

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยง เมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Multiple Shoot Formation of Aromatic Rice Seeds

ประภา ศรีพิจิตต์¹

Prapa Sripichitt

ABSTRACT

Seeds of aromatic rice (*Oryza sativa* L. cv. Khao Dawk Mali 105) were surface sterilized and cultured on Murashige and Skoog (MS) agar medium supplemented with benzyladenine (BA) or kinetin or 2 - isopentenyladenine (2 - iP) at the concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 mg/l to induce multiple shoot formation. It was found that BA was more effective than kinetin and 2 - iP in inducing multiple shoot formation. Among the BA levels tested, BA at a concentration of 25 mg/l induced the highest percentage of multiple shoot - forming seeds and the largest number of shoots per seed, 68% and 10.3 shoots per seed, respectively. Shoots were rooted 100% when transferred to the same medium without growth regulator or supplemented with indoleacetic acid or indolebutyric acid at the concentrations of 0.5 or 1.0 mg/l. The complete plantlets could survive when transplanted to soil in pots grown under greenhouse conditions.

บทคัดย่อ

นำเมล็ดข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม benzyladenine (BA) หรือ kinetin หรือ 2 - isopentenyladenine (2 - iP) ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มก./ล. เพื่อชักนำให้เมล็ดเจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด พบว่า BA สามารถชักนำให้เมล็ดพัฒนาเป็นยอดหลาย ๆ ยอดได้ในอัตราที่สูงกว่า kinetin และ 2 - iP ที่ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ และในระหว่าง BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA ที่ความเข้มข้น

25 มก./ล. สามารถชักนำให้ได้เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด และจำนวนยอดข้าวต่อเมล็ดที่สูงที่สุด กล่าวคือ 68 เปอร์เซ็นต์ และ 10.3 ยอดต่อเมล็ดตามลำดับ ยอดข้าวเหล่านี้เมื่อย้ายลงสู่อาหารวุ้นสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือที่เติม indoleacetic acid หรือ indolebutyric acid 0.5 หรือ 1.0 มก./ล. สามารถสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และต้นข้าว (plantlet) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดสามารถมีชีวิตรอดได้เมื่อย้ายลงปลูกบนดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนทดลอง

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำนำ

ปัจจุบันข้าวหอมไทยเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ นอกจากนี้ปริมาณความต้องการยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นทุกปี (วรวิทย์, 2530) อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตข้าวหอมของไทยยังไม่เพียงพอต่อปริมาณความต้องการดังกล่าว ปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการผลิตข้าวหอมอยู่ในระดับที่ต่ำนั้นเนื่องมาจากพันธุ์ข้าวหอมไทยส่วนใหญ่ เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกกันมากที่สุดในประเทศไทย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังมีลักษณะอื่น ๆ ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเพิ่มผลผลิต เช่น ต้นสูงทำให้หักล้มง่าย มีความไวต่อช่วงแสง ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงหลายชนิดด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมเพื่อยกระดับผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการ ผู้เขียนและคณะจึงได้ริเริ่มโครงการปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพของข้าวหอมโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวในสภาพปลอดเชื้อมักจะกระทำกันโดยการนำส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว เช่น เมล็ด (Cornejo - Martin *et al.*, 1979), กัพพะ (Nishi *et al.*, 1973), ใบ (Henke *et al.*, 1978), ลำต้น (Wu and Li, 1971), ราก (Kawata and Ishihara, 1968), ช่อดอกอ่อน (Chou *et al.*, 1983) และอับละอองเกสร (Oono, 1978) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อสร้างแคลลัส (callus) จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นข้าวต่อไป ซึ่งการชักนำให้เนื้อเยื่อข้าวเจริญเป็นต้นข้าวโดยผ่านขั้นตอนการสร้างแคลลัสก่อนนั้น มักจะให้เปอร์เซ็นต์ต้นข้าวต่ำ นอกจากนี้อัตราการเกิดต้นข้าวที่ขาดคลอโรฟิลล์ (ablino) ยังสูงด้วย เมื่อเร็ว ๆ นี้ Hisajima *et al.* (1987) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพวก Japonica และสามารถชักนำให้คัพพะพัฒนาเป็นต้นข้าว

