

## Regenerasi Tanaman dengan Kultur Anter Beberapa Persilangan Padi Hibrida

Yuniati P. Munarso, Iswari S. Dewi, dan Suwarno

Balai Besar Penelitian Tanaman Padi  
Jl. Raya 9 Sukamandi, Jawa Barat

**ABSTRACT. Plant Regeneration Derived from Anther Culture Obtained from Hybrids of Rice.** Plant regeneration derived from anther culture play an important role in supporting breeding program, especially hybrid rice breeding. The objectives of the research were to study the callus induction and plant regeneration, and to evaluate the efficiency of plant production using anther culture. An experiment was conducted using F<sub>1</sub> generation of four crosses F<sub>1</sub>s i.e. IR62829A/MTU9992, IR68886A/Bio-9, IR58025A/BP51-1, and IR68897/RHS412. The result showed that the F<sub>1</sub>s had different capability of callus induction and plant regeneration. F<sub>1</sub> generation of IR58025A/BP51-1 had the highest callus induction with the callus percentage of 2.70%, while the others ranged from 0.91-2.04%. Plant regeneration ability of the F<sub>1</sub>s varied between 0.00%-16.95%. High percentage of callus induction was not automatically followed by high plant regeneration ability. F<sub>1</sub> generation of IR58025A/BP51-1, IR62829A/MTU 9992, and IR68889A/RHS 412 crosses had plant production efficiency higher than IR68886A/Bio-9.

Keywords: crossing, hybrid rice, plant regeneration

**ABSTRAK.** Regenerasi tanaman merupakan langkah awal dalam kultur anter untuk menunjang program pemuliaan tanaman, terutama padi hibrida. Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari daya induksi dan regenerasi, serta efisiensi beberapa kombinasi persilangan dalam memproduksi tanaman melalui teknik kultur anter. Sebagai sumber eksplan digunakan empat persilangan (F<sub>1</sub>) yaitu IR62829A/MTU9992, IR68886A/Bio-9, IR58025A/BP51-1, dan IR68897/RHS412. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap persilangan (F<sub>1</sub>) mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menginduksi kalus dan regenerasi tanaman. Persilangan IR58025A/BP51-1 mempunyai kemampuan menginduksi kalus yang lebih baik dengan nilai rata-rata kalus 2,70%, sedangkan yang lainnya berkisar antara 0,91-2,04%. Daya regenerasi ke empat persilangan bervariasi antara 0,00-16,95%. Frekuensi pembentukan kalus yang banyak tidak selalu menghasilkan daya regenerasi yang besar. Kombinasi persilangan R58025A/BP51-1, IR62829A/MTU 9992, dan IR68889A/RHS 412 mempunyai efisiensi produksi tanaman yang lebih baik dibanding IR68886A/Bio-9.

Kata kunci: Persilangan, padi hibrida, regenerasi tanaman

Teknologi hibrida diketahui mampu meningkatkan produksi padi hingga 15-20% dibanding padi inbrida (Virmani *et al.* 1997). Produksi padi hibrida sangat ditentukan oleh kemantapan dan ketersediaan tiga galur pendukungnya, yaitu galur mandul jantan, galur pemulih kesuburan, dan galur pelestari (Virmani 2003; Virk *et al.* 2003). Berkenaan dengan hal itu, upaya penciptaan galur-galur pendukung tersebut sangat penting dilakukan.

Secara konvensional, proses pemuliaan untuk pemurnian galur memerlukan waktu yang cukup lama. Hal ini menjadi penghambat dalam proses penerapan teknologi padi hibrida. Oleh sebab itu, program pemuliaan padi hibrida menaruh perhatian yang kuat pada percepatan penyediaan galur-galur komponen padi hibrida. Upaya yang dilakukan adalah dengan pendekatan kultur anter.

