

NOTA CIENTÍFICA**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE ARROZ EXPOSTAS AO FRIO NA FASE DE GERMINAÇÃO¹**

LILIANE MARCIA MERTZ², FERNANDO AUGUSTO HENNING², RODRIGO CASTRO SOARES²,
ROSANE FÁTIMA BALDIGA², FABRÍCIO BECKER PESKE², DARIO MUNT DE MORAES³.

RESUMO - O frio é um dos principais problemas para o cultivo do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, já que a grande maioria das cultivares em uso são de origem tropical. A ocorrência de baixas temperaturas pode causar sérios danos ao estabelecimento da lavoura, diminuindo o estande inicial e favorecendo por consequência, o estabelecimento de plantas daninhas. O objetivo desse trabalho foi avaliar alterações fisiológicas em diferentes cultivares de arroz, quando submetidos à baixa temperatura durante a fase de germinação. Foram utilizadas sementes provenientes das cultivares BRS Agrisul, BRS Chuí, Lemont e Oro, as quais foram avaliadas em relação à tolerância a baixa temperatura através do teste de frio. Para avaliação das alterações fisiológicas, realizou-se análise das isoenzimas esterase e álcool desidrogenase, nas temperaturas de 25°C (ideal a germinação) e 13°C (baixa temperatura). As demais características avaliadas foram germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo e massa seca, a 25°C e 13°C. De acordo com os resultados do teste de frio, as sementes das cultivares Lemont e Oro, foram as que melhor toleraram a baixa temperatura. Na análise isoenzimática, o frio provocou diminuição na expressão da enzima esterase e aumento na expressão da enzima álcool desidrogenase. Em relação às demais avaliações, o frio influenciou negativamente em todas as características avaliadas, principalmente nas cultivares BRS Agrisul e BRS Chuí.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, isoenzimas, eletroforese.

PHYSIOLOGICAL CHANGES IN RICE SEEDS EXPOSED TO COLD IN THE GERMINATION PHASE

ABSTRACT - Cold is one of the main problems for rice cultivation in Rio Grande do Sul because the vast majority of cultivars in use are of tropical origin. The occurrence of low temperatures combined with the susceptibility of the materials used can cause serious damage to the establishment of the crop reducing the plant stand. The objective of this study was to evaluate the physiological changes in different rice cultivars, when exposed to low temperature during germination. Seeds from

¹ Submetido em 25/06/2008. Aceito em 27/12/2008.

² Eng. Agr., Alunos do Programa de Pós-Graduação em C&T de Sementes
– FAEM/UFPeL. e-mail: lilianemertz@yahoo.com.br

³ Eng. Agr., Dr. Prof. do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/
UFPeL.

four cultivars, BRS Agrisul, BRS Chuí, Lemont and Oro were used and evaluated regarding low temperature tolerance by the cold test. To evaluate the physiological changes, isoenzyme analyses of alcohol dehydrogenase and esterase were performed at temperatures of 25 °C (ideal for germination) and 13 °C (low temperature). The other characteristics evaluated were germination, germination speed, coleoptile length and dry weight at 25 °C and 13 °C. According to cold test results, seeds of the Lemont and Oro cultivars presented better tolerance to the low temperature. In the isoenzyme analysis, the cold caused an increase in the expression of the isoenzyme alcohol dehydrogenase and reduction in the esterase isoenzyme expression. For the other ratings, the cold caused damage to all the characteristics evaluated, especially in the BRS Agrisul and BRS Chuí cultivars.

Index terms: *Oryza sativa*, cold, electrophoresis.

INTRODUÇÃO

O arroz é cultivado nas mais diversas condições ambientais, porém quando comparado a outros cereais como a aveia ou o trigo, é muito mais sensível às baixas temperaturas (Okuno, 2003).

A ocorrência de frio é um dos principais problemas para o cultivo do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, já que a grande maioria das cultivares em uso é de origem tropical. A ocorrência de baixas temperaturas, aliadas à suscetibilidade dos materiais utilizados pode causar sérios danos no estabelecimento da lavoura, diminuindo o estande inicial e favorecendo por consequência o estabelecimento de plantas daninhas (Cruz, 2001).

A produtividade do arroz irrigado no Rio Grande do Sul tem sofrido fortes oscilações ao longo dos anos, ocasionadas, fundamentalmente, pelas condições climáticas, onde a ocorrência de baixas temperaturas tem sido um dos principais fatores determinantes dessa variabilidade nos níveis de produtividade (Steinmetz et al., 1996).