หลาย ๆ ต้นได้โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสร้างแคลลัส ซึ่งวิธีการนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มอัตราการชักนำให้เกิดต้นข้าวแล้ว ยังไม่พบต้นข้าวที่ขาดคลอโรฟิลล์ด้วย

ในการศึกษารั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะค้นหาและปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เมล็ดพัฒนาเป็นต้นข้าวจำนวนมากโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสร้างแคลลัส ทั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคเบื้องต้นสำหรับที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เมล็ดข้าวสร้างยอดหลาย ๆ ยอด

นำเมล็ดข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้ว มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol นาน 2 นาที แล้วแช่ใน 10% น้ำยาฟอกสี (chlorox) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม benzyladenine (BA) หรือ kinetin หรือ 2 - isopentenyladenine (2 - iP) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มก./ล. น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 26°C. เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ จึงทำการนับจำนวนเมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด และจำนวนยอดต่อเมล็ด

การชักนำให้ยอดยึดตัวยาวขึ้น

เนื่องจากยอดที่เกิดขึ้นในบางเมล็ดมีจำนวนมาก ทำให้มีขนาดเล็ก จึงได้ทำการแบ่งยอดเหล่านี้ออกเป็นกลุ่ม ๆ จำนวน 2 - 6 กลุ่ม แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การชักนำให้ยอดสร้างราก

ทำการย้ายกลุ่มยอดข้าวที่มีความสูงประมาณ 6 – 10 ซม. จำนวน 5 – 8 ยอด ไปเลี้ยงบนอาหารฐานสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือที่เติม indoleacetic acid (IAA) หรือ indolebutyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วจึงนับจำนวนกอข้าวที่สร้างราก

ผล

ผลของไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เมล็ดสร้างยอดหลาย ๆ ยอด

ภายหลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS ไปนานประมาณ 1 สัปดาห์ เมล็ดส่วนใหญ่จะงอกให้ต้นอ่อน 1 ต้น ต่อมาอีกหนึ่งหรือสองสัปดาห์เริ่มมียอดใหม่แตกออกมาจากบริเวณกัณหาใกล้กับส่วนโคนของยอดอันแรกที่ยกออกมา ซึ่งต่อมาจำนวนและขนาดของยอดจะเพิ่มขึ้น ภายหลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 5 สัปดาห์ จำนวนยอดที่เกิดขึ้นค่อนข้างจะคงที่ (Figure 1) จึงได้ทำการนับจำนวนเมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด และจำนวนยอด (ความยาวมากกว่า 0.5 ซม.) ต่อเมล็ด พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีไซโตไคนินไม่ว่าจะเป็น BA, kinetin หรือ 2 - iP สามารถชักนำให้เมล็ดพัฒนาเป็นยอดหลาย ๆ ยอดได้ ในขณะที่สูตรอาหารที่ไม่มีไซโตไคนิน เมล็ดจะงอกให้ยอดเพียงยอดเดียว อย่างไรก็ตาม BA สามารถชักนำให้เมล็ดพัฒนาเป็นยอดหลาย ๆ ยอดได้ในอัตราที่สูงกว่า kinetin และ 2 - iP ที่ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบตั้งแต่ 5 – 30 มก./ล. เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด (Table 1) และจำนวนยอดต่อเมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด (Table 2) และในระหว่าง BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 25 มก./ล. สามารถ

ชักนำให้ได้เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอด และจำนวนยอดต่อเมล็ดที่สร้างยอดหลาย ๆ ยอดสูงสุด กล่าวคือ 68% และ 10.3 ยอดต่อเมล็ดตามลำดับ สำหรับ BA ที่ความเข้มข้น 30 มก./ล. นอกจากจะให้อัตราการชักนำให้เมล็ดสร้างยอดหลาย ๆ ยอดต่ำกว่า BA ที่ 25 มก./ล. แล้ว ยอดที่ได้ส่วนใหญ่มักจะแคระแกรน ยอดข้าวที่ได้ทั้งหมดมีสีเขียว ไม่พบยอดข้าวที่ขาดคลอโรฟิลล์เลย เมล็ดที่ให้ยอดหลาย ๆ ยอดมักไม่มีรากเกิดขึ้น ส่วนเมล็ดที่มียอดเพียงยอดเดียวส่วนใหญ่จะมีรากงอกออกมาจากส่วนโคนของยอด