Kultur anter merupakan media penting untuk mengembangkan galur homozigot (galur murni) dan memperpendek siklus pemuliaan varietas unggul baru (Brar *et al.* 1994). Melalui kultur anter, galur homozigot dapat diperoleh dalam satu generasi, sedangkan melalui pemuliaan konvensional diperlukan waktu 6-7 generasi (Suhartini dan Hanarida 2000). Permasalahan dalam penerapan kultur anter pada padi adalah rendahnya regenerasi tanaman hijau. Hal ini disebabkan oleh terjadinya regenerasi tanaman albino atau tidak terjadinya regenerasi tanaman (Dewi *et al.* 2007, Zapata *et al.* 1983).

Chung (1992) menyebutkan bahwa kultur anter melibatkan proses produksi kalus dan regenerasi plantlet (tanaman) hijau. Salah satu persoalan yang muncul adalah plantlet yang dihasilkan berupa albino. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi daya induksi dan regenerasi anter dari beberapa kombinasi persilangan padi hibrida melalui teknik kultur anter, serta mengukur kemampuan teknik tersebut dalam menghasilkan tanaman hijau.

### BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca dan lapangan di Inlitpa Muara, Bogor, serta di rumah kaca dan laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian pada 2004. Bahan tanaman yang digunakan terdiri atas, empat galur mandul jantan (IR62829A, IR68886A, IR58025A, IR68897A) dan empat galur pemulih kesuburan pilihan (MTU 9992, Bio-9, BP51-1, RHS 412). Galur-galur tersebut digunakan sebagai tetua persilangan.

Persilangan dilakukan di Inlitpa Muara. Benih galur pemulih kesuburan disemai tiga kali dengan selang 5-7 hari. Tujuannya adalah untuk mendapatkan kesamaan waktu berbunga antara galur mandul jantan dengan galur pemulih kesuburan. Bibit berumur 21-25 hari dipindahkan ke lapangan untuk ditanam dengan jarak 20 cm x 20 cm, satu bibit per lubang. Pupuk diberikan dengan takaran 300 kg urea, 100 kg SP36, dan 100 kg KCl/ha. Sepertiga urea, semua SP36 dan KCl diberikan sebagai pupuk dasar, sedangkan sisa pupuk urea diberikan masing-masing sepertiga bagian pada waktu tanaman berumur tiga dan lima minggu setelah tanam.

Setelah mendapat kesamaan umur berbunga antara galur mandul jantan (tetua betina) dan galur pemulih kesuburan (tetua jantan), maka keduanya siap untuk disilangkan. Tetua betina yang akan disilangkan diamati terlebih dahulu kemandulan tepungsarinya (*pollen sterility*), baik secara visual maupun mikroskopis (Virmani *et al.* 1997). Tanaman yang mempunyai kemandulan tepungsari 100% (*highly sterile*) dijadikan sebagai tetua betina, kemudian dipindah ke rumah kaca untuk disilangkan di ruang persilangan dengan ke empat galur pemulih kesuburan. Dari persilangan ini diperoleh empat kombinasi persilangan ( $F_1$ ) yaitu IR62829A/MTU9992, IR68886A/Bio-9, IR58025A/BP51-1, dan IR68897/RHS412 yang dipergunakan sebagai bahan dalam kegiatan kultur anter.

Keempat genotipe benih hasil persilangan ( $F_1$ ) ditanam dalam ember di rumah kaca sebanyak empat kali. Setiap  $F_1$  ditanam satu bibit per rumpun, dua rumpun setiap ember. Tanah dipupuk dengan urea sebanyak satu sendok makan, SP36 dan KCl masing-masing sepertiga sendok makan sebagai pupuk dasar. Pupuk lanjutan diberikan berdasarkan nilai bagan warna daun.