A temperatura ideal para o desenvolvimento do arroz situa-se entre 25 °C e 30 °C (Yoshida, 1981). Temperaturas abaixo desse intervalo podem ocasionar um estresse por frio, o qual é considerado um dos estresses abióticos mais importantes para o arroz.

Os danos mais graves são observados no período reprodutivo (microsporogênese e florescimento). Na microsporogênese o frio ocasiona a esterilidade das espiguetas por meio da inviabilidade do pólen, enquanto no florescimento o frio prejudica a deiscência das anteras e o crescimento do tubo polínico, resultando em uma baixa fecundação das espiguetas (Yoshida, 1981; Cruz e Milach, 2000).

A resistência a baixas temperaturas é buscada nas fases

iniciais da planta (germinação/emergência e plântula), com a intenção de antecipar a semeadura e evitar que a etapa reprodutiva coincida com a época de início de frio (março), quando contornar o problema se torna mais difícil. Além disso, com a semeadura antecipada, o período reprodutivo acontece numa época de maior intensidade de radiação solar (dezembro/janeiro), favorecendo o aumento da produtividade.

Na germinação, a avaliação da tolerância ao frio tem sido feita submetendo-se as sementes a temperaturas que variam desde 10 até 25°C por períodos de três até trinta e cinco dias. As características mais comumente avaliadas são a porcentagem e a velocidade de germinação e o comprimento do coleóptilo e da radícula (Bertin et al., 1996; Sthapit e Witcombe, 1998).

As isoenzimas são produtos da expressão gênica e conseqüentemente, altamente influenciadas pelo ambiente. O termo isoenzima faz referência as diferentes formas moleculares que uma determinada enzima pode apresentar, porém, reagindo sempre com o mesmo substrato (Market e Moller, 1959). Estresses ambientais, como estresses ocasionados pela exposição de plantas ao frio, podem levar a alteração nos padrões de expressão dessas enzimas.

O sistema isoenzimático esterase é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos (Scandális, 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 Álcool Deshidrogenase (ADH) é de vital

função durante o ciclo da glicose em condições anaeróbicas, sendo encarregada pela reciclagem do NAD⁺, reduzindo o piruvato a 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 estresse (Kennedy et al., 1992).

O objetivo desse trabalho foi avaliar alterações fisiológicas que ocorrem em diferentes cultivares de arroz, quando submetidos à baixa temperatura durante a germinação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatro cultivares de arroz BRS-Agrisul, BRS-Chuí, Lemont e Oro, sendo as duas primeiras oriundas da Embrapa Clima Temperado pertencentes a subespécie *Indica*. As cultivares Lemont e Oro pertencem à subespécie *Japonica*, sendo a cultivar Lemont de origem americana e a cultivar Oro de origem chilena.

As cultivares foram avaliadas em relação à tolerância a baixa temperatura por meio do teste de frio. Para avaliar as alterações fisiológicas provocadas pelo frio, realizou-se análise das isoenzimas álcool desidrogenase e esterase, nas temperaturas de 13 °C (baixa temperatura para germinação) e 25 °C (temperatura ideal para germinação). As demais características avaliadas foram: germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo e massa seca de plântulas.

Análise de isoenzimas: as análises das isoenzimas esterase e álcool desidrogenase foram realizadas utilizando-se o sistema de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. O material vegetal foi composto de 100 sementes por cultivar, as quais foram colocadas para germinar nas temperaturas de 13°C e 25°C e coletadas em diferentes épocas (0, 1, 2, 3, 5 e 7 dias após a semeadura), utilizando-se um total de 10 sementes por cada época de amostragem. Após a coleta, as amostras foram maceradas e aproximadamente 200mg de cada extrato vegetal foi colocado em tubo um de microcentrífuga acrescentando-se solução extratora composta pelo tampão do gel (Lithium Borate 0,2M à pH 8,3 + Tris Citrato + 0,2M à pH 8,3) + 0,15% de 2-mercaptoetanol na proporção 1:2 (p/v). Utilizando cubas eletroforéticas, realizou-se a eletroforese em géis de poliacrilamida 7%, aplicando-se 20µL de cada sobrenadante coletado por amostra. Para coloração dos géis foram utilizados os sistemas descritos por Scandális (1969) e Alfenas (1998). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando

em consideração a presença/ausência, e a intensidade de expressão de cada uma das bandas.

