การชักนำแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้

Callus Induction and Cell Suspension Cultures of Khao Pong Krai Rice (*Oryza sativa* L.)

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] รัญญิการ์โปราหา[1] ราริ ช้อนทอง[1] อรสา จันทิมา[1] และแสงทอง พงษ์เจริญกิต[2]

Anurug Poeaim[1], Ranyikar Poraha[1], Rari Chontong[1], Orasa Jantima[1]and Saengtong Pongjaroenkit[2]

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ขนาดใหญ่ที่สุดคือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแคลลัสย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน1กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 วัน พบว่าการศึกษาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดวันที่ 21 มีน้ำหนักสด 0.8065 และน้ำหนักแห้ง 0.0809 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์โดยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจะมีการเรืองแสงสีเขียวสำหรับเซลล์มีชีวิต และจะไม่ติดสีสำหรับเซลล์ตาย

ABSTRACT

Mature seeds of Khao Pong Krai Rice (*Oryza sativa* L.) were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 1 3 and 5 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose. Callus formation could be obtained from all of media tested and the results that the largest callus obtained was MS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-D. Callus were transferred to liquid MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1 g/l L-proline 100 mg/l casein hydrolysate and 30 g/l sucrose for 24 days.The results, fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 21 days of 0.8065 g/10 ml fresh weight and 0.0809 g/10 ml dry weight. Study viability of suspension cells were determined by the method of fluorescein diacetate. Suspension cells green fluorescence for living cells and will not show for cell death.

Key Words: Rice; suspension cell, growth curve, Callus induction

e-mail address: kpanurug@kmitl.ac.th

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่อยู่คู่กับประเทศไทยและประเทศแถบเอเชีย สำหรับประเทศไทยถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดเพราะใช้เป็นอาหารหลักในการบริโภค จึงมีความสำคัญที่ต้องปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

[1]Department of Biology. Faculty of science. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520.

[2]สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ถนนแม่โจ้-เชียงใหม่ อ.สันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[2]Department of Genetic. Faculty of science. Maejo University, Maejo-Chiangmai Road, Sansai, Chiangmai 50290

มีคุณภาพดี ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคแมลงต่างๆ และทนต่อสภาพแวดล้อม ข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ เป็นพันธุ์ข้าวไร่ ปลูกได้ดีในที่สูง มีความไวต่อช่วงแสง ทรงกอตั้ง ลำต้นค่อนข้างแข็ง ใบและกาบใบสีเขียว ในปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมากซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งในหลายๆ วิธีที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ ดังเช่น งานวิจัยของ Poeaim *et al.* (1996) รายงานว่าการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับนำเซลล์ไปเลี้ยงเป็นต้นใหม่และการแยกโพรโทพลาสต์ Ella and Zapata (1993) รายงานเกี่ยวกับการเติมแอล-โพรลีน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิกา (indica) จะช่วยในการเจริญของแคลลัส และเซลล์ที่เกิดใหม่จะหลุดออกจากแคลลัสเดิมได้ง่าย Carsono and Yoshida (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวอินโดนีเซีย 15 สายพันธุ์และสายพันธุ์ญี่ปุ่น 1 สายพันธุ์ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเกิดเป็นแคลลัสได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองและที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดรากและยอด อนุรักษ์ และ นิตย์ศรี (2544) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตรเคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้จำนวนมากเลือกแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10-15 วันประมาณ 3-4 เดือนจะได้เซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอสามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็วนำเซลล์แขวนลอยที่เติบโตเป็นไมโครแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NBR 4 สูตร ที่ประกอบด้วยแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตรเคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร โดยที่สูตรที่ 1 เติมซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 2 เติมซีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตรสูตรที่ 3 เติมซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และสูตรที่ 4 เติมซีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตรอาหารทั้ง 4 สูตรสามารถชักนำให้เกิดเป็นจุดเขียว และสามารถเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้

จากความสำคัญดังกล่าวคณะผู้ทำวิจัยได้ทำการปรับปรุงหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เพื่อศึกษากราฟการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้เพื่อจะได้มีข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเมล็ดข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ ที่มีความสมบูรณ์แกะเปลือกล้างด้วยน้ำสะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้งบนทิชชู่ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and

