

Organogênese direta de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.)

Maristela dos Santos Rey^{1*}, Daiane Schmidt de Pinho², Anieb Prestes Vieira³, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁴, Carlos Roberto Pierobom¹ e José Antônio Peters⁴

¹Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ⁴Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ⁵Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: maris_rey@yahoo.com.br

RESUMO. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do Thidiazuron (TDZ) na regeneração *in vitro* de mesocótilos de duas cultivares de arroz. Para tal finalidade, os explantes foram inoculados em meios MS contendo diferentes concentrações de TDZ. Os resultados indicam que ocorreu um efeito significativo da concentração do regulador de crescimento em relação à taxa de regeneração e comprimento de brotações. Para a variável comprimento das brotações houve, também, uma interação entre os fatores cultivar e concentração do regulador de crescimento. Para os brotos de primeira passagem observaram-se diferenças significativas na taxa de regeneração das cultivares, bem como entre as doses e interação entre doses e cultivares. Todas as concentrações de TDZ utilizadas originaram brotações vitrificadas.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, regeneração, regulador de crescimento.

ABSTRACT. Direct organogenesis of rice (*Oryza sativa* L.) mesocoptiles. The objective of this work was to study the effect of Thidiazuron (TDZ) in the *in vitro* regeneration of rice cultivars. The explants were transferred to MS medium containing different concentration of TDZ. The results indicate that doses were significant on shoot regeneration and growth shoots. For the length of the shoots the interaction cultivar/concentration of TDZ was significant. For the shoots of first passage showing significant differences in the regeneration rate of cultivars, as well as among the concentrations and interaction these factors. All the utilized TDZ concentrations also originated vitrified shoots.

Key words: *in vitro* culture, regeneration, growth regulator.

Introdução

As respostas *in vitro* da maioria dos cereais, vêm sendo pesquisadas intensamente já há alguns anos. O arroz é uma das culturas mais estudadas, já que é fonte importante de alimento para grande parte da população mundial (SAHRAWAT; CHAND, 2001). A técnica de cultivo *in vitro* é de suma importância, já que é uma ferramenta para muitos trabalhos que envolvam biotecnologia, visto que técnicas de regeneração tornam-se indispensáveis para o sucesso em trabalhos que envolvam introdução de DNA exógeno (SALLAUD et al., 2003). Entretanto, a aplicação dos cultivos *in vitro* em engenharia genética depende da disponibilidade, repetibilidade e alta eficiência dos sistemas de regeneração de células, tecidos ou órgãos (SHARMA et al., 2007).

A capacidade de regeneração de inúmeros explantes tem sido investigada em arroz e outros cereais, envolvendo principalmente embriões (AL-FORKAN et al., 2004; TINJUANGJUN

et al., 2000), e tecidos basais (YOOKONGKAEW et al., 2007). Dentre estes explantes estão os embriões imaturos (SALLAUD et al., 2003) que são dependentes do ciclo da cultura para a sua obtenção, dificultando sua utilização o ano inteiro, tornando difícil ou às vezes, até impossível a realização de alguns estudos. 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, que podem ser obtidos em qualquer época, sem a dependência do ciclo da planta (TAVARES et al., 2004).

A regeneração de plantas está intimamente ligada ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultura, e na grande maioria das vezes, quando o objetivo é a regeneração de gemas e brotos e quebra da dominância apical, utiliza-se uma citocinina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O Thidiazuron (TDZ) é um regulador de crescimento, utilizado inicialmente como um desfolhante em

algodão (ARNDT et al., 1976 apud CHAUHAN et al., 2007), que tem sido utilizado positivamente na morfogênese *in vitro* (KHURANA et al., 2005). O TDZ é reportado como uma citocinina que facilita a proliferação de múltiplos brotos em algumas culturas (GAIRI; RASHID, 2004; SRIVATANAKUL et al., 2000), incluindo o arroz (YOOKONGKAEW et al., 2007) e outras espécies como feijão (MOHAMED et al., 2006), cevada (SHARMA et al., 2005) e trigo (SHAN et al., 2000). Em trabalho realizado por Ganesham et al. (2003) foi evidenciado o efeito positivo do TDZ na regeneração de brotações oriundas de embriões maduros, porém a citocinina não demonstrou efeito positivo na emissão de brotos oriundos de escutelos, ratificando a ocorrência de respostas adversas dependendo do tipo de explante utilizado em trabalhos de regeneração de plantas.

Este estudo tem por objetivo verificar o efeito deste regulador de crescimento sobre a taxa de regeneração, através de organogênese direta, e comprimento das brotações a partir de mesocótilos de duas cultivares de arroz, visando sua utilização em trabalhos de transformação genética.

