

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE ISOENZIMAS DURANTE O PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ EM GRANDES PROFUNDIDADES DE SEMEADURA¹

GASPAR MALONE², PAULO DEJALMAZIMMER³, GERI EDUARDO MENEGHELLO⁴,
MARIAALICE DASILVADE CASTRO⁵, SILMAR TEICHERT PESKE⁶

RESUMO – O processo de germinação se constitui num complexo e ordenado conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos em que a semente é submetida logo após iniciar a absorção de água. A retomada do crescimento do embrião por causa da absorção de água envolve a reativação de muitas enzimas já presentes nas sementes e a sínteses de outras que irão hidrolisar as substâncias de reserva, fornecer poder oxidante, energia, entre outras, para a germinação. A emergência das plântulas nas monocotiledôneas depende, principalmente, da profundidade de semeadura, e de muitos outros fatores tais como atributos genéticos e vigor das sementes, sendo que o embrião é nutrido de forma exclusiva, pelas reservas da semente. No presente trabalho, os padrões isoenzimáticos de Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Malato Deshidrogenase (MDH), Álcool Deshidrogenase (ADH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) de 34 ecótipos de arroz vermelho e 5 cultivares comerciais foram analisados durante o processo de germinação a 20 cm de profundidade com o objetivo de identificar variações de expressão diferencial nos sistemas isoenzimáticos analisados. Os cinco sistemas isoenzimáticos analisados apresentaram variações na expressão enzimática, principalmente quando comparados os padrões observados em semente seca e em plântulas em desenvolvimento. Dos resultados obtidos conclui-se que, há um diferencial de expressão nos genes que comandam a expressão das isoenzimas Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Malato Deshidrogenase (MDH), Álcool Deshidrogenase (MDH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), nos processos de germinação de sementes de arroz.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, eletroforese, extração de proteínas.

ISOENZIMATIC DIFFERENTIAL EXPRESSION AMONG RICE SEED GERMINATION PROCESS IN GREAT DEPTH SOWING

ABSTRACT – The germination process consists of a complex and regulated group of physiologic and biochemical events that happen in the seed soon after beginning water absorption. The restart of the embryo growth due to water absorption involves the reactivation of many enzymes that will hydrolyze reserve substances, to supply redox potential and energy for germination. Plantlet emergence in monocotyledonous depends, principally, on the sowing depth and other factors such as genetic potential and seed vigor, because the embryo is nurtured by the seed stores along. In this study, isoenzymatic patterns of Esterase (EST), Acid Phosphatase (ACP), Malate Dehydrogenase (MDH), Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Glutamate Oxalacetate Transaminase (GOT) were analyzed among germination processes at 20 cm in 34 red rice ecotypes and 5 commercial cultivars with the objective of identifying differential expression variations in the isoenzymatic systems analyzed. The five isoenzymatic systems analyzed showed variations in the

¹ Submetido em 26/09/2005. Aceito para publicação em 15/11/2006.

² Geneticista, M.Sc., Doutorando em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS. Campus Universitário s/n. CEP 96010-100. Cx.Postal 354. gmalone@ufpel.edu.br

³ Eng. Agr., Dr. Prof. Adjunto. Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel.

⁴ Eng. Agr., M.Sc., Doutorando em Ciência e Tecnologia de Sementes/FAEM/UFPel.

⁵ Téc. em Química. Técnica do Laboratório de Bio Sementes/FAEM/UFPel.

⁶ Eng. Agr., Ph.D. Prof. Titular. Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel.

enzymatic expression, mainly when compared with the patterns of the dry seed with the developing plantlets. From the results obtained it was concluded that there is differential expression in the isozyme genes Esterase (EST), Acid Phosphatase (ACP), Malate Dehydrogenase (MDH), Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Glutamate Oxalacetate Transaminase (GOT), showing participation in the germination process in rice.

Index terms: *Oryza sativa*, electrophoresis, protein extraction.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) se constitui num modelo para a genética e fisiologia das Poaceas cultivadas, principalmente pelo elevado conteúdo informativo disponível (Pennisi, 2000), pela sintenia com os demais cereais (Gale e Devos, 1998) e pela variabilidade genética que possui para caracteres de importância em fisiologia de sementes (Sguarezi et al., 2003). Além disso, é uma das principais espécies agrícolas do Brasil e do Estado do Rio Grande do Sul, que atualmente é o Estado responsável por aproximadamente 50% da produção nacional deste cereal. Diante disso, o arroz é um excelente foco de pesquisa, seja pela importância econômica regional e nacional, seja pela importância para a biologia da própria espécie e dos demais cereais.

