

Kultur Antera untuk Percepatan Perakitan Varietas Padi di Indonesia

Iswari S. Dewi^{1*} dan Bambang S. Purwoko²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: iswari.dewi01@gmail.com

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diajukan: 10 Januari 2012; Diterima: 23 Mei 2012

ABSTRACT

Anther Culture to Accelerate Rice Breeding in Indonesia. Iswari S. Dewi and Bambang S. Purwoko. Rice is a staple food crop in Indonesia, while the need is increasing due to high rice consumption as well as population increase. The problems can be solved through increase of national rice production. Productivity of lowland and upland should be increased intensively and other potential dry area outside Java and Bali Islands should be considered for extending the area of production. Recently, high yielding variety such as semi dwarf variety, hybrid rice, and new plant type of rice were being developed by Indonesian breeders. However, new method is needed to complement conventional breeding method in order to accelerate rice breeding. Anther culture is one of *in vitro* culture techniques that can be used to accelerate the obtainment of pure lines through doubled-haploids (DHs) regenerated at first generation of culture for less than one year. Thus, application of anther culture in conventional breeding will increase the efficiency of selection process as well as reducing the cost for labour, land and breeder's time. The obtainment of green plantlets derived from anther culture of *indica* rice subspecies has been improved by the addition of 1 mM putrescine into induction and regeneration media. Recently, several upland rice lines tolerant to abiotic stresses (i.e. low light intensity and aluminum toxicity) and biotic stresses (i.e. leaf and neck blast), several lowland rice/paddy lines tolerant to biotic stresses (i.e. bacterial leaf blight and blast), and several hybrid parental lines (i.e. male sterile, maintainer and restorer) were obtained in 2-3 years from several rice breeding program involving anther culture. However, potential use anther culture to provide unique genetic material for mapping populations for use in functional genomics and molecular breeding has not been explored. The results indicated that anther culture is a feasible technology that can be used for accelerating rice breeding program in Indonesia.

Keywords: Rice, anther culture, dihaploid.

ABSTRAK

Kultur Antera untuk Percepatan Perakitan Varietas Padi di Indonesia. Iswari S. Dewi dan Bambang S. Purwoko. Padi adalah komoditi pangan terpenting di Indonesia,

sedangkan kebutuhan beras terus meningkat seiring dengan penambahan jumlah penduduk dan adanya perubahan pola konsumsi penduduk dari non beras ke beras. Hal tersebut harus diatasi dengan jalan meningkatkan produksi padi secara nasional melalui peningkatan produktivitas lahan sawah yang ada serta pengembangan lahan potensial lainnya termasuk lahan kering yang umumnya terdapat di luar pulau Jawa dan Bali. Saat ini varietas unggul baru yang bersifat *semi dwarf* (VUB), padi hibrida dan padi tipe baru (PTB) sedang dikembangkan pemulia padi di Indonesia. Untuk dapat mempercepat perakitan varietas padi harus diterapkan suatu kombinasi metode pemuliaan konvensional dengan metode bioteknologi. Kultur antera merupakan salah satu teknik kultur *in vitro* yang dapat mempercepat perolehan galur murni melalui tanaman dihaploid (DH) yang dihasilkan langsung pada generasi pertama dalam waktu kurang dari setahun. Diterapkannya teknik ini pada program pemuliaan konvensional akan meningkatkan efisiensi proses seleksi selain dapat lebih hemat dalam biaya untuk tenaga kerja, sewa lahan, dan waktu pemulia dibandingkan dengan program pemuliaan konvensional biasa. Regenerasi tanaman hijau melalui kultur antera padi subspecies *indica* telah ditingkatkan melalui penambahan 1 mM putrescine ke media induksi dan regenerasi. Di Indonesia, saat ini dari berbagai penelitian perbaikan tanaman padi melalui kultur antera dalam waktu 2-3 tahun telah berhasil diperoleh galur-galur padi gogo toleran cekaman naungan, keracunan aluminium, tahan blas daun dan blas leher malai, galur-galur padi sawah tahan hawar daun bakteri dan blas, serta galur-galur mandul jantan beserta pelestarnya serta *restorer* untuk mendukung perakitan padi hibrida. Namun, potensi kultur antera dalam menyediakan material genetik untuk pemetaan yang dapat digunakan dalam *functional genomics* dan pemuliaan secara molekuler belum dieksplorasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa teknologi kultur antera merupakan teknologi yang layak untuk digunakan dalam percepatan program pemuliaan padi di Indonesia.

Kata kunci: Padi, kultur antera, dihaploid.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan komoditi pangan terpenting di Indonesia. Peranan padi sangat penting secara sosial, ekonomi, dan politik. Padi merupakan basis utama dalam menunjang ketahanan pangan nasional. Sampai saat ini produksi padi

nasional masih didominasi sumbangan dari lahan sawah beririgasi (94,82%), sedangkan sumbangan dari padi lahan kering (padi gogo) sangat rendah (5,18%). Belum stabilnya laju pertumbuhan produksi padi disebabkan oleh masih bergantungnya sumber pertumbuhan produksi yang berasal dari peningkatan produktivitas, sementara luas panen padi hanya sedikit mengalami peningkatan.

Indonesia masih memiliki potensi lahan yang cukup luas untuk pengembangan tanaman padi, yaitu sekitar 13,26 juta hektar lahan sawah serta 55,60 juta hektar lahan kering. Lahan sawah telah digunakan sekitar 10,80 juta hektar, sedangkan lahan kering baru sekitar 1,10 juta hektar yang dimanfaatkan untuk padi gogo (Deptan, 2009). Pada tahun 2005 kebutuhan beras sudah mencapai 52,8 juta ton gabah kering giling. Dengan asumsi terjadinya peningkatan penduduk sebesar 1,35%/tahun ditambah dengan adanya perubahan pola konsumsi penduduk dari non beras ke beras maka diperkirakan kebutuhan beras akan terus meningkat sekitar 70 juta ton gabah kering giling (GKG) pada tahun 2015 (Badan Litbang Pertanian, 2005). Oleh karena itu, produksi padi sawah perlu terus ditingkatkan dan potensi padi lahan kering harus terus dikembangkan dengan jalan merakit varietas-varietas baru yang dapat memberikan keunggulan daya hasil yang komparatif terhadap varietas unggul baru *semi-dwarf* (VUB) yang telah ada.

Keberhasilan meningkatkan produksi padi dengan VUB telah mendorong pemulia mengaplikasikan lebih lanjut dua konsep baru peningkatan potensi hasil, yaitu (1) konsep tanaman padi tipe baru (PTB) yang merupakan kombinasi perubahan bentuk arsitektur tanaman dan properti karakter fisiologi berdasarkan keefisienan dalam penangkapan cahaya untuk fotosintesis (Virk *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2008) dan (2) konsep eksploitasi fenomena vigor hibrida atau heterosis pada F_1 (Virmani dan Kumar, 2004; Cheng *et al.*, 2007).

