

DISTRIBUIÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE TÁXONES DO GÉNERO *AVENA* L.

José Carlos Costa, Avelino Balsinhas, Fernanda Cabral & Ildio Moreira
Instituto Superior de Agronomia, 1349-017, Lisboa. PORTUGAL

Costa, J. C., Balsinhas, A., Cabral, F. & Moreira, I. (2000).
Distribuição e caracterização isoenzimática de *taxa* do género
Avena L. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 373-386.

A prospecção efectuada em 270 searas de Portugal continental permitiu elaborar mapas de distribuição de *Avena strigosa* Schreber, *A. barbata* Pott ex Link s.l., *A. fatua* L., *A. sterilis* L. subsp. *sterilis*, *A. sterilis* subsp. *ludoviciana* (Durieu) Nyman, *A. sativa* L. subsp. *macrantha* (Hackel) Rocha Afonso, *A. byzantina* C. Koch e *A. x haussknechtii* Nevesky. A contagem do número de cromossomas da *A. x haussknechtii* mostrou $2n = 42$. A electroforese em gel de poliácridamida de folhas de carboxilesterase, fosfatases ácidas e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) permitiu separar *A. sativa*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* e *A. x haussknechtii* por apresentarem perfis isoenzimáticos diferentes entre si com bandas características. Os aspectos morfológicos e bioquímicos da *A. x haussknechtii* mostraram-se intermédios entre a *A. sativa* e *A. sterilis*. Este híbrido natural também apresentou maior polimorfismo isoenzimático.

Palavras-chave: *Avena*, *A. barbata*, *A. fatua*, *A. x haussknechtii*, *A. ludoviciana*, *A. sativa*, *A. sterilis*, *A. strigosa*, carboxilesterase, distribuição, electroforese, fosfatase ácida, glutamato oxaloacetato transaminase.

Costa, J. C., Balsinhas, A., Cabral, F. & Moreira, I. (2000).
Distribution and isoenzymatic differentiation of *Avena* L.
taxa. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 373-386.

The maps of distribution of *Avena strigosa* Schreber, *A. barbata* Pott ex Link s.l., *A. fatua* L., *A. sterilis* L. subsp. *sterilis*, *A. sterilis* L. subsp. *ludoviciana* (Durieu) Nyman, *A. sativa* L. subsp. *macrantha* (Hackel) Rocha Afonso, *A. byzantina* C. Koch and *A. x haussknechtii* Nevesky in continental Portugal were made searching 270 crop fields. The chromosome number of *A. x haussknechtii* is $2n = 42$. The results obtained by the use of polycrylamide gel

electrophoresis (PAGE) of *A. sativa*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* and *A. x haussknechtii* of three foliar enzymatic systems: acid phosphatase, esterase and glutamate oxaloacetate transaminase are presented. The observation of the zymogrammes for each individual and diagrammes obtained from the analysis of isoenzyme banding patterns have shown great differences between the three *taxa*. *A. x haussknechtii* shows an intermediate pattern distribution of isoenzyme banding between *Avena sativa* and *A. sterilis* reinforcing it is a natural hybrid between these two *taxa*.

Keywords: *Avena*, *A. barbata*, *A. fatua*, *A. x haussknechtii*, *A. ludoviciana*, *A. sativa*, *A. sterilis*, *A. strigosa*, distribution, electrophoresis, carboxilesterase, acid fosfatase, glutamate oxaloacetate transaminase.

INTRODUÇÃO

Em Portugal reconhecem-se os seguintes táxones do género *Avena* L.: *A. longiglumis* Durieu (2n = 14), *Avena strigosa* Schreber (2n = 14), *A. barbata* Pott ex Link subsp. *barbata* (2n = 28), *A. barbata* subsp. *lusitanica* (Tab. Morais) Romero Zarco (2n = 14), *A. fatua* L. (2n = 42), *A. sterilis* L. subsp. *sterilis* (2n = 42), *A. sterilis* L. subsp. *ludoviciana* (Durieu) Nyman (2n = 42), *Avena sativa* L. subsp. *macrantha* (Hackel) Rocha Afonso (2n = 42), *A. byzantina* C. Koch (2n = 42) e *A. x haussknechtii* Nevesky (FRANCO & ROCHA AFONSO 1998). *A. sativa*, *A. byzantina*, *A. strigosa* são cultivadas ou foram até há alguns anos atrás, enquanto as restantes surgem como ruderais ou infestantes das searas.

