สูตรอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวไทย

พิจิกา ทิมสุกใส[1] และอารีย์ วรัญญูวัฒก์[2*]

Timsuksai, P.[1] and Waranyuwat, A.[2] (2004).* **Callus Induction Medium for Thai Rice.** *Suranaree J. Sci. Technol. 11:60-66.*

Received: Sep 8, 2003; Revised: Nov 10, 2003; Accepted: Nov 27, 2003

Abstract

The production of rice callus for use in subsequent study by using reported modifications of an MS medium had encountered problems of low productivity and tissue browning after subculture. Therefore, this study aimed to elevate these constraints so that the callus of Thai rice cultivars could be induced efficiently. Mature seeds of five cultivars were cultured on six media under two conditions in a split-split plot design with five replications. The results showed that most cultivars produced more calli under lighting than in the dark and 3 out of 5 cultivars cultured well on a medium supplemented with 1 mg/l each of 2, 4-D and NAA plus 0.1-1 mg/l kinetin and 3% sucrose.

Keywords: Callus, rice, medium

บทคัดย่อ

การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัสเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง MS มักเกิดปัญหาได้ผลผลิตต่ำและการกลายเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อหลังจากทำการแบ่งย้ายเปลี่ยนอาหาร ดังนั้น การศึกษานี้ก็เพื่อขจัดปัญหาดังกล่าว เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกับข้าวพันธุ์ของไทย โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าว 5 พันธุ์ บนอาหาร 6 สูตร ในสองสภาพแวดล้อม วางแผนการทดลองแบบ split-split plot มี 5 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่า พันธุ์ส่วนใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสงสามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มืด 3 ใน 5 พันธุ์เพาะเลี้ยงได้ผลดีในอาหารที่เติม 2, 4-D และ NAA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีลักษณะตามต้องการ โดยการผสมพันธุ์เป็นวิธีปกติที่นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวใช้อยู่ แต่ไม่สามารถทำได้ถ้าหากว่าลักษณะที่ต้องการดังกล่าวไม่มีอยู่ในพันธุ์ข้าวที่จะนำมาผสมพันธุ์ แต่การใช้วิธีการสมัยใหม่เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถถ่ายทอดยีนจากแหล่งใด ๆ เข้ามายังพืช

[1] *อาจารย์ สถาบันราชภัฏสกลนคร จังหวัดสกลนคร*
[2] *สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา*
[*] *ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ*

ที่ต้องการได้

การใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้รับความสำเร็จค่อนข้างมากถึงขั้นการถ่ายยีนเพื่อให้ต้านทานสารปราบวัชพืช (Cao *et al.*, 1992) ต้านทานโรค (Lin *et. al.*, 1995) หรือต้านทานแมลง (Alam *et al.*, 1999) รวมถึงข้าวที่มีปริมาณวิตามินเอสูง (Burkhardt *et al.*, 1997) เป็นต้น แต่ข้าวส่วนใหญ่เป็นชนิดเมล็ดสั้น (japonica) ส่วนข้าวเมล็ดยาว (indica) แม้ว่า Takeuchi *et al.* (1997) รายงานว่ามีอัตราการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสสูงกว่าข้าวเมล็ดสั้น แต่ Sivamani *et al.* (1996) และ Tang *et al.* (2000) พบว่าเป็นพวกที่เพาะเลี้ยงได้ยาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพันธุกรรมต่างกันก็มีศักยภาพการเกิดแคลลัสและเกิดต้นต่างกัน ซึ่ง Zhang (1995) พบว่า ข้าวเมล็ดยาวบางพันธุ์เกิดแคลลัสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อาหาร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) แต่บางพันธุ์เกิดน้อยเพียง 1 ใน 3 เท่านั้น ดังนั้นแคลลัสจึงเป็นวัสดุเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่

จากรายงานวิจัยต่าง ๆ พบว่า อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวทั้งชนิดเมล็ดสั้นและเมล็ดยาว 2 สูตรหลักคือ สูตรดัดแปลงของ MS (Murashige and Skoog, 1962) และ N6 (Chu *et al.*, 1975) ฮอร์โมนที่ใช้ส่วนใหญ่คือ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) อัตราประมาณ 2–4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับข้าวไทย Vajrabhaya *et al.* (1984) ใช้ทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว 6 พันธุ์ เพาะเลี้ยงบนอาหาร LS จำนวน 28 สูตร และพบว่าองค์ประกอบของอาหารที่มี 2, 4-D อัตรา 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, กข. 23 และข้าวเหนียวสันป่าตอง อย่างไรก็ตาม อัตราการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสค่อนข้างต่ำมาก และพบว่า แคลลัสมักจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ซึ่งปัญหานี้ผู้วิจัยเองก็ประสบด้วยตัวเองจึงทำการศึกษาครั้งนี้

