

# การศึกษาเมแทบอลอเมติกส์ความทนเค็มในพันธุ์ข้าวไทย

## Study of Metabolomics of Salt Tolerance in Thai Rice Varieties

รัตนวรรณ จันทร์ศศิธร<sup>1),\*</sup> สุพัทธรา นราวัฒน์<sup>1)</sup> ภัทรศยา สายยี่ด<sup>1)</sup> สุกัญญา ดามา<sup>2)</sup>  
Rattanawan Jansasithorn<sup>1),\*</sup> Supatthra Narawatthana<sup>1)</sup> Pattarasaya Sai-Yued<sup>1)</sup> Sukanya Dapha<sup>2)</sup>

### Abstract

Metabolomics is the analytical study for measuring metabolite changes and their function during growth or under stress conditions, i.e., salt stress. This research aimed to analyze changes in metabolites of Thai rice varieties under salt stress treatment. The experiment was conducted in Pokkali (salt-tolerant rice variety) and IR29 (salt-sensitive rice variety) compared to Khao Dawk Mali 105, Pathum Thani 1 and RD85 under salt stress treatment for 0 1 2 3 4 and 7 days. The analysis of metabolites was conducted by comprehensive two-dimensional gas chromatography with a time-of-flight mass spectrometer (GCxGC-TOFMS). The results showed significant differences in metabolites, i.e. sugar, organic acid, amino acids, alcohol, fatty acids, organic compounds and amine in each rice variety. The principal component analysis (PCA) displayed a clear distinction between salt tolerant and susceptible rice varieties, which are Pokkali and IR29, respectively, during the salt stress treatment. The difference was found in Pathum Thani 1 and Khao Dawk Mali 105 after 1 and 4 days after salinity treatment which was similar to Pokkali. A significant increase in proline was found in Pokkali and Khao Dawk Mali 105 which proline is an important index for the response of plants to salt stress and relates to osmotic stress tolerance. In addition, hydroxynorvaline was also found in Pokkali which plays a significant role in responses to abiotic stress in plants. Most rice varieties could tolerate in salinity treatment for more than 7 days while IR29 showed senescence and brown leaves after 4 days of salt stress treatment. The influenced metabolic pathways related to salt tolerance were aminoacyl-tRNA biosynthesis, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, and alanine, aspartate, and glutamate metabolism. Our findings will lead to a further understanding of the salt tolerance mechanisms in rice and functional analysis of the genes related to the biosynthesis of the metabolites in rice.

**Keywords:** rice, Khao Dawk Mali 105, Pathum Thani 1, RD85, metabolomics, salt tolerance

### บทคัดย่อ

เมแทบอลอเมติกส์ เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณรวมถึงหน้าที่ของเมแทบอลิไต์ระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตหรือเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะเครียด เช่น ความเค็ม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำวิทยาการเมแทบอลอเมติกส์มาใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิไต์ที่เกิดขึ้นในพันธุ์ข้าวไทยที่ปลูกในภาวะเค็ม โดยทำการศึกษาในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali และพันธุ์อ่อนแอ IR29 เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวไทยพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 โดยการปลูกข้าวในภาวะที่มีความเค็มสูงเป็นเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วัน วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเมแทบอลิไต์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่เชื่อมต่อกับแมสสเปคโตรเมทรีแบบไทม์ออฟไฟลท์ พบการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิไต์ในกลุ่มกรดอะมิโน น้ำตาล กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ กรดไขมัน และสารอื่นๆ เช่น สารประกอบอินทรีย์ สารกลุ่มเอมีน เป็นต้น วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของเมแทบอลิไต์ของข้าวพันธุ์

\* corresponding author E-mail: rattanawan.j@rice.mail.go.th

Received: November 12, 2023/ Revised: November 24, 2023, 2023/ Accepted: November 26, 2023

<sup>1)</sup> สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี 72000 โทร. 0-3555-5340

Thailand Rice Science Institute, Mueang, Suphanburi 72000 Tel: 0-3555-5340

<sup>2)</sup> ศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โทร. 0-2529-1185

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

ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอได้อย่างชัดเจนตลอดการทดสอบ เมื่อพิจารณาจากพันธุ์ พบเมแทบอลิต์ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่นๆ ภายหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 1 และ 4 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับพันธุ์ Pokkali และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยพบการเพิ่มขึ้นของเมแทบอลิต์ proline ที่เป็นตัวชี้วัดสภาวะเครียดจากความเค็มของพืชและเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของโปรตีนต่อแรงดันออสโมติก นอกจากนี้ยังพบ hydroxynorvaline ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในข้าวพันธุ์ทนเค็ม โดยข้าวส่วนใหญ่มีความสามารถในการทนเค็มได้มากกว่า 7 วัน ในขณะที่ข้าวพันธุ์ IR29 มีความสามารถในการทนเค็มได้เพียง 4 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มแสดงอาการขาดน้ำและใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และพบว่าความทนเค็มมีความเกี่ยวข้องกับกลไกที่สำคัญ ได้แก่ aminoacyl-tRNA biosynthesis, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis และ alanine, aspartate and glutamate metabolism จากผลการศึกษานี้นำไปสู่การศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่และการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมแทบอลิต์เหล่านี้ต่อไป

**คำสำคัญ:** ข้าว ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 เมแทบอลอสมิกส์ ทนเค็ม

## คำนำ

ความเค็ม เป็นความเครียดชนิดหนึ่งที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของเกลือ ซึ่งส่งผลกระทบต่อพืชตั้งแต่ระดับเซลล์ การเจริญเติบโตไปจนถึงผลผลิต เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับค่าศักย์ออสโมติกและภาวะเครียดจากไอออน โดยในภาวะเค็มค่าศักย์ของน้ำในดินลดลงทำให้พืชดูดน้ำไปใช้ไม่ได้ ส่งผลให้พืชขาดน้ำ รวมถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ และการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลง (Meloni *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 1997) โดยทั่วไปข้าวสามารถปลูกในสภาพดินเค็มได้ที่ระดับความเค็มตั้งแต่ 0 ถึง 8 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร (Maas *et al.*, 1986) ซึ่งการตอบสนองต่อความเค็มของข้าวขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น พันธุกรรม ระยะเวลาการเจริญเติบโตของข้าว ระยะเวลาที่ได้รับอิทธิพลจากความเค็ม ชนิดของเกลือ เป็นต้น (Kazemi and Eskadari, 2011; Lutts *et al.*, 1995) ข้าวระยะเริ่มงอกและพัฒนาไปเป็นต้นกล้าเป็นระยะที่มีความอ่อนแอต่อสภาวะดินเค็มมากที่สุด รวมไปถึงระยะออกดอกที่มีผลทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวลดลง ยับยั้งการเจริญเติบโต และเกิดความเป็นหมันในระยะออกดอก ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่างมาก (Moradi and Ismail, 2007)

ต้นข้าวที่ปลูกในสภาวะดินเค็มจะชะงักการเจริญเติบโตและแตกกอลดลง ปลายใบมีสีขาว บางใบแห้งเป็นแถบๆ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเค็มเป็น 3.5 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร จะส่งผลให้ข้าวส่วนใหญ่มีผลผลิตลดลงร้อยละ 10 และถ้าระดับความเค็มเพิ่มขึ้นเป็น 7.2 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร ผลผลิตข้าวจะลดลงถึงร้อยละ 50