Material e métodos

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

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

Para os experimentos de regeneração os explantes foram inoculados em meio MS em frascos de vidro de 100 mL, contendo 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e Thidiazuron (TDZ) nas concentrações 0, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da adição de 2 g L⁻¹ de gelrite (agente geleificante) e posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm. Após a inoculação dos explantes nos meios de cultura, estes foram transferidos para sala de crescimento com

temperatura de 25 \pm 1 °C, fotoperíodo de 16h e densidade de fluxo de fótons de 42 μ mol m⁻² s⁻¹.

Sete a dez dias após o início dos experimentos, quando se observava o desenvolvimento de uma única brotação, realizou-se o corte da região apical da mesma, deixando-se o explante com 0,5 a 1,0 cm 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. Após, estas foram novamente inoculadas em meio MS contendo 3 mg L⁻¹ de TDZ, nas mesmas condições de incubação e procedimentos citados acima. 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. O delineamento foi inteiramente casualizado contendo quatro repetições e 10 plantas por parcela (frascos de vidro de 100 mL). Para interpretação dos dados foi aplicado uma regressão polinomial para análise da regeneração e comprimento das brotações, calculados por meio do programa estatístico SANEST.

Resultados e discussão

Conforme resultados obtidos, a regeneração de brotações ocorreu através de organogênese direta dos mesocótilos, isto é, não houve formação de calo. Analisando-se a Tabela 1 verifica-se para a variável regeneração de brotos que apenas o fator doses de TDZ foi significativo. Já com relação ao comprimento dos brotos verificam-se diferenças estatísticas entre as doses de TDZ, bem como uma interação entre estas e as cultivares estudadas.

Tabela 1. Quadro da análise da variância para as variáveis número e comprimento de brotações de arroz, cv. BRS Taim e BRS Querência, oriundas de mesocótilos cultivados *in vitro* em meios com diferentes concentrações de thidiazuron. Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

Causas da variação	Probabilidade > F	
	Núm. de brotos	Comp. De brotos
BRS Taim/BRS Querência	0,1226	0,09788
TDZ	0,00001**	0,00001**
BRS Taim/BRS Querência* TDZ	0,21967	0,00002**
Média geral	17,88	5,72
C.V.	25,915%	21,603%

**Diferença significativa (< 0,05%).

A Figura 1 comprova que a taxa de regeneração ajustou-se em uma regressão quadrática para as duas cultivares, sendo que a emissão dos brotos obteve seu ponto máximo na dose 3,58 mg L⁻¹,

ocorrendo a partir desta concentração uma queda na regeneração de brotações.

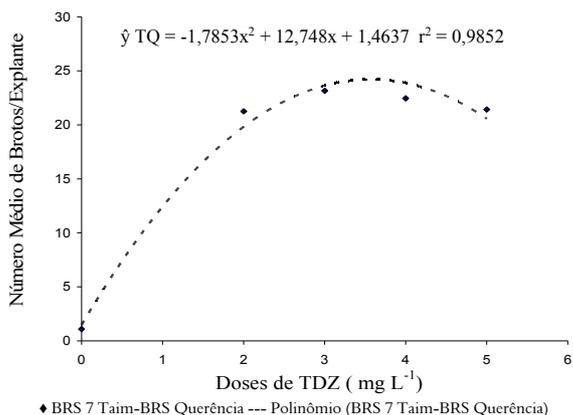


Figura 1. Número médio de brotos por explante a partir de mesocótilos de arroz das cultivares BRS Taim e BRS Querência, em função da concentração de Thidiazuron (TDZ), Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

A maior taxa de regeneração da cultivar BRS Taim ocorreu com 3 mg L⁻¹, com média de 25,57 brotos por explante. Já, para o cultivar BRS Querência, o melhor comportamento com relação a esta variável foi obtido com 4 mg L⁻¹ do regulador, com 24,35 brotações/explante (Figura 2). Entretanto, para os dois genótipos não ocorreu diferença estatística com relação às doses do regulador, porém estas diferiram significativamente da testemunha (0 mg L⁻¹).

A Figura 2 demonstra o comportamento das cultivares em relação a variável comprimento dos brotos, na qual os dados se ajustaram em regressões quadráticas. As linhas de tendência evidenciam que o comprimento de brotos foi drasticamente reduzido já com 2 mg L⁻¹ do regulador de crescimento, ocorrendo uma diminuição de 85,5% para BRS Taim e 93,7% para BRS Querência, desta concentração em relação ao tratamento testemunha.