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเลี้ยงและขยายปริมาณแคลลัสข้าวไทย เพื่อให้ได้คุณภาพดีสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

นำเมล็ดข้าวเปลือก 6 พันธุ์ คือ กข. 27 ขาวดอกมะลิ 105 น้ำสะกุย 19 เหลืองประทิว 123 หอมคลองหลวง 1 และ หอมสุพรรณบุรี มาแกะเปลือกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ พร้อม Tween 20 อัตรา 1-2 หยดต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ก่อนวางเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรดัดแปลง 6 สูตร ทั้งในสภาพมีแสง และในที่มืด ในห้องเพาะเลี้ยงที่ปรับอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส สูตรอาหารที่ใช้ คือ

1. MS + 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 0.3 กรัมต่อลิตร + น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์
2. MS + 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์
3. MS + 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์
4. MS + 2, 4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์
5. MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + ไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์
6. MS + 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + inositol 0.9 กรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 0.03 กรัมต่อลิตร + มอลโทส 3 เปอร์เซ็นต์

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ split-split plot จำนวน 5 ซ้ำ โดยใช้พันธุ์ข้าวเป็น main plot และสภาพเพาะเลี้ยงเป็น sub plot ส่วนสูตรอาหารเป็น sub-sub plot หลังจากเพาะเลี้ยงเป็น

เวลา 4 สัปดาห์ ทำการวัดผล และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT version 3/93 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารชักนำแคลลัสทั้งในสภาพมีแสงและไม่มีแสง ได้ 4 วัน ก็เริ่มเกิดแคลลัส หลังจากตัดแยกยอดออก แล้วเลี้ยงแคลลัสต่อจนครบ 4 สัปดาห์ ผลที่ได้ในตารางที่ 1 แสดงถึงจำนวนแคลลัสที่เกิดของข้าว 5 พันธุ์ โดยเฉลี่ยจากอาหารทุกสูตร พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดแคลลัสมากที่สุด (58.4 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือเหลืองประทิว 123 (54.6 เปอร์เซ็นต์) และ กข. 27 (52.7 เปอร์เซ็นต์) พันธุ์น้ำสะกุย 19 เกิดแคลลัสเพียง 30.6 เปอร์เซ็นต์ และหอมคลองหลวง 1 เกิด 12.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์หอมสุพรรณบุรีไม่เกิดแคลลัสเลย ซึ่งไม่ทราบสาเหตุ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า พันธุ์ข้าว สูตรอาหาร และสภาพการเพาะเลี้ยง มีผลต่อการเกิดแคลลัสของข้าวอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 2) การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงเกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มืด ยกเว้นพันธุ์หอมคลองหลวง 1 ซึ่งเกิดแคลลัสได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ ยังพบปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์กับสภาพการเพาะเลี้ยง และพันธุ์กับสูตรอาหาร (ตารางที่ 1) ปรากฏว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อใช้อาหารสูตร 1 และ 2 ดูเหมือนว่าพันธุ์หอมคลองหลวง 1 ตอบสนองไม่ดีกับอาหารทุกสูตร รวมทั้งปริมาณการเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัส

เมื่อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าว และสูตรอาหารที่มีต่อปริมาณการเกิดแคลลัส พบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารสูตร 1, 2 และ 3 (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์) พันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข. 27 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารสูตร 2 (ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) พันธุ์น้ำสะกุย 19 เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดด้วยอาหารสูตร 5 และ 6 แต่ต่ำเพียงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ส่วนพันธุ์หอมคลองหลวง 1 ตอบสนองได้ดีกับอาหารสูตร 5 (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร ดังเช่น Vajrabhaya *et al.* (1984) พบว่า พันธุ์ข้าวไทยตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกัน พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว 123 ข้าวเหนียวสันป่าตอง และ กข. 23 เหมาะสำหรับอาหารที่ใส่ 2, 4-D และไคเนติน แต่บางพันธุ์เกิดได้ดีเมื่อใช้น้ำมะพร้าวแทนไคเนติน เป็นต้น