COSTA (1988), baseando-se em caracteres morfológicos de sementes maduras, assinalou, no continente português, para *A. sterilis* subsp. *sterilis* seis tipos morfológicos correspondentes a três variedades [var. *calvescens* Trab. & Thell, var. *maxima* Pérez Lara e var. *setosissima* Malzew], para *A. sterilis* subsp. *ludoviciana* seis tipos morfológicos respeitantes a três variedades [var. *sterilis*, var. *glabrescens* (Dur.) Malzew e var. *psilantha* (Thell.) Malzew] e para *A. fatua* sete tipos morfológicos para igual número de variedades [var. *pilosissima* Gray, var. *glabrata* Peterm., var. *intermedia* (Lestib.) Leg. & Court., subsp. *septentrionalis* Malzew var. *valdipilosa*, var. *pilosa* Syme, var. *cinerea* Prant e var. *superba* Prant]. Assim, as observações morfológicas mostraram a existência de uma variação fenotípica destas infestantes das searas.

Contudo os métodos morfológicos usam fenótipos relativamente distantes da informação genética e influenciáveis pelo ambiente e estado de desenvolvimento da planta. As enzimas, por seu turno, são produtos quase directos dos genes, não sendo, em princípio afectadas por condições externas. A ampla distribuição geográfica e ecológica, assim como a variabilidade dos caracteres morfológicos pode manifestar a possibilidade de existência de várias formas genéticas

(MALAZEW 1930, TABORDA DE MORAIS 1936, 1939, THURSTON 1957, MAILLET 1980, GARCIA-BAUDIN *et al.* 1981). Em estudos sobre populações de plantas do género *Avena*, foi destacado a circunstância da variabilidade obtida a partir de “marcadores bioquímicos” ser superior à obtida com recurso a “marcadores morfológicos”(MARSHALL & ALLARD 1969, 1970). A electroforese de proteínas e enzimas tem sido utilizada com frequência no estudo do grau de diversidade genética entre espécies de um mesmo género e o estabelecimento de uma relação evolutiva entre elas (ALMGARD & CLAPHAM 1975, DARMENCY 1982). Em Espanha, CADAHIA & GARCIA-BAUDIN (1978) e CADAHIA *et al.* (1980), obtiveram, através de electroforese, diferenciação de proteínas totais e de isoenzimas de *A. fatua*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* e *A. sterilis* subsp. *ludoviciana*. As aveias hexaplóides ($2n = 42$) são plantas autogâmicas (JAIN & MARSHALL 1974, AUJAS & DARMENCY, 1984), mas não exclusivamente, pois foi verificada uma percentagem de alogamia (THURSTON 1957) que podia chegar aos 6% em *A. sativa* (JENSEN 1961) e aos 12% em populações naturais de *A. fatua* (IMAM & ALLARD 1965). Existe pois a possibilidade, ainda que remota, de híbridos interespecíficos entre espécies hexaplóides, como foi observado entre *A. sativa* e *A. sterilis* numa taxa de 3 a 11% (SHORTER *et al.* 1978), entre *A. sativa* e *A. fatua* com uma taxa 2 a 10 % (BAUM, 1969) e entre *A. sterilis* e *A. fatua* numa taxa 1 a 5% (SHORTER *et al.* 1978). Como evidenciaram numerosos trabalhos citados por CABRAL (1990), a electroforese de isoenzimas constitui um instrumento analítico de grande eficácia, funcionando aquelas como excelentes marcadores em estudos sistemáticos e de identificação e caracterização de genótipos, servindo de precioso apoio à caracterização morfológica em que as interacções são do tipo dominante/recessivo, obrigando a cruzamentos-testes a fim de poder distinguir os vários genótipos através da observação da descendência, contrariamente ao que sucede com as isoenzimas, que estando sob o controlo de alelos codominantes, vão permitir distinguir indivíduos homocigóticos em qualquer geração, dada a identidade entre genótipo e fenótipo. Os modelos electroforéticos de isoenzimas têm sido utilizados com sucesso na identificação de híbridos sexuais (GATES & BOULTER 1979; SCHIAVO *et al.* 1980, TANKSLEY & JONES 1981).

Neste trabalho, apresenta-se, em primeiro lugar, a distribuição dos diversos táxones e o grau de infestação nos campos cerealíferos de Portugal continental e procura-se a caracterização do polimorfismo de isoenzimas foliares numa população mista *A. sativa*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* e respectivo híbrido *A. x haussknechtii*. A contagem do número de cromossomas deste híbrido também foi efectuada.

MATERIAL E MÉTODOS

A prospecção de campo efectuou-se entre 1982 e 1987 em 270 searas (155 de trigo, 45 de aveia, 22 cevada hexástica, 9 de cevada dística, 13 de centeio, 3 de triticales, 1 de tremoceiro e 21 pousios) de todo país, com excepção dos Distritos

de Viana do Castelo e Viseu, cuja localização se encontra em COSTA *et al.* (1988). Em cada local, numa área de cerca de 200m², recolhiam-se ao acaso 40 inflorescências, que foram guardadas individualmente para medição das glumas e da lema, contagem do número de flores, necessárias à identificação efectuada através das chaves dicotómicas de ROCHA AFONSO (1980). Consideraram-se três graus de infestação: ocasional (até 10 espiguetas por 100 m²), frequente a importante (10-50 espiguetas por 100 m²) e muito importante (mais de 50 espiguetas por 100 m²).

