การสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Protoplast Isolation and Culture of Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.) Variety KDML 105

ประภา ศรีพิจิตต์[1] เสาวรี ตังสกุล[2]

Prapa Sripichitt[1] Saowaree Tangsakun[2]

ABSTRACT

Protoplasts were isolated from 3 sources of cells; leaves of seedlings, embryo-derived calli and cell suspension by incubating them in enzyme solution containing various kinds and concentrations of enzymes for 1, 3 and 5 hrs, repecitively. The results showed that leaves from 5-day-old seedlings was the most suitable source of cells for protoplast isolation which gave the highest yield of protoplasts 9.14 x 10^6 per 1 g fresh weight of leaves. The kinds and concentrations of enzymes optimum for protoplast isolation were different depended on the sources of cells used for isolation. The enzyme solution containing 2% cellulase Onozuka RS, 1% macerozyme R 10 and 0.1% pectolyase was suitable for isolation of protoplast from the leaves whereas calli and cell suspension gave high yielded protoplasts when incubated in enzyme solution containing 4 % cellulase Onozuka RS, 1% macerozyme R 10 and 0.2% pectolyase. The incubation period of 3 hrs was optimum for protoplast isolation from leaves, calli and cell suspension. However, protoplasts isolated from cell suspension possessed higher percentage of viability (80-90%) than protoplasts isolated from leaves and calli (50-60%). The isolated protoplast could not divide to form colony or callus when cultured on N_6 or K8P medium

Key words: rice (*Oryza sativa* L.) protoplast isolation, protoplast culture

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ โทร. 579-3130

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. Tel. 579-3130

[2] สถานีทดลองพืชไร่บ้านใหม่สำโรง อ.สีคิ้ว จ. นครราชสีมา โทร. 044-325-048

Ban Mai Sam Rong Field Crops Experiment Station, Amphoe Si Khiu, Nakhon Ratchasima, Thailand. Tel. 044-325-048.

บทคัดย่อ

ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากแหล่งของเซลล์ 3 แหล่ง ได้แก่ใบจากต้นกล้าข้าว แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ และเซลล์แขวนลอย โดยการแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าใบจากต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน เป็นแหล่งของเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์โดยให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด 9.14 x 10^6 โปรโตรพลาสต์/น้ำหนักสดของใบ 1 กรัม ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยผนังเซลล์เพื่อปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลล์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์ โดยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 2%, macerozyme 1% และ pectolyase 0.1% เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบ ในขณะที่แคลลัสและเซลล์แขวนลอยจะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นที่สูงเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 4%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2% เวลาในการแช่ใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอยเพื่อให้ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุดคือ 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยมีความมีชีวิต (80-90%) สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัส (50-60%) โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อสร้างโคโลนีหรือแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 หรือ K8P

คำหลัก : ข้าว การสกัดโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

คำนำ

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สำคัญพืชแรกซึ่งประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดย Deka and Sen (1976) เป็นกลุ่มแรกที่สกัดโปรโตพลาสต์จากกาบใบและแคลลัสของลำต้นข้าวและสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์เจริญเป็นแคลลัส แต่ไม่อาจพัฒนาเป็นต้นได้ ต่อมานักวิทยาศาสตร์จำนวนมากสามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นต้นได้ แต่ในระยะแรกความสำเร็จจำกัดอยู่เฉพาะข้าวเมล็ดสั้นพวก Japonica (Fuji mura *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1986; Kyozuka *et al.*, 1987) สำหรับข้าวเมล็ดยาวพวก indica ซึ่งเป็นข้าวที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด แต่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทำได้ยากนั้น เมื่อไม่นานมานี้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสามารถสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นต้นได้ (Lee *et al.*, 1989; Timothy and Sree Rangasamy, 1993; Gupta *et al.*, 1995) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเครื่องมือที่ช่วยทำให้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวรุดหน้าไปอย่างมาก จนถึงขั้นที่สามารถถ่ายทอดชิ้นส่วนของยีนหรือดีเอนเอที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในพืช (transgenic plant) ได้โดยตรง โดยผ่านเข้าไปทางโปรโตพลาสต์ (Toriyama *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1992) นอกจากนี้การชักนำให้โปรโตพลาสต์หลอมรวมกัน (fusion) ยังช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้ามพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลกัน (somatic hybridization) ซึ่งไม่สามารถผสมข้ามกันเองตามธรรมชาติเพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพ่อแม่ให้กับลูก (Kisaka *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตามการนำโปรโตพลาสต์มาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับศักยภาพของโปรโตพลาสต์ของพืชนั้น ๆ เช่น ความสามารถในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อของพืชให้ได้ปริมาณมาก ๆการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อชักนำให้ โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์สร้างโคโลนี (colony) และพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration) ดังนั้นการค้นหาและพัฒนาเทคนิคการสกัดโปรโตพลาสต์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวและการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์จึงเป็นงานสำคัญที่ต้องทำก่อนการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยง

โปรโตพลาสต์ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะค้นหาและพัฒนาเทคนิคการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ให้เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้น ทั้งนี้เพื่อนำเทคนิคที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญ ๆ เช่น ลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ลักษณะความต้านทานโรคและแมลงให้กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยตรงโดยผ่านทางโปรโตพลาสต์

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งของเซลล์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

