

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MESOCÓTILOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

REGENERATION *IN VITRO* OF RICE MESOCOPILES (*Oryza sativa* L.)

Maristela dos Santos Rey¹, Daiane Schimith de Pinho², Aniheb Prestes Vieira³, Eugênia Jacira Bolacel Braga⁴, Carlos Roberto Pierobom⁵ e José Antônio Peters⁴

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo eficiente de regeneração direta a partir de mesocótilos de duas cultivares de arroz visando sua utilização futura em trabalhos de transformação genética desta espécie. Para tal fim, mesocótilos obtidos de sementes recém-germinadas foram inoculados em meio de Murashige e Skoog suplementado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP). Após a inoculação os explantes ficaram em sala de crescimento a 25°C, 16 horas de fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons de 42µmol m⁻² s⁻¹. Foram avaliados aos 45 dias da inoculação dos explantes a indução de brotações e comprimento das brotações. Para a variável indução de brotos, ocorreu interação significativa entre cultivar e concentração de BAP. Foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de BAP no comprimento das brotações, ocorrendo uma redução significativa desta variável com o aumento da quantidade do regulador de crescimento no meio de cultura. Resultados similares foram obtidos ao se cultivar os brotos resultantes de diferentes concentrações de BAP, na concentração 5mg L⁻¹, demonstrando o efeito continuado da citocinina na eficiência deste tipo de explante para a regeneração de brotações, evidenciando um efeito do genótipo na resposta *in vitro*.

Palavras-chave: brotações, organogênese, cultura de tecidos

ABSTRACT

The objective of this study was to define an efficient protocol for a direct regeneration of shoots, using rice mesocoptiles genetic transformation of this species. Rice mesocoptiles were placed on MS medium, amended with different concentrations of Benzilaminopurin (BAP). After inoculation, shoots stayed in growth room at 25°C, 16 hours with light and flow density of 42µmol m⁻² s⁻¹. The induction and length of the shoots were appraised at 45 days after inoculation. For the variable induction of shoots, the interaction cultivar/concentration of BAP was significant. Significant differences of BAP concentrations the length the shoots were observed, causing a significant reduction of this variable with the increase of the amount of this growth regulator. Similar results were obtained on shoots growing on different BAP concentrations, and transferred to 5mgL⁻¹ BAP, demonstrating the cytokinin continuous effect on shoots regeneration and genotype effect *in vitro*.

Key works: shoots, organogenesis, tissue cultures

INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais importantes do mundo, com uma área de aproximadamente 150 milhões de hectares (EMBRAPA, 2005), sendo o Brasil responsável por cerca de três milhões de ha plantados no ano agrícola de 2007. O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro, abrangendo 59% desta produção (IBGE, 2008). Em consequência desta importância, muitos estudos são realizados visando o melhoramento genético da cultura, incluindo obtenção de maior variabilidade e, conseqüentemente, aumento da sua produtividade, qualidade e resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos.

A cultura de tecidos de plantas é uma ferramenta utilizada para acelerar vários processos biotecnológicos, como aumento da frequência de regeneração de plantas (RANCE *et al.*, 1994), indução de variabilidade (PENG & HODGES, 1989) e transformação genética (RAINIERI *et al.*, 1990). Porém, diversos fatores, como tipo e concentração de reguladores de crescimento, estágio fisiológico e tamanho de explantes, meios de cultura e condições de cultivo, podem influenciar o potencial regenerativo de uma espécie e mesmo de uma cultivar (MILACH *et al.*, 1991).

O crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente nas plantas e os análogos sintéticos (SOARES *et al.*, 2007). As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical, sendo que o balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de células, tecidos e órgãos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Teoricamente, a cultura de tecidos pode ser iniciada a partir de diferentes tipos de explantes, entretanto a regeneração *in vitro* é mais facilmente induzida em alguns órgãos e/ou tecidos. Neste contexto, órgãos ou tecidos jovens, como embriões imaturos, apresentam melhor capacidade regenerativa (OZAWA e KAWAHIGASHI, 2006), no entanto, possuem o obstáculo de estarem disponíveis apenas em um curto período de tempo (TAVARES *et al.*, 2004). Para superar este inconveniente, atualmente têm-se utilizado explantes oriundos da região basal e meristemática de ápices caulinares, obtidos a partir de sementes recém germinadas, contendo gemas axilares (CHRISTOU & FORD, 1995), que podem ser obtidos em qualquer época, sem a dependência do ciclo da

¹ Eng. Agr., Doutoranda em Fitossanidade, Rua 2032 A, n° 295, Setor Aeroporto, Morrinhos, GO. CEP: 75.650-000. E-mail: maris_rey@yahoo.com.br (autor para correspondência).