ผลของออกซินที่มีต่อการชักนำให้ยอดสร้างราก

ภายหลังจากที่ได้ย้ายกอข้าวที่ผ่านการชักนำให้ยอดยึดตัวยาวขึ้น (Figure 2) แล้วมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมออกซิน หรือที่เติม IAA หรือ IBA 0.5 หรือ 1.0 มก./ล. เป็นเวลานานประมาณ 1 สัปดาห์เริ่มมีรากสั้น ๆ จำนวน 3 – 4 รากงอกออกมาจากส่วนโคนของกอข้าว ต่อมาจำนวนและความยาวรากจะเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 3 สัปดาห์จึงนับจำนวนกอข้าวที่สร้างราก (Figure 3) สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมออกซิน หรือที่เติม IAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. สามารถชักนำให้กอข้าวสร้างรากได้ 100% (Table 3) แต่สูตรอาหารที่ไม่เติมออกซินสามารถชักนำให้กอข้าวสร้างรากได้รวดเร็วกว่า จำนวนรากมากกว่า และรากเจริญยึดตัวได้ดีกว่าสูตรอาหารที่เติม IAA และ IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล.

การย้ายกล้าข้าวลงปลูกในดิน

เมื่อกอข้าวมีรากสมบูรณ์แล้วได้ทำการย้ายออกจากขวดเพาะเลี้ยง ลำงวันที่ติดอยู่ที่ปลายรากออกให้หมด ปลูกกอข้าวในดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนทดลอง ผลปรากฏว่าข้าวทุกกอมีชีวิตรอดได้ (Figure 4) สามารถเจริญเติบโตจนกระทั่งออกดอก และเก็บเกี่ยวเมล็ดได้

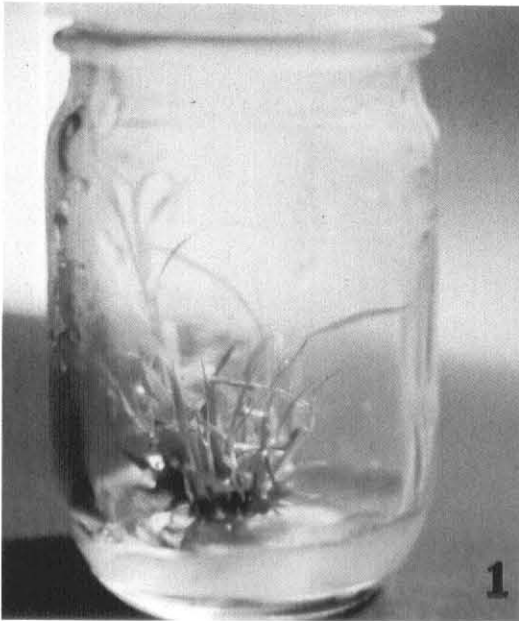


Figure 1. Multiple shoot formation of rice seed cultured on MS medium supplemented with BA 25 mg/l.

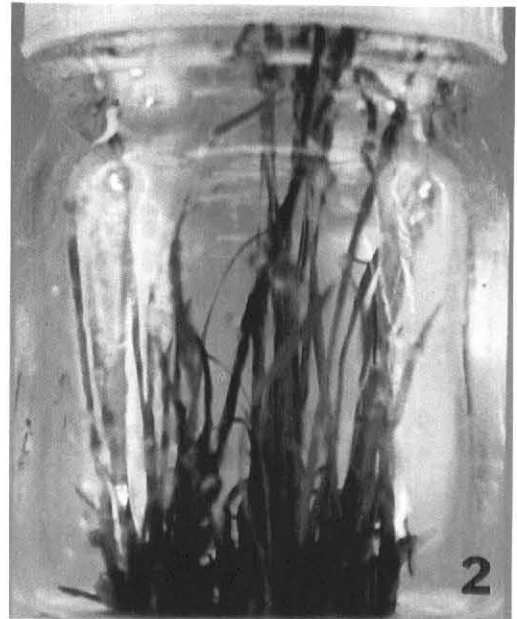


Figure 2. Shoot elongation after subcultured on MS medium supplemented with BA 1 mg/l.