O arroz vermelho possui alta similaridade morfofisiológica, e pertence à mesma espécie botânica que o arroz cultivado, porém é uma das principais espécies de plantas daninhas para a cultura. Por ser da mesma espécie que o arroz cultivado, se caracteriza como uma importante fonte de variabilidade genética para o melhoramento do arroz e certamente para os demais cereais. Constitui-se num acervo de genes perdidos durante o processo de seleção à que o arroz cultivado foi submetido na busca de adaptabilidade e produtividade. Estudos preliminares demonstraram elevada variabilidade genética para o caráter germinação/emergência a grandes profundidades, em diferentes ecótipos de arroz vermelho (Peske et al., 1997).

Noldin (1995) identificou que a longevidade de sementes de arroz vermelho decresce, consideravelmente, quando as sementes são depositadas na superfície do solo. Assim, após a colheita do arroz, em áreas infestadas com a invasora, os produtores devem evitar a adoção de práticas de manejo do solo que provoquem o enterrio das sementes, pois estas aumentam a sua longevidade quando localizadas a maiores profundidades no solo. Nesse sentido, Helpert (1981) constatou que 12% das sementes de arroz vermelho germinaram a 12cm de profundidade, enquanto a 16 cm a germinação foi de apenas 1%. Gealy et al. (2000), testando a

emergência de diversos ecótipos de arroz vermelho em diferentes texturas de solo até 7,5cm de profundidade verificaram que todos emergiram de maneira uniforme.

As isoenzimas são produtos da expressão gênica e conseqüentemente, altamente influenciadas pelo ambiente, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos, ou ainda sob um determinado estímulo (Ramírez et al. 1991). A análise da atividade isoenzimática constitui-se em uma das técnicas de marcadores bioquímicos muito utilizados desde a década de 60. O termo isoenzima faz referência as diferentes formas moleculares (alelos) que uma determinada enzima pode apresentar, porém, reagindo sempre com o mesmo substrato (Market e Moller, 1959).

O sistema isoenzimático Esterase é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos (Scandalios, 1969). As variantes destas proteínas encontradas em plantas, por exemplo, são geralmente monoméricas ou diméricas (Weeden e Wendel, 1990), com um alto nível de variabilidade (Gillespie e Langley, 1974). Em razão disso, Esterase é um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos em plantas (Weeden e Wendel, 1990) e o mais estudado em arroz (Endo e Morishima, 1983).

A enzima Fosfatase Ácida (ACP) tem sido amplamente caracterizada em plantas, e a sua atividade aumenta em plantas que apresentam deficiência de fósforo. O incremento na atividade de ACP sob baixas concentrações de fósforo tem sido reportado para um grande número de espécies e órgãos vegetais (Barrett-Lennard et al., 1982; Duff et al., 1989; Goldstein et al., 1989; Lefebvre et al., 1990; Ueki e Sato, 1977). Desta forma, espera-se que a intensidade da expressão da enzima Fosfatase Ácida aumente conforme o conteúdo de fósforo do solo decresce e quando os requerimentos nutricionais das plântulas são maiores.

A enzima Malato Deshidrogenase (MDH) tem sido associada com a biossíntese de oxalacetato (OAA), pela interconversão do malato para oxalacetato, durante o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) em plantas (Weeden

e Wendel, 1990). Assim, MDH assume uma função importante em uma ampla variedade de reações biossintéticas, tais como síntese de aminoácidos, gluconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas (Lin et al., 2003). Contudo, espera-se que a atividade de MDH seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação onde a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento.

A enzima Álcool Deshidrogenase (ADH) é de vital função durante o ciclo da glicose em condições anaeróbicas, devido a que é encarregada pela reciclagem do NAD^+ , reduzindo o piruvato para etanol (Sachs e Freeling, 1978). O processo de acumulação de etanol envolve a oxidação de NADH e resulta na produção de pequenas quantidades de ATP, fundamental para a sobrevivência de várias espécies sob condições de anóxia (Kennedy et al., 1992).