Pengambilan malai untuk bahan kultur anter dilakukan pada saat tanaman  $F_1$  mencapai fase bunting. Malai dikoleksi pada saat jarak antara daun bendera dengan daun dibawahnya 7-12 cm, bergantung pada  $F_1$  masing-masing. Stadia tersebut diduga memiliki pollen (tepungsari) fase uninukleat yang dapat menghasilkan daya kultur anter terbaik. Pada penelitian ini, stadia eksplan untuk setiap  $F_1$  berbeda. Eksplan IR68886A/Bio-9 diambil pada saat jarak daun bendera dengan daun di bawahnya mencapai  $12,0 \pm 1,3$  cm, IR68897/RHS412  $9,8 \pm 0,9$  cm, IR58025A/BP51-1  $11,5 \pm 0,7$  cm, dan IR62829A/MTU9992  $10,9 \pm 0,9$  cm. Eksplan berupa malai dibersihkan dan dibungkus dengan aluminium foil yang dilapisi kertas tisu basah, kemudian disimpan (diinkubasi) di ruang dingin bertemperatur  $5^\circ\text{C}$  selama 7 hari. Sterilisasi dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Malai dibuka, kemudian bulir-bulir (spikelet) dikumpulkan dan disterilisasi dengan cara perendaman dalam 20%

bayclin (5,24% NaOCl) selama 20 menit. Selanjutnya eksplan dicuci dengan air steril (*aquadest*) sebanyak dua kali. Tahap selanjutnya adalah inokulasi anter (penanaman eksplan), inkubasi kultur untuk induksi kalus, regenerasi tanaman dari kalus, dan aklimatisasi plantlet.

Bulir padi yang sudah steril dipotong sepertiga dari pangkalnya, kemudian dikumpulkan pada cawan petri steril. Masing-masing bulir diketukkan pada tepi cawan petri yang sudah berisi 25 ml media induksi kalus (N6 + 2,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l kinetin), sampai anter keluar dari pangkal yang terpotong tersebut dan jatuh ke atas media. Biakan anter diinkubasi dalam ruang gelap bertemperatur  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  untuk menginduksi keluarnya kalus yang berasal dari tepungsari di dalam anther. Setelah 3-10 minggu, kalus yang terbentuk yaitu yang berukuran 1-2 mm dipindahkan ke dalam botol kultur yang sudah berisi 25 ml media regenerasi (MS + 0,5 mg/l NAA + 2,0 mg/l kinetin). Tanaman hijau (plantlet hijau) yang tumbuh 3-5 cm dari kalus pada media regenerasi dipindahkan ke dalam tabung kultur berisi 15 ml media perakaran (MS + 0,5 ml IBA), lalu dibiarkan sampai akhirnya tumbuh dengan sempurna.

Plantlet yang telah memiliki sistem perakaran selanjutnya diaklimatisasi; pertama, dengan menanam plantlet di dalam tabung reaksi yang berisi air bersih secukupnya. Sebelum diaklimatisasi akar dibersihkan dari agar yang melekat dan dipotong sedikit untuk merangsang munculnya akar-akar baru. Setelah satu minggu kemudian dilakukan aklimatisasi kedua, dengan cara memindahkan tanaman pada bak yang berisi campuran pasir dan tanah. Cahaya diberikan secara tidak langsung dan berangsur-angsur. Satu minggu setelah aklimatisasi, tanaman dipindahkan ke media tanah gembur dalam ember dan ditanam di rumah kaca.

Pengamatan meliputi jumlah anter yang diinokulasikan, jumlah kalus yang tumbuh, dan jumlah plantlet (hijau/albino) yang dihasilkan dari sejumlah anter yang diinokulasi. Daya induksi kalus dihitung berdasarkan jumlah anter yang diinokulasikan dengan jumlah kalus yang terbentuk. Untuk melihat efisiensi kultur anter yang terkait dengan produksi plantlet hijau dinyatakan dalam rasio plantlet hijau terhadap jumlah kalus menghasilkan tanaman dan persentase plantlet hijau yang dihasilkan terhadap jumlah anter yang diinokulasi (Zhang 1992).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