1. ใบ นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) มาเพาะเลี้ยงบนจานแก้วเพื่อให้เมล็ดงอกเป็นต้นกล้า นำต้นกล้าที่มีอายุ 5, 7 และ 9 วัน มาใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์
2. แคลลัส นำแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 (Chu *et al.*, 1975) ที่เติม 2,4- D 2 มก./ล casein hydrolysate 30 มก./ล. proline 5 มิลลิโมลาร์ น้ำตาล sucrose 3% และวุ้น 0.7% เป็นเวลานาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ มาใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์
3. เซลล์แขวนลอย นำแคลลัสที่มีอายุ 3 สัปดาห์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหารในข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N6 ที่เติม 2, 4-D 2 มก./ล. proline 10 มิลลิโมลาร์ และน้ำตาล maltose 2% วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 2, 4 และ 6 สัปดาห์ นำเซลล์แขวนลอยที่มีอายุการเพาะเลี้ยงดังกล่าวมาใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

การสกัดโปรโตพลาสต์

1. **ใบ** นำใบมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ หนัก 1 กรัม แช่ในสารละลาย washing solution ปริมาตร 10 มล. ซึ่งประกอบด้วยเกลือ CPW (Frearson *et al.*, 1973) ที่เติม mannitol 15% และ MES 5 มิลลิโมลาร์ บรรจุอยู่ในจานแก้วขนาด 90 x 15 มม. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. **แคลลัส** นำแคลลัสหนัก 1 กรัมมาหั่นให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะรวมตัวกันอยู่แยกออกจากกัน แล้วแช่ในสารละลาย washing solution ตามวิธีการในข้อ 1
3. **เซลล์แขวนลอย** นำเซลล์แขวนลอยหนัก 1 กรัม แช่ในสารละลาย washing solution ตามวิธีการในข้อ 1
4. **ดูดสารละลาย** washing solution ออกจากใบแคลลัส และเซลล์แขวนลอย แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 15 มล. วางจานแก้วบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบ ต่อนาทีในที่มืดอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ การทดลองนี้ใช้สารละลายเอนไซม์ 4 ชนิดคือ

   (a) Cellulase Onozuka RS 2%,mace rozyme R 10 1% และ pectolyase 0.1%

   (b) Cellulase Onozuka RS 2%, mace rozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2%

   (c) Cellulase Onozuka RS 4%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.1%

   (d) Cellulase Onozuka RS 4%, mace rozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2%

   สารละลายเอนไซม์แต่ละชนิดจะเติม $CaCl_2$

$2HO_2$ 4 มิลลิโมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ และ mannitol 0.36 มิลลิโมลาร์ลงไปด้วย

5. ภายหลังจากการแช่ในสารละลายเอนไซม์นาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์และเศษเซลล์ต่าง ๆ แขวนลอยอยู่มากรองผ่าน nylon mesh ที่มีรูขนาด 50, 35 และ 25 ไมครอน ตามลำดับเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษชิ้นส่วนเซลล์ต่าง ๆ
6. นำสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์แขวนลอยอยู่ ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกสาร (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ซึ่งโปรโตพลาสต์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดปั่น (centrifuge tube)
7. ใช้ปิเปตชนิด pasture ดูดสารละลายเอนไซม์กับเศษเซลล์ออกให้หมด จนเหลือเฉพาะโปรโตพลาสต์ซึ่งอยู่ที่ก้นหลอดปั่น
8. เติมสารละลาย washing solution ประมาณ 10 มล. ลงในหลอดปั่น เพื่อล้างทำความสะอาดโปรโตพลาสต์
9. นำสารละลายโปรโตพลาสต์ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกสารที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาทีโปรโตพลาสต์จะตกตะกอนอยู่ก้นหลอดปั่น
10. ใช้ปิเปตชนิด pasture ดูดสารละลาย washing solution ทิ้งไปเหลือแต่โปรโตพลาสต์ ซึ่งอยู่ที่ก้นหลอดปั่น
11. ล้างทำความสะอาดโปรโตพลาสต์อีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 8-10
12. เติมสารละลาย washing solution หรืออาหารเหลวสูตรที่จะใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลงบนโปรโตพลาสต์ให้มีปริมาตร 1 มล.
13. ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วยที่นับจำนวนเซลล์ (hemacytometer) จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope)
14. คำนวณหาความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเพื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่สามารถสกัดและให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด

การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

1. เตรียมสีย้อม Evans blue ความเข้มข้น 0.1% โดยการละลาย Evans blue 0.1 กรัมในสารละลาย washing solution 100 มล.
2. หยอดสารละลาย Evans blue 5-7 หยด ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ 1 มล. ทิ้งไว้นาน 5 นาที
3. ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม ส่วนโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบไปเลี้ยงในอาหารสูตร N6 และ K8P (Kao and Michayluk, 1975) ที่เติม 2,4-D 1.5 มก./ล. Zeatin 0.2 มก./ล. Casein hydrolysate 500 มก./ล. และน้ำตาล glucose 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในจานแก้วขนาด 60 x 15 มม. โดยแบ่งการเลี้ยงเป็น 2 วิธีคือ 1) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว โดยให้มีความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเป็น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. 2) เลี้ยงโดยการฝังโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็ง (เติมวุ้น agarose 2.5%) โดยให้โปรโตพลาสต์ที่ฝังอยู่ในอาหารแข็งมีความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล.เก็บรักษาโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2°C