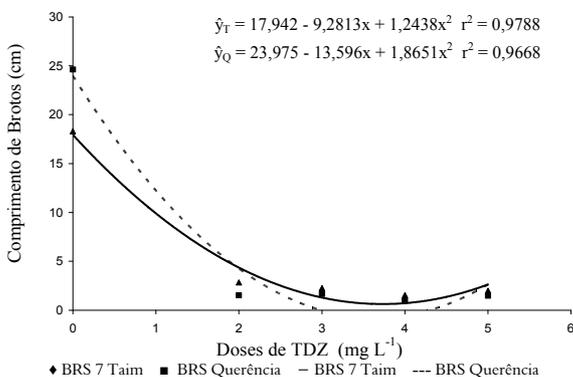


Figura 2. Curva de regressão do comprimento de brotos (cm) por explante de arroz das cultivares BRS Taim e BRS Querência, em função das doses de Thidiazuron (TDZ), Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

No entanto, a concentração que mais afetou esta variável foi com 4 mg L⁻¹, obtendo-se médias de 1,54 cm e 0,96 cm para as cultivares BRS Taim e BRS Querência, respectivamente.

Os resultados obtidos discordam de Tavares et al. (2004), que trabalhando com mesocótilos como explante, relataram resultados negativos de regeneração, quando utilizaram meio de cultura contendo TDZ, ANA, caseína, sorbitol e sacarose em regeneração da cultivar de arroz BRS Taim. Porém, em trabalho realizado por Gairi e Rashid (2004) foi evidenciado que cariópses de arroz cultivadas em meio de cultura MS contendo ANA e subsequente passagem para MS com 10 μM de TDZ, resultou em 50% de regeneração de brotos. Harshavardhan et al. (2002) relataram que 1 mg L⁻¹ de TDZ, utilizado juntamente com BAP e ANA induziu a formação de múltiplos brotos em sorgo. Já Kishore et al. (2006) relatam bons resultados de regeneração na mesma cultura, empregando apenas 0,5 mg L⁻¹ de TDZ.

Alguns trabalhos são reportados sobre o benefício do TDZ na regeneração de diferentes espécies, porém quando usado associado a outro regulador de crescimento (GAIRI; RASHID 2004; SHARMA et al., 2005; SHARMA et al., 2007; CARAMORI et al., 2001). Entretanto, conforme dados deste estudo, obtiveram-se altos índices de regeneração quando o TDZ foi usado isoladamente no meio de cultura, promovendo altas taxas de regeneração por organogênese direta a partir de mesocótilos e sem formação de calo (Figura 3).

Diferentemente dos dados deste estudo, muitos trabalhos com o uso do TDZ reportam resultados de regeneração de gramíneas via organogênese indireta, incluindo culturas como trigo, cevada e triticale (GANESHAN et al., 2006; SHAN et al., 2000; GANESHAN et al., 2003) e alguns em arroz (TAVARES et al., 2004).

O TDZ evidenciou uma maior taxa de regeneração de brotações que o regulador de crescimento BAP (dados não mostrados). No entanto, o efeito do regulador pode ser tóxico para a regeneração de brotos em doses elevadas. Os dados deste trabalho indicaram que o TDZ reduziu em 20 e 20,78% a regeneração de brotos dos genótipos BRS Taim e BRS Querência, respectivamente, quando utilizou-se concentrações mais elevadas deste regulador de crescimento (4 e 5 mg L⁻¹), denotando um efeito possivelmente tóxico do mesmo (Figura 2). Isto pode ser confirmado em estudo realizado por Chauhan et al. (2007) quando concentrações mais elevadas de TDZ tornaram-se deletérias para a regeneração de embriões imaturos de trigo. Em contrapartida, os autores afirmam ainda que o

regulador em concentrações menores pode potencializar a regeneração de brotos.

Com relação a redução do comprimento das brotações, uma hipótese seria que, doses menores que 2 mg L^{-1} pudessem reduzir esta porcentagem de inibição da altura das brotações. Esses dados concordam com Perez e Kerbauy (2004) quando estes mencionam que, quando se usa uma citocinina, o hormônio de crescimento concentra-se nas gemas laterais, promovendo seu desenvolvimento e consequentemente reduzindo a dominância apical.