Masalah utama dengan sistem pemuliaan konvensional untuk menghasilkan suatu varietas padi unggul dengan sifat-sifat yang diinginkan adalah lamanya waktu yang diperlukan dalam melakukan seleksi sampai diperoleh galur murni yang dapat digunakan sebagai material genetik bagi perakitan varietas padi unggul baru. Diperlukan 8-10 generasi hanya untuk penggalan dan seleksi dari populasi yang heterogen atau selama 4-5 tahun sebelum memperoleh galur murni yang diinginkan, sehingga untuk melepas suatu varietas dapat mencapai 7-10 tahun (Fehr, 1987). Melalui pemanfaatan sistem haploid, proses seleksi untuk memperoleh galur murni homozigot penuh (*dihaploid*/

DH) dipercepat hanya satu sampai dua generasi saja, sehingga seleksi fenotipik untuk sifat kuantitatif dipercepat dan dapat mempercepat perolehan varietas untuk pelepasan. Sistem haploid yang ditunjang teknik kultur jaringan, yaitu kultur antera, sudah lama digunakan dalam berbagai program pemuliaan sereal seperti padi (Datta, 2005).

Dalam tulisan ini dibahas sistem haploid (*haploid androgenic*) dalam program pemuliaan padi, perbaikan media kultur antera untuk regenerasi tanaman hijau pada padi asal subspecies *indica*, status terkini aplikasi kultur antera, serta potensi pemanfaatan kultur antera dalam *functional genomics* dan *molecular breeding*.

SISTEM HAPLOID DALAM PROGRAM PEMULIAAN PADI

Haploid dapat diperoleh secara alami, misalnya melalui proses partenogenesis dan eliminasi kromosom, serta diinduksi *in vitro* melalui proses androgenesis (*haploid androgenic*) dan proses ginogenesis (*haploid gynogenic*). Sistem haploid sudah diaplikasikan pada lebih dari 60 genera tetapi yang paling berhasil ialah pada tanaman sereal dan sayuran. Induksi haploid androgenik melalui kultur antera merupakan metode yang paling sederhana dan mudah dilaksanakan dibandingkan dengan kultur mikrospora (Datta, 2005). Penelitian mengenai produksi berbagai tanaman haploid androgenik lainnya pada legum, tanaman hias, dan buah masih terus berkembang di berbagai negara (Dewi dan Purwoko, 2011).

Produksi tanaman (*double-dihaploids*/DH) melalui kultur antera secara *in vitro* merupakan salah satu teknologi yang sangat menjanjikan dalam usaha perbaikan dan peningkatan hasil bagi berbagai jenis tanaman. Pemuliaan pada tanaman menyerbuk sendiri, seperti padi, ditujukan untuk mendapatkan galur-galur murni dengan daya hasil dan sifat-sifat yang unggul. Galur-galur murni dapat diperoleh secara cepat melalui kultur antera karena tanaman dapat diinduksi dari tepung sari muda (polen/mikrospora) yang terdapat di dalam antera. Mitosis baik asimetrik maupun simetrik bertanggung jawab dalam mengganggu polaritas yang diperlukan, sehingga mengubah perkembangan gametofitik normal dari mikrospora (tahap uninukleat-awal binukleat) atau polen muda ke arah perkembangan sporofitik atau pembentukan tanaman. Pada sereal, tampaknya polaritas dari pembelahan mitotik pertama sangat penting. Mikrospora embriogenik tampak membesar dan selanjutnya bentukan seperti bintang (*star-like organization*) terlihat di dalam sitoplasma mikrospora. Hal ini merupakan tanda dimulainya *reprogram-*

ming dari lintasan gametofitik menjadi sporofitik yang merupakan prinsip dasar androgenesis, sehingga mikrospora tidak akan menjadi sel gamet jantan melainkan akan membentuk sel-sel somatik. Secara bertahap mikrospora embriogenik yang mengalami pembelahan berulang akan membentuk kalus embriogenik atau embrioid dan selanjutnya tahap diferensiasinya menjadi embrio globuler dan fase-fase selanjutnya berlangsung normal sampai terbentuk planlet (da Silva *et al.*, 2000).

Dalam kultur antera dan kultur mikrospora, yaitu berturut-turut ketika antera yang berisi mikrospora dan mikrospora langsung dikulturkan *in vitro*, maka hanya mikrospora yang diinduksi untuk membelah dan menghasilkan agregat-agregat kecil yang akan menjadi kalus atau embrio. Polen atau mikrospora adalah haploid, yaitu hanya mempunyai $\frac{1}{2}$ set kromosom dari kromosom somatiknya sehingga tanaman yang dihasilkan dari mikrospora selama antera dikulturkan *in vitro*, baik melalui embriogenesis langsung atau melalui pembentukan kalus juga akan haploid. Pada kultur antera padi tanaman generasi pertama (DH₀) dapat diperoleh secara spontan selama kultur atau diinduksi dari tanaman haploid yang dihasilkan baik melalui pemangkasan (*ratooning*) atau pemberian 0,1-0,3% kolkisin. Tanaman DH tersebut adalah galur murni yang bersifat homozigot penuh dan sangat berharga bagi pemulia karena lebih tinggi homozigotitasnya dibandingkan dengan galur murni F₈ hasil seleksi populasi persilangan konvensional (Dewi dan Purwoko, 2001). Tanaman DH₀ dapat diperoleh sekitar 14 bulan, yaitu 5 bulan untuk mendapatkan tanaman F₁ donor antera, 2,5 bulan untuk mendapatkan eksplan malai muda berisi antera dengan mikrospora uninukleat, 2,5 bulan untuk mendapatkan tanaman hijau siap tanam di rumah kaca, dan sekitar 4 bulan untuk mendapatkan benih dari DH₀ (Sasmita *et al.*, 2006a).

Pada pemuliaan padi yang dibantu dengan teknik kultur antera seleksi dapat segera dilakukan pada generasi kedua (DH₁) dan ketiga (DH₂). Seleksi sangat difasilitasi pada tanaman dihaploid hasil kultur antera, karena sudah bersifat homozigot. Hal ini menguntungkan karena dibandingkan harus terus menerus menseleksi genotipe heterozigos di setiap generasi pada hasil persilangan konvensional, maka menseleksi galur-galur homozigot hasil kultur antera tentu akan lebih efisien, sehingga proses pemuliaan dapat diperpendek 2-3 tahun. Hal ini akibat seleksi untuk alel dominan difasilitasi pada dihaploid, sedangkan alel resesif yang berkorespon dengannya tidak didapati pada dihaploid jika lokus tersebut sudah ditempati oleh alel dominan. Sasmita *et al.* (2006b) memerlukan tambahan 10 bulan lagi, sejak diperolehnya DH₀, untuk menseleksi