² Biól., Depto. de Botânica, Laboratório de Cultura de Tecidos, UFPel. CEP: 96010-970, Capão do Leão, RS.

³ Bolsista de Iniciação Científica,

⁴ Prof. Adj., Depto. de Botânica, Laboratório de Cultura de Tecidos, UFPel. CEP: 96010-970, Capão do Leão, RS.

⁵ Prof. Adj., Depto. de Fitossanidade, FAEM/UFPel. CEP: 96010-970, Capão do Leão, RS.

(Recebido para publicação em 19/05/2008, aprovado em 07/04/2009 2010)

planta, tendo ainda como vantagens a dispensa de instalações sofisticadas para manutenção de plantas, e estarem disponíveis durante todo o ano.

Em arroz, ainda que seja observada uma considerável plasticidade no estabelecimento de culturas *in vitro* e na regeneração de plantas a partir de inúmeros tecidos ou células, existem consideráveis diferenças relacionadas com a capacidade morfogênica entre explantes e/ou genótipos (DORNELES & PETERS, 1993), sendo que genótipos mais responsivos têm sido utilizados para uso em técnicas como a transformação genética (DODE *et al.*, 2003).

Tanto na transformação de plantas, como em outras técnicas que envolvam a cultura de tecidos, é importante estabelecer eficientes protocolos de regeneração, tanto envolvendo embriogênese como organogênese. Em consequência do exposto, o objetivo deste estudo foi o de estabelecer um eficiente protocolo de regeneração direta a partir de mesocótilos de arroz, obtidos de sementes recém-geminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Como materiais vegetais foram utilizadas duas cultivares de arroz, BRS Taim e Querência, oriundas da Embrapa Clima Temperado. Sementes destas cultivares, previamente descascadas, foram desinfestadas com álcool 70%, durante 3 minutos, solução de hipoclorito de sódio 3% por 25 minutos, seguido de três lavagens em água destilada estéril.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) semi-sólido ($7g L^{-1}$) suplementado com $2mg L^{-1}$ de ácido α -naftalenoacético (ANA) e mantidas no escuro, à temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}C$, por 3 a 4 dias. Após a germinação das sementes, as plântulas foram seccionadas, retirando-se os coleótilos e as bases dos tecidos meristemáticos, isolando-se somente os mesocótilos com 0,3 a 0,5cm de comprimento, os quais foram utilizados como explantes.

Para os experimentos de regeneração os explantes foram inicialmente inoculados em meio MS, contendo mio-inositol ($100mg L^{-1}$), sacarose ($30g L^{-1}$) e benziladenina (BAP) em diferentes concentrações (0, 2, 3, 4 e $5mg L^{-1}$). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da adição do gelificante ($2g L^{-1}$ de gelrite) e posteriormente esterilizados em autoclave a $121^{\circ}C$

e $1,5atm$ por 15 min. Os explantes foram colocados nos meios de cultura e transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^{\circ}C$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $42\mu mol m^{-2} s^{-1}$.

Sete a dez dias após o início do experimento, quando se observou o desenvolvimento de uma única brotação, eliminou-se a região apical da mesma, deixando-se o explante com 0,5 a 1,0cm de comprimento, possibilitando assim uma melhor multiplicação das brotações basais. Quarenta e cinco dias após a inoculação dos mesocótilos nos diferentes meios de cultura foram realizadas as avaliações, sendo as brotações primárias, previamente separadas e cortadas na parte apical. Estas brotações foram então empregadas para a instalação do segundo experimento, sendo inoculadas em meio MS contendo $5mg L^{-1}$ de BAP, nas mesmas condições de incubação e procedimentos citados anteriormente.

No primeiro experimento foi determinado o número de brotações por explante inoculado, bem como o comprimento de cada brotação, utilizando-se para tal fim uma régua milimetrada. Já para o segundo experimento foi avaliado apenas o número de brotações originadas por broto primário. Em ambos experimentos foi empregado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (cultivares) x 5 (doses de BAP) com quatro repetições e 10 plantas por parcela. Para interpretação dos dados foi aplicado uma regressão polinomial para análise da regeneração e comprimento das brotações e teste de médias para as duas variáveis, calculada através do programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados obtidos (Tabela 1), observa-se na variável número de brotos que, tanto o fator concentração de BAP, bem como a interação entre as cultivares e as concentrações do regulador foram significativos, pois estas mostraram uma influência sobre o comportamento das cultivares. Já com relação ao comprimento médio das brotações, as duas cultivares apresentaram respostas similares mostrando que para esta variável apenas as concentrações de BAP foram significativas.