Teste de frio: para cada cultivar, foram utilizadas três repetições de 200 sementes (12 sub-amostras de 50), as quais foram semeadas em rolos de papel toalha (*Germitest*) umedecidos. As amostras foram colocadas no interior de sacos plásticos e incubadas em temperatura constante de 10°C por um período de sete dias. Transcorrido esse período, as amostras foram colocadas em temperatura constante de 25°C, sendo a avaliação realizada ao sétimo dia onde foram contabilizadas apenas as plântulas normais seguindo os mesmos padrões do teste de germinação estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Teste de germinação: no teste de germinação foram utilizadas três repetições com oito sub-amostras de 50 sementes (400 sementes por repetição) para cada cultivar. As sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Foram utilizadas duas temperaturas de germinação, a temperatura de 25°C e uma temperatura sub-ótima 13°C. A contagem de plântulas normais foi realizada aos 14 dias após a semeadura para a temperatura de 25° C e aos 21 dias para a temperatura de 13°C.

Comprimento do coleóptilo: na avaliação do comprimento do coleóptilo foram utilizadas quatro repetições de 15 sementes para cada cultivar. As sementes foram semeadas em rolo de papel umedecido, sendo o comprimento do coleóptilo medido aos 14 dias após a semeadura para a temperatura de 25° C e aos 21 dias após a semeadura para a temperatura de 13° C. Os resultados foram expressos em mm.

Matéria seca: para a avaliação da massa seca, foram utilizadas as plântulas oriundas da avaliação de comprimento do coleóptilo, utilizando-se o mesmo número de plântulas e de repetições. As amostras foram mantidas dentro de sacos de papel, em estufa, a 60°C, por 48 horas. Em seguida, as repetições foram pesadas em balança de precisão 0,001g e o valor obtido da soma de cada amostra foi dividido pelo número de plântulas utilizadas, com os resultados expressos em mg./plântula⁻¹.

Índice de velocidade de germinação (IVG): na determinação do IVG, foram utilizadas três repetições com oito sub-amostras de 50 sementes para cada cultivar, colocadas para germinar em rolos de papel umedecidos, nas temperaturas de 13 °C e 25 °C. As avaliações foram realizadas diariamente e a germinação contabilizada assim

que a radícula apresentasse no mínimo dois milímetros de comprimento.

Análise estatística: Os resultados de avaliação de todas as características foram submetidos à análise de variância, com delineamento inteiramente casualizado. A comparação entre as médias das temperaturas dentro de cada cultivar foi efetuada pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SASM-AGRI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de frio possibilitaram classificar as cultivares com relação à tolerância ao frio na fase da germinação, sendo que as cultivares Lemont e Oro pertencentes à subespécie *Japonica*, apresentaram maior tolerância em relação às cultivares BRS Agrisul e BRS Chuí. As cultivares Oro e Lemont, mantiveram média de plântulas normais de 82% e 90% respectivamente, mesmo mediante estresse por frio (Figura 1). Em trabalho conduzido por Cruz e Milach (1999), a tolerância ao frio na germinação foi avaliada em 24 genótipos de arroz das subespécies *Indica* e *Japônica*. Os resultados demonstraram a existência de variabilidade entre os genótipos estudados, no entanto, os maiores valores de crescimento de coleótilo foram observados em alguns genótipos da subespécie *Japônica*. Alguns genótipos pertencentes à subespécie *Indica*, porém, mostraram-se similares aos da subespécie *Japônica* de tolerância intermediária. Na Califórnia, Mackill e Lei (1997) estudaram 137 cultivares de arroz classificadas nas subespécies *Indica* e *Japônica* através de marcadores moleculares RAPD com relação à tolerância ao frio no estágio de plântula. Os resultados obtidos comprovam o maior grau de tolerância das cultivares *Japônicas* em relação aos da subespécie *Indica*. Apesar disso, segundo Jennings et al. (1979), há algumas cultivares da subespécie *Indica* provenientes de regiões de latitude elevada, como Nepal, que apresentam tolerância moderada ao frio, sendo uma boa alternativa ao uso de cultivares *Japônicas*.

Com relação às alterações fisiológicas ocorridas em decorrência do frio, pôde-se constatar que o estresse ocasionado pelas baixas temperaturas provocou prejuízos à germinação em todas cultivares avaliadas (Figura 2). No entanto, as cultivares Lemont e Oro mantiveram taxas de germinação acima de 70% confirmando a maior tolerância. Para as cultivares BRS Agrisul e BRS Chuí, as taxas de germinação foram reduzidas a valores próximos de zero (6% e 1% respectivamente).

