

เทคนิคการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูก (*Oryza sativa*) กับข้าวป่า (*O. minuta*)

Technique for Wide Cross between Cultivated Rice (*Oryza sativa*) and Wild Rice (*O. minuta*)

ชูศักดิ์ จอมพุก และ ชัยฤกษ์ มณีพงษ์¹

Choosak Jompuk and Chairerg Maneephong

ABSTRACT

Wide crosses between cultivated rice (*O. sativa*, AA, $2n = 24$) as the female and wild rice (*O. minuta*, BBCC, $2n = 48$) as the male had been made for introgression of some agronomic characters from wild rice into three cultivated rices. Gibberellin 75 ppm was sprayed onto pollinated panicles immediately after pollination to delaying dehiscent. Rate of seed sets was ranged from 14.52-25.30%. Embryo rescue of F_1 seed was made at 9-14 days after pollination. Embryos were cultured on 1/4 macronutrient strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0% sucrose and 0.6% agar at the pH of 5.8 and allowed to germinate in the dark. The rate of embryo rescue was ranged from 42.86-95.00% depending on the cultivars used. Embryos with the age of 13 days had high rate of rescue. The morphology of the F_1 hybrids from the three crosses were intermediate between the two parents but showed a preponderance of the traits of wild rice. They were robust and extremely vigorous. All of them had 36 chromosomes ($2n=36$) but completely sterile.

Key word: cultivated rice (*Oryza sativa*), wild rice (*O. minuta*), embryo rescue, interspecific hybridization

บทคัดย่อ

การถ่ายทอดลักษณะจากข้าวป่า *Oryza minuta* (BBCC; $2n=48$) ไปยังข้าวปลูก *O. sativa* (AA; $2n=24$) 3 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 นางมลิศ 4 และไออาร์

38 โดยการผสมข้ามมีข้าวปลูกเป็นต้นแม่ หลังผสมเกสรฉีดพ่นฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน 75 ppm เพื่อชะลอการร่วงของดอกและเก็บเมล็ดที่มีอายุ 9 ถึง 14 วันหลังผสมเกสรไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อกู้ชีพ (embryo rescue) บนอาหาร Murashige และ

¹ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

Skoog (MS) ที่ใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 1/4 เท่า เติมน้ำตาล 2% และ รัน 0.6% ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.8 แล้วนำไปไว้ในที่มืด จากการทดลองพบว่า กลุ่มผสมทั้งสามมีอัตราการผสมข้ามติดเมล็ดอยู่ระหว่าง 15.52 ถึง 25.30% มีอัตราการกักตัวผล 42.86 ถึง 95.00% และคัพภะที่มีอายุ 13 วัน กักตัวผล 42.86 ถึง 95.00% เมื่อปลูกผสมชั่วที่ 1 ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมพบว่ามิโครโมโซม จำนวน 36 โครโมโซม ($2n=36$) มีลักษณะทรงตันค่อนข้างยาวไปทางข้างล่างที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่และมีการเจริญเติบโตแข็งแรงดีแต่เป็นหมัน

คำนำ

ข้าวปลูก (cultivated rice) มีวิวัฒนาการมาจากข้าวป่าเป็นเวลานานกว่า 7,000 ปี มาแล้ว นอกจากจะมีวิวัฒนาการโดยธรรมชาติแล้ว ข้าวปลูกพันธุ์ดีส่วนมากได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวช่วยเพิ่มผลผลิต คุณภาพ ความต้านทานโรค แมลง ตลอดจนความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม วัตถุประสงค์ที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืชคือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานพันธุกรรมกว้าง (broad genetic base) โอกาสและความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้ตามวัตถุประสงค์ก็มีมากขึ้น (Chang, 1976) การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์ที่จะเปลี่ยนแปลงยีนเพียงหนึ่งคู่หรือมากกว่าในพืชพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งให้มีการปรับตัวดีขึ้น หรือเพื่อประโยชน์ตามที่ต้องการแหล่งของยีนส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้จากแหล่งพันธุกรรมภายในพืชปลูกชนิด (species) เดียวกัน ซึ่งทำให้ลักษณะต่าง ๆ ของพืชถูกจำกัดอยู่ในกรอบของพืชแต่ละชนิดเท่านั้น นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ใช้วิธีการถ่ายยีนจากแหล่งพันธุกรรมของพืชคนละชนิด โดยใช้พืชป่า (wild species) ที่มีความสัมพันธ์กับพืชปลูกเป็นแหล่งพันธุกรรมของลักษณะ