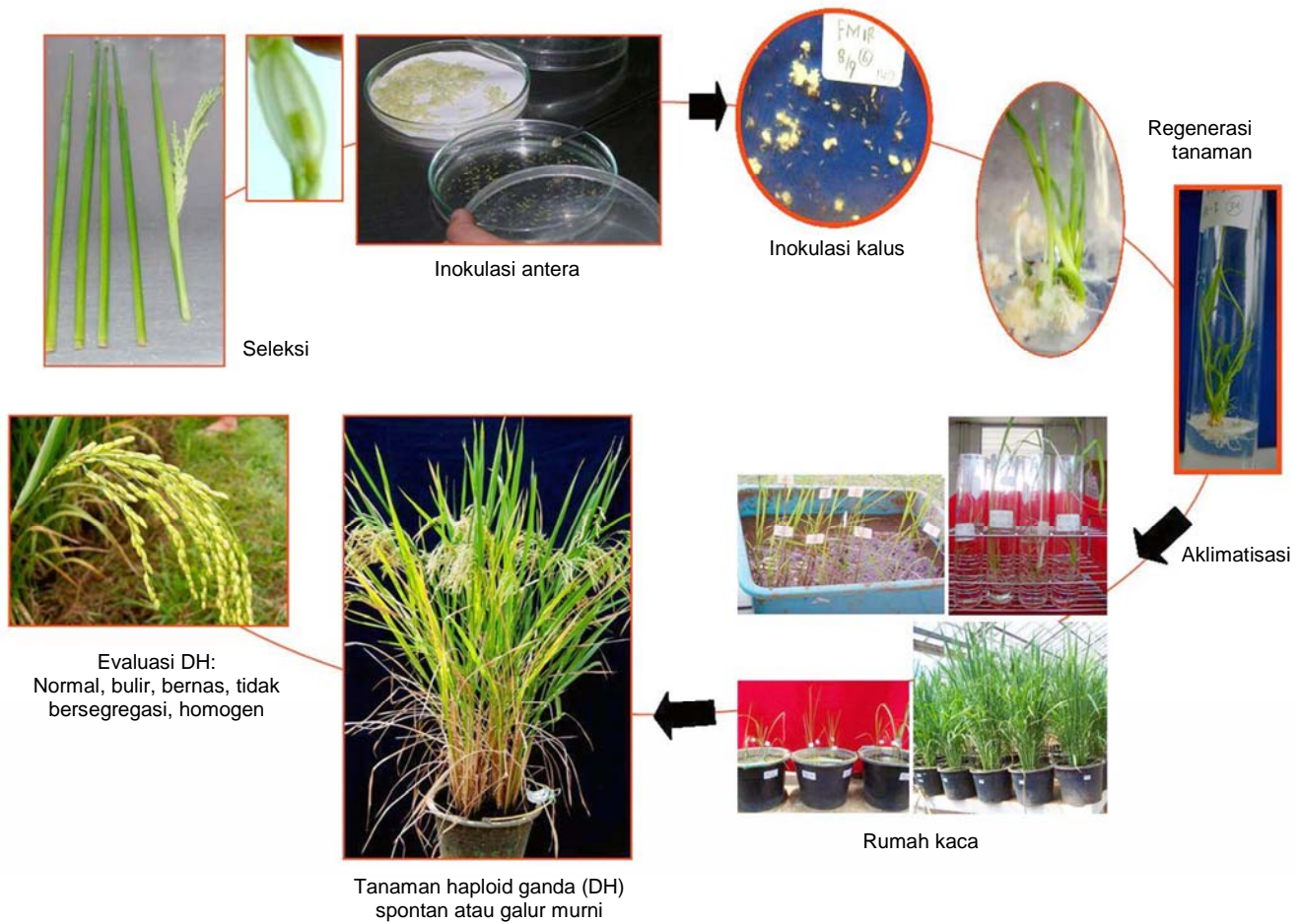
sehingga memperoleh galur padi DH dengan karakter yang diinginkan, yaitu toleran naungan. Kultur antera menghemat biaya, waktu, dan tenaga kerja.

Aplikasi teknik kultur antera dalam pemuliaan padi dimulai dengan pemilihan tetua, persilangan tetua, penanaman tanaman donor sumber eksplan, dan kultur antera tanaman donor *in vitro*, aklimatisasi regenerasi, karakterisasi tanaman DH, perbanyak benih tanaman DH, seleksi karakter yang diinginkan. Pada kultur antera digunakan antera yang berisi mikrospora uninukleat yang diperoleh dari malai muda sebagai bahan kultur. Malai muda yang berasal dari tanaman donor, yaitu tanaman F₁ atau F₂ terseleksi, diinkubasi selama 8 hari di ruang bersuhu 8±2°C sebelum antera dikulturkan di media induksi kalus. Kalus embriogenik yang terbentuk dari mikrospora akan menghasilkan planlet di media regenerasi yang selanjutnya dievaluasi di rumah kaca untuk mendapatkan tanaman DH spontan (*spontaneous dihaploid*) atau galur murni generasi pertama (DH₀). Teknik pewarnaan kromosom dapat digunakan untuk membedakan tanaman haploid dengan dihaploid. Prosedur kultur antera dari Dewi *et al.* (2004) disajikan pada Gambar 1.

Dengan menggunakan kultur antera, hasil rekombinasi dari persilangan difiksasi sebagai galur-galur homozigos penuh (dihaploid). Galur-galur harapan akan diperoleh berdasarkan keunggulan sifat-sifat agronomiknya setelah melalui serangkaian proses seleksi. Karakteristik agronomis utama seperti hasil dan kualitas biji dan sifat lain seperti toleransi terhadap cekaman biotik atau abiotik dapat segera dievaluasi pada generasi DH₁ dan DH₂. Sugimoto dan Arai (2002) dan Sasmita *et al.* (2006b) menunjukkan bahwa karakter tanaman dihaploid tetap stabil dari generasi ke generasi. Tanaman dihaploid yang tidak terseleksi sebagai galur harapan tetapi mempunyai sifat-sifat unggul yang bermanfaat tetap dapat digunakan sebagai tetua antara (intermediat) untuk disilangkan lebih lanjut dalam perakitan varietas baru lainnya (Purwoko *et al.*, 2010a).

PERBAIKAN MEDIA UNTUK REGENERASI TANAMAN HIJAU PADA KULTUR ANTERA PADI SUBSPESIES *INDICA*

Kultur antera sudah lama digunakan untuk perakitan padi subspecies *japonica* dan beberapa varietas sudah dilepas di Cina dan Korea (Dewi dan Purwoko, 2001). Hambatan utama dalam penggunaan teknik ini untuk pemuliaan padi di Indonesia adalah karena tetua yang digunakan dalam pemuliaan padi didominasi oleh padi subspecies *indica*. Subspecies *indica* dikenal rekalsitran atau sangat sukar diregenerasikan menjadi



Gambar 1. Tahapan kultur antera untuk pemuliaan padi. Dari kiri ke kanan: Seleksi antera mengandung mikrospora uninukleat, induksi kalus, regenerasi tanaman, aklimatisasi di air dan tanah lumpur di rumah kaca, penanaman dan evaluasi tanaman hasil kultur, seleksi tanaman dihaploid.

tanaman hijau melalui kultur *in vitro* dibandingkan dengan subspecies *japonica*. Padi subspecies *indica* juga memberikan tanggap androgenesis yang rendah dibandingkan padi subspecies *japonica* ketika anteranya dikulturkan (Bishnoi *et al.*, 2000).