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไปนาน 2-3 ชั่วโมง

ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว โดยการย้อมด้วยสี calcoflour white 0.1% ผนังเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นจะเรืองแสงเมื่อดูด้วยกล้อง fluorescence จากนั้นตรวจสอบการแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนี (colony) ของโปรโตพลาสต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไปนาน 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 และ 28 วัน

ผลการทดลอง

การสกัดโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าข้าว

ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีอายุ 5, 7 และ 9 วัน โดยการแช่ชิ้นส่วนใบในสารละลายเอนไซม์ 4 ชนิด ดังนี้

(a) cellulase Onozuka RS 2%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.1%

(b) cellulase Onozuka RS 2%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2%

(c) cellulase Onozuka RS 4%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.1% และ

(d) cellulase Onozuka RS 4%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2% และแช่เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า ใบที่มีอายุ 5 วัน เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (a) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 9.14 $x10^6$ โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. (Figure 1A) ในขณะที่ใบซึ่งมีอายุ 7 วัน เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (b) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 2.25 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. (Figure 1B) สำหรับใบที่มีอายุ 9 วัน ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 2.51 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล.เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (a) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง (Figure 1C)

จากการเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยทั้งสาม คือ อายุของใบ ชนิดของสารละลายเอนไซม์ และเวลาในการแช่ พบว่า ใบจากต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (a) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง จะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 9.14 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. หรือ 9.14 x 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสดของใบ 1 กรัม

โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบของต้นกล้าที่มีอายุต่าง ๆ ดังกล่าว มีรูปร่างกลมขนาดไม่สม่ำเสมอ ประกอบด้วยโปรโตพลาสต์ที่มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ภายในมีคลอโรพลาสต์จำนวนมาก (Figure 2A) และจากการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบโดยใช้ สีย้อม Evans blue พบว่าโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีย้อมมีจำนวนประมาณ 60% ที่เหลือเป็นโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตซึ่งติดสีน้ำเงิน (Figure 2 B)

การสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะไปนาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยการแช่ชิ้นส่วนแคลลัสในสารละลายเอนไซม์ 4 ชนิด คือ (a), (b), (c), และ (d) เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 2 สัปดาห์เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 3.19 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. (Figure 3A)ในทำนองเดียวกันแคลลัสที่มีอายุ 3 และ 4 สัปดาห์ เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง จะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 3.39 x 10^6 และ 2.74 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. (Figure 3B and C)

จากการเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยทั้งสาม คือ อายุของแคลลัส ชนิดของสารละลายเอนไซม์ และเวลาในการแช่ พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 3 สัปดาห์ เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 3.39x10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. หรือ 3.39 x 10^6 โปรโตพลาสต์

/น้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม

โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากแคลลัสที่มีอายุต่าง ๆ ดังกล่าวมีรูปร่างกลม โปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มีขนาดเล็กและโปรโตพลาสต์ยังคงมีคลอโรพลาสต์อยู่ภายใน แต่น้อยกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและจากการตรวจสอบโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากแคลลัสโดยใช้สีย้อม Evans blueพบว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มีความมีชีวิตโดยเฉลี่ยประมาณ 50-60% ซึ่งใกล้เคียงกับความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบ

การสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

ในการสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปนาน 2, 4 และ 6 สัปดาห์ โดยแช่เซลล์แขวนลอยในสารละลายเอนไซม์ 4 ชนิด คือ (a), (b), (c) และ (d) เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า เซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 2 สัปดาห์เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 2.86 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. (Figure 4A) เช่นเดียวกันเซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 4 และ 6 สัปดาห์ ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูง 2.90 x 10^6 และ 2.96 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง (Figure 4B and 4C)

จากการเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยทั้งสาม คือ อายุของเซลล์แขวนลอย ชนิดของสารละลายเอนไซม์และเวลาในการแช่ พบว่า เซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 6 สัปดาห์เมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด (d) เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาในความหนาแน่นสูงสุด 2.96 x 10^6 โปรโตพลาสต์/อาหาร 1 มล. หรือ 2.96 x 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอย 1 กรัม

โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยที่มีอายุต่าง ๆ ดังกล่าวมีรูปร่างกลมประกอบด้วยโปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเล็กและใหญ่ปะปนกัน และจากการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโต พลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยโดยใช้สีย้อม Evans blue พบว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้มีความมีชีวิตโดยเฉลี่ยประมาณ 80-90% ซึ่งสูงกว่าความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัส

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบในอาหารเหลวสูตร N_6 และ K8P ที่เติม 2, 4-D 1.5 มก./ล. zeatin 0.2 มก./ล. casein hydrolysate 500 มก./ล. และน้ำตาล glucose 0.7 โมลาร์ ไปนาน 2-3 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์โดยการย้อมด้วยสี calcoflour white พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ โดยผนังเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นจะเรืองแสงเมื่อดูด้วยกล้อง fluorescence (Figure 2C) โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงโดยการฝังในอาหารแข็งไม่สามารถตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงทั้งในอาหารเหลวและฝังในอาหารแข็งไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อสร้างโคโลนีหรือแคลลัส

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองสกัดโปรโตพลาสต์จากใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอยของข้าวด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ cellulase Onozuka RS, macerozyme R 10 และ pectolyase โดย macerozyme R 10 และ pectolyase ซึ่งเป็นเอนไซม์พวก pectolyase จะทำหน้าที่ย่อยสลาย middle lamella ที่เชื่อมระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จากนั้น cellulase Onozuka RS ซึ่งเป็นเอนไซม์พวก cellulase จะทำลายผนังเซลล์ (cell wall) ทำให้โปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยจากเซลล์ออกมาอยู่ในสารละลายเอนไซม์ (Ishii,1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง pectolyase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการสกัดโปรโตพลาสต์จากข้าวพวก indica ถ้าปราศจากเอนไซม์ชนิดนี้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้น้อยมาก