ที่ต้องการต่าง ๆ เช่น ความต้านทานโรค และแมลงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และให้ผลผลิตสูงเพื่อถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ให้กับพืชพันธุ์ปลูก (Moss, 1985) การผสมพันธุ์ระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่ามีอุปสรรคต่าง ๆ ที่กีดกันความสำเร็จหลายอย่างสาเหตุหนึ่งที่มีความสำคัญคือความแตกต่างกันของจำนวนโครโมโซมและชุดยีน (genome) เพื่อขจัดอุปสรรคดังกล่าวในการผสมพันธุ์ Nezu *et al.*, (1960) แนะนำให้ใช้ข้าวที่เป็นดิพลอยด์เป็นต้นแม่ และข้าวที่เป็นเตตราพลอยด์เป็นต้นพ่อ นอกจากนี้การผสมพันธุ์ระหว่างข้าวปลูกที่เป็นดิพลอยด์กับข้าวป่า *O. officinalis* (Jena and Khush, 1986) และ *O. minuta* (Sitch *et al.*, 1989) ใช้ข้าวปลูกเป็นต้นแม่ และข้าวป่าเป็นต้นพ่อ ในปัจจุบันเทคโนโลยีใหม่ ๆ เช่น การฉีดพ่น GA_3 75 ppm ลงบนยอดเกสรตัวเมียก่อนหรือหลังการผสมเกสรในการผสมข้ามพืชต่างชนิดหรือสกุลมีผลทำให้อัตราการผสมข้ามเกิดอัตราการผสมติดเมล็ดมากขึ้น (Brar and Khush, 1986) และใช้ GA_3 75 ppm ผสมกับ NAA 75 ppm (Amante-Bordeos *et al.*, 1991) ส่วนฮอร์โมนตัวอื่น ๆ เช่น indole acetic acid, naphthalene acetic acid และ kinetin ยังไม่มีการศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนเหล่านี้มีผลต่อการผสมข้ามชนิดในข้าว การกักตัว (embryo rescue) การใช้สารโคลชิซินเพิ่มจำนวนโครโมโซมช่วยแก้การเป็นหมันของลูกผสม ตลอดจนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรผสมชั่วแรกสามารถช่วยแก้ปัญหาและเอาชนะอุปสรรคต่าง ๆ ของการผสมข้ามข้ามชนิดได้ (Toenniessen, 1990)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเทคนิคการใช้ฮอร์โมนมาช่วยทำให้เกิดการผสมข้าม เพื่อให้การติดเมล็ดดีขึ้นและการกักตัวผลของลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า เพื่อเป็นแนวทางในการนำลักษณะที่ดีบางอย่างจากข้าวป่ามาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า

พันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) นางนวลเอส 4 (NMS 4) และโออาร์ 58 (IR 58) ข้าวสองพันธุ์แรกเป็นข้าวไทยพันธุ์ส่งเสริมมีความต้านทานแล้ง ทนเค็มปานกลาง และที่สำคัญที่สุดเมล็ดมีคุณภาพหุงต้มและรับประทานเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ยังขาดลักษณะการต้านทานโรคและแมลงที่สำคัญ ส่วนพันธุ์โออาร์ 58 เป็นพันธุ์ข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติมีลักษณะทางการเกษตร (agronomic character) ที่ดี ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและแมลงหลายชนิด การผสมพันธุ์ใช้ข้าวปลูกทั้ง 3 พันธุ์เป็นต้นแม่ และข้าวป่า (*O. minuta* G.S. No. 5510) ซึ่งมีลักษณะความต้านทานเพลี้ยจักจั่นสีเขียวดีมากเป็นต้นพ่อ โดยนำอับละอองเกสร (anther) ของข้าวป่าไปวางบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่ที่ผ่านการทำลายเกสรตัวผู้ (emasculation) โดยวิธีอบด้วยไอร้อน 45°C นาน 10 นาที การผสมเกสรทำในช่วงเวลาประมาณ 9.00 น. ถึง 10.00 น. หลังการผสมเกสรฉีดพ่น GA₃ 75 ppm (gibberellic acid 75 mg ละลายน้ำ 1 ลิตร เติม tween 20 0.5 cc) ลงบนยอดเกสรตัวเมียเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผสมเกสรแล้วฉีดพ่นฮอร์โมนกับการผสมแล้วไม่ฉีดพ่นฮอร์โมน