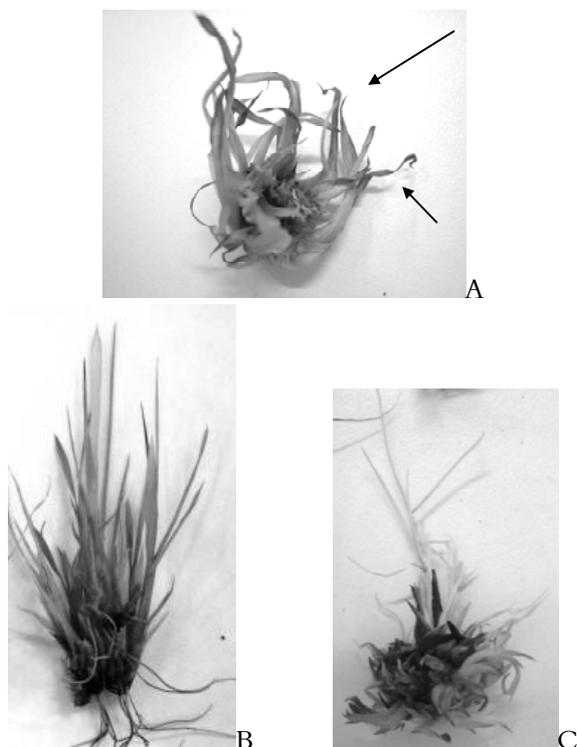


Figura 3. A - Explantes com brotações vitrificadas e com pontas enroladas; B - Explante com brotação normal; C - brotos atrofiados e aglomerados. Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

No segundo experimento foi estudada a capacidade de regeneração dos brotos primários, oriundos dos mesocótilos. Sendo seus produtos de regeneração denominados brotos de primeira passagem (BPP). Com relação as doses do TDZ na regeneração dos BPP, observou-se que ocorreu diferença estatística entre as cultivares e entre os tratamentos, ocorrendo, também, uma interação entre esses fatores (Tabela 2).

A Figura 4 indica que o comportamento distinto das duas cultivares ajustou-se em duas regressões cúbicas. As curvas demonstraram que a regeneração de BPP para as duas cultivares não manteve um aumento constante de regeneração, havendo uma queda significativa a partir do tratamento 4 mg L^{-1} , para as duas cultivares.

Tabela 2. Quadro da análise da variância da variável número de brotos de primeira passagem das cultivares BRS Taim e BRS Querência sob efeito do uso do regulador de crescimento TDZ. Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

Causas da variação	Probabilidade > F
BRS Taim/BRS Querência	0,02516**
TDZ	0,00001**
BRS Taim/BRS Querência* TDZ	0,00058**
Média geral	8,218
C.V.	20,856%

**Diferença Significativa (< 0,05%).

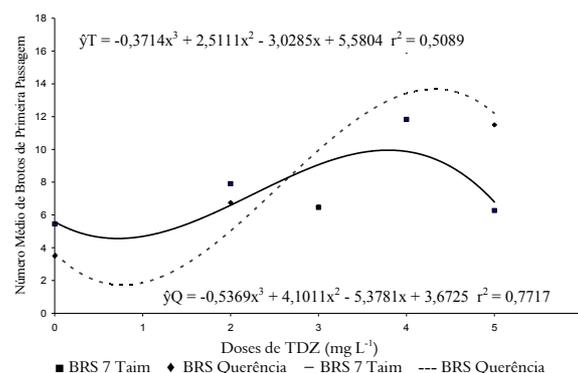


Figura 4. Curva de regressão do número médio de brotos de primeira passagem das cultivares BRS Taim e BRS Querência, em função da concentração de Thidiazuron (TDZ). Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, 2008.

A concentração 4 mg L^{-1} originou os maiores resultados de emissão de BPP, com médias de 11,83 e 16,00 brotos para BRS Taim e BRS Querência, respectivamente (Figura 4), a partir daí ocorre uma redução nos resultados desta variável. Husain et al. (2007) estudando o efeito do TDZ em uma espécie florestal, concluíram que doses maiores que $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ do regulador, reduzem em até 40% sua regeneração de brotos.

Um fator a ser mencionado, é a ocorrência de explantes com brotos vitrificadas e com as pontas enroladas nas duas etapas do experimento (dados não apresentados), em todas as doses estudadas. Também ocorreram explantes com brotações, na sua grande maioria atrofiados, senescidos, aglomerados ou com aspecto de queima (Figura 3). Este efeito provavelmente seja consequência de algum efeito fitotóxico da concentração de TDZ no meio de cultura. O surgimento de vitrificação com uso de TDZ também foi verificado por Chun-Lai et al. (2001) estudando seus efeitos na regeneração de beterraba.