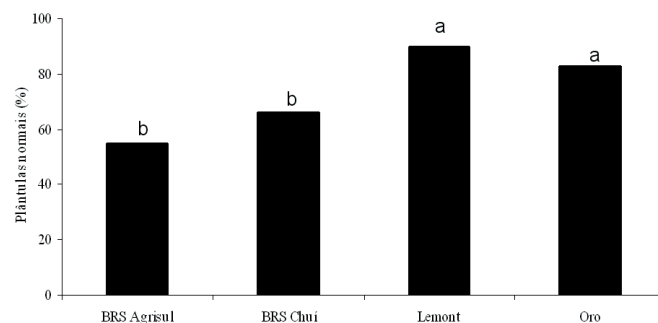


FIGURA 1. Porcentagem média de plântulas normais obtidas pelo teste de frio em sementes de arroz de diferentes genótipos.

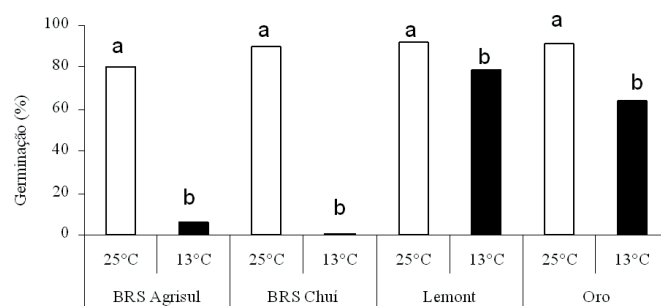


FIGURA 2. Porcentagem de germinação de sementes de arroz de diferentes genótipos, nas temperaturas de 25°C e 13°C.

No teste de IVG, o frio induziu uma redução drástica na velocidade da germinação, mesmo nas cultivares que se mostraram mais tolerantes (Figura 3). No estágio de germinação, os sintomas de danos pelo frio mais comumente observados, são o atraso e a diminuição na porcentagem de germinação. Durante o estágio de plântula, o frio pode provocar atraso no desenvolvimento, redução na estatura e amarelecimento das folhas. No período reprodutivo, os sintomas de dano pelo frio são má inserção da panícula, esterilidade e manchas nas espiguetas (Souza, 1990).

Assim como os demais parâmetros avaliados, os valores de comprimento do coleótilo e de matéria seca de plântulas também se mostraram reduzidos na temperatura de 13°C (Figuras 4 e 5).

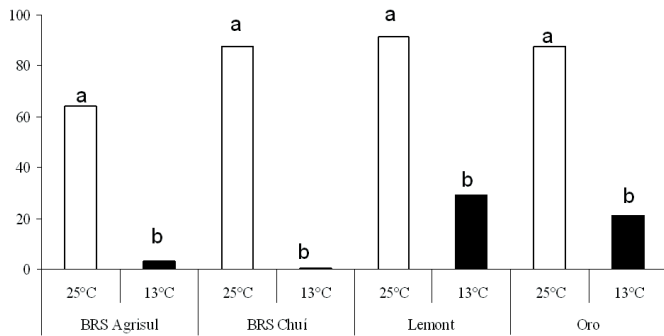


FIGURA 3. Índice de velocidade de germinação de sementes de arroz de diferentes genótipos, nas temperaturas de 25°C e 13°C.

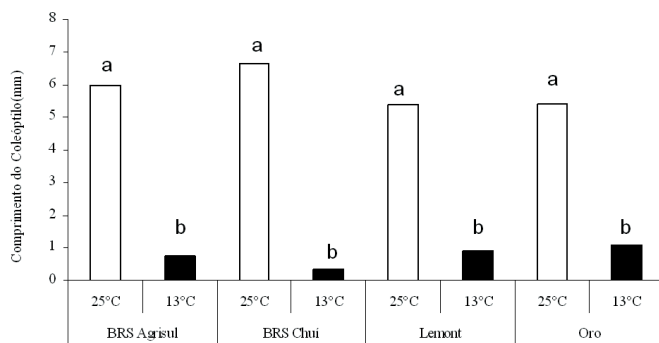


FIGURA 4. Comprimento de coleótilo de plântulas de arroz, de diferentes genótipos, nas temperaturas de 25°C e 13°C.