Skoog,1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนการเกิดแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร และลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้น และวัดค่าเฉลี่ยความกว้าง และยาวของแคลลัสแล้วนำมาคำนวนเป็นพื้นที่ของแคลลัส จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาชั่งน้ำหนักสด 0.15 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4–D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วันในช่วง 0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสดโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการอบ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 1 นาที ชั่งน้ำหนักสด นำเซลล์มาอบที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งและจดบันทึก (อนุรักษ์, 2550) และการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยโดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์เซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีเขียวเรืองแสง Rotman and Papermaster (1966)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเพาะเมล็ดข้าวบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้าวสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกระดับความเข้มข้น แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็ง เกาะกันเป็นก้อน (compact callus) และแบบเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) มีสีเหลืองอ่อน โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด เกิดเป็นรากและยอดน้อยที่สุด และมีขนาดของแคลลัสใหญ่ที่สุดเท่ากับ 257.21 ตารางมิลลิเมตร เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัสจากอาหารทั้ง 4 สูตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นจะกลายเป็นยอดและรากจำนวนมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับ Carsono and Yoshida (2006) และเกิดแคลลัสสีน้ำตาลตามที่ Abe and Futsuhara (1991) และ Ogawa *et al.* (1999) กล่าวไว้ (Figure 1) จากนั้นย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีสีเหลืองอ่อน และกระจายอยู่ภายในอาหารเหลว (Figure 2 A) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 24 วัน ในวันที่ 21 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 0.8065 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร และ 0.0809 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ (Table 2, Figure 3, Figure 4) เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์แขวนลอยด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Fluorescence microscope ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตและตายภายในอาหารโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต เพื่อให้เกิดกิจกรรม fluorochomatic ขึ้นภายในเซลล์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ความยาวคลื่นแสง 440-480 นาโนเมตร จะสังเกตเห็นสีเขียวเรืองแสงกับเซลล์ที่มีชีวิตส่วนเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วจะไม่สามารถติดสีได้ (Figure 2 B)

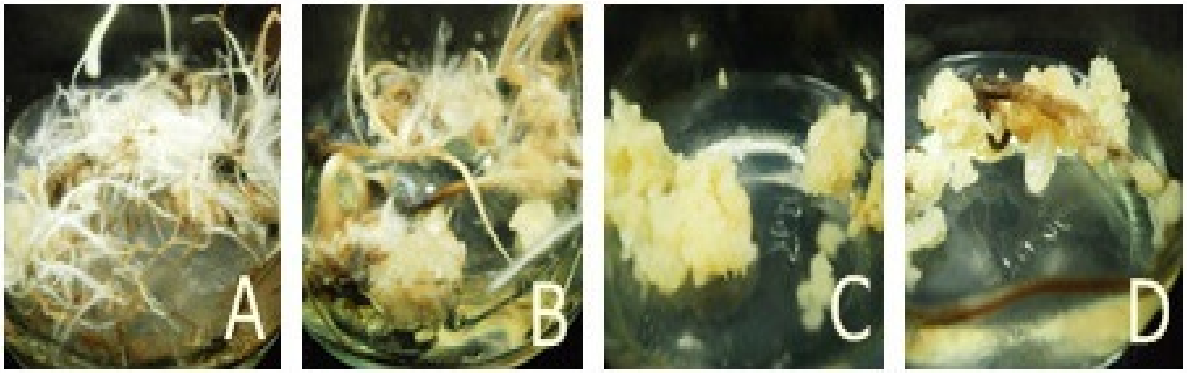

Figure1 Callus from seed of Khao Pong Krai rice were cultured on solid MS media supplemented with 30 g/l sucrose, 2.6 g/l gellan gum with (A) 0.5 mg/l 2,4-D, (B) 1mg/l 2,4-D, (C) 3 mg/l 2,4-D and (D) 5 mg/l 2,4-D

Table 1 Effect of callus formation seed of Khao Pong Krai rice which were cultured on solid MS media supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2,4-D 30 g/l sucrose and 2.6 g/l gellan gum for 6 weeks