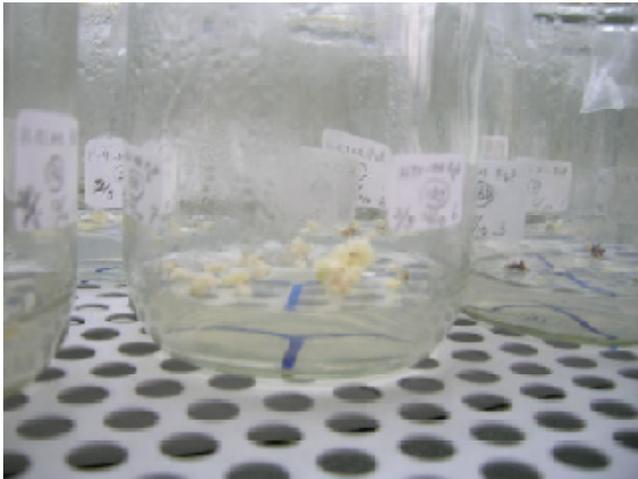
### Induksi Kalus

Pada penelitian ini, kalus mulai terbentuk setelah kultur diinkubasi lebih dari 3 minggu. Proses inisiasi

dediferensiasi tepungsari atau mikrospora terjadi di dalam anter yang dikulturkan secara *in vitro* (Dewi *et al.* 2004). Metabolit yang dihasilkan dari tapetum akan memasuki ruang anter dan memberikan nutrisi untuk perkembangan mikrospora serta melingkupi embrio atau kalus muda yang terbentuk (Hird *et al.* 1994).

Gambar 1 menunjukkan kalus yang baru dipindah dari cawan petri ke dalam botol kultur berisi media regenerasi tanaman. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak semua kalus yang tumbuh dapat menjadi kalus embriogenik. Hal ini terlihat dari penampilannya secara visual, bahwa kalus embriogenik akan berwarna agak kuning dan kompak, sedangkan yang bukan embriogenik akan berwarna putih karena mengandung pati.

Setiap genotipe (kombinasi persilangan) mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan kalus. Jumlah kalus terbanyak dihasilkan oleh IR58025A/BP51-1, rata-rata tiga butir kalus/cawan petri, IR68897A/RHS412 menghasilkan 2-3 butir kalus/cawan petri, IR62829A/MTU 9992 menghasilkan dua butir kalus/cawan petri, sedangkan IR68886A/Bio-9 menghasilkan satu butir kalus/cawan petri (Tabel 1).



Gambar 1. Kalus dari anter padi yang baru dipindahkan kedalam botol regenerasi.

Tabel 1. Daya induksi kalus dari empat kombinasi persilangan (F<sub>1</sub>).

| Persilangan       | Rata-rata jumlah anter | Rata-rata jumlah kalus | Induksi kalus (%) |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| IR68886A/Bio-9    | 116 b                  | 1 b                    | 0,91 c            |
| IR68897A/RHS 412  | 136 a                  | 2-3 a                  | 2,04 ab           |
| IR62829A/MTU 9992 | 129 a                  | 2 ab                   | 1,56 bc           |
| IR 58025A/BP51-1  | 106 b                  | 3 a                    | 2,70 a            |

Angka sekolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05.

Kemampuan anter dalam menghasilkan kalus sangat beragam di antara keempat genotipe tersebut. Persentase induksi kalus tertinggi diperoleh dari IR58025A/BP51-1 sebesar 2,70%, lebih tinggi dari IR68897A/RHS412 (2,04%), IR62829A/MTU 9992 (1,56%), dan IR68886A/Bio-9 (0,91%). Hanarida dan Apriana (2002) menyatakan bahwa frekuensi pembentukan kalus dari kultur anter sangat bergantung pada genotipe yang digunakan. Masyhudi (1994) juga melaporkan bahwa induksi kalus dalam kultur anter tidak hanya ditentukan oleh perbedaan spesies dalam genus, tetapi juga oleh perbedaan varietas dalam suatu spesies tanaman.

Menurut Reiffers dan Freire (1990), frekuensi pembentukan kalus pada kultur anter padi berkisar antara 0,22-29%. Pembentukan kalus juga dapat dipengaruhi oleh perlakuan awal, seperti stres dingin (Ishak dan Dwimahyani 1997), dan kondisi media tumbuh kultur anter (Masyhudi 1997). Suhu dingin (< 10°C) yang diberikan pada eksplan sebelum inokulasi anter pada media dapat meningkatkan pembentukan kalus (Zapata *et al.* 1983). Pengaruh stres dingin pada varietas Taipei 309 dengan menggunakan beberapa tingkatan suhu rendah, menghasilkan tanggapan terbaik untuk pembentukan kalus, adalah kejutan dingin 8°C dengan masa inkubasi 8 hari (Zapata *et al.* 1983).