(จากผลการทดลองเบื้องต้น) แต่เมื่อเติม pectolyase ลงในสารละลายเอนไซม์เดิมที่มีเพียง cellulase และ macerozyme ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้เพิ่มขึ้นมาก ในทางตรงกันข้ามการสกัดโปรโตพลาสต์จากข้าวพวก japonica ไม่มีความจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ pectolyase ดังเช่นการทดลองของ Li and Murai (1990) สามารถสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าว japonica พันธุ์ Nipponbare และ Taipei 309 ได้ในความหนาแน่น 2.3- 3 x 10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 4% และ macerozyme R 10 1% เท่านั้น

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ใช้เป็นแหล่งในการสกัดโปรโตพลาสต์ ในการทดลองครั้งนี้พบว่า สารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 2%, macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.1% ในขณะที่การสกัดโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยควรใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R 10 1% และ pectolyase 0.2% หรืออาจกล่าวได้ว่าการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจากแคลลัส และเซลล์แขวนลอย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใบที่นำมาสกัดโปรโตพลาสต์มาจากต้นกล้าที่อายุยังน้อย โดยใบที่มีอายุน้อยจะมีผนังเซลล์เป็นแบบ primary wall (เทียมใจ, 2527) ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย cellulose, hemicellulose และ pectin ซึ่งสารละลายเอนไซม์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้ง่าย ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Bharadwaj *et al.* (1994) ที่สกัดโปรโตพลาสต์จากใบของต้นกล้าข้าวและให้ผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้ cellulase Onozuka RS 2%, pectolyase 0.1% และ hemicellulase 0.05% อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของข้าวมีความต้องการชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในการสกัดโปรโตพลาสต์จาก immature scutellum ต้องใช้ cellulase Onozuka RS 2% และ pectolyase 0.2% (Biswas *et al.*, 1994)

ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีผลต่อผลผลิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในสารละลายเอนไซม์ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อแช่ชิ้นส่วนใบแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงโปรโตพลาสต์ถูกปลดปล่อยออกมาในความหนาแน่นต่ำสุด ความหนาแน่นจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อแช่นาน 3 ชั่วโมง แต่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่เพิ่มขึ้นเป็น 5 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระยะเวลาในการสกัดโปรโตพลาสต์ 1 ชั่วโมง น้อยเกินไป เอนไซม์ยังทำงานไม่ได้เต็มที่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยเมื่อนำสารละลายโปรโตพลาสต์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่าโปรโตพลาสต์บางเซลล์ผิวยังไม่เรียบร้อย เกาะกันเป็นกลุ่ม บางเซลล์ยังเป็นรูปวงรีไม่กลมเต่ง แต่ถ้าระยะเวลานานเกินไป (5 ชั่วโมง) ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เฉลี่ยจะลดลง โดยเมื่อนำสารละลายโปรโตพลาสต์มาตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบโปรโตพลาสต์แตกเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lee *et al.* (1989) ที่กล่าวว่า ระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในสารละลายเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยถ้าระยะเวลาในการแช่นานขึ้นจะทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตลดลง

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอย พบว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยมีความมีชีวิตสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัส ทั้งนี้คงมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์ของใบและแคลลัสได้รับอันตรายในระหว่างการหั่นชิ้นส่วนของใบและแคลลัสให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำไปแช่ในสารละลายเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์แทรกซึมเข้าไปในเซลล์ได้ดีขึ้น ส่วนเซลล์แขวนลอยนั้น

เซลล์อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ไม่ได้รับความเสียหายใด ๆ เนื่องจากเซลล์อยู่ในสภาพที่เป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆอยู่แล้ว จึงไม่ต้องหั่นให้เล็กลงอีก

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ส่วนมากนิยมสกัดโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อให้ได้กลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์นั้น จะต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองแรงงานมาก นอกจากนี้ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จะลดลง เมื่อเซลล์แขวนลอยที่ใช้ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลานานขึ้น (Abdullah *et al.*, 1986; Wu and Zapata, 1992) วิธีแก้ปัญหาทางหนึ่งอาจทำได้โดยการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบและแคลลัส ซึ่งจะสะดวกและรวดเร็วกว่าการสกัดจากเซลล์แขวนลอย นอกจากนี้โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัสยังสามารถชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นได้เช่นกัน (Wu and Zapata, 1992; Gupta, 1993; Moura *et al.*, 1997) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองสกัดโปรโตพลาสต์จากทั้งใบ แคลลัสและเซลล์แขวนลอย พบว่า ใบให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด 9.14 x 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักของใบ 1 กรัม รองลงมาคือผลผลิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากแคลลัส 3.39 x 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสดของแคลลัส 1 กรัม ส่วนเซลล์แขวนลอยให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด 2.96 x 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอย 1 กรัม ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ใบและแคลลัสสามารถใช้เป็นแหล่งของเซลล์ในการสกัดโปรโตพลาสต์ได้เช่นเดียวกับเซลล์แขวนลอยในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 *Lee et al.* (1989) แนะนำว่าความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ไม่ควรต่ำกว่า 10^6 โปรโตพลาสต์/น้ำหนักสด 1 กรัม จึงจะขยายงานด้านการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไปจนถึงขั้นการชักนำให้โปรโตพลาสต์เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอยในการทดลองครั้งนี้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นได้

โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไปนาน 2-3 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อสร้างโคโลนีหรือแคลลัสในทำนองเดียวกันกับโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในการฝังในอาหารแข็งก็ไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ วิธีการเพาะเลี้ยงตลอดจนสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความมืด/สว่าง อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ดังนั้นจึงควรจะทดลองสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อีก โดยการเลือกใช้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสม เลี้ยงโดยใช้วิธีการ อื่น ๆ เช่น feeder layer, nurse culture เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ สร้างแคลลัส แล้วจึงชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น จากนั้นจึงนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. ใบจากต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 5 วัน เป็นแหล่งของเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งของเซลล์ที่เป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

2. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์เพื่อปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลล์ที่ใช้ในการสกัดโปรโตพลาสต์

3. เวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดโปรโตพลาสต์จากใบ แคลลัส และเซลล์แขวนลอย คือ 3 ชั่วโมง

4. โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอยมีชีวิตสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่สกัดได้จากใบและแคลลัส

5. โปรโตพลาสต์ที่สกัดได้ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อสร้างโคโลนีเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 และ K8P

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

เทียมใจ ตุลยาธร. 2527. โครงสร้างพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 207 หน้า.

Abdullah, R.; E.C. Cocking and J.A. Thompson. 1986. Efficient regeneration from rice protoplasts through somatic embryoge nesis. *Bio/Technology* 4: 1087-1090.

Bharadwaj, S.; K.K. Narayanan and J. Thomas. 1994. Etiolation increases the efficiency of protoplast isolation from rice seedling tissues. *Rice Biotech. Quart.* 20: 2-3.

Biswas, G.C.G.; P.K. Burkhardt; J. Wunn; A. Kloti and I. Potrykus. 1994. Fertille indica rice plants regenerated from protoplasts isolated from scutellar tissue of imma ture embryos. *Plant cell Rep.* 13: 528-532.

Chu, C.C., C.C. Wang; C.S. Sun; H. Chen; K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for an ther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659-668.

Deka, P.C. and S.K. Sen. 1976. Differentiation in calli originated from isolated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. *Mol. Gen. Genet.* 145: 239-244.

Frearson, E.M.;J.B. Power and E.C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplasts. *Dev. Bio.* 33: 130-137.

Fujimura, T.; M. Sakurai; H. Negishi and A. Hirose. 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant tissue Cult. Lett.* 2: 74-75.

Gupta, J.N. 1993. Fertile plant regenerated from mesophyll protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Biotech. Quart. 16: 2-3.*

*Gupta, J.N.; G.*S. Cheema; R. Kaur and H.S. Dhaliwal. 1995. Plant regeneration from protoplasts of scented indica rice using heterogeneous feeder system. *Curr.Sci.* 68: 541-543.

Ishii, S. 1989. Enzyme for the isolation of proto plasts. Pages. 23-33. In : Y.B.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry 8 : Plant Protoplasts and genetic Engineering I. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirement for growth of *Vicica hajas tana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Plant* 126: 105-110

Kisaka,H.;M. Kisaka and T. Kameya. 1998. Inter-

ภาพประกอบคำอธิบายเรื่อง

การสกัดและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวหอม (Oryza sativa L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Protoplast Lsolation and Culture of Aromatic Rice (Oryza sativa L.) Variety KDML 105