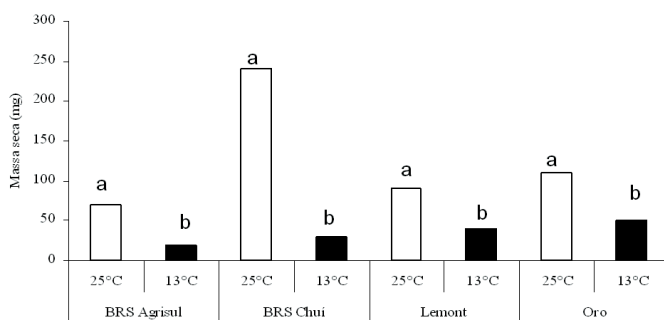


FIGURA 5. Massa seca de plântulas de arroz, de diferentes genótipos, nas temperaturas de 25°C e 13°C.

Pelos padrões isoenzimáticos da enzima esterase foi possível observar a presença de dois alelos. No alelo 1,

verificou-se uma redução acentuada da expressão desta enzima em sementes de arroz expostas ao frio (Figura 6). A enzima esterase participa de reações de hidrólise de ésteres e, portanto, atua diretamente no metabolismo de lipídeos. Brandão Junior et al. (1999) observaram a diminuição do número e intensidade de bandas de esterase com a perda da viabilidade das sementes. No entanto, em trabalho conduzido por Cruz et al. (2007), avaliando o comportamento dessa enzima em sementes de milho, observaram maior intensidade das bandas a 10°C do que a 25°C, provavelmente devido a um metabolismo mais acelerado em temperaturas ótimas, sugerindo que os materiais de reserva já haviam sido metabolizados aos sete dias da germinação, o que provavelmente não ocorreu aos 14 dias na temperatura de 10°C. O mesmo pode ter ocorrido nesse trabalho, onde a temperatura de 13°C provocou uma diminuição no metabolismo fazendo com que a expressão dessa enzima inicia-se apenas ao sétimo dia do teste de germinação, enquanto que, na temperatura ideal, já foi possível observar uma maior intensidade das bandas ao terceiro dia da germinação. O sistema esterase, se apresenta como uma provável ferramenta na seleção de cultivares de arroz tolerante ao frio. Neste sistema isoenzimático, dois locos, o *Est-2* e *Est-3* já foram associados à tolerância ao frio em arroz (Majumder et al., 1989; Nagamine e Nakagahra, 1991). No primeiro, o alelo *Est-20* foi encontrado em genótipos tolerantes e os alelos *Est-21* e *Est-22* em sensíveis, independente da subespécie a que pertenciam. Além disso, o padrão isoenzimático identificado variou conforme o estágio de desenvolvimento em que o genótipo se mostrava tolerante, sendo identificado o alelo *Est-20* no estágio vegetativo onde havia tolerância ao frio e o alelo *Est-22* no estágio reprodutivo, onde era sensível (Majumder et al., 1989).

Na Figura 7, observa-se o resultado da enzima álcool desidrogenase. A referida enzima atua no metabolismo anaeróbico, reduzindo acetaldeído a etanol e oxidando NADH a NAD⁺ (Bray et al., 2000). A temperatura de 13°C induziu o aumento na atividade dessa enzima em comparação à temperatura de 25°C. Estudos relacionados à atividade da enzima álcool desidrogenase em resposta ao frio, sugerem que o etanol seria responsável pela manutenção da fluidez da membrana plasmática em condições de estresse por frio. Em plântulas de arroz expostas à baixa temperatura, ocorre rápido incremento na expressão do gene que codifica para enzima álcool desidrogenase (Christie et al., 1991; Minhas e Grover, 1999). A álcool desidrogenase é uma enzima envolvida na fermentação alcoólica, em resposta a uma condição de anaerobiose. Estudos conduzidos por Kato-Noguchi

e Yasuda (2007) indicam que o frio induz a fermentação alcoólica em raízes e plântulas de arroz, levando a produção de etanol. O etanol é conhecido por prevenir a degradação de lipídios em membranas e por promover o aumento na fluidez

dos lipídeos dessa camada, o que sugere que, a produção de etanol através de fermentação alcoólica pode conduzir a uma adaptação das plântulas de arroz a baixas temperaturas, alterando as propriedades físicas dos lipídios de membrana.