### Regenerasi Tanaman

Pada kultur jaringan padi, regenerasi tanaman dari kalus dapat berupa plantlet hijau dan plantlet albino. Menurut Dewi *et al.* (2004), kalus yang berwarna kekuningan umumnya menghasilkan plantlet hijau, sedangkan kalus yang berwarna putih menghasilkan plantlet albino atau tanaman yang tidak mempunyai klorofil.

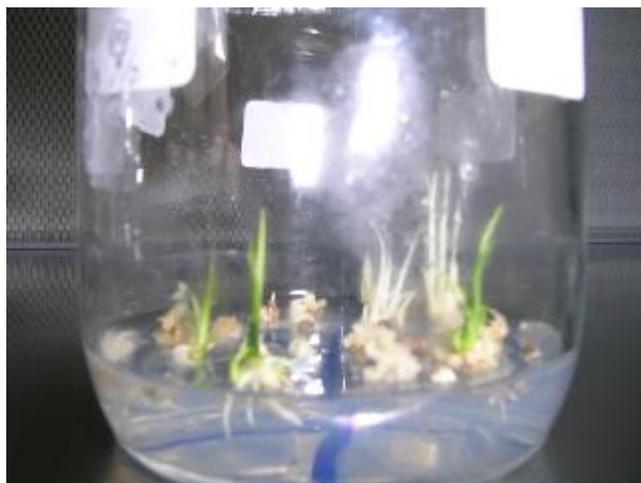
Frekuensi pembentukan kalus yang tinggi belum tentu mempunyai daya regenerasi tanaman yang tinggi. Hal ini ditunjukkan oleh persilangan IR58025A/BP51-1 yang memproduksi kalus dalam jumlah banyak tetapi tidak mampu beregenerasi, sehingga persentase pembentukan plantlet tidak jauh berbeda dengan persilangan IR62829A/MTU9992. Zapata dan Torrizo (1989) serta Masyhudi (1997) melaporkan bahwa faktor genotipe memegang peranan penting, baik dalam pembentukan kalus maupun regenerasinya.

Plantlet hijau yang dihasilkan dari semua kombinasi persilangan selama biakan rata-rata rendah. Hal ini disebabkan oleh tingginya pertumbuhan plantlet albino dari kalus yang terbentuk (Gambar 3), bervariasi antara 47-100%, atau secara keseluruhan mempunyai plantlet albino rata-rata 74% (Tabel 2). Frekuensi pembentukan plantlet albino kemungkinan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan kultur. Untuk induksi kalus diperlukan ruang

Tabel 2. Efisiensi kultur anter pada empat kombinasi persilangan  $F_1$  padi hibrida Laboratorium BB Biogen, 2004.

| Silangan          | Plantlet              |                     |                        |                      | Efisiensi kultur anter |                               |
|-------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
|                   | Jumlah plantlet hijau | Plantlet hijau* (%) | Jumlah plantlet albino | Plantlet albino* (%) | Rasio PH dengan KMT*   | PH dengan JA yang diinokulasi |
| IR68886A/Bio-9    | 0,0 c                 | 0,00                | 1,0 b                  | 100,00               | 0,00                   | 0,00 b                        |
| IR68897A/RHS 412  | 1,0 bc                | 25,00               | 3,0 b                  | 75,00                | 1,72                   | 0,04 b                        |
| IR62829A/MTU 9992 | 6,0 ab                | 35,29               | 11,0 a                 | 64,71                | 14,63                  | 0,23 b                        |
| IR 58025A/BP51-1  | 10,0 a                | 43,75               | 9,0 a                  | 56,25                | 16,95                  | 0,47 a                        |
| Rata-rata         | 4,25                  | 26,01               | 6,00                   | 73,99                |                        |                               |