การกู้ชีพ (embryo rescue)

เก็บดอก (spikelet) ที่ผสมแล้วเกิดกัพพะของลูกผสมทั้ง 3 คู่ผสมจากต้นแม่ที่มีอายุระหว่าง 9 ถึง 14 วันหลังการผสมเกสร นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 20% นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นแยก lemma และ palea ออก แล้วตัดเฉพาะกัพพะไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog,

1962) ดัดแปลงที่ใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 25% เติมน้ำตาล 2% ใช้น้ำ 0.6 % ปรับระดับ pH เป็น 5.8 เก็บขวดเพาะเลี้ยงไว้ในที่ไม่มีแสง กระทั่งกัพพะงอกแล้วมี coleoptile ยาว 2 ถึง 3 เซนติเมตร จึงนำมาไว้ในที่มีแสง เมื่อต้นข้าวมีใบ 2 ถึง 3 ใบ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว (nutrient solution) ที่อุดมภูมิห่องและย้ายปลูกลงดินเมื่อต้นข้าวแข็งแรงดี มีใบประมาณ 4-5 ใบ

ศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการนับจำนวนโครโมโซมของลูกผสมชั่วที่ 1

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการกู้ชีพ ได้แก่ ทรงต้น ลำต้น การแตกกอ รวง เมล็ด และสีของยอดเกสรตัวเมีย เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

การนับจำนวนโครโมโซม (ดัดแปลงจากวิธีการของชัยฤกษ์, 2527) ดัดปลายรากข้าวปลูก ข้าวป่า และลูกผสมชั่วที่ 1 ยาวประมาณ 2 ถึง 3 ซม. แช่ปลายราก (pretreatment) ใน 8 hydroxyquinoline ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยสารละลายที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ 3 ส่วน กรดแอซิดิกเข้มข้น 1 ส่วน เติม ferric chloride (FeCl₃) 0.1% แช่นาน 24 ชั่วโมง แล้วย้อมโครโมโซมด้วยสี acetocarmine 1% และตรวจนับโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลและวิจารณ์

การผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า

การผสมพันธุ์ระหว่างข้าวป่า *O. minuta* กับโออาร์ 58 มีอัตราการผสมติดเมล็ดสูงสุด 18.62% ส่วนการผสมกับข้าวไทย 2 พันธุ์คือ ขาวดอกมะลิ 105 และ นางนวลเอส 4 มีอัตราการผสมติดเมล็ดอยู่ในระดับปานกลาง คือ 12.86 และ 11.00% ตามลำดับ

(Table 1) อัตราการผสมข้ามติดเมล็ดแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้เป็นกลุ่มผสม (Jena and Khush, 1986) ความแตกต่างของอัตราการผสมติดเมล็ดนั้น เกิดขึ้นเนื่องจากอัตราการงอกของท่อละอองเกสรที่ ตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย และการเจริญของท่อ ละอองเกสรไปถึงรังไข่ในแต่ละกลุ่มผสมแตกต่างกัน ทำให้โอกาสที่ผสมข้ามแล้วติดเมล็ดในแต่ละกลุ่มผสมจึง ต่างกัน (Sitch, 1990)

ในการทดลองที่มีการฉีดพ่นฮอร์โมนพบว่า GA₃ 75 ppm ช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดเมล็ดมากขึ้น โดยกลุ่มผสมไออาร์ 58 ขาวดอกมะลิ 105 และ นางมลอศ 4 มีอัตราการผสมติดเมล็ดเพิ่มขึ้นจากการไม่ฉีด GA₃ เป็น 6.68, 4.55 และ 3.52% ตามลำดับ (Table 1) อัตราการผสมติดเมล็ดที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นผลจาก GA₃ ไป กระตุ้นการเจริญของท่อละอองเกสรไปถึงรังไข่เร็วกว่าปกติก่อนที่จะเซลล์เชื้อตัวผู้ (sperm nuclei) จะสลายไป (Brar และ Khush, 1986)

