidant enzyme activities and gene-specific modulation of TC-NER pathway. BioMed Research International 1-15.

Malefo, M.B., E.O. Mathibela, B.G. Crampton and M.E. Makgopa. 2020. Investigating the role of Bowman-Birk serine protease inhibitor in Arabidopsis plants under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry 149: 286-293.

Nounjan, N., P. Chansongkrow, V. Charoensawan, J.L. Siangliw, T. Toojinda, S. Chadchawan and P.

Theerakulpisut. 2018. High performance of photosynthesis and osmotic adjustment are associated with salt tolerance ability in rice carrying drought tolerance QTL: physiological and co-expression network analysis. Frontiers in Plant Science 9: 1135.

Olmos, E., J.G. Garma, M.C. Gomez-Jimenez and N. Fernandez-Garcia. 2017. Arabinogalactan proteins are involved in salt-adaptation and vesicle trafficking in tobacco by-2 cell cultures. Frontiers in Plant Science 8: 1092.

Parveen, A., S. Ahmar, M. Kamran, Z. Malik, A. Ali, M. Riaz and G.H. Abbasi. 2021. Abscisic acid signaling reduced transpiration flow, regulated Na^+ ion homeostasis and antioxidant enzyme activities to induce salinity tolerance in wheat (*Triticum Aestivum* L.) seedlings. Environmental Technology & Innovation 24: 101808.

Pérez-Díaz, J., T.M. Wu, R. Pérez-Díaz, S. Ruíz-Lara, C.Y. Hong and J.A. Casaretto. 2014. Organ- and stress-specific expression of the ASR genes in rice. Plant Cell Reports 33(1): 61-73.

Quan, R., J. Wang, J. Hui, H. Bai, X. Lyu, Y. Zhu, H. Zhang, Z. Zhang, S. Li and R. Huang. 2018. Improvement of salt tolerance using wild rice genes. Frontiers in Plant Science 8: 2269.

Quinet, M., A. Ndayiragije, I. Lefevre, B. Lambillotte, C. C. Dupont-Gillain and S. Lutts. 2010. Putrescine differently influences the effect of salt stress on polyamine metabolism and ethylene synthesis in rice cultivars differing in salt resistance. Journal of Experimental Botany 61(10): 2719-2733.

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available source: https://www.R-project.org/. (May 20, 2023)

Razzaque, S., S.M. Elias, T. Haque, S. Biswas, G.M. Nurnabi Azad Jewel, S. Rahman, X. Weng, A.M. Ismail, H. Walai, T.E. Juenger and Z.I. Seraj. 2019. Gene expression analysis associated with salt stress in a reciprocally crossed rice population. Scientific Reports 9(1): 8249.

Rossatto, T., M.N. Amaral, L.C. Benitez, I.L. Vighi, E.J.B. Braga, A.M. Magalhães Júnior, M.A.C. Maia and L.S. Pinto. 2017. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, Cv. BRS AG, under saline stress. Physiology and Molecular Biology of Plants 23(4): 865-875.

Ruan, S.L., H.S. Ma, S.H. Wang, Y.P. Fu, Y. Xin, W.Z. Liu, F. Wang, J.X. Tong, S.Z. Wang and H.Z. Chen. 2011. Proteomic identification of *OsCYP2*, a rice cyclophilin that confers salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings when overexpressed. BMC Plant Biology 11(1): 34.

Saha, J. and K. Giri. 2017. Molecular phylogenomic study and the role of exogenous spermidine in the metabolic adjustment of endogenous polyamine in two rice cultivars under salt stress. Gene 609: 88-103.

Sanyal, R.P., V. Prashar, N. Jawali, R. Sunkar, H.S. Misra and A. Saini. 2022. Molecular and biochemical analysis of duplicated cytosolic CuZn superoxide dismutases of rice and in silico analysis in plants. Frontiers in Plant Science 13: 864330.

Shan, L., C. Li, F. Chen, S. Zhao and G. Xia. 2008. A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. Plant, Cell & Environment 31(8): 1128-1137.

Sharma, R., A. Sahoo, R. Devendran and M. Jain. 2014. Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative Stresses in Arabidopsis. K. Wu (eds.). PLoS ONE 9(3): e92900.

Sripinyowanich, S., P. Klomsakul, B. Boonburapong, T. Bangyeekhun, T. Asami, H. Gu, T. Buaboocha and S. Chadchawan. 2013. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environmental and Experimental Botany 86: 94-105.