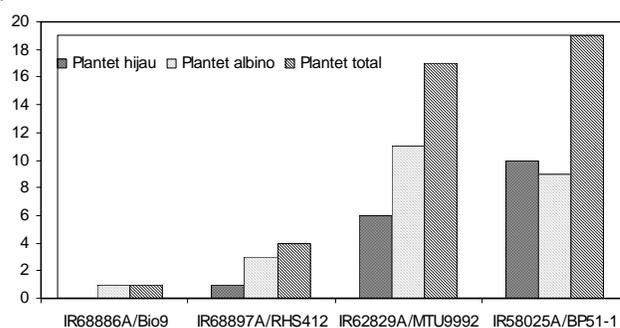
PH = Plantlet hijau, PA = Plantlet albino, KMT = Kalus menghasilkan tanaman, \* = tidak diuji statistik. JA= Jumlah anter, Angka sekelom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05.



Gambar 2. Kalus yang beregenerasi menjadi plantlet hijau pada botol kultur, Laboratorium BB Biogen, 2004.

gelap total dengan tujuan menghindari proses fotosintesis sehingga polen androgenik membelah dan membentuk kalus tanpa adanya cahaya. Untuk meregenerasikan kalus diperlukan ruang terang dengan cahaya yang kuat (1000-3000 lux) agar kalus dapat tumbuh, mengandung klorofil, dan berfotosintesis sehingga mampu beregenerasi menjadi tanaman seutuhnya. Kondisi lingkungan kultur untuk regenerasi kalus pada penelitian ini adakalanya berubah, akibat gangguan listrik, sehingga cahaya atau temperatur ruangan kurang stabil. Menurut Masyhudi (1997), temperatur yang stabil sekitar 25°C cocok untuk kultur anter tanaman padi. Makin tinggi temperatur ruangan, makin banyak jumlah plantlet albino yang terbentuk (Chen *et al.* 1986).

Ada dua kriteria dalam memperhitungkan efisiensi kultur anter yang terkait dengan produksi plantlet hijau (Zhang 1992), yaitu rasio plantlet hijau terhadap jumlah kalus dalam menghasilkan tanaman, dan persentase plantlet hijau yang dihasilkan terhadap jumlah anter yang



Gambar 3. Regenerasi tanaman hasil kultur anter pada empat kombinasi persilangan  $F_1$  padi hibrida, Laboratorium BB Biogen, 2004.

dikulturkan. Pada penelitian ini, rasio plantlet hijau terhadap jumlah kalus dalam menghasilkan tanaman dari yang tertinggi berturut-turut adalah IR58025A/BP51-1 (16,95), IR62829A/MTU 9992 (14,63), IR68889A/RHS 412 (1,72), dan IR68886A/Bio-9 (0,00). Persentase plantlet hijau terhadap jumlah anter yang diinokulasi berturut-turut adalah IR58025A/BP51-1 (0,47%), IR62829A/MTU 9992 (0,23%), dan IR68889A/RHS 412 (0,04%). Hal ini menunjukkan bahwa efisiensi ketiga kombinasi persilangan tersebut dalam menghasilkan plantlet hijau lebih baik dibandingkan dengan IR68886A/Bio-9 (Tabel 2).

## KESIMPULAN

1. Kemampuan induksi kalus dan regenerasi tanaman pada setiap kombinasi persilangan  $F_1$  berbeda. IR58025A/BP51-1 mempunyai daya induksi kalus tertinggi (2,70%) dibanding  $F_1$  lainnya.
2. Dari efisiensi produksi tanaman, kombinasi persilangan IR58025A/BP51-1, IR62829A/MTU 9992, dan IR68889A/RHS 412, lebih baik dibandingkan dengan IR68886A/Bio-9.

3. Untuk memanfaatkan teknik kultur anter secara operasional praktis sebagai teknik pembentukan galur homozigot, diperlukan jumlah anter yang cukup banyak agar tanaman homozigot yang diperoleh memiliki keragaman genetik yang luas.