Tabela 1 - Quadro da análise da variância das variáveis número e comprimento de brotos das cultivares de arroz BRS Taim e Querência em relação às concentrações de BAP utilizadas no meio de cultura. Pelotas, 2008

Causas da Variação	Probabilidade de >F	
	Número de brotos	Comprimento de brotos
BRS Taim/Querência	0,868	0,532
BAP	0,00001*	0,00001*
BRS Taim/Querência/*BAP	0,00079*	0,69944
Média Geral	6,11	5,72
C.V.	14,77%	9,21%

*Diferença significativa (<0,05%)

A Figura 1 mostra o comportamento das cultivares sob o efeito do BAP para a variável número de brotos por explante, a

qual ajustou-se em duas regressões lineares e crescentes para os dois genótipos.

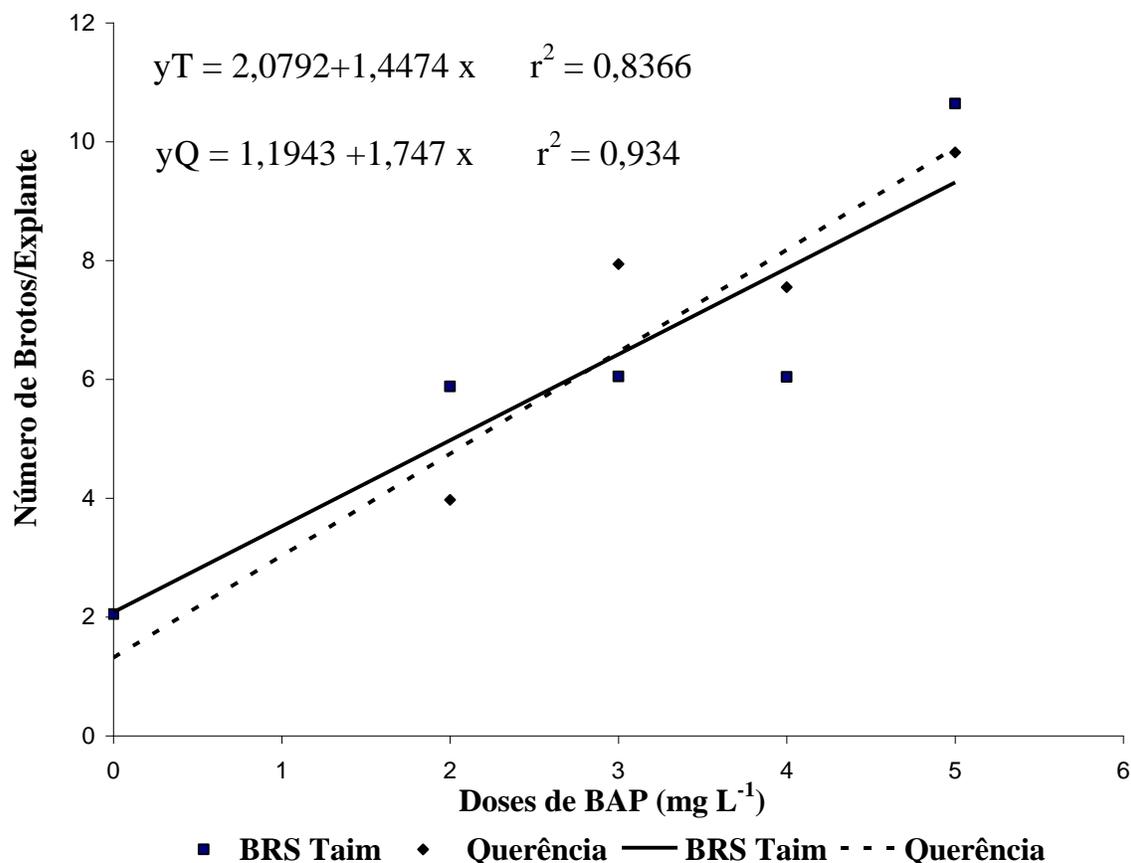


Figura 1 - Número médio de brotos por explante a partir de mesocótilos de arroz das cultivares BRS Taim (yT) e Querência (yQ) em função da concentração de BAP. Pelotas, 2008