Este trabalho demonstrou que o uso de TDZ, favorece a regeneração de brotos, porém, este pode ser nocivo aos explantes, quando manipulado em doses elevadas. Assim, estudos devem ser realizados para se estabelecer um protocolo de regeneração que envolva doses do regulador de crescimento que não afetem a qualidade dos explantes.

Conclusão

O TDZ é eficiente na regeneração de brotos a partir de mesocótilos de sementes recém germinadas das cultivares BRS Taim e BRS Querência, embora induza, com o aumento das concentrações utilizadas, brotações vitrificadas.

Referências

- AL-FORKAN, M.; POWER, J. B.; ANTHONY, P.; LOWE, K. C.; DAVEY, M. R. Agrobacterium-mediated transformation of Bangladeshi indica rices. **Cellular Molecular Biology Letters**, v. 9, n. 2, p. 287-300, 2004.
- CARAMORI, L. P. C.; FÁVARO, S.; VIEIRA, L. G. E. Thidiazuron as a promoter of multiple shoots in cotton explants (*Gossypium hirsutum* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 23, n. 5, p. 1195-1197, 2001.
- CHAUHAN, H.; SRINIVAS, A. D.; PARAMJIT, K. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 3, p. 191-199, 2007.
- CHUN-LAI, Z.; DONG-FANG, C.; MALCOLM, C.; ELLIOTT, A. S. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, v. 37, n. 2, p. 305-310, 2001.
- GANESHAN, S.; BAGA, M.; HARVEY, B. L.; ROSSNAGEL, B. G.; SCOLES, G. J.; CHIBBAR, R. N. Production of multiple shoots from Thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 1, p. 57-64, 2003.
- GANESHAN, S.; CHODAPARAMBIL, S. V.; BAGA, M.; BRIAN FOWLER, D.; HUCL, P.; ROSSNAGEL, B. G.; CHIBBAR, R. N. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to Thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, n. 1, p. 63-73, 2006.
- GAIRI, A.; RASHID, A. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. **Plant Cellular Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 29-33, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. parte 2, cap.6, p. 183-258.
- HARSHAVARDHAN, D.; RANI, T. S.; ULAGANATHAN, K.; SEETHARAMA, N. An improved protocol for regeneration of *Sorghum bicolor* from isolated shoot apices. **Plant Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 163-171, 2002.
- HUSAIN, M. K.; ANIS, M.; SHAHZAD, A. In vitro propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v. 43, n. 1, p. 59-64, 2007.
- KISHORE, N. S.; VISARADA, K. B. R. S.; LAKSHMI, Y. A.; PASHUPATINATH, E.; RAO, S. V.; SEETHARAMA, N. In vitro culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 174-182, 2006.
- KHURANA, P.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, S. Thidiazuron and woody plant tissue culture. **Journal of Plant Biology**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2005.
- MOHAMED, S. V.; SUNG, J. M.; JENG, T. L.; WANG, C. S. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: High efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 2, p. 187-199, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- PEREZ, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G.; BARBANTE (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 9, p. 251-278.
- SALLAUD, C.; MEYNARD, D.; VAN, B. J.; GAY, C.; BES, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 8, p. 1396-1408, 2003.
- SHAN, X. Y.; LI, D. S.; QU, R. D. Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, v. 36, n. 3, p. 207-210, 2000.
- SAHRAWAT, A. K.; CHAND, S. High-frequency plant regeneration from coleoptile tissue of indica rice (*Oryza sativa* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2001.
- SHARMA, V. K.; HANSCH, R.; MENDEL, R. R.; SCHULZE, A. J. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments. **Plant Breeding**, v. 124, n. 3, p. 242-246, 2005.
- SHARMA, V. K.; HANSCH, R.; MENDEL, R. R.; SCHULZE, J. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. **Plant Cellular Report**, v. 23, n. 1-2, p. 9-16, 2007.
- SRIVATANAKUL, M.; PARK, S.; SANDERS, J.; SALAS, M.; SMITH, R. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1165-1170, 2000.
- TAVARES, L. F. S.; MAGALHÃES, A. M.; PETERS, J. A. Organogênese indireta de explantes de arroz da região meristemática de ápices caulinares. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 203-207, 2004.

TINJUANGJUN, P.; LOC, N. T.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A.; HRISTOU, P. Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. **Molecular Breeding**, v. 6, n. 4, p. 391-399, 2000.

YOOKONGKAEW, N.; SRIVATANAKUL, M.; NARANGAJAVANA, J. Development of genotype-independent regeneration system for transformation of

rice (*Oryza sativa* ssp. indica). **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 2, p. 237-245, 2007.

Received on May 19, 2008.

Accepted on August 29, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.