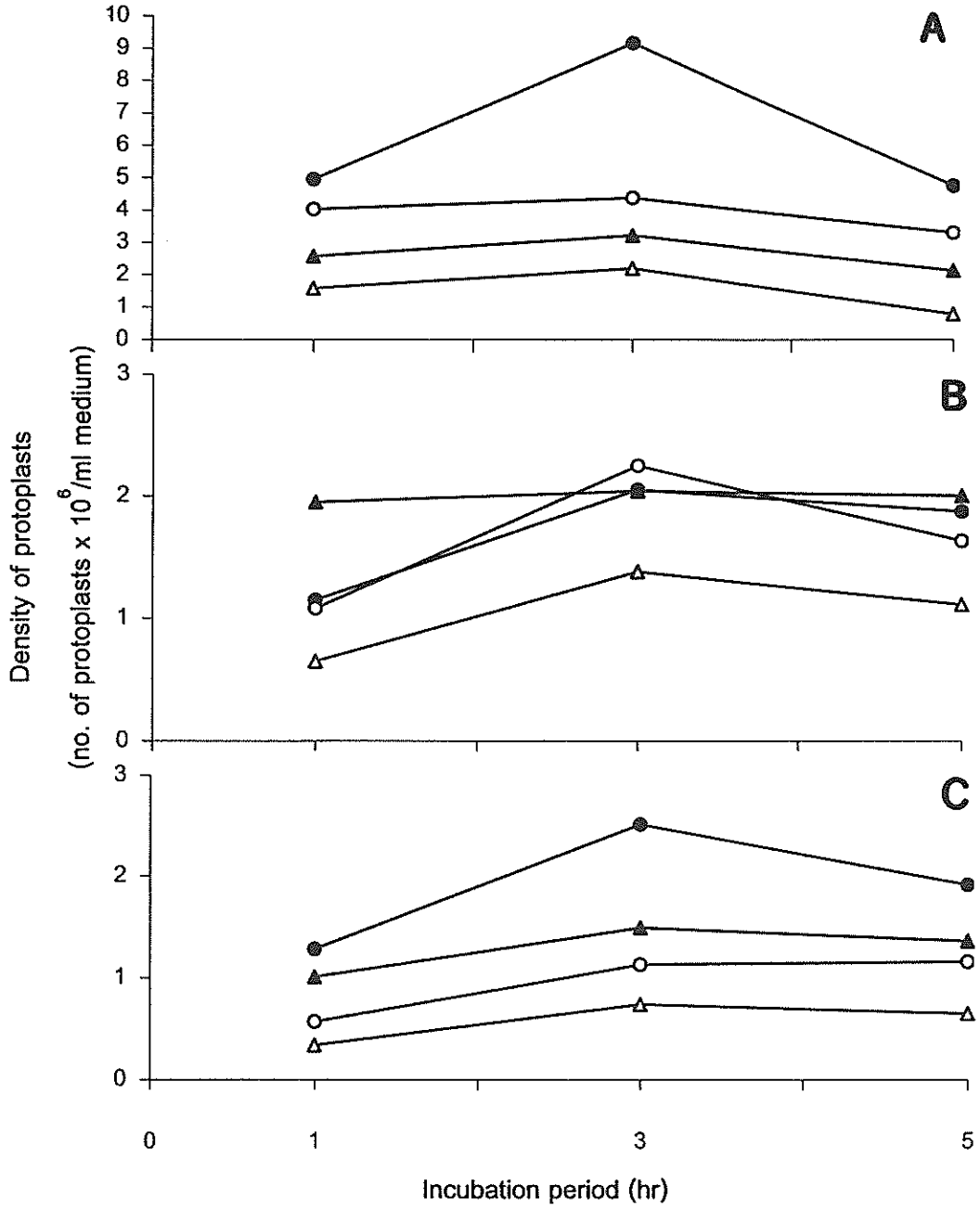


Figure 1 Density of protoplasts isolated from leaves of 5 (A), 7(B) and 9(C)-day-old seedlings after incubating for 1,3 and 5 hrs in 4 kinds of enzyme solution ;

(a) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (—●—)

(b) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (—○—)

(c) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (—▲—)

(d) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (—△—)