Saat antera dikulturkan, butir tepung sari muda/polen muda/mikrospora diinisiasi ke arah terjadinya androgenesis. Polen *in vivo* secara alami banyak mengandung prekursor etilen, yaitu ACC, sehingga pada kultur antera terjadinya kematian yang tinggi pada antera saat awal inkubasi diduga akibat terakumulasi etilen di dalam wadah kultur (Tiainen, 1996). Akumulasi etilen dalam kultur *in vitro* diduga menjadi salah satu faktor penyebab terjadinya rekalsitran. Etilen mempengaruhi tanggap morfogenetik, baik dalam hal mendorong ataupun menghambat morfogenesis *in vitro* (Kumar *et al.*, 1997). Etilen dikenal sebagai penginduksi penuaan. Antera padi subspecies *indica* cepat mengalami *senescen*. Degenerasi yang terlalu cepat

pada jaringan antera, termasuk tapetum, dan mikrospora selama kultur *in vitro* berhubungan dengan penghambatan proses embriogenesis, yaitu dihambatnya perkembangan mikrospora sehingga gagal berproliferasi. Hal ini disebabkan mikrospora yang sedang berproliferasi masih berhubungan dengan dinding antera melalui alat seperti suspensor untuk memperoleh nutrisi dari tapetum (Chen, 1983). Hal ini menyebabkan pada padi subspecies *indica* pembentukan kalus rendah dan kalus yang terbentuk pun kurang embriogenik sehingga banyak meregenerasikan tanaman albino. Tanaman albino selalu mendominasi bahkan dapat mencapai 100% dalam regenerasi tanaman padi subspecies *indica*. Tanaman albino adalah tanaman yang mengalami defisiensi kandungan klorofil, sehingga tanaman ini tidak dapat berfotosintesis. Dengan dihasilkannya tanaman albino, maka efisiensi dari penggunaan kultur antera dalam program pemuliaan yang menggunakan padi subspecies *indica* menjadi

berkurang. Oleh karena itu di Indonesia penelitian untuk mengurangi terbentuknya tanaman albino menjadi prioritas dalam pengembangan teknik kultur antera untuk pemuliaan padi berbasis subspecies *indica* (Dewi dan Purwoko, 2001).

Melalui serangkaian penelitian telah diperoleh formulasi media kultur antera padi subspecies *indica*, sehingga masalah tanaman albino yang merupakan hambatan utama dalam aplikasi kultur antera serta masalah subspecies padi *indica* yang sulit meregenerasikan tanaman hijau sudah dapat diatasi. Purwoko (2001) dan Purwoko *et al.* (2001a dan 2001 b) menunjukkan bahwa pemberian poliamina, dalam bentuk putresina, spermidina atau spermina dapat meningkatkan regenerasi tanaman hijau lebih dari tiga kali lipat pada kultur antera padi subspecies *japonica*. Selanjutnya Dewi *et al.* (2006) melalui pemberian 1 mM putresina di media induksi dan regenerasi di samping perlakuan inkubasi malai di suhu 5°C selama 8-10 hari dapat meningkatkan perolehan tanaman hijau pada padi subspecies *indica*.

Poliamina adalah zat pengatur tumbuh yang terdapat pada semua organisme hidup. Dalam lintasan biosintesis poliamina (PA), *S-adenosylmethionine* (SAM) merupakan prekursor dalam pembentukan putresina menjadi spermidina dan spermina. Namun SAM juga merupakan prekursor dalam biosintesis etilena, melalui pembentukan senyawa *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid* (ACC). Dalam hal ini SAM menjadi senyawa kunci, sehingga peningkatan dalam biosintesis PA akan menyebabkan menurunnya laju biosintesis etilena (Bais dan Ravishankar, 2002). Dewi dan Purwoko (2008) menemukan bahwa penuaan antera yang cepat ketika dikulturkan *in vitro* adalah akibat lebih tingginya laju produksi etilena antera padi subspecies *indica* dibandingkan dengan padi subspecies *japonica*. Etilena adalah penginduksi proses penuaan (*senescence inducer*), sehingga produksi etilena yang tinggi akan berkontribusi terhadap penurunan proporsi antera yang hidup. Oleh sebab itu dalam kultur antera padi subspecies *indica*, putresina menjadi faktor esensial sebagai *senescence inhibitors* karena menghambat proses penuaan antera yang dikulturkan. Antera harus dipertahankan tetap hidup sampai terjadi inisiasi pembentukan kalus embriogenik yang penting dalam proses regenerasi tanaman (*androgenesis*). Di media induksi kalus putresina dapat memelihara viabilitas dan memperpanjang hidup dinding sel antera, sehingga tapetum tetap dapat memberikan nutrisi pada mikrospora yang sedang aktif membelah. Di media regenerasi putresina mendorong peningkatan regenerasi tanaman hijau dari ka-

lus embriogenik (Dewi *et al.*, 2007; Dewi dan Purwoko, 2008).

STATUS APLIKASI KULTUR ANTERA DALAM PEMULIAAN PADI DI INDONESIA

Setelah teknik kultur antera terbukti dapat digunakan untuk padi subspecies *indica* (Dewi *et al.*, 2006), maka teknik ini segera diinkorporasikan ke dalam program pemuliaan padi VUB (Purwoko *et al.*, 2007; Hanarida *et al.*, 2010), PTB (Abdullah *et al.*, 2008; Herawati *et al.* 2008; 2009; Safitri *et al.*, 2010) dan padi hibrida (Munarso *et al.*, 2008; Rumanti *et al.*, 2009, Dewi *et al.*, 2011). Saat ini teknik kultur antera dan formulasi media untuk padi subspecies *indica* telah dimasukkan dalam program pemuliaan padi di berbagai institusi, seperti BB Padi, IPB, dan PT BISI.

Padi Varietas Unggul Baru (VUB)

Generasi awal padi varietas unggul baru VUB atau padi tipe *semi dwarf* adalah padi dengan potensi hasil tinggi (4-5 t/ha) dengan penampilan fisik tanaman yang pendek (≤ 100 cm), beranak banyak dan sangat respon terutama terhadap pemupukan nitrogen tinggi. Di Indonesia saat ini VUB dirakit dengan tujuan selain berpotensi hasil tinggi (>5 t/ha) dan tahan terhadap organisme pengganggu tanaman (OPT) padi juga harus berumur gejal dan mempunyai kualitas beras serta bentuk biji yang memenuhi selera konsumen.

Dari persilangan tetua dengan sifat unggul seperti ketahanan terhadap WBC, HDB, dan rasa nasi baik telah diperoleh galur-galur harapan VUB berumur gejal dan berpotensi hasil tinggi melalui kultur antera F_1 persilangan Cigeulis/IRBB66, IRBB66/Cigeulis, BP1356-16KN-6/Celebes, BP9454/Cigeulis, Inpari-1/Kinamaze, Fatmawati/Waisekoku, Fatmawati/Kinamaze, dan Fatmawati/IR71146 (Purwoko *et al.*, 2007; Hanarida *et al.*, 2010). Evaluasi mutu beras 17 galur dihaploid hasil kultur antera F_1 menghasilkan galur-galur dengan beras berukuran panjang dan berbentuk sedang, pengapuran rendah, nilai amilosa $>25\%$, dan bersuhu gelatinisasi sedang, sehingga galur-galur tersebut dapat digunakan lebih lanjut untuk bahan pemuliaan dalam upaya pembentukan varietas baru bermutu beras baik (Lestari, 2009).

Untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit blas yang saat ini sudah mulai menyerang padi sawah telah dilakukan kultur antera dari persilangan antara IR64 dengan *O. rufipogon* (Acc. IRGC 105491). Dari hasil evaluasi sampai generasi ketiga (DH_3) telah dihasilkan galur Bio1, Bio2, dan Bio8 yang mempunyai penampilan agronomi baik dan lebih tahan blas dibandingkan tetuanya, varietas IR64 (Utami *et al.*, 2010).

Padi Tipe Baru

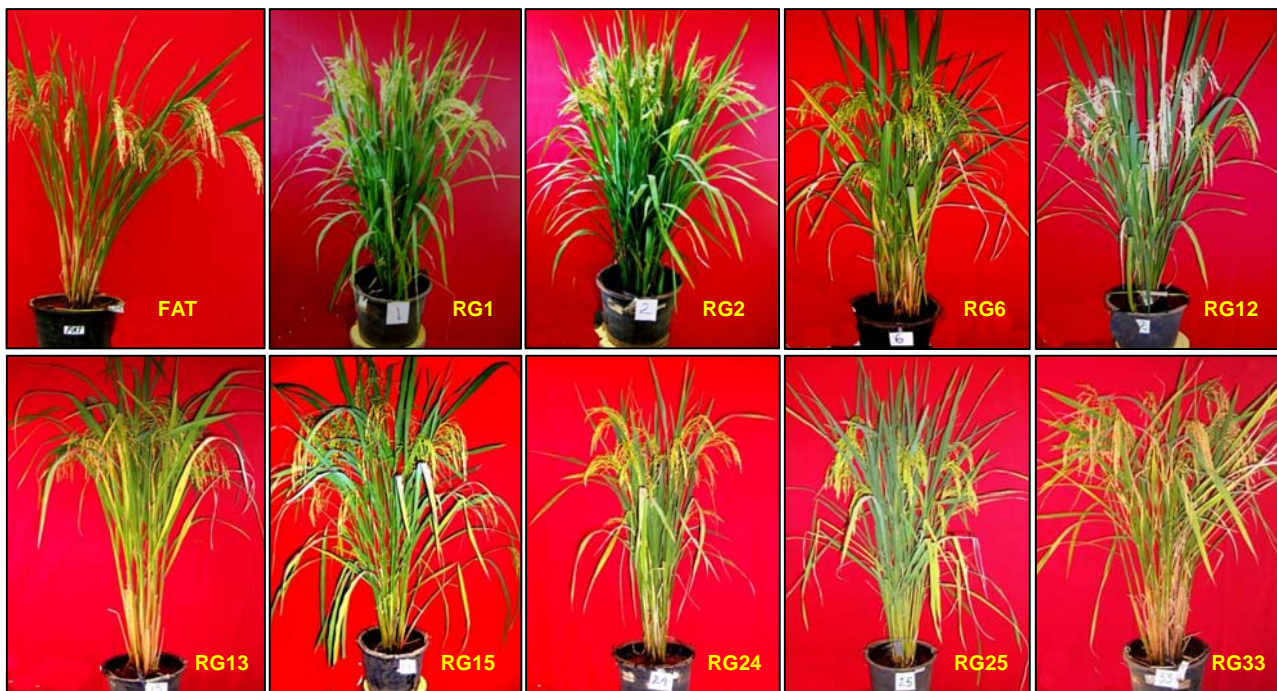
Peningkatan produktivitas tanaman padi dapat dilakukan melalui peningkatan indeks panen (IP) dan produksi bahan kering (biomasa) tanaman (Khush, 1995). IP padi VUB sekarang rata-rata adalah 0,5 sehingga untuk mendapatkan hasil 10 t/ha gabah kering giling (GKG), maka VUB harus ditanam pada lahan yang dapat menghasilkan biomassa 20 t/ha. Saat ini *new plant type of rice* (NPT) atau idiotipe tanaman padi sawah tipe baru yang dirumuskan oleh IRRI menghasilkan biomassa total 22 t/ha (kadar air 14%) dengan IP 0,6, sehingga hasilnya lebih tinggi 30% (Peng *et al.*, 2008).

Saat ini padi tipe baru (PTB) untuk padi sawah yang dikembangkan di Indonesia adalah yang mempunyai jumlah anakan sedang tetapi produktif semua (12-18 batang), jumlah gabah/malai 150-250 butir, persentase gabah bernas 85-95%, bobot 1.000 butir 25-26 g, batang kokoh dan pendek (80-90 cm), umur genjah (110-120 hari). Dengan sifat-sifat tersebut potensi hasil PTB dapat mencapai 9-13 t/ha (Abdullah, 2008). Di Indonesia sampai saat ini sejak dimulainya program padi tipe baru tahun 1995 baru dilepas satu varietas padi tipe baru untuk lahan sawah pada tahun 2003 yaitu, Fatmawati. Namun dengan menggunakan kultur antera yang dikombinasikan dengan seleksi silang berulang dalam pemuliaan padi PTB, pemulia di BB Padi berhasil memperoleh galur-galur DH dengan

karakter tahan HDB hanya dalam waktu 3 tahun (Abdullah *et al.*, 2005; 2008; Abdullah, 2008). Demikian juga di BB Biogen melalui kombinasi induksi mutasi sinar gamma dan kultur antera berhasil mendapatkan galur mutan dihaploid turunan Fatmawati yang berdaya hasil lebih tinggi dan lebih tahan blas dibandingkan induknya, varietas Fatmawati (Lestari *et al.*, 2010).

PTB gogo dikembangkan dengan memodifikasi PTB sawah, yaitu dengan menyesuaikan pada syarat pertumbuhan padi gogo di lahan kering, yaitu kanopi harus cepat menutup agar dapat mengurangi penguapan air tanah dan pertumbuhan gulma. Oleh karena itu, PTB padi gogo yang dikembangkan adalah yang mempunyai jumlah anakan produktif 6-9, malai lebat (>150 gabah isi/malai), umur genjah (120-130 hari), tinggi tanaman <140 cm, kanopi daun lebih lebar, dan indeks panen >0,3 (Herawati *et al.*, 2009).

Hanya dalam waktu 3 tahun (2007-2009) melalui teknik kultur antera telah diperoleh galur-galur harapan padi gogo dengan kriteria yang telah ditetapkan serta memiliki sifat toleran keracunan Al dan tahan blas yang dapat dikembangkan di lahan-lahan Podsolik Merah Kuning di luar Pulau Jawa (Herawati *et al.*, 2009; 2010; Safitri *et al.*, 2011). Beberapa galur padi gogo toleran keracunan Al disajikan pada Gambar 2. Pada tahun 2010-2011 galur-galur harapan padi gogo yang telah diuji daya hasilnya sedang diuji multilokasi agar dapat dilepas sebagai varietas (Purwoko *et al.*,



Gambar 2. Penampilan galur-galur gogo PTB dihaploid toleran keracunan Al dan tahan blas. FAT= Fatmawati sebagai sumber karakter PTB.