การทดลองนี้ ได้ผลคล้ายคลึงกับของสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และคณะ (2537) ที่ใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เช่นเดียวกัน และสูตรอาหารใกล้เคียงกัน อาหารสูตร 2 และ 3 ยังใช้ได้ดีกับข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข. 27 ด้วย นอกจากนี้ การพบว่าข้าว 4 ใน 5 พันธุ์เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงให้ได้รับแสง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเผดิม ระติสุนทร และคณะ (2536) ที่พบว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดแคลลัสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในสภาพมีแสง สุริยันต์ ฉะอุ่ม และคณะ (2540) รายงานว่า ข้าวพันธุ์นางมลเอส-4 เกิดแคลลัสได้ดีในที่มืด ซึ่งการทดลองครั้งนี้ ก็พบว่าพันธุ์หอมคลองหลวง 1 เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเกิดแคลลัสของข้าวตอบสนองต่อสภาพการเพาะเลี้ยงต่างกัน

การทดลองครั้งนี้ ได้นำสูตรอาหารที่เคยมีผู้วิจัยรายงานไว้มาเพาะเลี้ยง แต่ให้ผลไม่สอดคล้อง นอกจากนี้ แคลลัสที่ได้เมื่อทำการแบ่งขยายเพิ่มปริมาณ มักเกิดปัญหาการกลายเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อพัฒนาสูตรอาหารขึ้นใหม่เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการชักนำแคลลัสข้าวจากเมล็ดแก่สามารถใช้อาหารสูตร 1, 2 หรือ 3 และสามารถแบ่งขยายแคลลัสเลี้ยงเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลได้ด้วยอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D และ NAA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ casein hydrolysate 0.1 กรัม โปรลีน

Table 1. Number of calli and percent induction (in parenthesis) of five Thai rice varieties grown under light and in the dark.

Cultivar	Dark/Light	No. seeds cultured	Media						Cultivar Mean (%)
			1[1]	2	3	4	5	6	
KDML[2]	Dark	250	148 (59.2)	177 (70.8)	187 (74.8)	137 (54.8)	100 (40.0)	107 (42.8)	57.07
	Light	250	182 (72.8)	185 (74.0)	174 (69.6)	141 (56.4)	111 (44.4)	102 (40.8)	59.67
LPT	Dark	250	145 (58.0)	167 (66.8)	143 (57.2)	130 (52.0)	93 (37.2)	69 (27.6)	49.80
	Light	250	172 (68.8)	200 (80.0)	167 (66.8)	166 (66.4)	87 (34.8)	100 (40.0)	59.47
RD	Dark	250	125 (50.0)	174 (69.6)	133 (53.2)	130 (52.0)	75 (30.0)	73 (29.2)	47.33
	Light	250	149 (59.6)	199 (79.6)	189 (75.6)	167 (66.8)	86 (34.4)	81 (32.4)	58.07
NSK	Dark	250	57 (22.8)	53 (21.2)	83 (33.2)	59 (23.6)	92 (36.8)	93 (37.2)	29.13
	Light	250	86 (34.4)	69 (27.6)	61 (24.4)	61 (24.4)	106 (42.4)	97 (38.8)	32.00
HKL	Dark	250	44 (17.6)	34 (13.6)	32 (12.8)	22 (8.8)	74 (29.6)	27 (10.8)	15.53
	Light	250	20 (8.0)	19 (7.6)	21 (8.4)	18 (7.2)	43 (17.2)	27 (10.8)	9.87

[1] Media
1 = MS + 2, 4-D 2 mg/l + casein hydrolysate 0.3 g/l + sucrose 3%
2 = MS + 2, 4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l + sucrose 3%
3 = MS + 2, 4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 1 mg/l + sucrose 3%
4 = MS + 2, 4-D 2.5 mg/l + sucrose 3%
5 = MS + 2, 4-D 0.5 mg/l + NAA 2.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l + sucrose 3%
6 = MS + 2, 4-D 2 mg/l + myo-inositol 0.9 g/l + casein hydrolysate 0.03 g/l + maltose 3%

[2] Cultivar
KDML = Khao Dok Mali 105
LPT = Luang Pratew 123
RD = RD 27
NSK = Nam Sakui 19
HKL = Hom Klong Luang 1

Table 2. Analysis of variance of number of callus induction and size of callus at 4 weeks old grown with and without light.