A enzima Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) tem uma importante participação em reações de transaminação, durante a eliminação do Nitrogênio dos aminoácidos e na formação de grupos “ceto” para o Ciclo de Krebs e gluconeogênese (Tanksley, 1983). Em função de esta enzima estar diretamente envolvida no metabolismo do N, é possível que variações ocorram à medida que acontece a síntese e degradação de aminoácidos durante o processo de germinação. Sem dúvida, a enzima GOT tem uma participação fundamental no metabolismo protéico, não somente durante a germinação, mas, durante todo o ciclo de vida da planta.

Isoenzimas são marcadores de tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos (variantes) para um mesmo gene.

Nesse trabalho foram analisados os níveis e o momento de expressão das isoenzimas Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Malato Deshidrogenase (MDH), Álcool Deshidrogenase (MDH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) durante o processo de germinação das sementes em grandes profundidades de semeadura em arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biosementes do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Foram analisadas isoenzimas Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Malato Deshidrogenase (MDH), Álcool Deshidrogenase (ADH) e Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) de 34 ecótipos de arroz vermelho coletadas no estado de Rio Grande do Sul e de cinco cultivares

comerciais (IRGA 409, IRGA 410, IRGA 417, BRS – Pelota e El passo L144). Sementes de 39 amostras de arroz foram colocadas para germinar a 20cm de profundidade em casa de vegetação. A metodologia adotada foi de tubos PVC de 75mm de diâmetro, de 25cm de comprimento. Um total de 20 sementes foram colocadas para cada uma das 39 amostras e para cada época de coleta, dentro de um tubo de PVC, contendo inicialmente cinco cm de solo. Depois de colocadas as sementes, os tubos foram completados até o topo com mais 20cm de solo. Para a coleta do material, o solo foi removido, e as sementes/plântulas em processo de germinação foram coletadas, lavadas com água destilada e submetidas à extração de isoenzimas.

A extração de material vegetal para a análise isoenzimática foi realizada ao 0 (semente seca), 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a semeadura (durante o processo de germinação). O material vegetal foi macerado em gral de porcelana sobre cubos de gelo. De cada uma das amostras, 200mg do extrato vegetal foram colocados em tubo *ependorf* acrescidos de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:3 (p/v). O sistema de eletroforese vertical foi realizada em géis de poliácridamida 7%, colocando 20 μL de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Os padrões isoenzimáticos foram analisados pelo sistema de tampões descrito por Scandalios (1969). Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6°C. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10V.cm⁻¹, até que a frente de corrida, formado pelo azul de bromofenol, atingisse 9cm do ponto de aplicação. Foram utilizados os sistemas de coloração descritos por Scandalios (1969) e Alfenas (1998). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a presença/ausência, assim como a intensidade de expressão de cada banda eletroforética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos cinco sistemas isoenzimáticos utilizados para avaliar os 34 ecótipos de arroz vermelho e as cinco cultivares comerciais foi possível visualizar que houve variação significativa na intensidade da expressão isoenzimática conforme avança o processo de germinação das sementes (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Os padrões dos cinco sistemas isoenzimáticos analisados apresentaram variações na expressão. Devido ao grande número de géis de eletroforese para analisar as 39 amostras de arroz e as seis épocas de

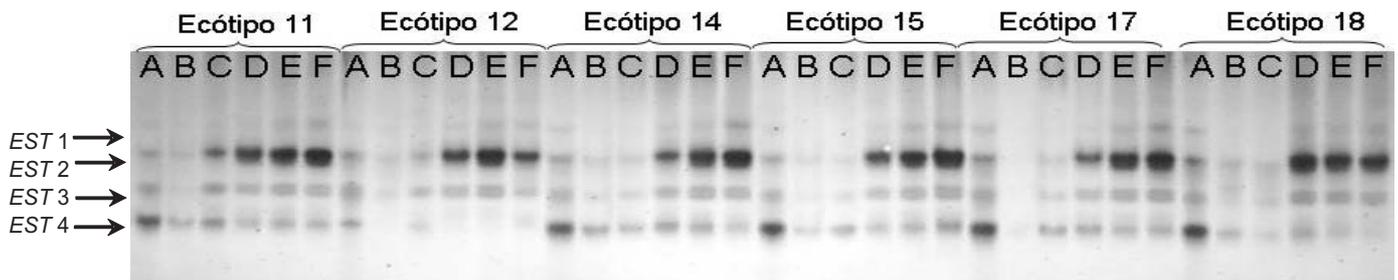


FIGURA 1. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Esterase em seis ecótipos de arroz vermelho submetidos à germinação em grandes profundidades. A- 0 dias (semente); B- 3 dias; C- 6 dias; D- 9 dias; E- 12 dias e F- 15 dias após a semeadura.