Observa-se que conforme aumentaram as concentrações do regulador de crescimento houve um incremento na regeneração de brotações. Este acréscimo da concentração de BAP no meio de cultura proporcionou maior formação de brotos, alcançando médias de 10,64 e 9,82 brotos/explante, para as cultivares BRS Taim e Querência, respectivamente, quando utilizou-se 5mg L⁻¹ de BAP (Tabela 2). Para o genótipo BRS Taim não houve diferenças significativas entre os tratamentos 2, 3 e 4mg L⁻¹ de BAP, obtendo médias de regeneração de brotos de 5,88, 6,05 e 6,04

respectivamente, porém estes diferenciaram-se significativamente da testemunha que obteve uma média de número de brotos de 2,05 e 1,15 para BRS Taim e Querência, respectivamente. Para Querência, os tratamentos 3 e 4mg L⁻¹ de BAP propiciaram resultados estatisticamente iguais com médias de emissão de brotos de 7,94 e 7,55, respectivamente, entretanto esses resultados foram estatisticamente diferentes dos tratamentos onde se usou concentrações de 0 e 2mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 - Número médio de brotações/explante e comprimento médio das brotações (cm) obtidas a partir de mesocótilos de arroz, das cultivares BRS Taim e Querência, em função das concentrações de BAP no meio de cultura. Pelotas, 2008

Doses de BAP (mg L ⁻¹)	Número de brotos		Comprimento de brotos	
	BRS Taim	Querência	BRS Taim	Querência
0	2,05 C*	1,15 D	18,37 A	18,08 A
2	5,88 B	3,97 C	4,12 B	4,06 B
3	6,05 B	7,94 B	2,87 C	2,58 C
4	6,04 B	7,55 B	2,78 C	2,52 C
5	10,64 A	9,82 A	2,74 C	2,37 C

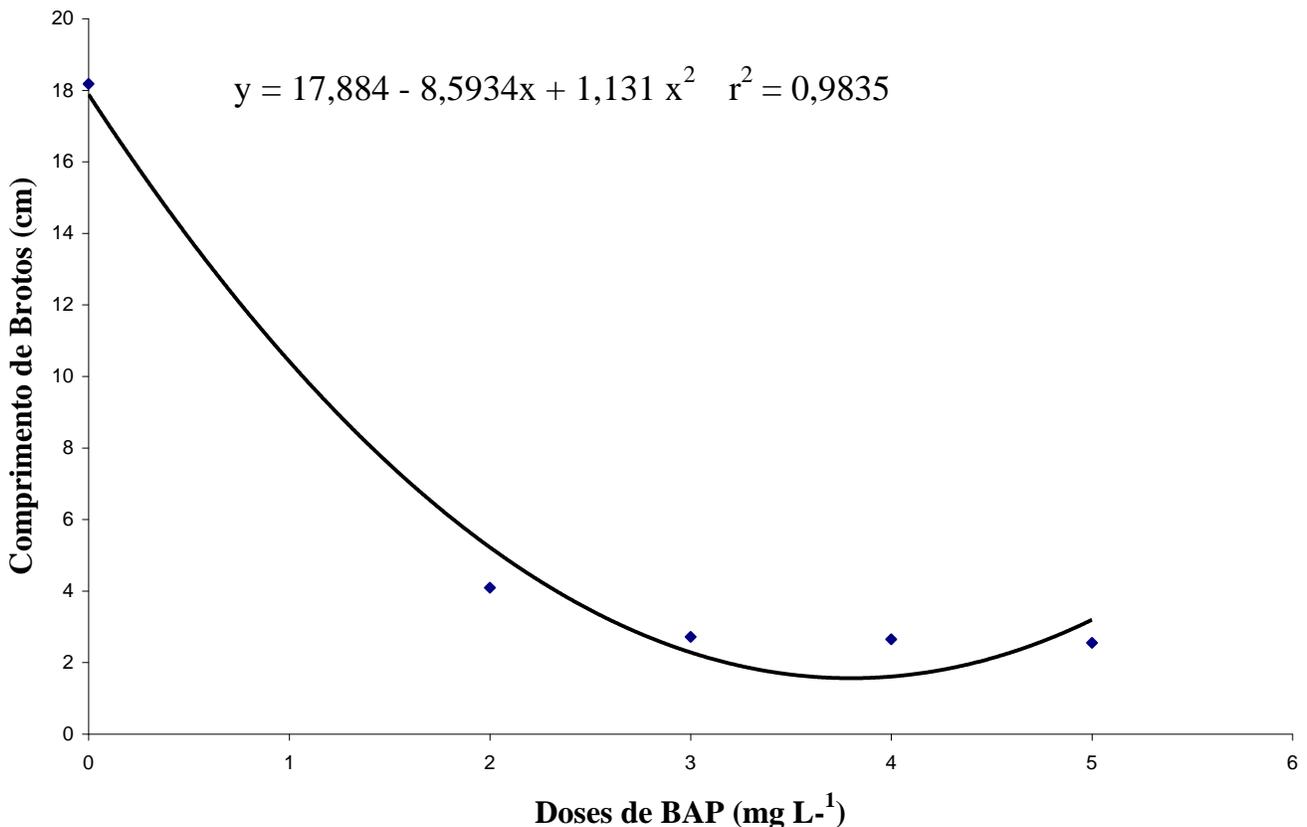
*Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de médias de Duncan á nível de 0,05% de probabilidade de erro.