(Hoang *et al.*, 2016) นอกจากนี้ กิตติพัฒน์ และคณะ (2558) พบว่า ความเค็มระดับสูง (13.20 เดซิซีเมนต์ต่อเมตร) ส่งผลกระทบต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้า ข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และ กข47 มากกว่าข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ก่ำดอย และขาวดอกมะลิ 105 โดยทำให้ข้าวทุกพันธุ์มีอัตราการงอกต่ำและงอกช้าลง เช่นเดียวกับธีระรัตน์ และคณะ (2560) รายงานว่าภายใต้ความเครียดที่ระดับความเค็ม 8 เดซิซีเมนต์ต่อเมตรเป็นเวลา 14 วัน ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 มีการเจริญเติบโตลดลง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ยังคงรักษา ระดับของการเจริญเติบโตได้ดี

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิต์ในข้าวที่ภาวะเค็ม พบว่า มีรายงานถึงการพบสาร serotonin, salicylic acid, ferulic acid และ gentisic acid ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการสร้างกลไกที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม ในขณะที่เมแทบอลิต์อื่นๆ เช่น กรดแอมิโน น้ำตาล และกรดอินทรีย์ จะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติก รวมไปถึงต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Rajkumari *et al.*, 2023) รวมถึงพบการสะสมของ proline ในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม (พันธุ์ IKP และ IR31785) สูงกว่าข้าวพันธุ์ทนเค็ม (พันธุ์ Nona Bokra และ IR4630) อย่างมีนัยสำคัญ (Lutts *et al.*, 1996) และการสะสม proline เพิ่มขึ้นเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเค็ม (Pongprayoon *et al.*, 2008)

สำหรับพันธุ์ข้าวไทย พบว่า ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่มีการ

ตอบสนองต่อความเค็มด้วยการสร้าง proline เพิ่มขึ้น โดย proline จะช่วยปรับค่าแรงดันออสโมติกภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม (ธีระรัตน์ และคณะ, 2560) ในขณะที่พบการเพิ่มขึ้นของสาร uracil, L-proline, malonate, L-carnitine, L-lactate และ guanine ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้ภาวะเค็ม โดยมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์ aminoacyl-tRNA (Jumpa *et al.*, 2023) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิไต์ที่เกิดขึ้นในพันธุ์ข้าวไทยโดยเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอเมื่อปลูกในภาวะเค็ม เพื่อนำไปสู่การค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงข้าวพันธุ์ทนเค็มต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. พันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ พันธุ์ Pokkali (พันธุ์ทนเค็ม) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ปทุมธานี 1 (PTT1) กข85 (RD85) และ IR29 (พันธุ์อ่อนแอ)

### 2. การทดสอบความทนเค็มในระยะกล้า

การปลูกข้าวทดสอบเริ่มจากแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในคลอรีนความเข้มข้นร้อยละ 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) เมื่อข้าวอายุ 21 วัน เติมน้ำโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อปรับระดับความเค็มให้มี

ค่าการนำไฟฟ้า 8 เดซิซีเมนตต่อเมตรและปรับ pH ให้อยู่ที่ระดับ 5-5.5 ทุก 2 วัน เมื่อข้าวอายุได้ 23 วัน ปรับระดับความเค็มอีกครั้งให้มีค่าการนำไฟฟ้าเป็น 12 เดซิซีเมนตต่อเมตร และปรับ pH ให้อยู่ที่ระดับ 5-5.5 ทุก 2 วัน เก็บตัวอย่างใบข้าวก่อนได้รับโซเดียมคลอไรด์และหลังจากได้รับเกลือเป็นเวลา 1 2 3 4 และ 7 วัน (ข้าวอายุ 22 23 24 25 และ 28 วัน) ทำการทดสอบจำนวน 5 ซ้ำ

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

### 3. การสกัดและวิเคราะห์เมแทบอลิไต์ในตัวอย่างข้าวพันธุ์ทนเค็ม

สกัดจากตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียดในไนโตรเจนเหลวปริมาณ 100 มิลลิกรัม เติมน้ำละลาย MeOH แชนเนลปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (950 รอบต่อนาที) (Thermo shaker รุ่น MSC-100, บริษัท ALLSHENG) และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,200 รอบต่อนาที (Centrifuge รุ่น WiseSpinCF-10, บริษัท DAIHAN Scientific) นาน 15 นาที แยกส่วนใสที่ได้นำมาเติมคลอโรฟอร์ม 400 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสอีกครั้ง นำมาเติมคลอโรฟอร์ม 300 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะไนโตรเจน ( $N_2$  evaporator รุ่น MD200-2, บริษัท Allsheng) และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์เมแทบอลิไต์ (Jacob *et al.*, 2007)

Table 1 Scale of salt tolerance in rice (standard evaluation system for rice, IRRI (2002))

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

#### 4. การวิเคราะห์เมแทบอลอไมกส์ด้วยเครื่อง GCxGC-TOFMS

ทำ derivatization โดยเติม methoxyamin hydrochloride ใน pyridine ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยความเร็ว 950 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1.5 ชั่วโมง เติม N-Methyl-N-(Trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) และเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง 13,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที กรองตัวอย่างใส่ขวดเพื่อเตรียมฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometer (GCxGC-TOFMS รุ่น Pegasus HT บริษัท Leco corporation) โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส เพื่อให้ระเหยกลายเป็นไอ และใช้ split ratio เท่ากับ 20 โดยใช้คอลัมน์ Rxi-5MS ในการวิเคราะห์ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 325 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ detector เป็น mass spectrometer ที่มีอุณหภูมิ transfer line และ ion source เท่ากับ 230 และ 290 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พลังงาน 70 eV และใช้การวิเคราะห์แบบสแกน (scan mode) ที่มวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 50-450 หน่วยมวล อะตอม (Jacob *et al.*, 2007)

#### 5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เมแทบอลอไมกส์ของข้าวพันธุ์ต่างๆ ในระยะกล้าที่ผ่านการทดสอบความเค็มเป็นเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วันที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง GCxGC-TOFMS จะวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม chromaTOF software ที่ความเหมือนมากกว่า หรือเท่ากับร้อยละ 70 และ signal-to noise ratio เท่ากับ 100 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปจัดเรียงด้วยโปรแกรม statistical compare in chromaTOF software และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis, PCA) ด้วยโปรแกรม MetaboAnalyst 5.0 และสร้าง heatmap ด้วยโปรแกรม R เพื่อทำการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของเมแทบอลอไมกส์ของพันธุ์ทนเค็มกับพันธุ์อ่อนแอ โดยเมแทบอลอไมกส์ที่มีปริมาณ

แตกต่างกันที่ระดับมากกว่า 1.5 fold change ( $p < 0.1$ ) จัดเป็นเมแทบอลอไมกส์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดำเนินงานวิจัยที่สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ และศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวง ระยะเวลา 1 ปี (ตุลาคม 2564 - กันยายน 2565)