Source of variation	df	Mean squares	
		Number of callus	Size of callus
Main plot (V = Variety)	4	5,741.09 **	151.95 **
Error a	16	18.31	0.12
Sub plot (L = Light)	1	306.03 **	8.33 **
V x L	4	163.25 **	0.82 ns
Error b	20	36.35	0.35
Sub sub plot (M = Media)	5	743.92 **	9.39 **
V x M	20	340.91 **	1.20 **
L x M	5	22.05 ns	0.58 ns
V x L x M	20	25.66 ns	0.19 ns
Error c	200	20.73	0.27
CV (%) a		20.5	5.5
CV (%) b		28.8	9.3
CV (%) c		21.8	8.2

**, * = significant at $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively ns = non significant

Table 3. Size of callus (in millimeter) at four weeks old as affected by media.

Media[2/]	Cultivar[1/]				
	KDML	LPT	RD	NSK	HKL
1	8.25 a	7.06 ab	7.39 ab	7.22 a	3.50 b
2	8.19 a	7.52 a	7.77 a	7.18 ab	4.10 a
3	7.31 b	7.12 ab	6.46 c	6.84 abc	3.40 b
4	7.65 b	7.01 b	7.23 b	6.42 c	3.40 b
5	6.45 c	6.37 c	6.67 c	6.70 bc	3.50 b
6	6.18 c	6.39 c	6.70 c	6.72 bc	3.10 b
Mean	7.34	6.91	7.04	6.85	3.50

[1/] Means in the same column followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ by DMRT.
[2/] See Table 1

1 กรัม และน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองครีม และมีคุณลักษณะดี จึงอาจจะเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ศึกษาในขั้นอื่นต่อไป

บทสรุป

ผลการศึกษานี้พอสรุปได้ว่า ปริมาณการเกิดแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวขึ้นกับพันธุ์ สูตรอาหาร และสภาพการเพาะเลี้ยง โดยภาพรวมแล้ว อาหารที่เหมาะสำหรับข้าวหลายพันธุ์ คือ สูตรดัดแปลง MS ที่ใส่ 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 0.1 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันจะให้ผลดี แต่การเลี้ยงในที่มืดก็ให้ผลค่อนข้างดี และเป็นการประหยัดไฟด้วย นอกจากนี้การแบ่งย้ายแคลลัสแล้วเลี้ยงในที่มืด ยังช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อได้ด้วย พันธุ์หอมคลองหลวง 1 เป็นพันธุ์ที่ไม่ค่อยตอบสนองต่อสูตรอาหารที่ใช้และเป็นพันธุ์เดียวที่ควรเพาะเลี้ยงในที่มืด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวพิมาย อำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เผดิม ระติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และเลิศลักษณ์ เงินศิริ. (2536). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 27:278-285.

สุริยันต์ ฉะอุ่ม, ศรีสม สุรวัฒนานนท์, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม และเฉลิมชัย วงศ์วัฒนา. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์นางมลเอส-4. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 31: 166-174.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ และพรรณณี รอดแรงบุญ. (2537). การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28:92-98.

Alam, M.F., Datta, K., Albigo, E., Oliva, N., Tu, J., Virmani, S.S., and Datta, S.K. (1999). Transgenic insect-resistant maintainer line (IR 68899B) for improvement of hybrid rice. Plant Cell Rep. 18:572-575.

Burkhardt, P.K., Beyer, P., Wunn, J., Kloti, A., Armstrong, G., Schlertz, M., von Lintig, J., and Potrykus, I. (1997). Transgenic rice endosperm expressing daffodil phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. Plant J. 11:1071-1078.

Cao, J., Duan, X., McElroy, D., and Wu, R. (1992). Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Rep. 11:586-591.

Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C.,. Chu, C.Y., and Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18:659-668.

Lin, W., Arunatha, C.S., Datta, K., Potrygus, I., Muthukrishnan, S., and Datta, S.K. (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. Bio/Technol. 13:686-691.

Linsmaier, E.M., and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Sivamani, E., Shen, P., Opalka, N., Beachy, R.N., and Fauguet, C.M. (1996). Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile

transgenic plant using the biolistic method. Plant Cell Rep. 15:322-327.

Takeuchi, Y., Abe, T., and Sasahara, T. (1997). Genetic analysis of plant regeneration from seed derived calli in rice. Crop Sci. 37:963-965.

Tang, K., Hu, Q., Zhao, E., and Wu, A. (2000). Factors influencing plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell suspension culture of recalcitrant indica rice cultivar IR36. *In vitro* Cell. Dev. Biol. (Plant). 36:255-259.

Vajrabhaya, M., Vajrabhaya, T., Nabors, M.W., and Yoshida, S. (1984). New varieties of rice for saline and acid soil through tissue culture. Progress Report II: Callus growth and regeneration. Chulalongkorn University, Bangkok. p. 41.

Zhang, S. (1995). Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Rep. 15:68-71.