Estes dados concordam com Dode *et al.* (2003), já que estes autores afirmam que resultados positivos em sistema de cultivo *in vitro* envolvendo cultivares de arroz estão intimamente ligados ao balanço hormonal do meio de cultura.

Outros autores, como Pathirana *et al.* (2002) e Arockiasamy & Ignacimuthu (2007) também relatam que doses mínimas de BAP podem favorecer a regeneração de brotos em meristemas e ápices caulinares de arroz usados como explantes em cultivo

in vitro. Em outras gramíneas, como a cana de açúcar a concentração de 5mg L⁻¹ de BAP induziu as maiores médias de

regeneração de brotos/explante (FRANKLIN *et al.*, 2006).



◆ BRS Taim/ Querência — BRS Taim/Querência

Figura 2 - Comprimento médio de brotos (cm) por explante de arroz das cultivares BRS BRS Taim e Querência em função da concentração de BAP. Pelotas, 2008.

Os resultados contidos na Figura 2 mostram o comportamento decrescente do comprimento de brotações em relação ao aumento das concentrações de BAP. Os dois genótipos se enquadraram em uma regressão única e quadrática, não indicando um comportamento distinto com relação à influência da citocinina. Segundo a Tabela 2, nota-se uma relação inversa entre o comprimento das brotações e a dose de BAP, isto é, o aumento da concentração do regulador de crescimento no meio de cultura determinou uma redução ao tamanho das brotações, principalmente nas maiores concentrações. Na concentração mais elevada houve uma redução média de 85,9% no comprimento das brotações, nas duas cultivares estudadas, em comparação com o tratamento sem BAP.

O efeito negativo da citocinina utilizada ocorreu mesmo na concentração mais baixa (2mg L⁻¹), com uma redução média de 77,5% no comprimento das brotações (Tabela 2) em relação a testemunha (tratamento sem BAP), a qual foi compensada pelo aumento da taxa de multiplicação dos explantes, concordando com os dados mostrados por Diniz *et al.* (2003). Estes resultados podem ser explicados pela perda da dominância apical proporcionada pelo uso do regulador de crescimento e também pelo corte do ápice do explante aos 10 dias após a repicagem. Respostas similares foram encontradas

por Carvalho *et al.* (1999), quando evidenciaram que aumentando a concentração de BAP no cultivo *in vitro* do café obtiveram as maiores médias de regeneração, porém houve um decréscimo acentuado no comprimento dos brotos. Perez & Kerbauy (2004) mencionam que, ao utilizar-se uma citocinina em explantes desprovidos de ápice, o regulador se concentra quase que totalmente nas gemas laterais, promovendo seu desenvolvimento.

Provavelmente, neste estudo, o suprimento externo de citocinina, com relação à variável altura dos brotos, tenha superado a necessidade deste regulador de crescimento nos explantes, tendo um efeito negativo. Segundo Lane & McDougald (1982), a necessidade externa de citocinina depende do genótipo, da eficiência de transporte de BAP e do metabolismo deste, podendo criar requerimentos maiores ou menores.

No segundo experimento, as brotações primárias obtidas dos mesocótilos e oriundas dos meios contendo diferentes concentrações de BAP foram inoculadas no mesmo meio mineral com 5mg L⁻¹ de BAP. Segundo os dados contidos na Tabela 3, ocorreu diferença significativa dentro dos fatores cultivares e doses de BAP e também em relação à interação deles, evidenciando a influência contínua do BAP na regeneração de brotos originados dos brotos primários.

Tabela 3 - Quadro da análise da variância da variável regeneração dos brotos oriundos dos brotos primários das cultivares de arroz BRS Taim e Querência sob efeito do uso contínuo do BAP. Pelotas, 2008.