Concentration of 2,4-D (mg/l)	Number of seed inoculation	Number of callus formation	% of callus formation	size of callus formation (mm^2.)
0.5	30	25	83.33	26.31
1	30	26	86.67	37.03
3	30	28	93.33	257.21
5	30	29	96.67	107.18

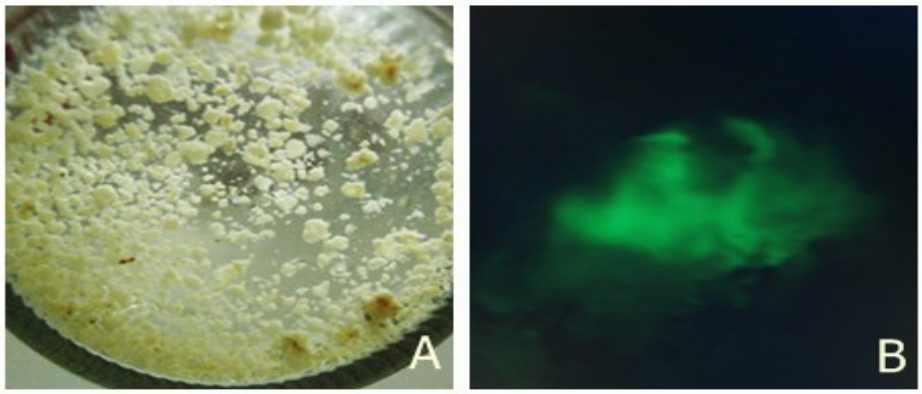

Figure 2 (A) Cell suspension of Khao Pong Krai rice were cultured on liquid MS media supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate and 30 g/l sucrose. (B) Viability of suspension cells was determined by fluorescein diacetate

Table 2 The measurement of fresh and dry weight for suspension of Khao Pong Krai rice in liquid MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate and 30 g/l sucrose for 24 days

Days	Fresh Weight (g/10ml)	Dry Weight (g/10ml)
0	0.1751	0.0192
3	0.2010	0.0332
6	0.3448	0.0385
9	0.4013	0.0403
12	0.4706	0.0546
15	0.5825	0.0565
18	0.8479	0.0640
21	0.8065	0.0809
24	0.3544	0.0693

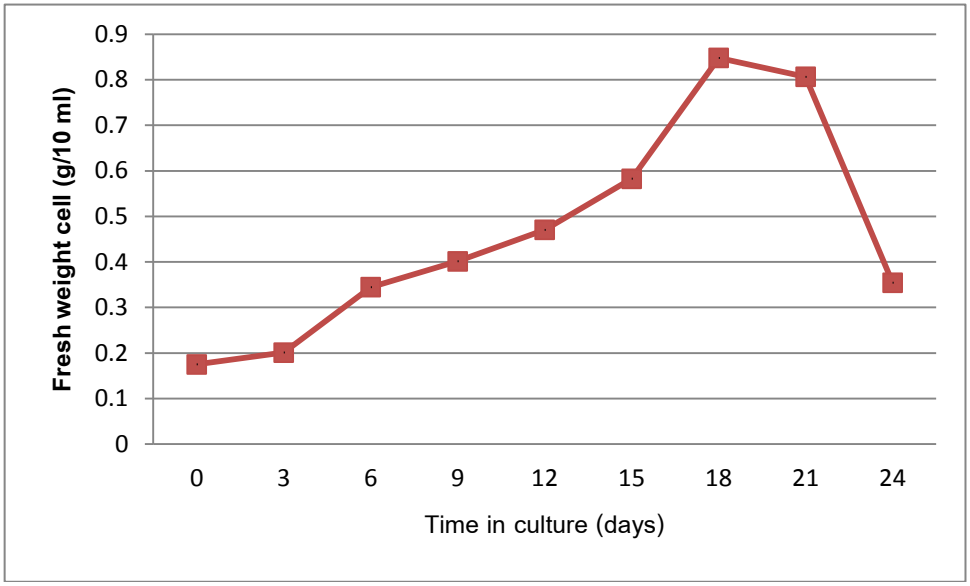

Figure 4 Growth rate of fresh weight cell for suspension of Khao Pong Krai rice in liquid MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate and 30 g/l sucrose for 24 days