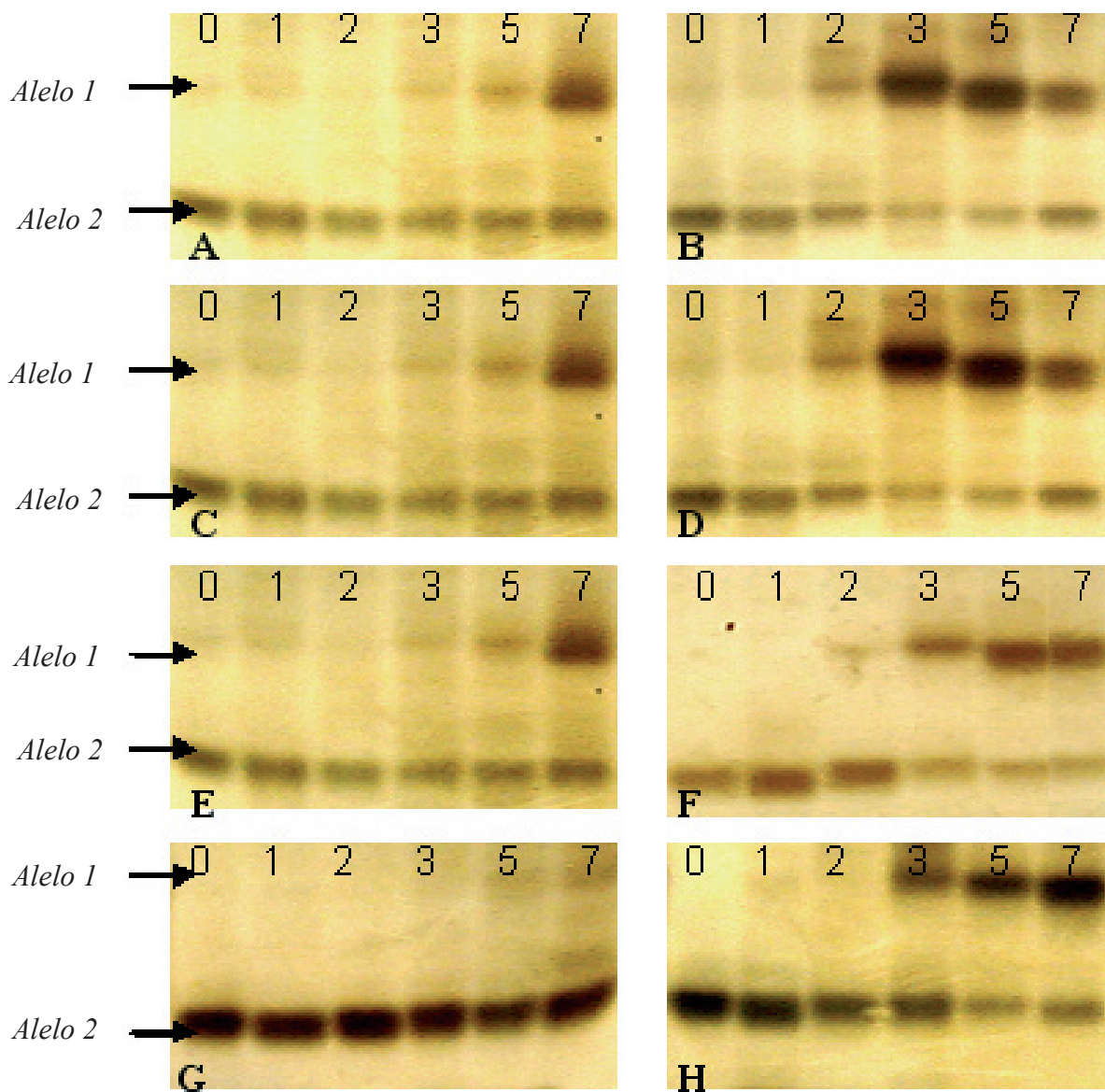


FIGURA 6. Padrões eletroforéticos da enzima esterase, em sementes de quatro genótipos de arroz, germinadas nas temperaturas de 13°C (baixa temperatura) e 25°C (temperatura ideal), em diferentes épocas (0, 1, 2, 3, 5 e 7 dias após a sementeira). A-BRS Agrisul 13°C; B-BRS Agrisul 25°C; C-BRS Chuí 13°C; D – BRS Chuí 25°C; E-Lemont 13°C; F-Lemont 25°C; G-Oro13°C; H-Oro 25°C.