การกู้ชีพ (embryo rescue)

นำคัพภะลูกผสมชั่วที่ 1 ของทั้งสามกลุ่มผสมที่มีอายุหลังจากการผสมเกสรตั้งแต่ 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS คัดแปลง พบว่าในกลุ่มผสมนางมลอศ 4 x *O. minuta* คัพภะที่มี

อายุ 9 วัน มีอัตราการกู้ชีพกะรอดค่อนข้างต่ำ อัตราการกู้ชีพกะรอดมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่ออายุคัพภะมากขึ้น (10 และ 11 วัน) อัตราการกู้ชีพกะรอดสูงสุดเมื่อคัพภะมีอายุ 12 วัน และมีอัตราลดลงจนต่ำสุดเมื่อคัพภะมีอายุ 14 วัน (Table 2) คัพภะอายุ 9 วัน มีขนาดเล็กและแข็งแรงน้อยกว่าคัพภะที่มีอายุมากขึ้น แต่เมื่อคัพภะมีอายุ 13 และ 14 วัน กลับมีอัตราการกู้ชีพกะรอดต่ำลงเนื่องจากคัพภะเริ่มสลายตัวและเหี่ยวแห้ง ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การกู้ชีพกะรอดในอัตราต่ำ ซึ่งต่างจากรายงานของ Jena and Khush (1984) ที่กล่าวว่า การกู้ชีพกะรอดของการผสมข้ามในข้าว อายุที่เหมาะสมแก่การนำมากู้ชีพกะรอดคือ 14 วันหลังการผสมเกสร ส่วนอัตราการกู้ชีพกะรอดในกลุ่มผสมขาวดอกมะลิ 105 x *O. minuta* จะมีอัตราการกู้ชีพกะรอดสูงสุด เมื่อคัพภะมีอายุ 13 วัน และ ไออาร์ 58 x *O. minuta* ผลการทดลองมีแนวโน้มคล้ายกับในกลุ่มผสมนางมลอศ 4 x *O. minuta*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำนวนโครโมโซมของลูกผสมชั่วที่ 1

ลักษณะทรงต้นโดยรวมของลูกผสมอยู่ระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ แต่ค่อนข้างยาวป้านมากกว่า (Figure 1a-1c) มีความสูงใกล้เคียงกับข้าวปลูกส่วนลักษณะอื่น ๆ คล้ายกับข้าวป่า เช่น รวง เมล็ด และ

Table 1 Rate of embryo formation on treated GA₃ 75 ppm and nontreated from crosses *O. sativa* x *O. minuta*.

Crosses	No. of spikelet pollinated		No. of embryo formation		Percentage of embryo formation		Comparision of embryo ^{1/}
	Treated		Nontreated		Treated		
	GA ₃	GA ₃	GA ₃	GA ₃	GA ₃	GA ₃	
KDML 105 x <i>O. minuta</i>	224	591	39	76	17.41	12.86	+4.55
NMS 4 x <i>O. minuta</i>	310	481	45	46	14.52	11.00	+3.52
IR58 x <i>O. minuta</i>	249	188	63	35	25.30	18.62	+6.68

^{1/} Percentage of embryo (treated GA₃ v.s. nontreated GA₃)

หนวด (awn) สีของยอดเกสรตัวเมียเป็นสีดำเหมือนข้าวป่า ยกเว้นในคู่ผสม ไออาร์ 58 x *O. minuta* ยอดเกสรตัวเมียเป็นสีขาวเหมือนข้าวปลูก ลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 3 คู่ผสมมีจำนวนโครโมโซม 36 โครโมโซม ($2n = 3x = 36$) (Figure 1e) ประกอบด้วยยีนอม ABC ซึ่งเป็นทรพลอยด์ (triploid) เนื่องจากข้าวปลูก *O. sativa* มีจำนวนโครโมโซม 24 โครโมโซม ($2n = 2x$; AA) (Figure 1d) และข้าวป่า *O. minuta* มีจำนวนโครโมโซม 48 โครโมโซม ($2n = 4x = 48$; BBCC)(Figure 1f)

(Chang, 1985) ลูกผสมชั่วที่ 1 มีความเป็นหมัน 100% (Sitch et al., 1989) จึงทำให้ผสมตัวเองไม่ติดเมล็ด

สรุป

การผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่ามีอัตราการผสมติดเมล็ดอยู่ระหว่าง 14.52 ถึง 25.30% และเมื่อฉีดพ่น GA_3 75 ppm หลังการผสมเกสรช่วยให้อัตราการผสมติดเมล็ดเพิ่มขึ้น 3.52 ถึง 6.68%

Table 2 Embryo rescue of F_1 hybrid from *O. sativa* x *O. minuta*.