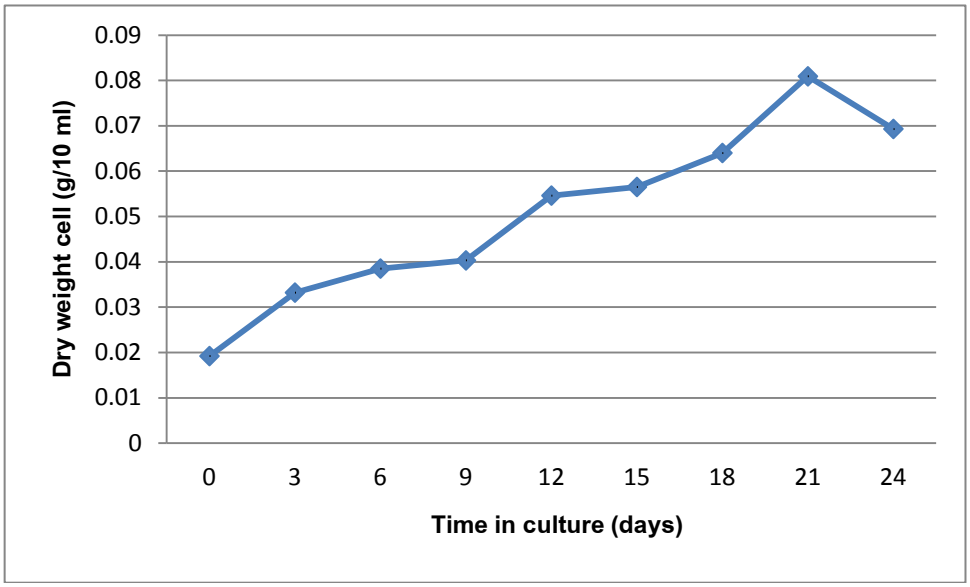

Figure 5 Growth rate of dry weight cell for suspension of Khao Pong Krai rice in liquid MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate and 30 g/l sucrose for 24 days

สรุป

จากการนำข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาแข็งสังเคราะห์รสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ สามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่อาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งได้จากการคำนวนค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัสที่ได้เท่ากับ 257.21 ตารางมิลลิเมตร คือ สูตรอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่าค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดที่คือ 0.8065 และ 0.0809 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 9-18 วัน การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยโดยการย้อมสีด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตตส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Fluorescence microscope เซลล์ที่มีชีวิตจะปรากฏสีเขียวเรืองแสง ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่มีการเรืองแสงสีเขียว จากข้อมูลที่ได้สามารถนำเซลล์แขวนลอยไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น แยกโพโทพลาสต์ การนำเซลล์แขวนลอยไปเพาะเลี้ยงเป็นต้นใหม่ และสามารถนำเซลล์แขวนลอยไปใช้ในการถ่ายยีนได้

เอกสารอ้างอิง

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2544. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60, น. 174-180. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. ครั้งที่ 39. ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

Abe, T. and Y. Futsuhara. 1991. Diallel analysis of callus growth and plant regeneration in rice seed-callus. **Jpn. J. Genet.** 66: 129-140.

Carsomo, N. and T. Yoshida. 2006. Identification of callus induction potential of 15 indonesian rice genotype. **Plant Prod. Sci.** 9(1): 65-70.

Dixon, R A. 1991. **Plant cell culture.** Practical Approach Series.

Ella, E. S and F.J. Zapata. 1993. Suspension initiation in indica rice requires proline. **IRRN.** 18(1): 17-18.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco Tissue cultures. **Plant Physiology** 15: 473-497.

Poeaim, A and N. Sangduen. 1996. Protoplast Isolation and Culture from CellSuspension Culture by using KHAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.), p. 115. *In* **Abstracts of the Third Asia – Pacific Conference on Agricultural Biotechnology** : Issues and Choices. Nation Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA). November 10-15. Prachuapkhirikhan, Thailand.

Ogawa, T., H. Fukuoka, H. Yano and Y. Ohkawa. 1999. Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures. **Plant Cell Report** 18: 576-581.

Rotman, B. and B.W. Papermaster. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by hydrolysis of fluorogenic esters. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 55: 134–141.