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์หาเมแทบอลอไมกส์ในตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ Pokkali (พันธุ์ต้านทาน) ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 และ IR29 (พันธุ์อ่อนแอ) ในระยะกล้าที่ผ่านการทดสอบความเค็มเป็นเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วัน ด้วยเครื่อง GCxGC-TOFMS และจัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม statistical compare พบเมแทบอลอไมกส์ทั้งหมด จำนวน 65 ชนิด สามารถแยกประเภทออกได้เป็น สารประกอบประเภท น้ำตาล ร้อยละ 26 กรดอินทรีย์ ร้อยละ 24 แอลกอฮอล์ ร้อยละ 14 กรดอะมิโน ร้อยละ 11 กรดไขมัน ร้อยละ 3 และสารอื่นๆ เช่น phenylalanine, shikimic acid, putrescine, proline และ salicylic acid เป็นต้น ร้อยละ 22 (Fig. 1) การศึกษาที่ผ่านมาพบเมแทบอลอไมกส์ จำนวน 30 สาร ในใบข้าวพันธุ์ Dendang และ Fatmawati ซึ่งเป็นข้าวในกลุ่ม indica และข้าวพันธุ์ Nipponbare กลุ่ม japonica ที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบ น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในใบข้าวพันธุ์ทนเค็ม Dendang โดยสารดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับ fructose metabolism และ tricarboxylic acid cycle ตามลำดับ (Chang *et al.*, 2019) Fu และคณะ (2018) พบเมแทบอลอไมกส์ จำนวน 112 สาร ในใบข้าวบาร์เลย์ รวมถึงข้าวในกลุ่ม indica และกลุ่ม japonica ภายหลังจากปลูกในภาวะเค็มที่ 100 และ 150 mM โซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 9 วัน โดยเมแทบอลอไมกส์ที่พบประกอบด้วยกรดอะมิโน น้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารอื่นๆ เป็นต้น

เมื่อนำข้อมูลเมแทบอลอไมกส์มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis (PCA)) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร เพื่อหาองค์ประกอบหลักที่สามารถใช้อธิบายและหาความสัมพันธ์ของตัวแปร โดยเมื่อนำมาศึกษาความแตกต่างของเมแทบอลอไมกส์ในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali และพันธุ์อ่อนแอ IR29 ที่ผ่านการทดสอบความเค็มเป็นระยะเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วัน พบว่า สามารถอธิบายค่าความแปรปรวนรวมจาก

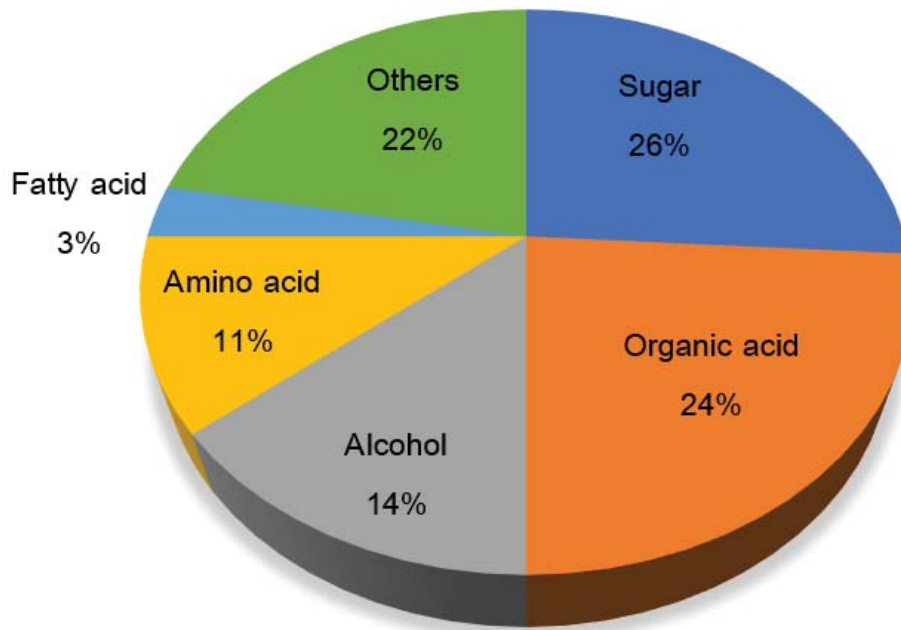


Fig. 1 Metabolites found in leaves of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1) and RD85 after salinity treatment for 0 1 2 3 4 and 7 days

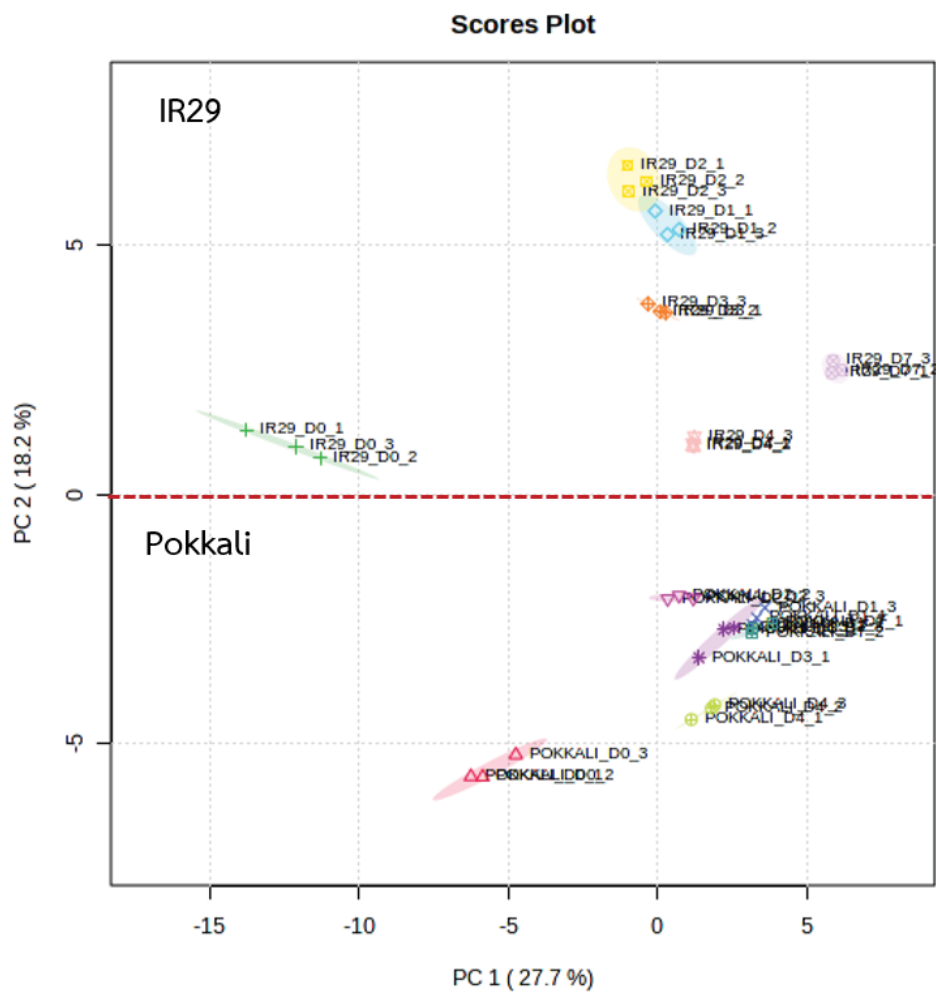


Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of metabolites found in leaves of Pokkali and IR29 after salinity treatment for 0 1 2 3 4 and 7 days