Causas da Variação	Probabilidade >F	
	Número de brotos	BRS
Taim/Querência	0,00001*	
BAP	0,00256*	
BRS Taim/Querência*BAP	0,00361*	
Média Geral	33,815	
C.V.	8,896%	

*Diferença Significativa (< 0,05%)

A análise contida na Figura 4 indicou que o comportamento das duas cultivares ajustou-se em duas regressões cúbicas, sendo que os genótipos BRS Taim e Querência mostraram um comportamento distinto com relação à emissão de brotos após o cultivo em diferentes concentrações de BAP e transferência para meio com apenas 5

mg L⁻¹ desse regulador de crescimento. As cultivares BRS Taim e Querência apontaram para um comportamento crescente de regeneração de brotos naqueles tratamentos prévios com as concentrações de 2 e 3mg L⁻¹ de BAP respectivamente, e a partir daí houve uma queda na taxa de multiplicação.

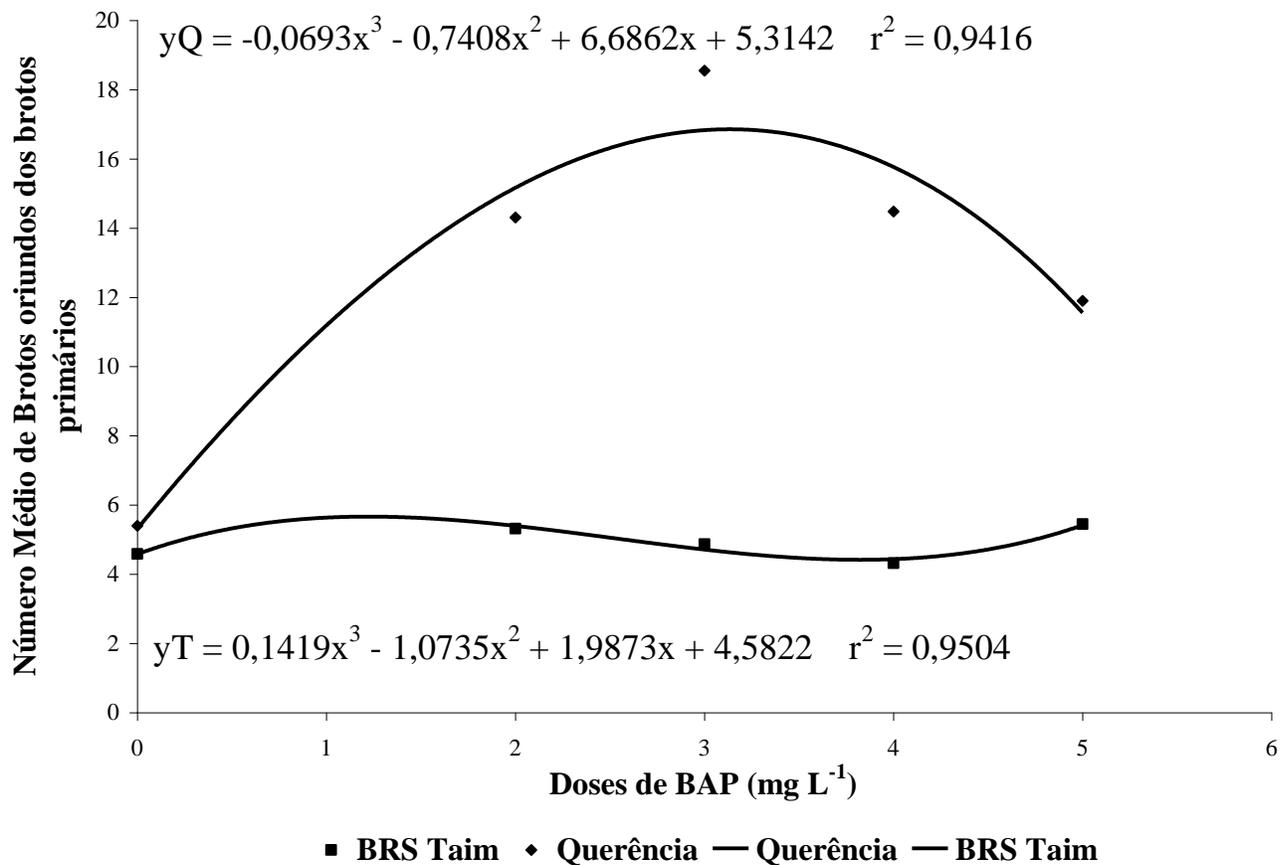


Figura 3 - Número médio de brotos das cultivares de arroz BRS Taim e Querência em função do efeito contínuo do BAP. Pelotas, 2008

A Tabela 4 mostra que o genótipo Querência apresentou maior taxa de multiplicação que o cv. BRS Taim, alcançando 14,48 brotações/explante, mesmo quando este foi submetido à concentrações mais elevadas de citocinina. Para o genótipo BRS Taim, a maior taxa de regeneração de brotos ocorreu com a concentração 5mg L⁻¹, entretanto não ocorreu

diferença significativa entre as doses do regulador de crescimento. Estes resultados traçam um paralelo com os resultados obtidos por Khanna *et al.* (1998), que um comportamento distinto em diferentes genótipos de arroz em relação aos nutrientes e reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura.