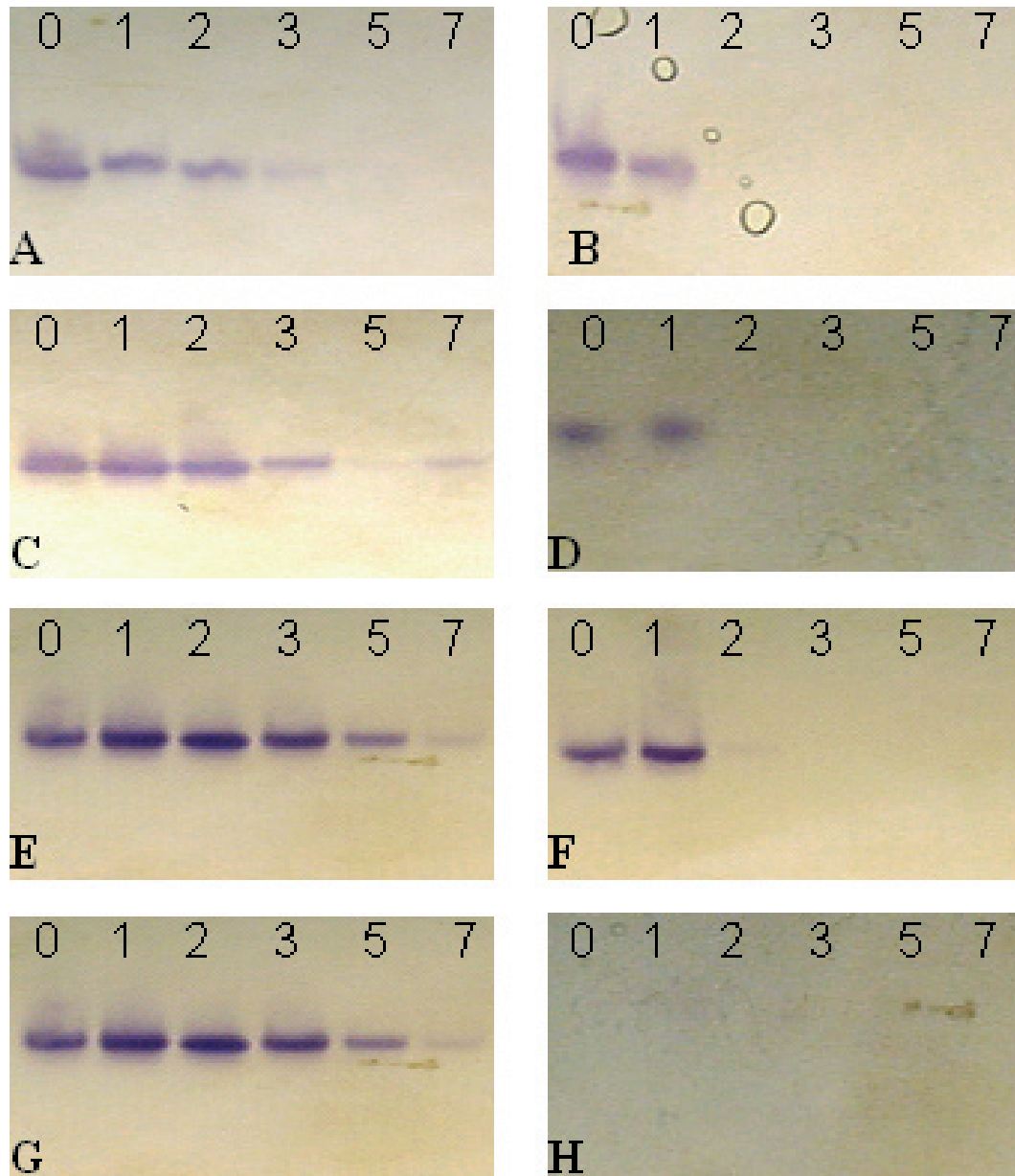


FIGURA 7. Padrões eletroforéticos da enzima álcool desidrogenase, em sementes de arroz de diferentes genótipos, germinadas nas temperaturas de 13°C (baixa temperatura) e 25°C (temperatura ideal). A-BRS Agrisul 13°C; B-BRS Agrisul 25°C; C-BRS Chuí 13°C; D – BRS Chuí 25°C; E-Lemont 13°C; F-Lemont 25°C; G-Oro13°C; H-Oro 25°C. Pelotas, UFPel – 2007.

As baixas temperaturas induzem a peroxidação dos lipídeos da membrana fazendo com que a membrana passe de uma forma mais líquida para uma fase de gel (Uemura e Yoshida, 1986; Feng et al., 2000). O incremento na concentração de etanol promove o aumento da fluidez das membranas, prevenindo essa transição da fase líquida para

fase de gel, o que levaria a uma maior tolerância ao frio (Frenkel e Erez, 1996; Saltveit et al., 2004).

CONCLUSÕES

O frio influencia negativamente a germinação de

sementes e o desempenho inicial de plântulas de arroz.