2010b). Galur-galur yang potensial untuk dilepas disajikan pada Gambar 3.

Padi Hibrida

Peningkatan potensi hasil tanaman selain dapat dilakukan dengan memodifikasi tipe tanaman (Peng *et al.*, 2008) juga dapat dilakukan dengan memanfaatkan fenomena heterosis (Virmani dan Kumar, 2004). Heterosis atau vigor hibrida adalah keunggulan dari hibrida F_1 terhadap salah satu atau kedua tetuanya dalam hal ketegaran pertumbuhan, vitalitas tanaman, kapasitas reproduktif, ketahanan terhadap cekaman, adaptasi tanaman, produktivitas tanaman, dan sifat-sifat lainnya (Yuan *et al.*, 2003).

Padi hibrida sistem tiga galur yang dianut di Indonesia merupakan generasi F_1 dari persilangan antara galur mandul jantan sebagai tetua betina dengan galur pemulih kesuburan yang mempunyai gen *fertility-restoring* (gen *Rf*) dominan sebagai tetua jantan, sehingga varietas padi hibrida selalu bersifat heterozigot namun berpenampilan homogen (seragam) sama seperti varietas padi inbrida. Tingkat heterosis dari varietas padi hibrida sangat ditentukan oleh karakter dan latar belakang genetik kedua tetuanya (You *et al.*, 2006).

Dalam perakitan tetua padi hibrida secara konvensional untuk perakitan galur mandul jantan (GMJ/galur A) dilakukan silangbalik agar sifat mandul jantan dapat ditransfer pada galur-galur elit yang merupakan galur pelestari (galur B) yang efektif dan sudah beradaptasi dengan lingkungan target, sedangkan untuk

perbaiki galur pemulih kesuburan (galur R) dianjurkan menyeleksi hasil persilangan $R \times R'$ (di mana R dan R' mengandung gen *Rf* berbeda) atau persilangan $A \times R$ (Virmani *et al.*, 1997) dengan seleksi berulang (*recurrent* atau *pedigree*). Proses seleksi yang lama tersebut tentu dapat diperpendek dengan menyediakan galur murni B dan R secara cepat dengan kultur antera.

Dari hasil penelitian 2007-2009 melalui silangbalik ke galur pelestari telah dihasilkan 125 galur-galur mandul jantan 100% steril dengan latar belakang sitoplasmik *wild abortive* (WA), Gambiaca (GAM), dan Kalinga (KAL) lengkap beserta galur pelestarinya (Rumanti *et al.*, 2009; Purwoko *et al.*, 2010c). Galur pelestari yang digunakan sebagai *recurrent parent* dalam proses silang balik tersebut merupakan galur DH yang bersifat pelestari dan tahan HDB (Dewi *et al.*, 2011). Galur mandul jantan yang 100% steril dan pelestari pasangannya yang tahan HDB disajikan pada Gambar 4.

Melalui kultur antera $F_1 R \times R$ telah diperoleh 20 galur-galur dihaploid pemulih kesuburan berumur genjah dengan kisaran umur panen 94-103 hari setelah semai (Dewi *et al.*, 2009). Saat ini lebih dari 10 kombinasi hibrida yang telah melalui uji lini x tester sedang duji ketahanannya terhadap cekaman kekeringan dan diobservasi daya hasilnya lebih lanjut untuk mendapatkan padi hibrida berheterosis tinggi dan juga sesuai untuk ditanam di lahan sawah tadah hujan di mana kekeringan merupakan kendala utama (Purwoko *et al.*, 2010c).



Galur padi gogo WI-44. 104 HSS, tahan blas, toleran naungan. Potensi hasil 6 t/ha



Galur padi gogo IW-67. 107 HSS, tahan blas, toleran naungan. Potensi hasil 6,9 t/ha



Galur FM1R-1-3-1, padi gogo tipe baru (PGTB) turunan varietas gogo lokal Fulan Telo Mihat dari P. Buru x Fatmawati. 104 HSS, tahan blas. Potensi hasil 7,6 t/ha

Gambar 3. Galur-galur harapan yang potensial untuk dilepas.



Gambar 4. Galur mandul jantan dan pelestariannya. Galur mandul jantan 100% steril tahan HDB dan eksersi stigma baik (atas) dan galur pelestari tahan HDB dengan karakter bunga dan eksersi malai baik (bawah).

POTENSI KULTUR ANTERA UNTUK Mendukung FUNCTIONAL GENOMICS DAN MOLECULAR BREEDING

Penemuan gen-gen yang penting dan penetapan fungsi dari setiap gen merupakan tantangan dalam penggunaan sekuen genom padi untuk kepentingan pemuliaan. Galur-galur DH berguna dalam analisis genetik, khususnya untuk sifat-sifat yang kuantitatif. Studi lokus-lokus sifat kuantitatif (QTL) selama ini difasilitasi dengan mengembangkan marka molekuler pada populasi bersegregasi (F_2) atau populasi hasil silang balik. Namun, studi tersebut ternyata sulit diulang untuk memperoleh nilai fenotipik yang akurat agar dapat digunakan dalam pembuatan peta (*fine mapping*) QTL. Penggunaan galur-galur inbred rekombinan (RILs) sebenarnya lebih menguntungkan untuk studi QTL, namun waktu yang diperlukan untuk pengembangan populasi RIL amat lama. Saat ini dalam hubungannya dengan *functional genomics*, banyak studi yang menggunakan populasi DH untuk membuat map genetik dan mencari lokasi QTL, karena galur-galur DH adalah homozigot sehingga ketika diperbanyak tidak lagi bersegregasi. Hal ini menyebabkan ekspresi fenotip yang berkaitan dengan heterosigositas dapat dihindarkan. Kekhawatiran mengenai distorsi dalam segregasi tidak perlu, karena persentase marka RFLP yang menunjukkan distorsi segregasi pada populasi hasil

kultur antera ternyata serupa dengan yang biasa terjadi pada populasi F_2 (Datta, 2005).

Transformasi padi merupakan alat yang penting untuk mempelajari *reverse genetics*. Selain mendukung percepatan proses perakitan varietas dalam pemuliaan konvensional, kultur antera juga dapat digunakan dalam percepatan perakitan varietas padi transgenik. Di Indonesia, teknik ini belum digunakan untuk mendukung program transgenesis, padahal sel dan jaringan haploid merupakan resipien ideal untuk menerima gen asing dalam pembuatan tanaman transgenik, karena setelah penggandaan kromosom akan segera dihasilkan individu homozigot atau galur murni yang mengandung gen tersebut. Kombinasi DH dan nilai tambah dari transgenesis atau penggunaan *marker assisted selection* (MAS) dapat digunakan untuk memperoleh varietas baru. Di Jepang, Swiss, Hungaria, Denmark, dan Amerika, sistem haploid androgenik melalui kultur antera sudah digunakan pada tanaman padi, jagung, dan gandum untuk memperoleh galur homozigot atau galur murni tanaman transgenik dengan cepat (Otani *et al.*, 2005; Aulinger, 2002; Mihály *et al.*, 2002).