องค์ประกอบที่ 1 (principal component 1(PC1)) และ 2 (principal component 2 (PC2)) ได้ร้อยละ 45.9 และเมื่อพิจารณาตาม PC1 (แกน X) พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของเมแทบอลิไตซ์ของข้าวพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอได้อย่างชัดเจน (Fig. 2) เช่นเดียวกับงานวิจัยของประเทศอินเดียพบความแตกต่างของเมแทบอลิไตซ์ในข้าวพันธุ์ทนเค็มพันธุ์ Bhutnath และ Nonabokra และพันธุ์อ่อนแอพันธุ์ Sujala และ MTU 7029 ที่ปลูกในภาวะเค็มโดยวิเคราะห์ PCA และ partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ที่ร้อยละ 55 และ 49 ตามลำดับ (Gupta and De, 2017) นอกจากนี้ Fu และคณะ (2018) ก็พบว่า PC1 สามารถแยกความแตกต่างของเมแทบอลิไตซ์ในใบข้าวบาร์เลย์ และใบข้าวกลุ่ม indica และ japonica ที่ปลูกในภาวะเค็มได้อย่างชัดเจนโดยอธิบายความแปรปรวนได้ถึงร้อยละ 50.4

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในข้าวทั้ง 5 พันธุ์ที่นำมาทดสอบความทนเค็มเป็นเวลา 14 และ 7 วัน พบว่า สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ร้อยละ 60.7 63.5 และ 63.0 ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาทั้ง PC1 และ PC2 ในวันแรกของการทดสอบ พบว่า เมแทบอลิไตซ์ในข้าวพันธุ์ Pokkali และปทุมธานี 1 มีความแตกต่างกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข85 และ IR29 (Fig. 3a) ในขณะที่วันที่ 4 ของการทดสอบ พบว่า เมแทบอลิไตซ์ในข้าวพันธุ์ Pokkali และขาวดอกมะลิ 105 มีความแตกต่างกับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กข85 และ IR29 (Fig. 3b) และในวันที่ 7 ของการทดสอบ พบว่า ข้าวพันธุ์ IR29 มีสารเมแทบอลิไตซ์แตกต่างจากข้าวอีก 4 พันธุ์ (Fig. 3c) ซึ่งกล่าวได้ว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีเมแทบอลิไตซ์แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาภายใต้ภาวะเค็ม

เมื่อนำข้อมูลเมแทบอลิไตซ์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยเลือกเฉพาะสารที่มีความแตกต่างกันที่ระดับมากกว่า 1.5 fold change ระหว่างข้าวพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอในระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 14 และ 7 วัน มาสร้าง heatmap เพื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของเมแทบอลิไตซ์ในข้าวแต่ละพันธุ์ด้วยโปรแกรม R พบว่า ข้าวแต่ละพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิไตซ์ที่แตกต่างกัน โดยในวันแรกหลังการทดสอบพบการ

เพิ่มขึ้น (up-regulation) ของสารในกลุ่มน้ำตาล กรดแอมิโน หรือกรดอินทรีย์ ในข้าวพันธุ์ต่างๆ เช่น glutamic acid, asparagine, lysine, carbamic acid, proline, phenylalanine, hydroxynorvaline, hydroxypyruvic acid, putrescine และน้ำตาล galactopyranoside และ rhamnose ทั้งในข้าวพันธุ์ Pokkali IR29 ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 (Fig. 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Khan และคณะ (2020) พบการเพิ่มขึ้นของกรดแอมิโนและน้ำตาลในพืชภายใต้สภาวะเครียด รวมถึงการรายงานในข้าวทั้งพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอที่พบการเพิ่มขึ้นของกรดแอมิโน น้ำตาล และกรดอินทรีย์ในข้าวระยะกล้าในช่วงแรกของการทดสอบความทนเค็ม (Xie *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตาม ในช่วงแรกของการทดสอบข้าวทุกพันธุ์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (Table 2)

สำหรับข้าวพันธุ์ Pokkali ในวันที่ 4 ของการทดสอบพบการเพิ่มขึ้นของ proline เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สอดคล้องกับการศึกษาในข้าวระยะกล้าจะมี proline เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะเค็มขึ้นกับความเข้มข้นของไฮโดรเมคคัลโรลต์ (Fu *et al.*, 2018; Hakim *et al.*, 2014) และสามารถพบได้ทั้งในข้าวพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์อ่อนแอ (Chunthaburee *et al.*, 2016; Kanawapee *et al.*, 2012; Lutts *et al.*, 1996; Lutts *et al.*, 1999) โดย proline จะทำหน้าที่เป็น osmoprotectant เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์ และช่วยลดการสูญเสียน้ำ โดยจะพบการเพิ่มขึ้นในพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะเครียด (Gupta and De, 2017) ในขณะที่ Lutts และคณะ (1999) พบว่าการเพิ่มขึ้นของ proline มีความเกี่ยวข้องกับความเครียดจากภาวะเค็ม รวมไปถึงการทำหน้าที่ในการจับอนุมูลอิสระ (Smimoff and Cumbes, 1989) นอกจากนี้ยังพบ hydroxynorvaline ในข้าวพันธุ์ Pokkali แตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่นๆ (Fig. 5) เช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของ hydroxynorvaline ในพืชที่ปลูกในภาวะเค็ม (Jumpa *et al.*, 2022)

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความทนเค็มในงานวิจัยนี้ พบว่า ในวันที่ 4 ของการทดสอบ ข้าวทุกพันธุ์ยังสามารถเติบโตได้ในภาวะเค็ม (Fig. 6 และ Table 2) อย่างไรก็ตาม หลังการทดสอบ 7 วันมีเพียงข้าวพันธุ์ Pokkali ที่สามารถทนเค็มได้ในระดับค่อนข้างสูง (T) ในขณะที่ข้าวพันธุ์