Figure 3. Shoots were rooted when transferred to basic MS medium.



Figure 4. Complete plantlets regenerated from aromatic rice seeds.

Table 1 Effects of cytokinin at various concentrations on multiple shoot formation of rice seeds shown as number of multiple shoot - forming seeds (%). Each treatment comprised 30 seeds.

cytokinin mg/l	2 - iP	Kinetin	BA
0	0	0	0
5	8.0	12.5	15.4
10	7.4	14.3	36.1
15	16.0	16.7	37.3
20	18.2	23.1	64.0
25	16.7	36.4	68.0
30	29.6	45.2	54.2
Average	16.0	24.7	45.8

Table 2 Effects of cytokinin at various concentrations on multiple shoot formation of rice seeds shown as number of shoots per multiple shoot - forming seed. Each treatment comprised 30 seeds.

cytokinin mg/l	2 - iP	Kinetin	BA
0	0	0	0
5	2.0	2.4	2.3
10	2.0	2.5	2.8
15	2.7	2.8	3.5
20	4.5	3.8	8.1
25	6.6	5.4	10.3
30	7.1	6.7	5.6

Table 3 Effects of auxin at various concentrations on root formation of rice shoots.

Auxin (mg/l)	Frequency of root formation (%)	Rooting characteristics
0	100	fast, numerous, long
IAA 0.5	100	rather fast, numerous, long
1.0	100	rather fast, moderate, stunted
IBA 0.5	100	rather fast, moderate, long
1.0	100	rather fast, moderate, long

ระยะเวลานับตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นจนได้ต้นข้าว (plantlet) ประมาณ 10 สัปดาห์ หลังจากย้ายต้นข้าวลงปลูกในดินจนกระทั่งเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 3 เดือน รวมทั้งสิ้นเป็นเวลาประมาณ 5 เดือน 2 สัปดาห์ ซึ่งนับว่าใกล้เคียงกับระยะที่ใช้ในการปลูกข้าวจากเมล็ดในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบผลสำเร็จจนถึงขั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 3 อย่าง (Murashige, 1974) คือ 1) ลักษณะของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง 2) องค์ประกอบของอาหาร และ 3) สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ในระหว่างปัจจัยทั้ง 3 อย่างนี้ องค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโต มีบทบาทที่สำคัญยิ่งต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นต้นพืช ในพืชใบเลี้ยงคู่มีรายงานจำนวนมากกล่าวว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกไซโตไคนินสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชพัฒนาเป็นยอดหรือต้นได้ (Bapat and Rao, 1977 ; Atreya *et al.*, 1984) ทั้งนี้เนื่องจากไซโตไคนินไปยับยั้งการเจริญของตายอดแต่ส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic region) ในการทดลองครั้งนี้ไซโตไคนินทั้ง 3 ชนิด คือ BA, kinetin และ 2 - iP สามารถชักนำให้เมล็ดข้าวสร้างยอดหลาย ๆ ยอดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง BA ที่ความเข้มข้น 20 - 25 มก./ล. ชักนำให้เมล็ดสร้างยอดได้ในอัตราที่สูง Hisajima *et al.* (1987) ได้ทดลองใช้ไซโตไคนินทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกันเพื่อชักนำให้เมล็ดข้าวพวก Japonica สร้างยอดหลาย ๆ ยอด พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 25 - 150 μ M เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เมล็ดสร้างยอดหลาย ๆ ยอดได้ ส่วน kinetin และ 2 - iP ไม่มีผลเลย ในข้าวโพด Hisajima and Arai (1987) รายงาน