### DAFTAR PUSTAKA

- Brar, D.S., T. Fujimura, S. McCouch, and F.J. Zapata. 1994. Application of biotechnology in hybrid rice. p. 53. *In*: S.S. Virmani (Ed.). Hybrid rice technology new development and future prospects. Selected Papers from the IRRI.
- Chen, C.C., H.S. Tsay., and C.R. Huang. 1986. Rice (*Oryza sativa* L.): factors affecting androgenesis. *In*: Y.P.S. Bajaj (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 2, crops I. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. p. 123-138
- Chung, G.S. 1992. Anther culture for rice improvement in Korea. *In*: K. Zheng and T. Murashige (Eds.). Anther culture for rice breeders. Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou. China. p. 8-37.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinoor, dan I.H. Somantri. 2004. Kultur antera padi pada beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. Vol.9. No.1. 2004. p. 14-19.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, dan H. Aswidinoor. 2007. Regenerasi tanaman pada kultur antera padi: pengaruh persilangan dan aplikasi putresin. *Bul. Agron.* 35:(2):68-74.
- Hanarida, I.S. dan A. Apriana. 2002. Induksi kalus dan regenerasi tanaman melalui kultur anter pada silangan padi tipe baru. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 21(2):20-23.
- Hird D.L., D. Worrall, R. Hodge, S. Smart, W. Paul, and R. Scott. 1994. Characterisation of *Arabidopsis thaliana* anther-specific gene which shares sequence similarity with  $\beta$ -1-3-glucanases. p. 137-158. *In*: R.J. Scott and A.D. Stead (Eds.) Molecular and cellular aspects of plant reproduction. Soc.Exp. Biol. Seminar Series 55. Cambridge Univ. Press. UK.
- Ishak dan I. Dwimahyani. 1997. Induksi kalus dan regenerasi tanaman dari kultur anter padi var. Arias. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 2(2):44-48.
- Masyhudi, M.F. 1994. Kultur anter tanaman padi. *Buletin Penelitian* 9:23-31.
- Masyhudi, M.F. 1997. Kultur anter tanaman padi subspecies javanica. *Jurnal Litbang Pertanian*, XVI (1):30-36.
- Reiffers, I. dan A.B. Freire. 1990. Production doubled haploid rice plants (*Oryza sativa* L.) by anther culture. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 21. p.165-170
- Suhartini, T., dan I.S. Hanarida. 2000. Kesamaan genetik galur-galur padi hasil kultur anter F<sub>1</sub> pada generasi H<sub>1</sub>. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 19(2):13-20
- Virmani, S.S., B.C. Viraktamath, C.I. Casal, R.S. Toledo, M.T. Lopez, and J.O. Manalo. 1997. Hybrid rice breeding manual. IRRI. Philippines. p. 119-120.
- Virmani, S.S. 2003. Advances in hybrid rice research and development in the tropics. p 8. *In*: S.S. Virmani, C.X. Mao, and B.Hardy (Eds.). Hybrid rice for food security poverty alleviation and environmental protection. IRRI.
- Virk, P.S., G.S. Kush, and S.S. Virmani. 2003. Breeding strategies to enhance heterosis in rice. p. 21-22. *In*: S.S. Virmani, C.X. Mao, and B.Hardy. Hybrid rice for food security poverty alleviation and environmental protection. IRRI.
- Zapata F.J., G.S. Khush, J.P. Crill, M.H. Neu, R.O. Romero, L.B. Torrizo, and M. Alejar. 1983. Rice anther culture at IRRI. P. 27-46. *In*: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop co-sponsored by the institute of Genetics. Academia Sinica and the IRRI. Science Press. Beijing. China.
- Zapata, F.J. and L.B. Torrizo. 1989. Breeding for rice varieties tolerant to adverse conditions through tissue culture at IRRI. *Strengthening Collaboration in biotechnology: International Agriculture Research and Private Sector*. p. 93-108.
- Zhang, Z.H. 1992. Anther culture for rice breeding at SAAS. *In* Zheng, K. and T. Murashige (Eds.). Anther culture for rice breeders. Proceedings of Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou. China. p. 36-74.