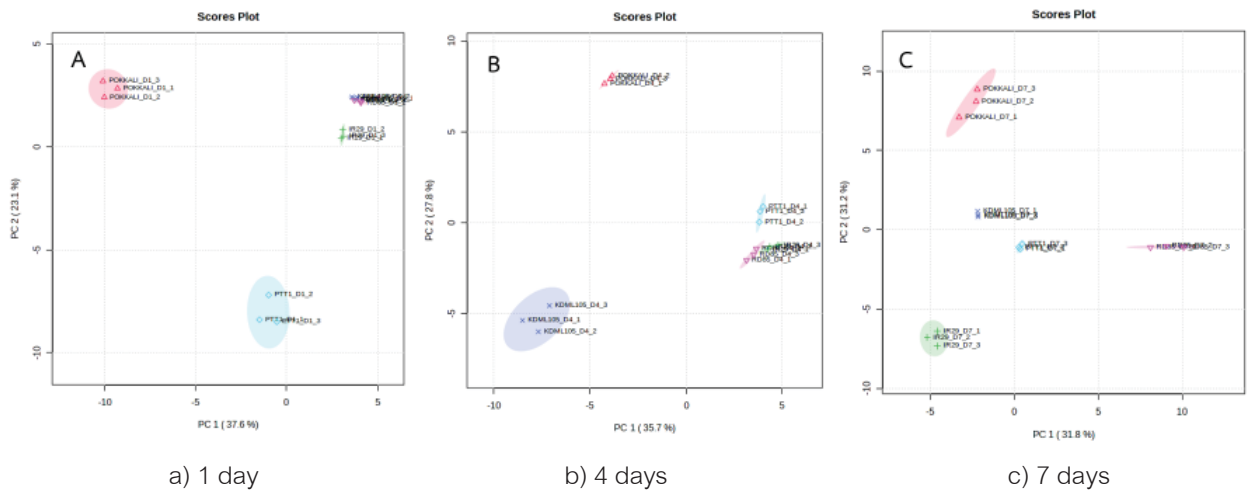


Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of metabolites found in leaves of Pokkali, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1), RD85, and IR29 after salinity treatment for 1 4 and 7 days

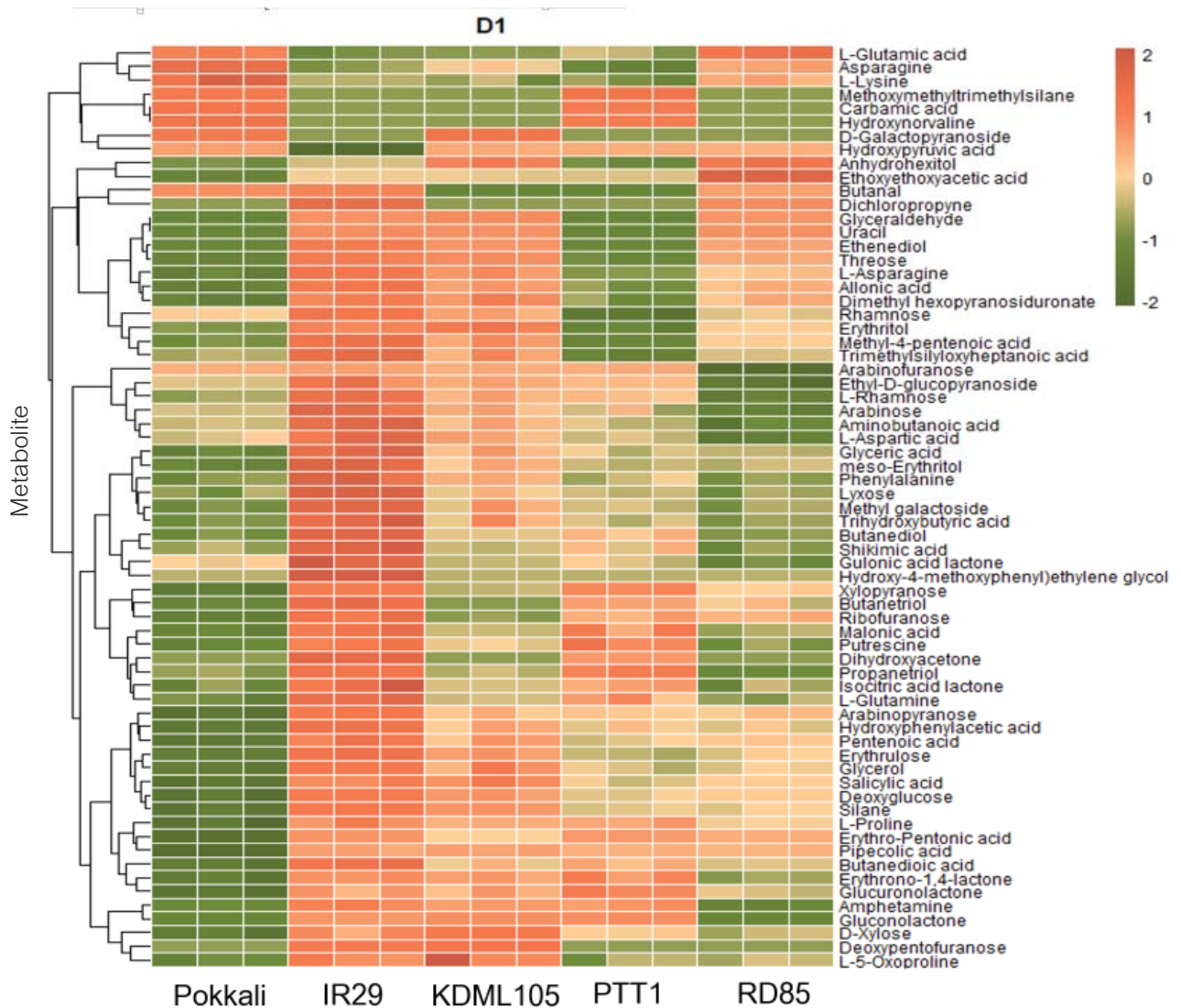


Fig. 4 Heatmap of metabolites found in leaves of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1) and RD85 after salinity treatment for 1 day

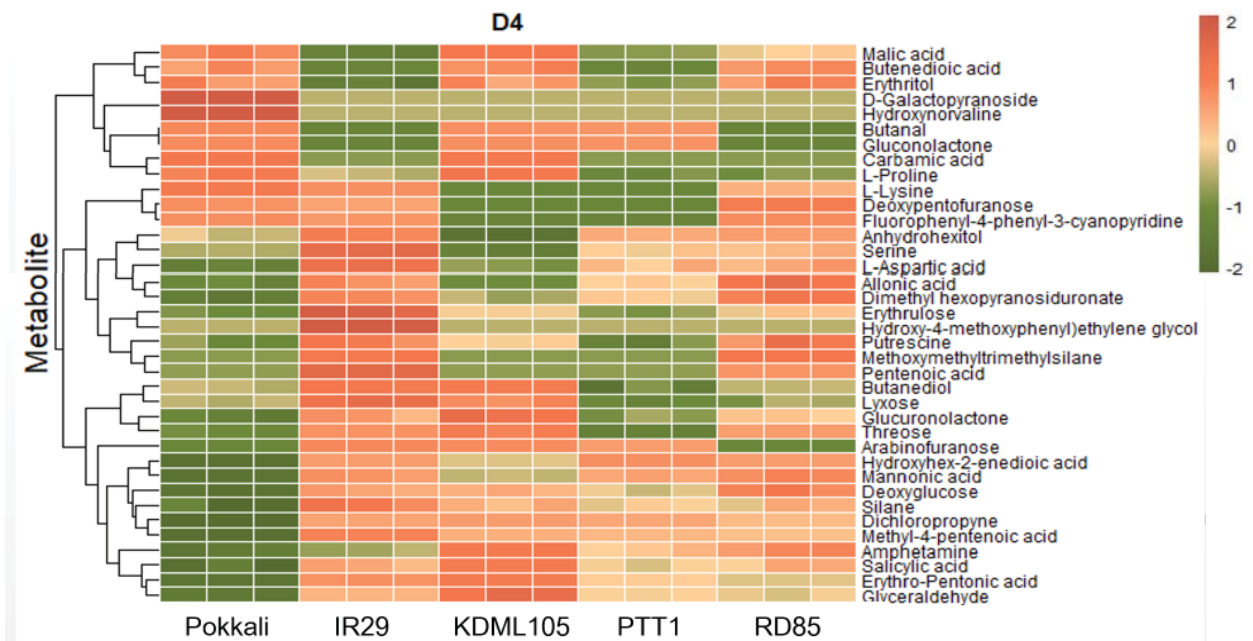


Fig. 5 Heatmap of metabolites found in leaves of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1) and RD85 after salinity treatment for 4 days