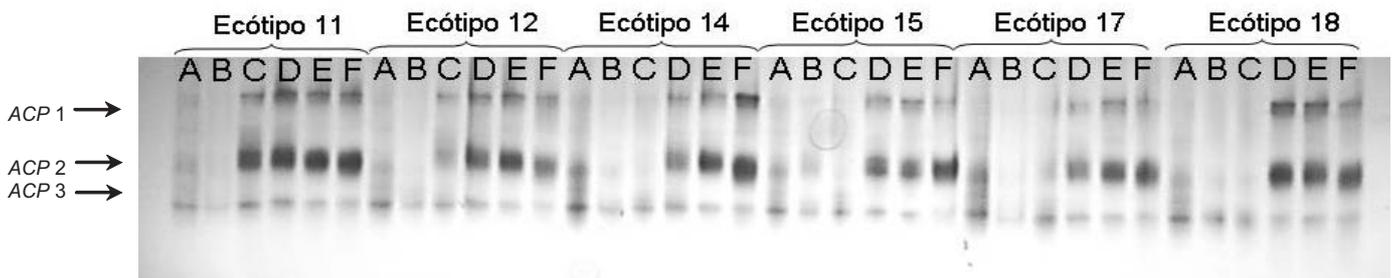


FIGURA 2. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Fosfatase Ácida em seis ecótipos de arroz vermelho submetidos à germinação em grandes profundidades. A- 0 dias (semente); B- 3 dias; C- 6 dias; D- 9 dias; E- 12 dias e F- 15 dias após a semeadura.

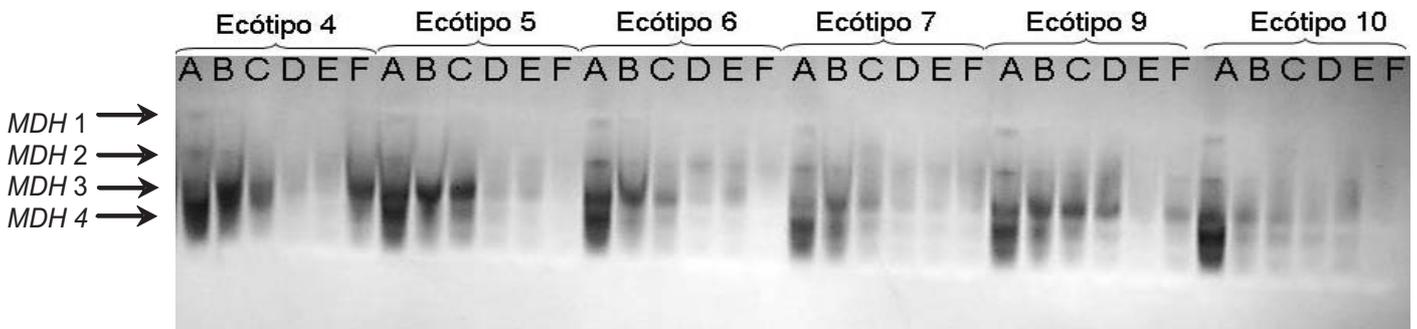


FIGURA 3. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Malato Desidrogenase em seis ecótipos de arroz vermelho submetidos à germinação em grandes profundidades. A- 0 dias (semente); B- 3 dias; C- 6 dias; D- 9 dias; E- 12 dias e F- 15 dias após a semeadura.

colheita, apenas resultados representativos são apresentados nas figuras.

Sistema isoenzimático Esterase (EST) – Analisando o padrão isoenzimático de EST foi possível identificar 4 alelos (*EST 1*, *EST 2*, *EST 3* e *EST 4*). A expressão e intensidade dos alelos variou consideravelmente na semente seca (0 dias) quando comparados aos padrões nos demais estádios de desenvolvimento (Figura 1), sendo que o alelo *EST 4* foi expresso com maior intensidade na semente seca. Por outro lado, foi possível evidenciar que existe um gradiente de expressão dos alelos *EST 2* e *EST 3*, a partir dos três dias

após a semeadura das sementes. Como exemplo, pode-se inferir de que no ecótipo 11, o alelo *EST 2* começa a ser expresso no mínimo 3 dias antes do que o mesmo alelo nos ecótipos 12, 14, 15, 17 e 18.