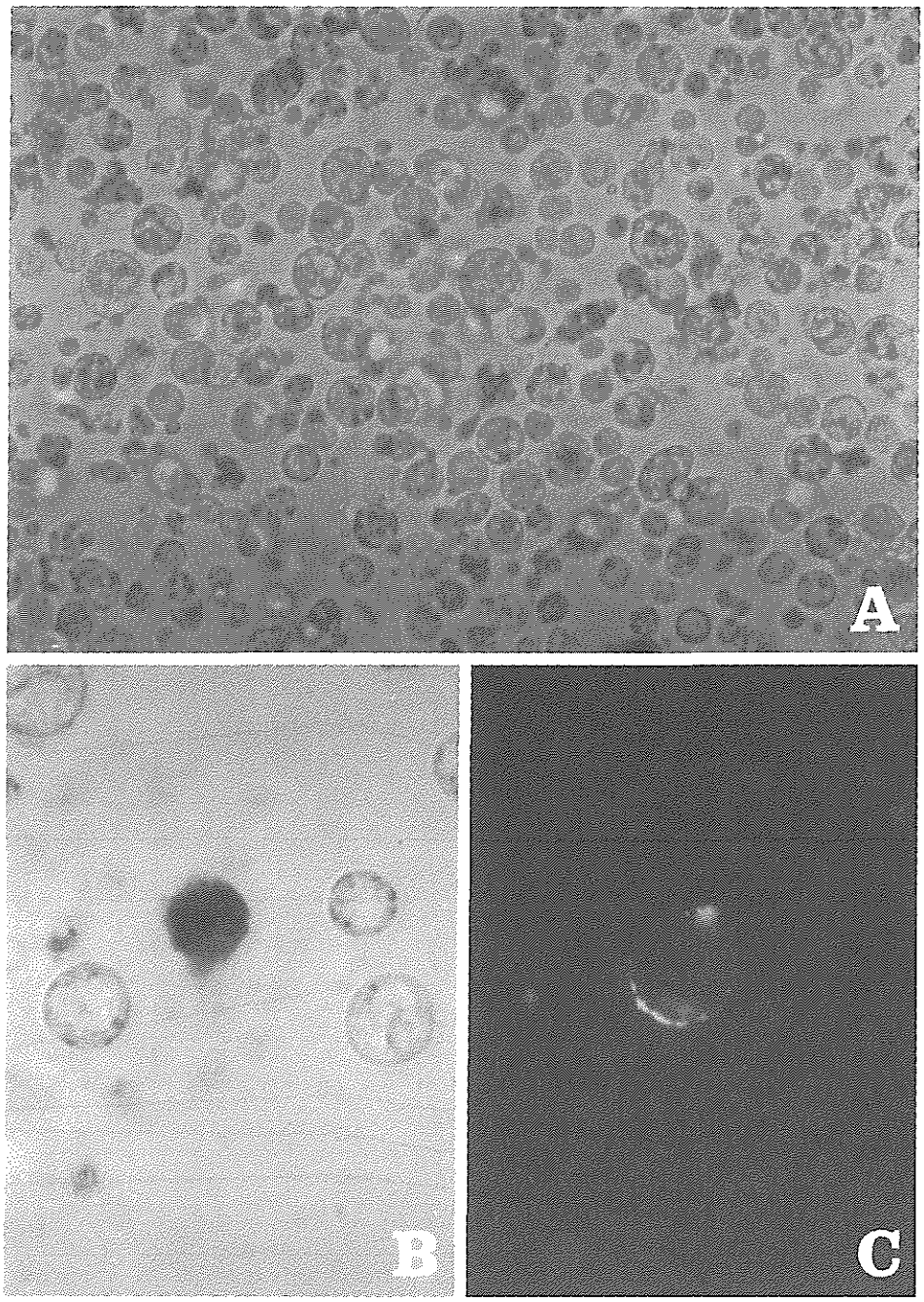


Figure 2 Protoplasts isolated from leaves of 5- day-old seedlings (A) ; Inviable protoplast was stained with Evans blue (B) ; Regenerated cell wall was fluoresced when stained with calcoflour white (C).

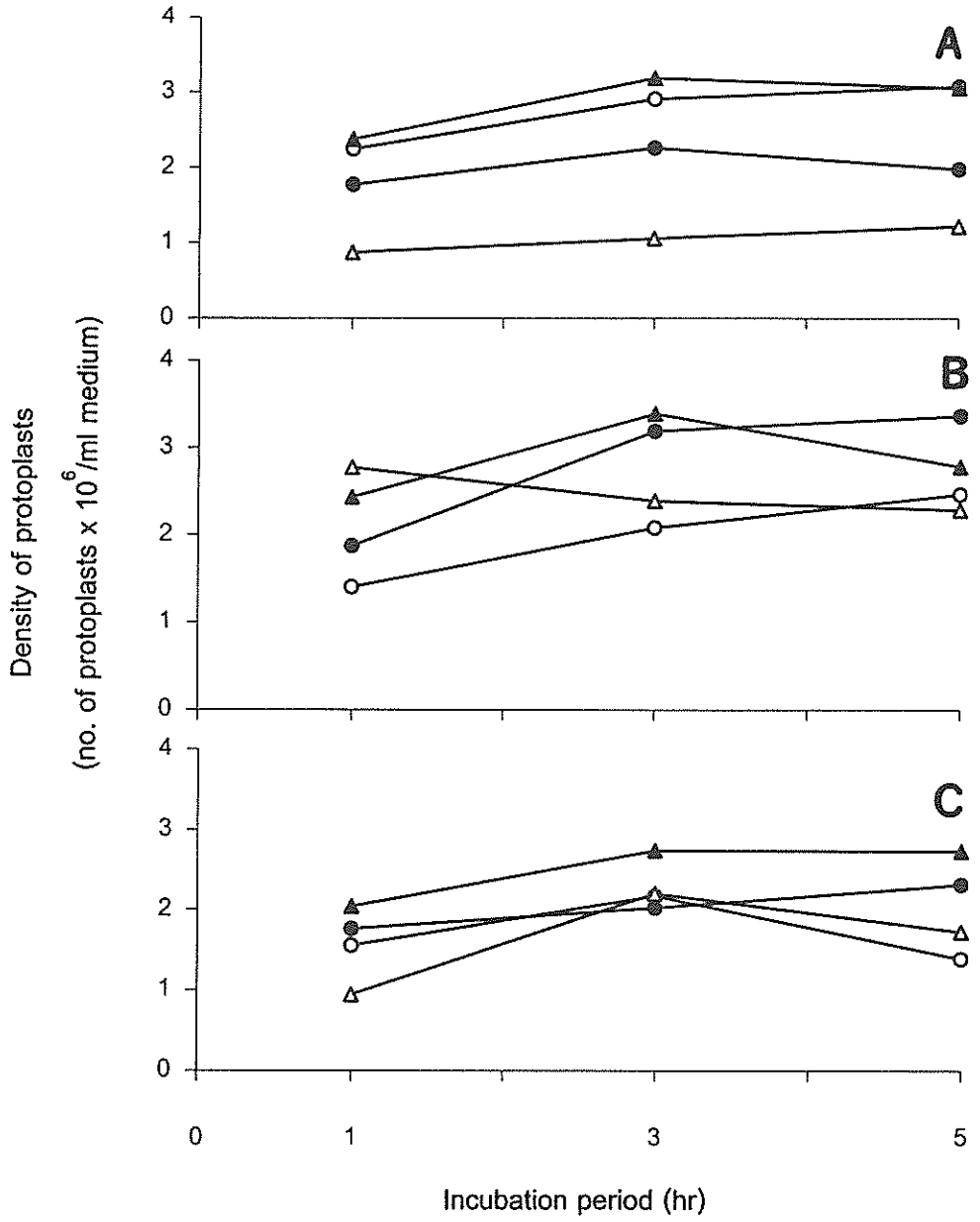


Figure 3 Density of protoplasts isolated from embryo-derived calli of 2(A), 3(B) and 4(C) weeks' culture after incubating for 1,3 and 5 hrs in 4 kinds of enzyme solution ;

(a) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (—●—)

(b) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (—○—)

(c) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (—△—)

(d) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (—▲—)