Crosses	Age of embryo (days)	No. of pollinated	No. of embryo cultured	No. of embryo germinated	Percentage of germination
KDML 105 x <i>O. minuta</i>	9	157	21	16	76.19
	10	152	21	16	76.19
	11	140	22	12	54.54
	12	133	18	14	77.77
	13	115	16	13	81.25
	14	118	19	14	73.68
		815	118	85	72.03
NMS 4 x <i>O. minuta</i>	9	107	13	9	69.23
	10	129	16	12	75.00
	11	99	14	12	85.71
	12	143	16	14	87.50
	13	145	17	14	82.35
	14	115	15	8	55.33
		738	19	69	75.82
IR 58 x <i>O. minuta</i>	9	105	25	22	88.00
	10	40	14	6	42.86
	11	70	15	14	93.33
	12	95	20	19	95.00
	13	87	16	15	93.75
	14	40	8	6	75.00
		437	91	82	90.12
Total			300	236	78.66

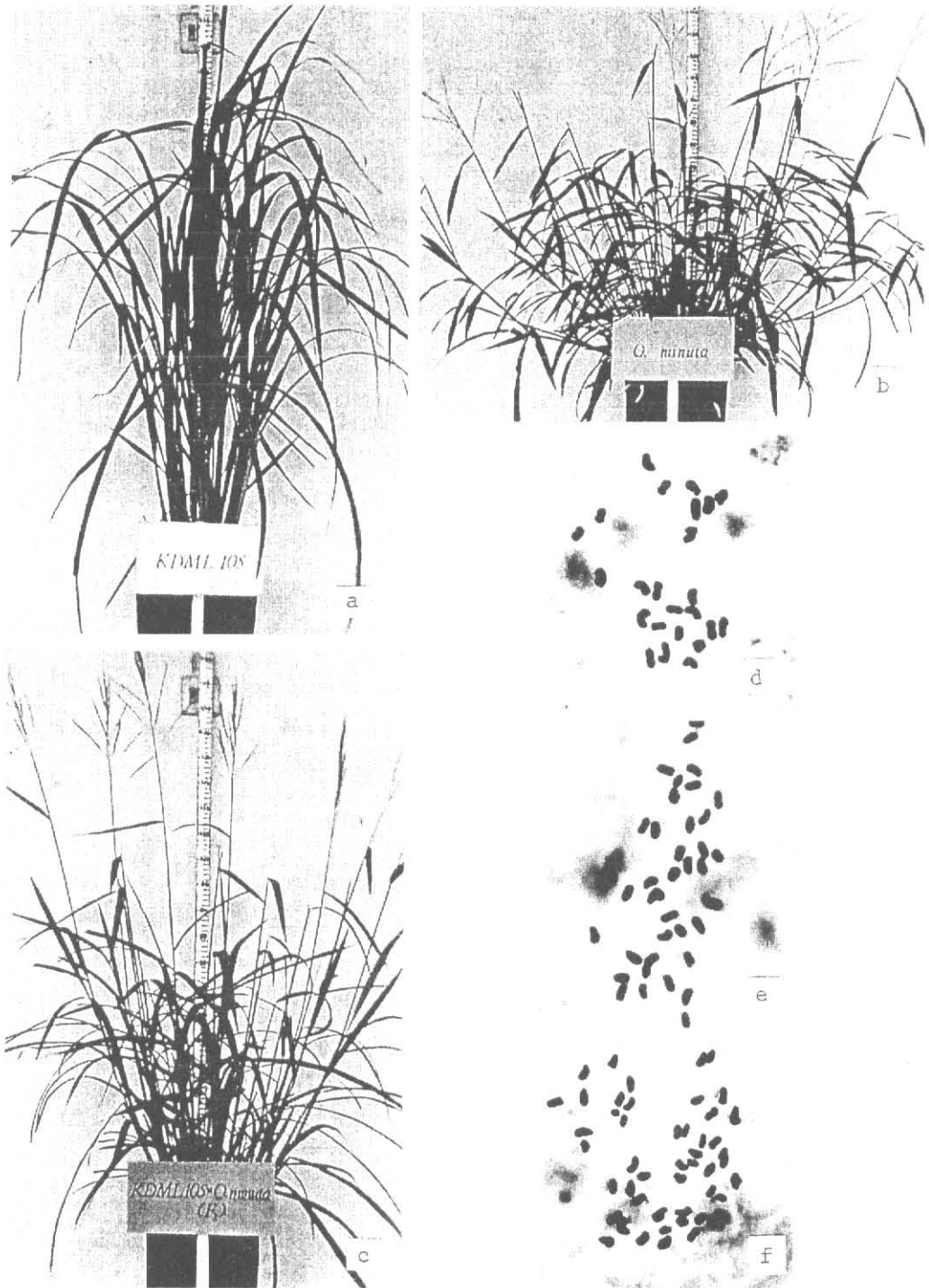


Figure 1 Morphology and chromosome of rice. a=*O. sativa*, b=*O. minuta*, c= F_1 hybrid, d=chromosome of *O. sativa*, e = chromosome of F_1 hybrid, f = chromosome of *O. minuta* (x5000).

การกู้ชีพ อายุของกัพพะที่เหมาะสมคือกัพพะที่มีอายุระหว่าง 11 ถึง 13 วันหลังการผสมเกสร โดยมีอัตราการกู้ชีพรอดเฉลี่ยประมาณ 78.66% ลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่มีลักษณะคล้ายข้าวป่ามากกว่าข้าวปลูก เมื่อนับจำนวนโครโมโซม พบว่ามี 36 โครโมโซม และเป็นหมัน 100%

เอกสารอ้างอิง

- ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2527. เซลพันธุศาสตร์. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ .213 น.
- Amante-Bordeos, A.D., R.J. Nelson, N.P. Oliva, R.D. Falmacio, H.L. Leung, and L.A. Sitch. 1991. Transfer of blast and bacterial blight resistance from *O. minuta* to *O. sativa*, pp. 234-246. *In* Rice Genetics II IRRI, Manila.
- Brar, B.S. and G.S. Khush. 1986. Wide hybridization and chromosome manipulation in cereals, pp. 221-263. *In* D. A. Evans., W.R. Sharp and P.V. Ammirato (eds.). Handbook of Plant Cell Culture Volume 4. Macmillan Publishing Company, New York.
- Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rice. *Euphytica* 22:425-441.
- Chang, T.T. 1985. Crop history and genetic conservation : Rice-A Case Study. *Iowa State J. of Research* 59:425-455.
- Chu, Y.I., H. Morishima, and H.I. Oka. 1969. Reproductive barriers distributed in cultivated rice species and their wild relatives, Japan. *J. Genet.* 44:207-233.
- Jena, K.K. and G.S. Khush. 1984. Embryo rescue of interspecific hybrid and its scope in rice improvement. *Int. Rice Genet. Newsl.* 1 : 133-134.
- Jena, K.K. and G.S. Khush. 1986. Production of monosomic alien additional lines of *O. sativa* having a single chromosome of *O. officinalis*, pp. 199-208. *In* Rice Genetics. IRRI, Manila.
- Moss, J.P. 1985. Wide species in crop improvement, pp. 199-208. *In* Biotechnology in International Agricultural Research. IRRI, Manila.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nezu, M., T.C. Katayama, and H. Kihara. 1960. Genetic study of the *Oryza*. 1. Crossability and chromosomal affinity among 17 species. *Seiken Zihō* 11:1-11.
- Sitch, L.A. 1990. Incompatibility barriers operating in crosses of *Oryza sativa* with related species and genera, pp. 77-93. *In* J.P. Gustafson (ed.). Gene Manipulation in Crop improvement. Plenum Press, New York.
- Sitch, L.A., A.D. Amante, R.D. Falmacio, and H. Leung. 1989. *O. minuta*, a source of blast and bacterial blight resistance of rice improvement, pp. 315-322. *In* Review of Advances in Biotechnology 1985-1988. IRRI, Manila.
- Toenniessen, G.H. 1990. Rice biotechnology: progress and prospects. Paper prepared for the SCI conference on pest management in rice, 4-7 June 1990. London. 25 p.