ข้าวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข85 สามารถทนเค็มในระดับปานกลาง (MT) และพันธุ์ IR29 อยู่ในระดับอ่อนแอ (S) (Fig. 6 และ Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในข้าวบาร์เลย์พันธุ์ทนเค็มที่พบว่า สามารถเจริญเติบโตในภาวะเค็มได้มากกว่า 7 วัน ในขณะที่พันธุ์อ่อนแอสามารถเจริญเติบโตมีอายุได้เพียง 4 วัน (Wang *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังพบว่า ในวันที่ 7 ของการทดสอบ พบการเพิ่มขึ้นของ shikimic acid ในข้าวพันธุ์ Pokkali ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข85 (Fig. 7) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gupta และ De (2017) พบ shikimic acid ในข้าว ทั้งพันธุ์ทนเค็มและอ่อนแอ โดยพบทั้งการเพิ่มขึ้นและลดลง โดยข้าวพันธุ์ทนเค็ม Bhutnath พบการเพิ่มขึ้นของ shikimic acid หลังจากปลูกในภาวะเค็มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 50 mM เป็นเวลา 5 วัน แต่กลับพบการลดลงของ shikimic acid ในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Nonabokra เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ Sujala และ MTU7029 หรือพบการเพิ่มขึ้นของ shikimic acid ในข้าวกลุ่ม japonica และ indica ที่ปลูกในภาวะเค็มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 150 mM เป็นเวลา 9 วัน (Fu *et al.*, 2018) เป็นต้น นอกจากนี้ Maeda และ Dudareva (2012) ได้รายงานความเกี่ยวข้องของ

shikimate pathway กับการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นในพืชทั้งจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต

เมื่อนำเมแทบอลไลต์ของข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali โดยพิจารณาจากการทดสอบความทนเค็มที่พบว่าการทดสอบ 7 วัน ข้าวพันธุ์ Pokkali ยังมีความสามารถในการทนเค็มได้ค่อนข้างสูง โดยเลือกเมแทบอลไลต์ที่มีปริมาณแตกต่างกันที่ระดับมากกว่า 1.5 fold change ( $p < 0.1$ ) มาวิเคราะห์ pathway analysis ด้วยโปรแกรม MetaboAnalyst โดยพิจารณาที่ค่า  $p < 0.05$  พบกลไกที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม ดังนี้ aminoacyl-tRNA biosynthesis, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism, glutathione metabolism, arginine and proline metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, glycine, serine, threonine metabolism และ nitrogen metabolism (Fig. 8) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการรายงานพบความเกี่ยวข้องกับกลไก aminoacyl-tRNA biosynthesis, arginine and proline metabolism, sulfur metabolism และ butanoate metabolism ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ IR29 (Jumpa *et al.*, 2023) ดังนั้น ผลจากงานวิจัยครั้งนี้ควรจะ



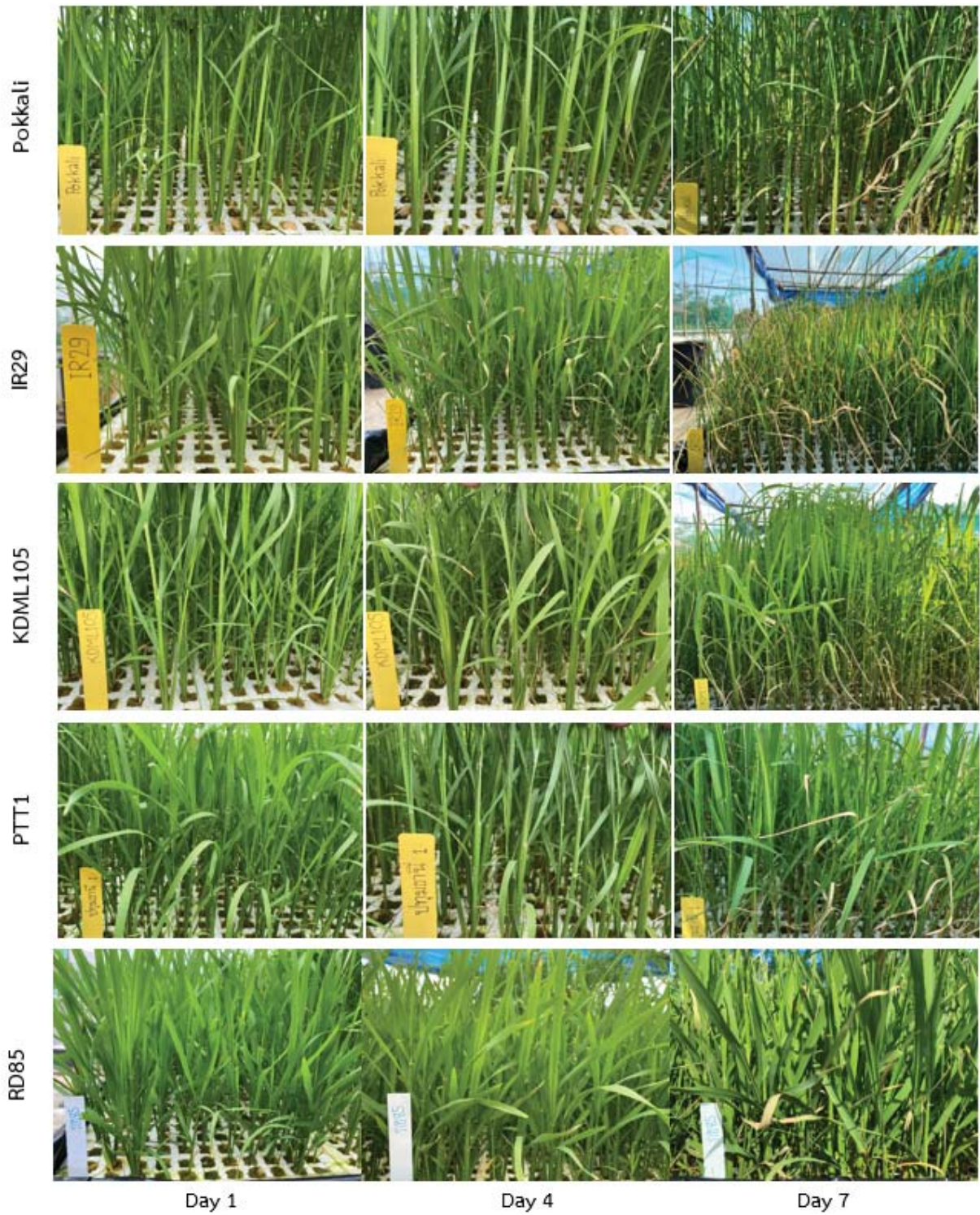


Fig. 6 Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1) and RD85 after salinity treatment for 1 4 and 7 days