Tabela 4 - Média do número de brotos de arroz BRS Taim e Querência oriundos dos brotos primários sob diferentes concentrações de BAP e subcultivadas em meio contendo 5mg L⁻¹ desta citocinina. Pelotas, 2008

Concentrações de BAP dos meios de origem (mg L ⁻¹)	Cultivar	
	BRS Taim	Querência
0	4,59a*A	5,45aC
2	5,32bA**	14,31aAB
3	4,87bA	18,55aA
4	5,04bA	14,48aAB
5	5,45bA	11,90bB

Médias seguidas de mesmas letras (minúsculas na linha* e maiúsculas na coluna**) não diferem entre si, pelo teste de médias de Duncan ao nível de 0,05% de probabilidade de erro

Por sua vez, Nhut & Van (2000), estudando a regeneração de meristema apical de arroz, demonstraram que o uso de BAP na concentração de 10µmol (2,25mg L⁻¹) determinou uma regeneração média de 16 brotos por explante, valor bem superior aos encontrados nesta pesquisa. Estes resultados demonstram mais uma vez que a frequência de regeneração de plantas *in vitro* é dependente dos genótipos utilizados, bem como da sua interação com as condições de cultivo (KHANNA *et al.*, 1998; OZAWA *et al.*, 2003).

Diferentes explantes são reportados no cultivo *in vitro* da cultura do arroz, tais como cariópses (PATHIRANA *et al.*, 2002), base do tecido meristemático (TAVARES *et al.*, 2004), anteras (LANNES *et al.*, 2005), embriões imaturos (DODE *et al.*, 2004), porções basais de brotos (YOOKONGKAEW *et al.*, 2007) e também segmentos de folhas (CHUGH & KHURANA, 2003). Entretanto, neste estudo foi comprovada a facilidade do uso do mesocótilo como explante para trabalhos *in vitro*, sendo que sua vantagem é a não dependência do ciclo da cultura para obtenção de material. Seu uso é viável, principalmente por originar resultados em curto intervalo de tempo, diferentemente de quando comparado com embriões imaturos, o explante mais utilizado na cultura do arroz (NARAYANAM *et al.*, 2004). Outra vantagem também comprovada neste estudo é a utilização dos brotos primários como explantes, o que implica na totipotência de algumas partes dos vegetais, que tem a capacidade de regenerar plantas quando postos em condições adequadas (KERBAUY, 1999). Este estudo demonstra, sobretudo, que mesmo explorando o efeito contínuo do BAP, o uso do mesocótilo em si tem a capacidade de seguir emitindo brotos, mesmo quando retirados do explante de origem, e, dependendo do genótipo, regenerar uma maior quantidade de brotações, como foi o caso da cultivar Querência.

Este permite estabelecer um protocolo de regeneração seguro para a cultura do arroz, visando seu uso em trabalhos de transformação genética, já que a obtenção de brotos é uma das principais ferramentas para o sucesso de estudos que envolvam transferência de DNA exógeno.

CONCLUSÃO

Mesocótilos de sementes pré-germinadas são excelentes explantes para a regeneração de brotações, via organogênese direta;

A adição de BAP aos meios de cultura aumentam a taxa de regeneração, apesar de diminuírem o comprimento das brotações;

O efeito continuado do BAP mantém a capacidade de regeneração dos brotos.

REFERÊNCIAS

AROCKIASAMY, S.; IGNACIMUTHU, S., Regeneration of transgenic plants from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, n. 26, p.1745-1753, 2007.

CARVALHO, G.R.; PIO, R.; PASQUAL, M., CARVALHO, G.R.; SCARANTE, M.J. Efeitos do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista Universidade de Alfenas**, Alfenas, n.5, p.185-187, 1999.

CHRISTOU, P.; FORD, T.L. Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration. **Annals of Botany**, London, v.75, p.449-454, 1995.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n.74, p.151-161, 2003.

DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L.; TEIXEIRA, A.L. de A., GOMES, E.S. HERNANDEZ, F.F.F. Ácido giberélico (ga3) e 6-benzilaminopurina (bap) no crescimento *in vitro* de macela (*Egletes viscosa* L.) Less. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.4, p.934-938, 2003.

DODE, L.B.; BRAGA, E.J.B.; GONÇALVES, F.S.M.; OLIVEIRA, L.A.A.; MAGALHÃES, JR. A.M. de; FRANCO, D.I.; PETERS, J.A. Efeito do balanço hormonal do meio de cultura e das condições fisiológicas da semente na indução de calos em arroz cv. "BRS Taim". **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v.9, n.2, p.113-116, 2003.

DORNELLES, L.T.; PETERS, J.A. Regeneração de plantas a partir de panículas imaturas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.6, n.2, p.97-104, 1993.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo de arroz irrigado no Brasil**: sistemas de produção 3, versão eletrônica, nov., 2005.

FRANKLIN, G.; ARVINTEH, S.; SHEEBA, C.J.; KANCHANA, M.; SUBRAMONIAN, N. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, n.50, p.111-119, 2006.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Parte 2**, cap.6, p.183-258, 1998.
- IBGE. **Indicadores Agrícolas**, Brasília, 2008.
- KHANNA, H.K.E RAINA, S.K. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n.52, p.145-153, 1998.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPASPI/EMBRAPA-CNPDS, 1999, v.2, p.519-531.
- LANE, W.D.; McDOUGALD, J.M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinina and auxina. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.62, p.689-694, 1982.
- LANNES, S.D.; ZIMMER, P.D.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; VIEIRA E.A.; MAGALHÃES JUNIOR, A.M. de; KOPP, M.M.; FREITAS, F.A. Regeneração *in vitro* de anteras de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) e mapeamento de QTL associado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1355-1362, 2005.
- MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F.; DORNELLES, A.L.C.; LANGE, C.E. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, p.1947-1956, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NARAYANAN, N.N.; BAISAKH, N.; OLIVA, N.P.; VERACRUZ, C.M.; GNANAMANICKAM, S.S. ; DATTA, K.; DATTA, S.K. Molecular breeding: marker-assisted selection combined with biolistic transformation for blast and bacterial blight resistance in Indica rice (cv. CO39). **Molecular Breeding**, Netherlands, n.14, p.61-71, 2004.
- NHUT, D.T.; LE, B.V.; VAN, T.V. Somatic embriogénese and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. **Plant Physiology**, Rockville, n.157, p.559-565, 2000.
- OZAWA, K.; KAWAHIGASHI, H.; KAYANO, T. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by interation of the geneinvolved in regeneration ability of the callus. **Plant Science**, Oxford, v.165, p.395-402, 2003.
- OZAWA, K.E KAWAHIGASHI, H. Positional cloning of the nitrite reductase gene associated with good growth and regeneration ability of calli and establishment of a new selection system for Agrobacterium-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Oxford, v.170, p.384-393, 2006.
- PATHIRANA, R.; WIJITHAWARNA, W.A., JAGODA, K. & RANAWAKA, A.L. Selection of rice for iron toxicity tolerance through irradiated caryopsis culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n.70, p.83-90, 2002.
- PENG, J.Y.; HODGES, T.K. Genetic analysis of plant regeneration on in rice (*Oryza sativa* L.). **In vitro**, Heidelberg, n.25, p.91-94, 1989.
- PEREZ, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G. BARBANTE (ed) **Fisiologia Vegetal**, Campinas, 2004. Cap.9, p.251-278.
- RAINIERI, D.M.; BOTTINO, P.; GORDON, M.P. & NESTER, E.W. Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). **Bio-Tech.**, n.8, p.33-38, 1990.
- RANCE I. M.; TIAN, W.; MATHEWS, H.; KOCHKO, A.; BEACHY, R.N; FAUQUET, C. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of *indica* rice. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, n.13, p.647-651,1994.
- SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E.B., MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* gomes). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.4, p.1048-1053, jul./ago., 2007.
- TAVARES, L.F. da S.; MAGALHÃES JR., A.M. de; PETERS, J.A. Organogênese indireta de explantes de arroz da região meristemática de ápices caulinares. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.2, p.203-207, abr-jun, 2004.
- YOOKONGKAEW N.; SRIVATANAKUL, M.; NARANGAJAVANA, J. Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. indica). **Journal Plant Research**, Japan, n.120, p.237-245, 2007.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST: Sistema de análise estatística para computador**. Registrado na Secretaria Especial de Informática (SEI), sob nº 066-060 – categoria A, Pelotas, 1984