ว่า BA สามารถชักนำให้เมล็ดสร้างยอดหลาย ๆ ยอดได้ในขณะที่ kinetin และ 2 - iP ไม่มีผลในการชักนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซินสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชสร้างรากได้ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี IAA หรือ IBA สามารถชักนำให้ยอดข้าวสร้างรากได้ดีพอ ๆ กับสูตรอาหารที่ไม่มีออกซิน ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองในข้าว (Hisajima *et al.*, 1987) ส่วนในข้าวโพด Hisajima and Arai (1987) รายงานว่า IBA สามารถชักนำให้ยอดสร้างรากได้

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมบนสูตรอาหาร MS ที่มี BA ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถชักนำให้เมล็ดสร้างยอดต่อต้นในอัตราที่สูง ภายในระยะเวลาอันรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับชักนำให้ได้นั้นจากแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอย นอกจากนี้ยอดที่ได้ทั้งหมดยังมีสีเขียวไม่พบยอดหรือต้นข้าวที่ขาดคลอโรฟิลล์ ซึ่งโดยปกติต้นข้าวที่เจริญมาจากแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยมักจะมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่ขาดคลอโรฟิลล์สูง จึงนับได้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวมีข้อได้เปรียบอย่างมาก ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ร่วมกับสิ่งก่อกลายพันธุ์เพื่อสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมให้กับประชากรข้าว หรือนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกเพื่อลักษณะบางประการ แทนวิธีการคัดเลือกโดยอาศัยแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอย ซึ่งมักจะพบกับปัญหาการสูญเสียความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส หรือเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเป็นเวลานาน ๆ ในระหว่างการคัดเลือก นอกจากนี้อาจนำไปใช้ในการผสมข้ามระหว่างข้าวคนละชนิดได้ อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้เพิ่งเริ่มขึ้นเป็นครั้งแรกในข้าวพวก Indica ควรจะได้มีการปรับปรุงเทคนิคให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นเพื่อเพิ่มอัตราการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากจากเมล็ด

เอกสารอ้างอิง

- วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2530. ข้าวหอมขาวดอกมะลิ 105 ปัสมาดี และอื่น ๆ. โครงการตำราชาวบ้าน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 น.
- Atreya, C.D., J.P. Rao and N.C. Subrahmanyam. 1984. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments. Plant Sci. Lett. 34 : 379 - 383.
- Bapat, V.A. and P.S. Rao. 1977. Experimental control of growth and differentiation in organ culture of *Physalis minima* Linn. Z. Pflanzenphysiol. 85 : 403 - 416.
- Chou, K.T., K.L. Ge, I.S. Tsai, C.S. Yang and H.W. Yang. 1983. Callus induction and redifferentiation of different hybrid rice plant parts, pp. 207 - 213. In F.J. Zapata (ed.). Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing, China.
- Cornejo - Martin, M.J., A.M. Mingo - Castel and E. Primo - Millo. 1979. Organ redifferentiation in rice callus : Effects of C_2H_4 , CO_2 and cytokinins. Z. Pflanzenphysiol. 94 : 117 - 123.
- Henke, R.R., M.A. Mansar and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling - derived calli of rice (*Oryza sativa*). Physiol. Plant. 44 : 11 - 13.
- Hisajima, S. and Y. Arai. 1987. Micropropagation of maize plant through seed culture *in vitro*. Plant Tissue Culture Letters 4 : 38 - 40.
- Hisajima, S., P. Chongpraditnun and Y. Arai. 1987. Microplant propagation of rice plants *in vitro*. Japan. J. Trop. Agr. 31 : 12 - 15.
- Kawata, S. and A. Ishihara. 1968. Regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the seminal roots. Proc. Jap. Acad. 44 : 549 - 553.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 135 - 166.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio - assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473 - 497.
- Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi. 1973. The role of auxins in differentiation of rice tissue cultured *in vitro*. Bot. Mag. Tokyo 86 : 183 - 184.
- Oono, K. 1978. Test tube breeding of rice by tissue culture. Trop. Agric. Res. Ser. 11 : 109 - 124.
- Wu, L. and H.W. Li. 1971. Induction of callus tissue initiation from different somatic organs of rice plant by various concentration of 2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid. Cytologia 36 : 411 - 416.