Sistema isoenzimático Fosfatase Ácida (ACP) – Na Figura 2 a hipótese de que a intensidade da expressão da enzima ACP aumenta à medida que diminui a concentração de fósforo inorgânico no solo pode ser confirmada, observando que a expressão de *ACP 1* e *ACP 2* é quase nula (na semente seca e aos três dias após a semeadura) e intensa (a partir dos 9 dias após a semeadura). Contudo, o alelo *ACP 3* apresentou



FIGURA 4. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Álcool Deshidrogenase em seis ecótipos de arroz vermelho submetidos à germinação em grandes profundidades. A- 0 dias (semente); B- 3 dias; C- 6 dias; D- 9 dias; E- 12 dias e F- 15 dias após a semeadura.

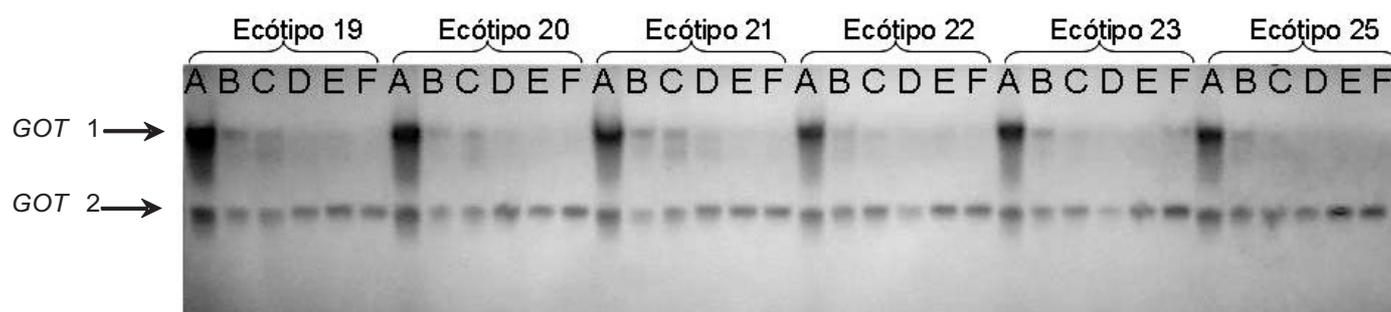


FIGURA 5. Padrão eletroforético obtido com o sistema isoenzimático Glutamato Oxalacetato Transaminase em seis ecótipos de arroz vermelho submetidos à germinação em grandes profundidades. A- 0 dias (semente); B- 3 dias; C- 6 dias; D- 9 dias; E- 12 dias e F- 15 dias após a semeadura.

expressão praticamente constante em todos os ecótipos e grau de desenvolvimento, sendo, portanto, um alelo constitutivo desta enzima. Foi possível observar também, que novamente o ecótipo 11 apresentou expressão diferencial do alelo *ACP 2* com relação aos demais ecótipos analisados expressando o alelo *ACP 2* a partir dos 6 dias após a semeadura, enquanto que os demais ecótipos somente apresentaram expressão deste alelo a partir dos 9 dias após a semeadura (Figura 2).

Sistema isoenzimático Malato Deshidrogenase (MDH) – No padrão eletroforético do sistema MDH foram observados 4 alelos, dos quais, o alelo *MDH 1*, *MDH 2* e *MDH 4* foram apenas expressos em semente seca em todos os ecótipos analisados. O alelo que apresentou maior diferencial de expressão foi o alelo *MDH 3*, sendo que no ecótipo 4, por exemplo, foi expresso aos 0, 3, 6 e 15 dias. Por outro lado, no restante dos ecótipos foi expresso apenas na semente seca, aos 3 e 6 dias após a semeadura (Figura 3). Esses resultados concordam com a hipótese de que uma maior expressão da enzima MDH esta associada com a síntese de novos tecidos nos estádios iniciais do desenvolvimento.