Table 2 Salt tolerant scale of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105, Pathum Thani 1 and RD85 after salinity treatment

Variety	Score - tolerant level					
	0 DAS <sup>1)</sup>	1 DAS	2 DAS	3 DAS	4 DAS	7 DAS
Pokkali (tolerant var.)	1-HT	1-HT	1-HT	1-HT	3-T	3-T
IR29 (salt-sensitive var.)	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

<sup>1)</sup>DAS = Days after salinity treatment

HT = highly tolerant, T = tolerant, MT = moderately tolerant, S = susceptible

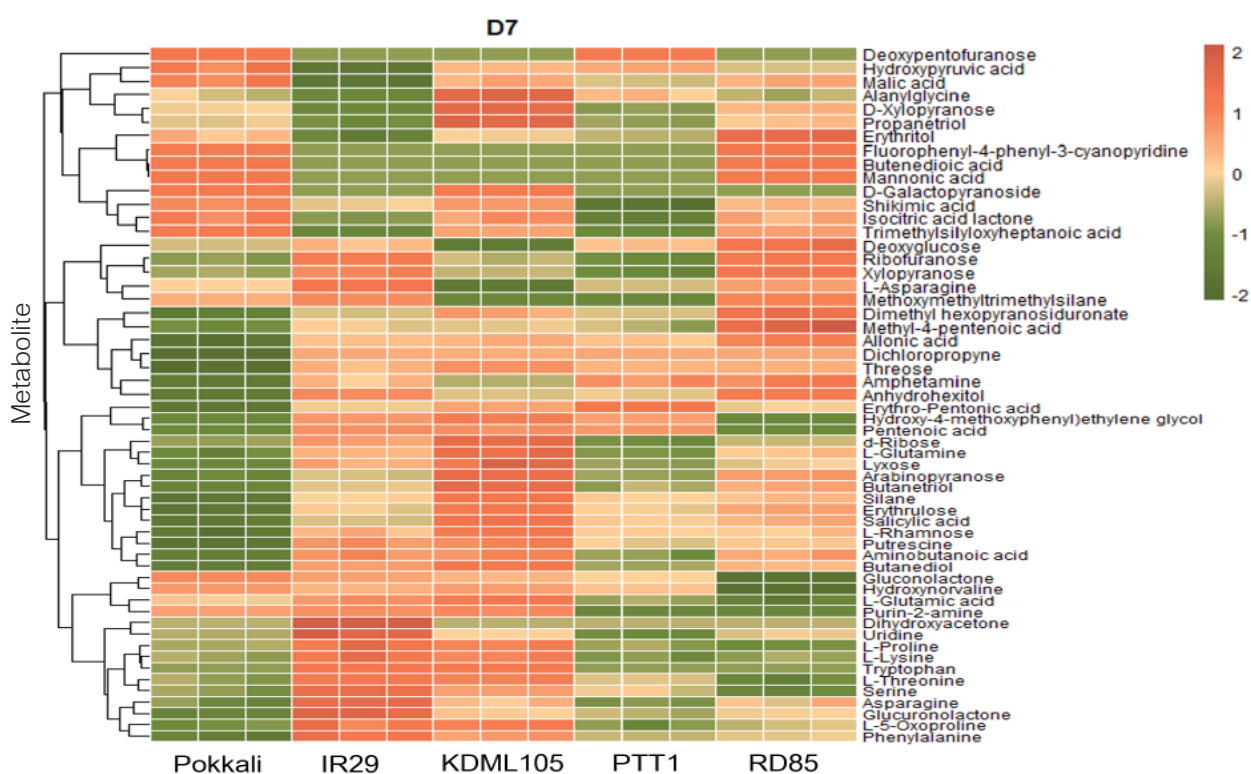


Fig. 7 Heatmap of metabolites found in leaves of Pokkali, IR29, Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PTT1) and RD85 after salinity treatment for 7 days

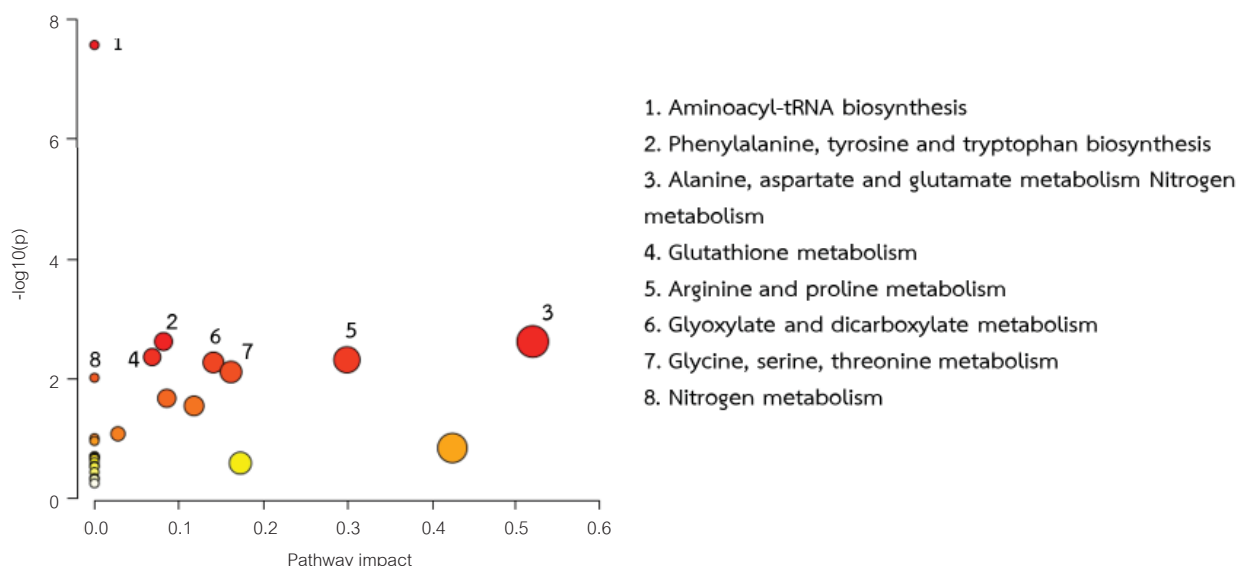


Fig. 8 Pathway analysis of salt-tolerant rice varieties (Plots depicted computed metabolomics pathway as a function of  $-\log_{10}(p)$  and pathway impact for the key differential metabolites from salt-tolerant rice varieties)

ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ของเมแทบอลิซึมที่วิเคราะห์ได้กับกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความทนเค็ม เพื่อนำไปสู่การศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มและใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษาระดับอณูชีววิทยาของความทนเค็มในข้าวระยะกล้าพันธุ์ Pokkali ข้าวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 กข85 และ IR29 ที่ปลูกในสภาพที่มีความเค็มสูงเป็นเวลา 0 1 2 3 4 และ 7 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเมแทบอลิซึมในใบข้าวโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GCxGC-TOFMS) พบเมแทบอลิซึมจำนวน 65 ชนิด ประกอบด้วยสารในกลุ่มน้ำตาลและกรดอินทรีย์สูงมากที่สุด โดยสามารถแยกความแตกต่างของเมแทบอลิซึมในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali และพันธุ์อ่อนแอ IR29 ได้อย่างชัดเจน ตลอดจนการทดสอบข้าวแต่ละพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกันในภาวะเค็ม โดยพบการเพิ่มขึ้น (up-regulation) ของเมแทบอลิซึมที่วิเคราะห์ได้โดย proline ในข้าวพันธุ์ Pokkali และข้าวดอกมะลิ 105 นอกจากนี้ยังพบ hydroxynorvaline และ shikimic acid ในข้าวพันธุ์ Pokkali หลังการทดสอบเป็นเวลา 4 วันขึ้นไป โดยเมแทบอลิซึมที่พบมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างกลไกการตอบสนองต่อความเครียดของข้าว นอกจากนี้เมื่อนำ

เมแทบอลิซึมของข้าวพันธุ์ทนเค็มมาวิเคราะห์ pathway analysis พบกลไกที่เกี่ยวข้อง 3 ลำดับแรก ได้แก่ aminoacyl-tRNA biosynthesis, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis และ alanine, aspartate and glutamate metabolism ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้จะนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็ม เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการทนเค็มต่อไป

### คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ส่งเสริมและสนับสนุนงบประมาณ แผนงานวิจัยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพยุคใหม่และศาสตร์ทางโอมิกส์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและรักษาเสถียรภาพการผลิตข้าว แผนงานวิจัยย่อย การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมแทบอลิซึมและโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าว ทีมงานวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัย สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ และศูนย์วิจัยข้าวคลองหลวง ในการดำเนินงานวิจัยนี้



## เอกสารอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ จุลพงษ์, ภาณุวัฒน์ เอ็งวงศ์ตระกูล, เสาวนิตย เนตรจินดา, มานิกา แย้มสุข, พรพรรณ เขียงฉิน, ชุติมา พลูทอง, ทิวา พาโคกทม และคัทลียา ฉัตรเที่ยง. 2558. ผลของความเค็มต่อการงอกและลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของข้าวนาสวนและข้าวเก่า. หน้า 1805-1814. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 12: ตามรอยพระยุคลบาท. 8-9 ธันวาคม 2558. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน, จ.นครปฐม.
- ธีระรัตน์ อุบลรัตน์, เกศราภรณ์ จันทร์ประเสริฐ และวาสนี พงษ์ประยูร. 2560. การตอบสนองด้านสรีรวิทยาและจัดกลุ่มข้าวหอมพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ต่อภาวะเครียดจากความเค็มจากเกลือโซเดียมคลอไรด์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 22(2): 233-247.
- Chang, J., B.E. Cheong, S. Natera and U. Roessner. 2019. Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 144: 427-435.
- Chunthaburee, S., A. Dongsansuk, J. Sanitchon, W. Pattanagul and P. Theerakulpisut. 2016. Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage. *Saudi Journal of Biological Science* 23: 467-477.
- Fu, L., Q. Shen, L. Kuang, J. Yu, D. Wu and G. Zhang. 2018. Metabolite profiling and gene expression of Na/K transporter analyses reveal mechanisms of the difference in salt tolerance between barley and rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 130: 248-257.
- Gupta, P. and B. De. 2017. Metabolomics analysis of rice responses to salinity stress revealed elevation of serotonin, and gentisic acid levels in leaves of tolerant varieties. *Plant Signaling & Behavior* 12(7): e1335845.
- Hakim, M.A., A.S. Juraimi, M.M. Hanafi, M.R. Ismail, A. Selamat, M.Y. Rafii and M.A. Latif. 2014. Biochemical and anatomical changes and yield reduction in rice (*Oryza sativa* L.) under varied salinity regimes. *BioMed Research International* 2014(6): 208584.
- Hoang, T.M.L., T.N. Tran, T.K.T. Nguyen, B. Williams and P. Wurm. 2016. Improvement of salinity stress tolerance in rice: challenges and opportunities. *Agronomy* 6(4): 54.
- IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice (SES). International Rice Research Institute, Manila. 56 p.
- Jacobs, A., C. Lunde, A. Bacic, M. Tester and U. Roessner. 2007. The impact of constitutive heterologous expression of a moss Na<sup>+</sup> transporter on the metabolomes of rice and barley. *Metabolomics* 3(3): 307-317.
- Jumpa, T., D.M. Beckles, P. Songsri, K. Pattanagul and W. Pattanagul. 2022. Physiological and metabolic responses of Gac leaf (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) to salinity stress. *Plants* 11: 2447.
- Jumpa, T., J. Phetcharaburanin, M. Suksawat and W. Pattanagul. 2023. Physiological traits and metabolic profiles of contrasting rice cultivars under mild salinity stress during the seedling stage. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 51(2): 13211.
- Kanawapee N, J. Sanitchon, W. Lontom, P. Threerakulpisut. 2012. Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. *Plant and Soil* 358: 235-249.
- Kazemi, K. and H. Eskadari. 2011. Effect of salt stress on germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa*) cultivars in Iran. *African Journal of Biotechnology* 10(77): 17789-17792.
- Khan, N., S. Ali and P. Zandi. 2020. Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Plant Metabolites and Abiotic Stress Tolerance* 52(2): 355-363.
- Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1995. Change in plant responses to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46(12): 1843-1852.

- Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. Effect of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regulation* 19(3): 207-218.
- Lutts, S., V. Majerus and J.M. Kinet. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105(3): 1399-3054.
- Maas, E.V. and G.J. Hoffman. 1986. Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage Division* 103: 115-134.
- Maeda, H. and N. Dudareva. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 73-105.
- Meloni, D.A., M.A. Oliva, H.A. Ruiz and C.A. Martinez. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24(3): 599-612.
- Moradi, F. and A.M. Ismail. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany* 99(6): 1161-1173.
- Nguyen, H.T., R.C. Babu and A. Blum. 1997. Breeding for drought resistance in rice: Physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science* 37: 1426-1443.
- Pongprayoon, W., S. Chu-um, A. Pichakum and C. Kirdmanee. 2008. Proline profiles in aromatic cultivars photoautotrophically grown in responses to salt stress. *International Journal of Botany* 4(3): 276-282.
- Rajkumari, N., S. Chowrasia, J. Nishad, S.A. Ganie and T.K. Mondal. 2023. Metabolomics-mediated elucidation of rice responses to salt stress. *Planta* 258(6): 111.
- Smimoff, N. and Q.J. Cumbes. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28(4): 1057-1060.
- Wang, Y., X. Zeng, X. Qijun, X. Mei, H. Yuan, J. Dunzhu, Z. Sang and T. Nyima. 2019. Metabolite profiling in two contrasting Tibetan hullless barley cultivars revealed the core salt-responsive metabolome and key salt-tolerance biomarkers. *AoB Plants* 11(2): plz021.
- Xie, Z., C. Wang, S. Zhu, W. Wang, J. Zhu and X. Zhou. 2020. Characterizing the metabolites related to rice salt tolerance with introgression lines exhibiting contrasting performances in response to saline conditions. *Plant Growth Regulation* 92:157-167.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3<sup>rd</sup> ed. IRRI. Los Baños, Laguna. 83 p.