PENUTUP

Teknologi kultur antera merupakan teknologi yang layak (*feasible*) untuk digunakan dalam percepatan program pemuliaan padi di Indonesia. Kultur antera padi telah dikembangkan sehingga dengan protokol Dewi *et al.* (2004) lebih mudah mendapatkan tanaman hijau dari kultur antera F₁ padi subspecies *indica x indica* yang biasanya sulit dilakukan melalui penambahan ZPT poliamina, yaitu 10⁻³ M putresina di media induksi kalus dan regenerasi tanaman. Melalui kultur antera dalam waktu singkat (2-3 tahun) telah diperoleh galur-galur harapan padi sawah VUB dan PTB tahan hawar daun bakteri, galur padi gogo PTB toleran keracunan aluminium dan tahan blas, dan galur mandul jantan 100% steril tipe Wild Abortive, Gambiaca, dan Kalinga beserta pelestariannya dan galur pemulih kesuburan berumur genjah untuk mendukung perakitan padi hibrida. Potensi penggunaan kultur antera masih dapat digali lebih lanjut terutama untuk mendukung program *functional genomics* dan *molecular breeding* yang sedang dirintis oleh Badan Litbang Pertanian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Litbang Pertanian melalui DIPA BB Biogen 2005-2009, Proyek PAATP, dan KKP3T, Kemendiknas melalui proyek Hibah Bersaing IX dan XI serta IMHERE B2C-IPB, Kemenristek melalui RUT XII, serta Pemda-Dinas Pertanian Kab. Buru atas kepercayaan dan dana penelitian yang telah diberikan untuk penelitian yang berbasis teknik kultur antera.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, B. 2008. Perakitan dan pengembangan varietas padi tipe baru. *Dalam* Daradjat, A.A., A. Setyono, A.K. Makarim, dan A. Hasanuddin. (eds.). Padi: Inovasi Teknologi Produksi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Badan Litbang Pertanian. hlm. 67-90.
- Abdullah, B., I.S. Dewi, A. Apriana, A. Sisharmini, dan H. Safitri. 2005. Development of new plant type rice lines through anther culture. *Proceedings of the 17th ASEAN Science & Technology Week (ASTW)*, Jakarta 5-14 Agustus, 2005. p. 116-122.
- Abdullah, B., I.S. Dewi, Sularjo, H. Safitri, dan A.P. Lestari. 2008. Perakitan padi tipe baru melalui seleksi silang berulang dan kultur anter. *J. Penel. Pertan. Tan. Pangan* 27(1):1-8.
- Aulinger, I.E. 2002. Combination of *in vitro* androgenesis and biolistic transformation: An approach for breeding transgenic maize (*Zea mays* L.) lines. Dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Diss. ETH No. 14920. 110 p.
- Badan Litbang Pertanian. 2005. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Padi. Badan Litbang Pertanian, DEPTAN.
- Bais, H.P. and G.A Ravishankar. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:1-34.
- Bishnoi, U., R.K. Jain, J.S. Rohilla, V.K. Chowdhury, K.R. Gupta, and J.B. Chowdhury. 2000. Anther culture of recalcitrant *indica x Basmati* rice hybrids. *Anther culture of indica rice hybrids*. *Euphytica* 114:93-101.
- Chen, Y. 1983. Anther and pollen culture of rice in China. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. *Proceedings of a workshop cosponsored by the Institute of Genetics, Academia Sinica and the International Rice Research Institute*. Science Press, Beijing, China, pp. 11-26
- Cheng, S.H., L.Y. Cao, J.Y. Zhuang, S.G. Chen, X.D. Zhan, Y.Y. Fa, D.F. Zhu, and S.K. Min. 2007. Super hybrid rice breeding in China: achievements and prospects. *J. Integrative Plant Biol.* 49(6):805-810.
- Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Sci.* 89:1870-1878.
- da Silva, A.L.S, M.L. Moraes-Fernandes, and A.G. Ferreira. 2000. Ontogenic events in androgenesis of brazilian barley genotypes. *Rev. Brasil. Biol.* 60(2):315-319.
- Departemen Pertanian. 2009. Basis Data Statistik Pertanian. Departemen Pertanian Republik Indonesia. <http://database.deptan.go.id/bdsp/new-data.asp> [13 Januari 2010].
- Dewi I.S. dan B.S. Purwoko. 2001. Kultur antera untuk mendukung program pemuliaan tanaman padi. *Bul. Agron.* 29:59-63.
- Dewi, I.S. dan B.S. Purwoko. 2008. Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development. *Indo. J. Agric. Sci.* 9(2):60-67.
- Dewi, I.S. dan B.S. Purwoko. 2011. Kultur *in vitro* untuk pembentukan tanaman haploid androgenik. *Dalam* G.A Wattimena, *et al.* Bioteknologi untuk Pemuliaan Tanaman. IPB Press. hlm. 107-158.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, dan I. Hanarida. 2004. Kultur antera padi pada beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. *J. Biotek. Pertan.* 9(1):14-19.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, I.H. Somantri, dan M.A. Chozin. 2006. Regenerasi tanaman pada kultur antera beberapa aksesi padi *indica* toleran aluminium. *J. Agrobiogen* 2(1):30-35.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, dan I.H. Somantri. 2007. Regenerasi Tanaman pada kultur antera padi: Pengaruh persilangan dan aplikasi putresin. *Bul. Agron.* 35(2):68-74.