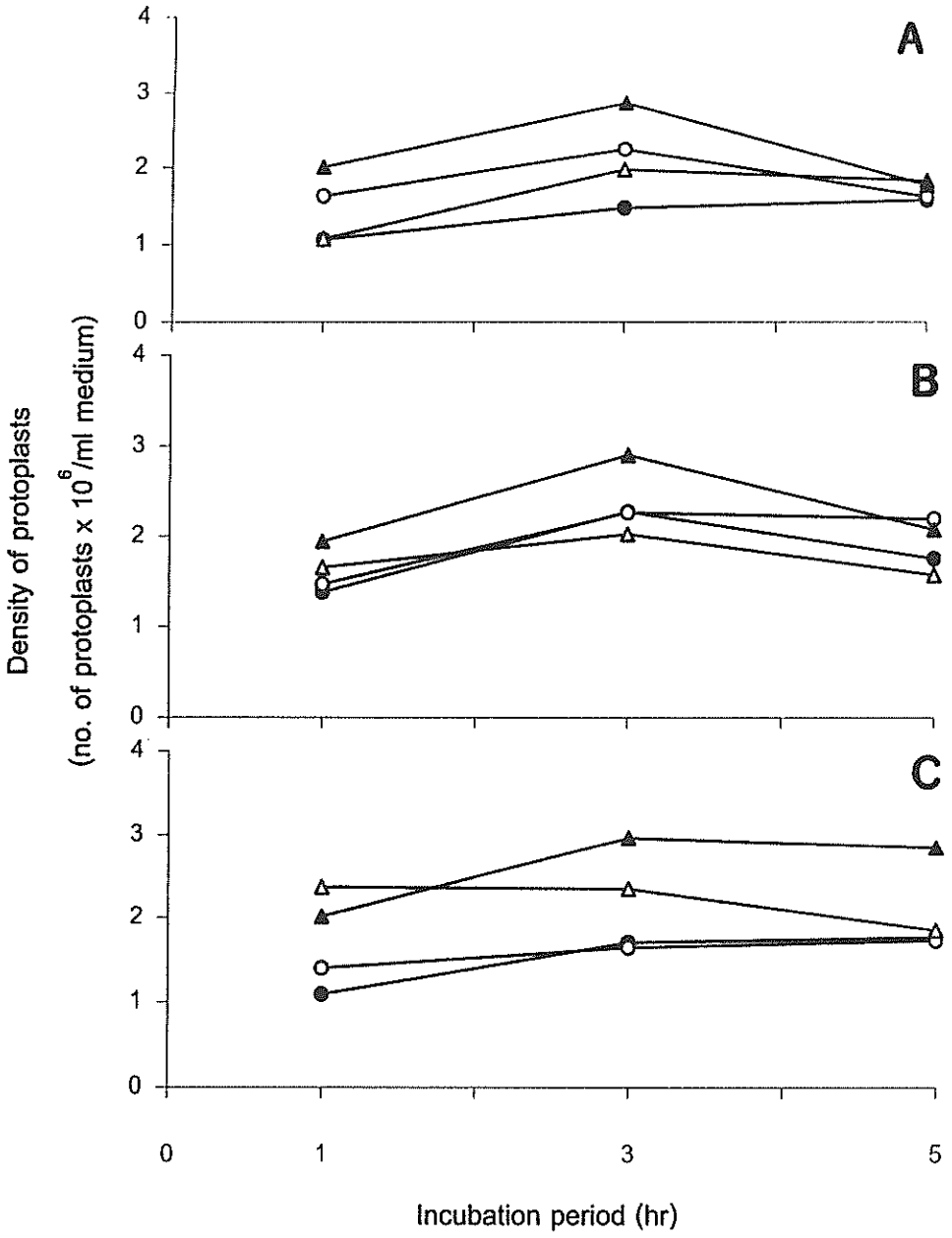


Figure 4 Density of protoplasts isolated from cell suspension of 2(A), 4(B) and 6(C) weeks' culture after incubating for 1,3 and 5 hrs in 4 kinds of enzyme solution ;

(a) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (●)

(b) cellulase Onozuka RS 2% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (○)

(c) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.1% (△)

(d) cellulase Onozuka RS 4% macerozyme R10 1% and pectolyase 0.2% (▲)

generic somatic hybrideization of rice (*Oryza sativa* L.) and braley (*Hordeum valgare* L.) by protoplast fusion. Plant *Cell Rep.* 17 : 362-367

Kyozuka, J. ; Y. Hayashi and K. Shimamoto. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* 206 :408-413.

Lee, L.; R.E. Schroll; H.D. Grimes and T.K. Hodges. 1989. Plant regeneration from indica rice *(Oryza sativa* L.) protoplasts. *Planta* 178 : 325-333.

Li, Z. and N. Murai. 1990. Efficient plant regene ration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Rep.* 9: 216-220.

Li, Z.; Q. Xie; M.C. Rush and N. Murai. 1992. Fertile transgenic rice plants generated via protoplasts from the U.S. cultivar Labelle. *Crop Sci.* 32: 810-814.

Moura, D.S.; F.J. Zapata-Arias; A. Endo and A.T. Neto. 1997. Plant regeneration from protoplasts isolated from primary calli using mature embryos of two Brazillian rice cultivars. *Euphytica* 94: 1-5.

Timothy, R. and S.R. Sree Rangasamy. 1993. Plant regeneration from indica rice protoplasts. *Curr. Sci.* 64: 257-259.

Toriyama, K.; Y. Arimoto; H. Uchimiya and K. Hinata. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/ Technology* 6: 1072-1074.

Wu, C. and F.J. Zapata. 1992. Plant regeneration from protoplasts isolated from primary callus of four japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Plant Sci.* 86:83-87.

Yamada, Y.; Z.Q. Yang and D.T. Tang. 1986. Plant regeneration from protoplasts derived callus of rice *(Oryza stiva* L.*). Plant cell Rep.* 5: 85-88.