Sudhir, P. and S.D.S. Murthy. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis.

Photosynthetica 42(4): 481-486.

Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91(5): 503-527.

Thomas, D.S.G. and N.J. Middleton. 1993. Salinization: new perspectives on a major desertification issue. Journal of Arid Environments 24(1): 95-105.

Trivedi, D.K., M.W. Ansari and N. Tuteja. 2013. Multiple abiotic stress responsive rice cyclophilin: (*OsCYP-25*) mediates a wide range of cellular responses. Communicative & Integrative Biology 6(5): e25260.

Tsai, Y.C., C.Y. Hong, L.F. Liu and C.H. Kao. 2005. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H_2O_2. Journal of Plant Physiology 162(3): 291-299.

Tuteja, N., R.K. Sahoo, B. Garg and R. Tuteja. 2013. *OsSUV3* dual helicase functions in salinity stress tolerance by maintaining photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. Cv. IR64). The Plant Journal 76(1): 115-127.

Udomchalothorn, T., K. Plaimas, S. Sripinyowanich, C. Boonchai, T. Kojonna, P. Chutimanukul, L. Comai, T. Buaboocha and S. Chadchawan. 2017. *OsNucleolin1-L* expression in Arabidopsis enhances photosynthesis via transcriptome modification under salt stress conditions. Plant and Cell Physiology 58(4): 717-734.

Vengosh, A. 2003. Salinization and saline environments. pp. 1-35. *In*: Treatise on Geochemistry (eds.). Elsevier.

Wang, Y., J. Wang, X. Zhao, S. Yang, L. Huang, F. Du, Z. Li, X. Zhao, B. Fu and W. Wang. 2020. Overexpression of the transcription factor gene *OsSTAP1* increases salt tolerance in rice. Rice 13(1): 50.

Wu, T.M., W.R. Lin, Y.T. Kao, Y.T. Hsu, C.H. Yeh, C.Y. Hong and C.H. Kao. 2013. Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. Plant Molecular Biology 83(4-5): 379-390.

Yamada, N., C. Theerawitaya, H. Kageyama, S. Cha-um and T. Takabe. 2015. Expression of developmentally regulated plasma membrane polypeptide (DREPP2) in rice root tip and interaction with Ca^{2+}/CaM complex and microtubule. Protoplasma 252(6): 1519-1527.

Yang, Z., J.L. Li, L.N. Liu, Q. Xie and N. Sui. 2020. Photosynthetic regulation under salt stress and salt-tolerance mechanism of sweet sorghum. Frontiers in Plant Science 10: 1722.

Yoshida, S., D.A. Forno, J.H., Cock and K.A. Gome. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Las Baños, Laguna. 83 p.

Yuenyong, W., A. Chinpongpanich, L. Comai, S. Chadchawan, and T. Buaboocha. 2018. Downstream components of the calmodulin signaling pathway in the rice salt stress response revealed by transcriptome profiling and target identification. BMC Plant Biology 18(335): 1-23.

Zang, A., X. Xu, S. Neill and W. Cai. 2010. Overexpression of *OsRAN2* in rice and Arabidopsis renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. Journal of Experimental Botany 61(3): 777-789.

Zhang, C.J. and Y. Guo. 2012. *OsTRXh1* regulates the redox state of the apoplast and influences stress responses in rice. Plant Signaling & Behavior 7(3): 440-442.

Zhang, Q., Y. Liu, Y. Jiang, A. Li, B. Cheng and J. Wu. 2022a. *OsASR6* enhances salt stress tolerance in rice. International Journal of Molecular Sciences 23(16): 9340.

Zhang, Y., Y. Wang, X. Sun, J. Yuan, Z. Zhao, J. Gao, X. Wen, F. Tang, M. Kang, B. Abliz, Z. Zhang, H. Zhang, F. wang, and Z. Li. 2022b. Genome-wide identification of MDH family genes and their association with salt tolerance in rice. Plants 11(11): 1498.

Zhao, Y., W. Dong, N. Zhang, X. Ai, M. Wang, Z. Huang, L. Xiao and G. Xia. 2014. A wheat allene oxide cyclase gene enhances salinity tolerance via jasmonate signaling. Plant Physiology 164(2): 1068.

Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. Plant Physiology 124(3): 941.