Sistema isoenzimático Álcool Deshidrogenase (ADH) – Durante os estágios iniciais da germinação, a degradação do amido (principal substância de reserva nas sementes de

arroz) é degradada num processo quase que totalmente anaeróbico, até que a casca da semente é rompida pela saída do eixo embrionário (Aldasoro e Nicolás, 1980). Esse processo, muitas vezes está associado à presença de solos encharcados, onde a difusão dos gases da atmosfera para a semente é limitada, fazendo com que as sementes da maioria das espécies percam rapidamente a viabilidade e não germinem (Kennedy et al., 1992). No entanto, algumas espécies, têm desenvolvido mecanismos de tolerância à anóxia (Vartapetian et al., 1978; Alpi e Beevers, 1983). Confirmando estas evidências no padrão isoenzimático para ADH foram observados dois alelos, com expressão exclusiva nas sementes secas, evidenciando que a medida que o processo de germinação avança e o processo aeróbico de geração de energia começa a ser predominante, a enzima ADH não é mais necessária (Figura 4). Os alelos *ADH 1* e *ADH 2* expressaram nas sementes secas de todos os ecótipos e cultivares analisadas, sendo que a expressão diminuiu para zero com o avanço do processo de emergência das plântulas.

Sistema isoenzimático Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT) – Para essa enzima houve a expressão de dois alelos. Um deles, o alelo *GOT 2*, expressou-se de forma constitutiva em todos os ecótipos e cultivares analisados

(Figura 5). Já, o alelo *GOT 1* apresentou padrão de expressão diferencial (Figura 5), sendo expresso intensamente na semente seca de todas as amostras analisadas. No entanto, a intensidade da expressão decresceu consideravelmente na medida em que o processo de emergência avançava. A expressão remanescente do alelo *GOT 1* pode ser atribuído ao fato de que aos 3 e 6 dias após a semeadura nem todas as sementes tinham emitido a raiz, razão de algumas sementes ainda continuarem expressando o alelo *GOT 1*. Provavelmente, o alelo *GOT 2* esteja intimamente relacionado com a degradação das proteínas de reserva da semente nos estádios iniciais da germinação, disponibilizando desta forma, o N necessário para as reações biossintéticas da germinação.

Nos cinco sistemas isoenzimáticos analisados houve padrões de expressão diferencial durante o processo de germinação das sementes em semeaduras realizadas a grandes profundidades. De uma forma geral, pode ser observado que o padrão isoenzimático expresso na semente seca (0 dias), variou em todos os sistemas protéicos analisados, quando comparado com os padrões isoenzimáticos expressos pelas plântulas em desenvolvimento. Isto pode ser atribuído ao fato de que os programas de desenvolvimento da semente seca e durante a germinação correspondem a diferentes processos de diferenciação celular e perfis de expressão gênica. Na semente seca a atividade metabólica é extremamente baixa, mantendo apenas as reações biossintéticas necessárias para a respiração celular. Já, nas plântulas em desenvolvimento durante o processo de germinação, diversas reações bioquímicas e biossintéticas são desencadeadas, tais como a intensa produção de ATP, a degradação de proteínas e polissacarídeos de reserva, a síntese de RNAm novos, a reestruturação e reparo de membranas e organelas danificadas, o que modifica consideravelmente a expressão isoenzimática.

Embora as cultivares comerciais utilizadas apresentassem maiores dificuldades de desenvolvimento em grandes profundidades, em comparação com as plântulas de arroz vermelho (dados não mostrados), a expressão isoenzimática destas respondeu ao mesmo padrão alélico e de intensidade que para os ecótipos de arroz vermelho. Isto evidencia que os genes responsáveis pela expressão das isoenzimas analisadas neste trabalho permaneceram estáveis durante o processo de seleção e melhoramento que as cultivares foram submetidas. Foi possível associar a expressão de determinados alelos com o desempenho fisiológico das amostras de arroz analisadas.

Estudos prévios, analisando os atributos fisiológicos dos mesmos 34 ecótipos de arroz vermelho utilizados neste estudo,

têm revelado uma ampla variabilidade genética para o caráter germinação em grandes profundidades, identificando constituições genéticas associadas com a capacidade de germinação das sementes em profundidades superiores a 15 cm (Peske et al., 1997; Sguarezi et al., 2003). Entre eles, o ecótipo de arroz vermelho 11, foi o que melhor comportou-se quando submetido à germinação em grandes profundidades. Consequentemente, no mesmo ecótipo foram observados padrões de expressão diferencial dos alelos *EST 2* e *ACP 2*, evidenciando participação destes alelos no processo de germinação/emergência. Estudos mais aprofundados de mapeamento genético e caracterização protéica poderão corroborar a associação destas isoenzimas no processo de germinação/emergência em grandes profundidades em arroz. A identificação e clonagem de genes que atuam no processo de germinação/emergência poderão ser de fundamental importância na obtenção de constituições genéticas mais adaptadas a germinação em grandes profundidades.