- Dewi, I.S., M. Yunus, E.G. Lestari, I.R. Tambunan, dan A. Dadang. 2009. Aplikasi Kultur Antera dan Pencarian Satu Marka Molekuler Fungsional Rf4 untuk Membentuk Satu Galur Pelestari dan Pemulih Kesuburan Dari Cms-Wa. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian. Bogor. 27 hlm.
- Dewi, I.S., I.A. Rumanti, B.S. Purwoko, dan T.S. Kadir. 2011. Karakter agronomi dan ketahanan beberapa galur pelestari dihaploid terhadap hawar daun bakteri. *Bul. Plasma Nutfah* 17(2):88-95.
- Fehr, W.R. 1987. *Principles of Cultivar Development*. Vol 1. McGraw-Hill, Inc, New York. 536 p.
- Hanarida I.S., I.S. Dewi, D.W. Utami, T.S. Kadir, T.J. Santoso, D. Ambarwati, A. Sisharmini, dan A. Apriana. 2010. Pembentukan Gen Pool Genotipe Berumur Ultra Genjah melalui Hibridisasi, Mutasi, Kultur Antera, MAS serta MAB. Laporan Kerjasama Penelitian Balai Besar Penelitian Padi dengan Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. 22 hlm.
- Herawati, R., B.S. Purwoko, I.S. Dewi, N. Khumaida, dan B. Abdullah. 2008. Pembentukan galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru. *Bul. Agron.* 36 (3): 181-187.
- Herawati, R., B.S. Purwoko, dan I.S. Dewi. 2009. Keragaman genetik dan karakter agronomi galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru hasil kultur antera. *J. Agron. Indo.* 37(2):87-94.
- Herawati R., B.S. Purwoko, and I.S. Dewi. 2010. Characterization of doubled haploid derived from anther culture for new plant type upland rice. *J. Agron. Indo.* 38(3):177-184.
- Khush, G.S. 1995. Modern varieties-their real contribution to food supply. *Geo. J.* 35(3):275-284.
- Kumar, A., T. Altabella, M.A. Taylor, and A.F. Tiburcio. 1997. Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Sci.* 2:124-130.
- Lestari, A.P. 2009. Evaluasi mutu beras 18 galur padi hasil kultur anter. *Dalam* Setyono, A., U.S. Nugraha, S.D. Indrasari, dan S.Y. Agus (eds.). *Inovasi Teknologi Padi Mengantisipasi Perubahan Iklim Global Menunjang Ketahanan Pangan*. Prosiding Seminar Nasional Padi 2008. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. hlm. 1449-1455.
- Lestari, E.G., I.S. Dewi, R. Yunita, dan D. Sukmadjaya. 2010. Induksi mutasi dan keragaman somaklonal untuk meningkatkan ketahanan penyakit blas daun pada padi Fatmawati. *Bul. Plasma Nutfah* 16(2):96-102.
- Mihály, R., E. Kótai, O. Kiss, and J. Pauk. 2002. *In vitro* selection of transformed foreign gene (*bar*) in wheat anther culture. *Acta Biologica Szegediensis. Proc. 7th Hungarian Congress on Plant Physiology.* 46:9-10.
- Munarso, Y.P., I.S. Dewi, dan Suwarno. 2008. Regenerasi tanaman dengan kultur anter beberapa persilangan padi hibrida. *J. Penel. Pertan. Tan. Pangan* 27(1):13-17.
- Otani, M., Y. Wakita, and T. Shimada. 2005. Doubled haploid plant production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using anther culture. *Plant Biotech.* 22(2):141-143.
- Peng, S., G.S. Khush, P. Virk, Q. Tang, and Y. Zou. 2008. Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. *Field Crops Res.* 108:32-38.
- Purwoko, B.S. 2001. Pengaruh aplikasi spermin pada tahap kultur berbeda terhadap regenerasi tanaman pada kultur antera padi. *J. Biosains* 6(2):43-48.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, dan A.W. Usman. 2001a. Poliamina meningkatkan regenerasi tanaman hijau pada kultur antera padi cv Taipei 309. *Hayati* 8:117-120.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, dan A. Mufida. 2001b. Pengaruh putresin terhadap induksi kalus dan regenerasi tanaman pada kultur antera padi. *J. Tan. Tropika* 4:88-96.
- Purwoko, B.S., B. Abdullah, I.S. Dewi, dan P. Sasmita. 2007. Pengembangan Galur-Galur Padi Baru melalui Teknik Kultur Antera untuk Mendukung Ketahanan Pangan Nasional. Laporan Akhir KKP3T. Kerjasama Badan Litbang Pertanian dengan IPB. 32 hlm.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, and N. Khumaida. 2010a. Rice Anther Culture to Obtain Doubled-Haploids with Multiple Tolerances. *Asian Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18(1):55-57.
- Purwoko, B.S., D. Wirnas, I.S. Dewi, dan H. Safitri. 2010b. Uji Multilokasi dan Stabilitas Padi Gogo. Laporan Hasil Penelitian Hibah Penelitian I-MHERE B2C. LPPM, Institut Pertanian Bogor. 48 hlm.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, Satoto dan I.A. Rumanti. 2010c. Perakitan Padi Hibrida Berumur Sangat Genjah (90-104 HSS) Berpotensi Hasil Tinggi (10 t/ha) untuk Meningkatkan Produksi Lahan Sawah Tadah Hujan. Laporan KKP3T. IPB bekerjasama dengan Badan Litbang Pertanian. 35 hlm.
- Rumanti, I.A., I.S. Dewi, B.S. Purwoko, dan H. Aswidinnoor. 2009. Evaluasi galur haploid ganda pelestari hasil kultur antera untuk perakitan galur mandul jantan pada padi. *J. Agron. Indon.* 37(1):1-7.
- Safitri, H., B.S. Purwoko, D. Wirnas, I.S. Dewi, dan B. Abdullah. 2010. Daya kultur antera beberapa persilangan padi gogo dan padi tipe baru. *J. Agron. Indo.* 38(2):81-87.
- Safitri, H., B.S. Purwoko, D. Wirnas, I.S. Dewi, dan B. Abdullah. 2011. Evaluasi karakter agronomi dan komponen hasil 35 genotipe padi haploid ganda hasil kultur antera. Prosiding Seminar Ilmiah Hasil Penelitian Padi Nasional, 24-25 Nopember 2010. Buku 1. BB Padi-Badan Litbang Pertanian.
- Sasmita, P., B.S. Purwoko, S. Sujiprihati, I. Hanarida, dan M.A. Chozin. 2006a. Karakterisasi dan Evaluasi Toleransi Padi Gogo Haploid Ganda Hasil Kultur Antera terhadap Naungan. Ringkasan Disertasi. Institut Pertanian Bogor. 20 hlm.
- Sasmita, P., B.S. Purwoko, S. Sujiprihati, I. Hanarida, I.S. Dewi, dan M.A. Chozin. 2006b. Evaluasi pertumbuhan

- dan produksi padi gogo haploid ganda toleran naungan dalam sistem tumpang sari. *Bul. Agron.* 34(2):79-86.
- Sugimoto, K. and T. Arai. 2002. Stability of characters of a doubled haploid rice variety, Shirayukihime. *Breeding Sci.* 52(1):15-21.
- Tiainen, T. 1996. Influence of ethylene in microspore embryogenesis. *In* S.M Jain, S.K Sopory, R.E Veilleux (eds.). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. I. Fundamental Aspects and Methods. Kluwer Acad. Publ. Netherlands. p. 177-187.
- Utami, D.W., A.D. Ambarwati, A. Apriana, A. Sisharmini, I. Hanarida, dan S. Moeljopawiro. 2010. Keragaan sifat tahan penyakit blas dan agronomi populasi silang balik dan haploid ganda turunan IR64 dan *Oryza rufipogon*. *Bul. Plasma Nutfah* 16(2):90-95.
- Virk, P.S., G.S. Kush, and S. Kumar. 2004. Breeding to enhance yield potential of rice at IRRI: The ideotype approach. *IRRN* 29(1):5-9.
- Virmani, S.S., B.C. Viraktamath, C.L. Casal, R.S. Toledo, M.T. Lopez, and J.O. Manalo. 1997. *Hybrid Rice Breeding Manual*. IRRI, Los Banos. The Philippines. 83 p.
- Virmani, S.S. and I. Kumar. 2004. Development and use of hybrid rice technology to increase rice productivity in the tropics. *IRRN* 29(1):10-19.
- You, A., X. Lu, H. Jin, X. Ren, K. Liu, H. Yang, G. Yang, L. Zhu, and G. He. 2006. Identification of quantitative trait loci across recombinant inbred lines and testcross populations for traits of agronomic importance in rice. *Genetics* 172:1287-1300.
- Yuan, L.P., X. Wu, F. Liao, G. Ma, and Q. Xu. 2003. *Hybrid Rice Technology*. China Agric. Press, Beijing, Cina. 135 p.
-