As cultivares Lemont e Ouro são mais tolerantes ao frio que as cultivares BRS Agrisul e BRS Chuí.

O frio provoca aumento na expressão da enzima álcool desidrogenase e diminuição da enzima esterase, tornando-as promissoras para estudos de mecanismos relacionados à tolerância ao frio.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

BERTIN, P.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. **Euphytica**, v.89, p.201-210, 1996.

BRANDÃO-JUNIOR, D.S.; CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C. Variações eletroforéticas de proteínas e isoenzimas relativas à deterioração de sementes de milho envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.114-121, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 1992.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1203

CHRISTIE, P.J.; HAHN, M.; WALBOT, V. Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings. **Plant Physiology**, v.95, p.699-706, 1991.

CRUZ, H.L.; FERRARI, C.S.; MENEGHELLO, G.E.; KONFLANZ, V.; ZIMMER, P.D.; VINHOLES, P.S.; CASTRO, M.A.S. Avaliação de genótipos de milho para semeadura precoce sob influência de baixa temperatura. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.1, p.52-60, 2007.

CRUZ, R.P. **Bases genéticas da tolerância ao frio em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2001. 155f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Avaliação de genótipos de arroz quanto à tolerância ao frio na germinação. In: REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária, 1999. p.42-44

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.909-917, 2000.

ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.129-146.

FENG, A.L.; TANG, X.; WANG, X. Changes of microsomal membrane properties in spring wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) exposed to enhanced and ultraviolet-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v.57, n.1, p.60-65, 2000.

FRENKEL, C.; EREZ, A. Induction of chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings by endogenous and applied ethanol. **Plant Physiology**, v.96, p.593-600, 1996.

GILLESPIE, J. H.; LANGLEY, C. H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, v.76, p.837-887, 1974.

JENNINGS, P.R.; COFFMAN, W.R.; KAUFFMAN, H.E. **Rice improvement**. Los Baños : International Rice Research Institute, Philippines, Cap. 10: Temperature tolerance: p.183-186, 1979.

KATO-NOGUCHI, H.; YASUDA, Y. Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1013-1018, 2007.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, v.100, p.1-6, 1992.

MACKILL, D.J.; LEI, X. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Science**, v.37, p.1340-1346, 1997.

MAJUMDER, M.K.; SESHU, D.V.; SHENOY, V.V. Implication of fatty acids and seed dormancy in a new screening procedure for cold tolerance in rice. **Crop Science**, v.29, p.1298-1304, 1989.

MARKET, C.; F. MOLLER. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.45, p.753-763, 1959.

MINHAS, D.; GROVER A. Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. **Plant Science**, v.146, p.41-51, 1999.

NAGAMINE, T.; NAKAGAHARA, M. Genetic control of chilling injury in rice seedlings detected by low-temperature treatment. In: INTERNATIONAL RICE GENETICS

- SYMPOSIUM, 2., 1991, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1991. p.737-739
- OKUNO, K. Genetics and molecular biology research on cold tolerance of rice. In: INTERNATIONAL TEMPERATE RICE CONFERENCE, 3., 2003, Punta del Este. Symposias and conferences. Punta del Este: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuárias, 2003. 1 CD-ROM.
- 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.
- SALTVEIT, M.E.; PEISER, G.; RAB, A. Effect of acetaldehyde, arsenite, ethanol, and heat shock on protein synthesis and chilling sensitivity of cucumber radicles. **Plant Physiology**, v.120, p.556-562, 2004.
- SCANDÁLIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v.3, n.1, p.37-79, 1969.
- SOUZA, P.R. Alguns aspectos da influência do clima temperado sobre a cultura do arroz irrigado, no sul do Brasil. **Lavoura Arrozeira**, v.43, n.389, p.9-11, 1990.
- STEINMETZ, S.; INFELD, J.A.; MALUF, J.R.T.; SOUZA, P.R. de; BUENO, A.C. **Zoneamento agroclimático da cultura do arroz irrigado no estado do Rio Grande do Sul**: recomendação de épocas de semeadura por município. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. 30p. (EMBRAPA-CPACT. Documentos, 19)
- STHAPIT, B.R.; WITCOMBE, J.R. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. **Crop Science**, v.38, p.660-665, 1998.
- UEMURA, M.; YOSHIDA, S. Studies on freezing injury in plant cells. II. Protein and lipid changes in the plasma membranes of Jerusalem artichoke tubers during a lethal freezing in vivo. **Plant Physiology**, v.80, p.187-195, 1986.
- 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
- YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: The International Rice Research Institute, 1981. p.269