CONCLUSÕES

Há variações no padrão de expressão das enzimas EST, ACP, MDH, ADH e GOT durante o processo de germinação de sementes de arroz em maiores profundidades de semeadura.

A expressão isoenzimática das cultivares comerciais de arroz responde ao mesmo padrão alélico e de intensidade que os ecótipos de arroz vermelho durante o processo de germinação.

REFERÊNCIAS

- ALDASORO, I.; NICOLÁS, G. Fermentative products and dark CO₂ fixation during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *Phytochemistry*, Pullman, v.19, p.3-5, 1980.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1998. 574p.
- ALPI, A.; BEEVERS, H. Effects of O₂ concentration on rice seedlings. *Plant Physiology*, Rockville, v.71, p.30-34, 1983.
- BARRETT-LENNARD, E.G.; ROBSON, A.D.; GREENWAY, H. Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves. *Journal Experimental Botany*, Oxford. v.33, p.682-693, 1982.
- DUFF, S.M.G.; MOORHEAD, G.B.G.; LEFEBVRE, D.D.; PLAXTON W.C. Phosphate starvation inducible bypass of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, Rockville. v.90, p.1275-1278, 1989.

- ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.129-146.
- GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science**, Washington, v.282, n.5389, p.656-659, 1998.
- GEALY, D. R.; SALDAIN, N. E.; TALBERT, R. E. Emergence of red rice (*Oryza sativa*) ecotypes under dry-seeded rice (*Oryza sativa*) culture. **Weed Technology**, Washington, v.14, n.2, p.406-412, 2000.
- GILLESPIE, J. H., LANGLEY, C. H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, p.837-887, 1974.
- GOLDSTEIN, A.H.; BAERTLEIN, D. DANON, A. Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**. Ottawa, v.7, p.7-16, 1989
- HELPERT, C. W. **Dormancy, germination, and emergence of red rice (*Oryza sativa* L.)**. 1981, 92f. Thesis (Ph.D. Dissertation in Agronomy) – Texas A&M University, Texas.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1-6, 1992.
- LEFEBVRE, D.D.; DUFF, S.M.G.; FIFE, C.; JULIEN-INALSINGH, C.; PLAXTON, W.C. Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increase in Pi-absorption rate. **Plant Physiology**, Rockville. v.93, p.504-511, 1990.
- LIN, C.F.; JIANG, L.Z.; ZHANG, X.N.; QIAN, X.Y.; LIANG, Z.S.; YANG JS. Cloning and prokaryotic expression of a cDNA encoding a putative mitochondrial malate dehydrogenase in *Oryza sativa*. **DNA Sequence**, Cambridge v,14, n.1, p.75-7, 2003.
- MARKET, C.; F. MOLLER. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.45, p.753-763. 1959.
- NOLDIN, J. A. **Characterization, seed longevity, and herbicide sensitivity of red rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes, and red rice control in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]**. 1995. 218f. Thesis (Ph.D. Dissertation in Agronomy) – Texas A&M University, Texas.
- PENNISI, E. Stealth genome rocks rice researchers. **Science**, Washington, v.288, n.5464, p.239-241, 2000.
- PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A.; NUNES, M.M.; FERREIRA, L.H. Sobrevivência de sementes de arroz vermelho depositadas em solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.3, n.1, p.17-22, 1997.
- RAMIREZ, H.; CALDERON; A. ROCCA. W. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: ROCCA, W.; MROGINSKI, L. (Ed). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.825-856.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, Göteborg, v.161, p.111-115, 1978.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, Austin, v.3, p.37-39, 1969.
- SQUAREZI, C.N.; PESKE, S.T.; BOBROWSKI, V.L.; MOREIRA, H.L.M. Análise da qualidade fisiológica do arroz vermelho (*Oryza sativa* L.). **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p. 75, 2003.
- TANKSLEY, S.D. **Isozymes**, part b. Amsterdam: Elsevier, 1983. 472p.
- UEKI, K.; SATO, S. Regulation of phosphatase synthesis by orthophosphate in cultured tobacco cells. **Plant Cell Physiol**, Tokio, v.18, p.1253-1263, 1977.
- VARTAPETIAN, B.B.; MAZLIAK, P.; LANCE, C. Lipid biosynthesis in rice coleoptiles grown in the presence or in the absence of oxygen. **Plant Science Letters**, Perpignan Cedex, v.13, p.321-328, 1978.
- WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S (Ed.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p.46-72.