Semearam-se no Outono 1986 na Tapada da Ajuda, 100 cariopses de *A. x haussknechtii* colhidas em 10/5/1985 numa seara de aveia instalada na Terra Grande situada, também, na Tapada da Ajuda. Em 1991, voltou-se a efectuar uma nova sementeira.

Contaram-se os cromossomas de *A. sativa*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* e *A. x haussknechtii* em esfregaços de raízes obtidas a partir de cariopses germinadas em caixas de Petri à temperatura de 25°C e um fotoperíodo de 14 h de dia e 10 h de noite numa câmara climatizada, durante 3-4 dias. As sementes foram colhidas na seara acima referida na Tapada da Ajuda. Quando as raízes atingiram 1cm de comprimento foram cortadas e colocadas em água a 4°C durante 24 h no sentido de maximizar as células em c-metáfase, sendo posteriormente fixadas em etanol acético para posterior determinação do número de cromossomas em células metafásicas. O método de Feulgen e Rossenbeck foi usado para a visualização dos cromossomas ao microscópio óptico.

Como CADAHIA *et al.* (1980) e VECCHIO *et al.* (1982) obtiveram bons resultados com folhas de *Avena* spp., optou-se por este material para a electroforese. Assim semearam-se cariopses de *Avena sativa*, *A. sterilis* subsp. *sterilis* e *A. x haussknechtii* na Tapada da Ajuda, que cresceram numa câmara de vegetação climatizada à temperatura constante 27° C e um fotoperíodo de 16 h dia / 8 noite até às 6-7 folhas expandidas. Cortaram-se os limbos das folhas frescas pertencentes a plantas no mesmo estado vegetativo. Maceraram-se e homogeneizaram-se 250 mg de folhas frescas com 1 ml do meio de extracção e 100 mg de polivinilpirrolidona insolúvel, seguindo-se uma centrifugação durante 15 minutos a 14000 r.p.m. para utilização do sobrenadante para migração electroforética. Estas operações de extracção, desde a maceração até à centrifugação, decorreram no frio a uma temperatura entre 0° e 4° C. A electroforese de isoenzimas foliares em gel de poliacrilamida, segundo a técnica descontínua de ORNSTEIN (1964) e DAVIS (1964), modificada por LAEMMLI (1970) foi efectuada com um sistema electroforético vertical com recurso a um banho termorregulador e com refrigeração. A migração electroforética realizou-se sob condições nativas com a temperatura variando 0 e 4° C utilizando uma diluição de 11% de um tampão tris-glicina a pH 8. A quantidade de sobrenadante utilizada para cada amostra na migração foi de 50 µl. Cada migração electroforética durou cerca de 3 h 30 m, aplicando-se uma intensidade

de corrente eléctrica de 150 mA. A visualização da frente de migração obteve-se através da adição ao tampão de migração de 1 µl do corante de referência azul de bromofenol. Os sistemas isoenzimáticos utilizados foram: carboxilesterase, fosfatase ácida e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT). A carboxilesterase foi revelada pela técnica proposta por MARKERT & HUNTER (1959). A revelação da fosfatase ácida realizou-se segundo o método de SCANDALIOS (1969). Para a revelação da GOT utilizou-se a técnica proposta por SCHWARTZ *et al.* (1963). Os géis foram medidos por inspecção visual, complementada pela leitura num densitómetro. Os valores de Rf foram calculados para cada banda usando a fórmula de MITTAL *et al.* (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

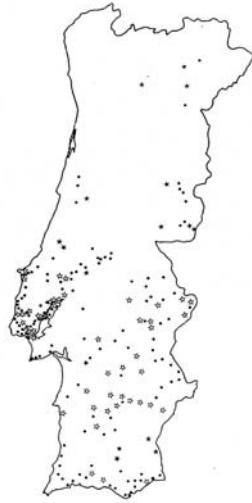
Em relação à prospecção efectuada e às medições da lema e gluma constatou-se que na Província Cantabro-Atlântica (Região Eurosiberiana) (COSTA *et al.* 1999) as espécies do género *Avena* não ocorreram em searas, com a excepção da *A. barbata s.l.* encontrada ocasionalmente (mapas 1, 2, 3, 4, 5, 6). Não se observou *A. longiglumis* e *A. byzantina* em searas e pousios.

A. sterilis subsp. *sterilis* foi o táxone mais representado com uma frequência de 68% nas searas, não tendo ocorrido na Terra Fria, e que surgiu com elevados graus de infestação especialmente no sul do país; foi a única espécie assinalada no SE de Portugal (mapa 1). Estes resultados estão de acordo com os de GARCIA-BAUDIN & SALTO (1979) para Espanha; contudo DORDIO (1970) observou este táxone na Beira Alta.

A. sterilis subsp. *ludoviciana* apareceu quase sempre ocasionalmente, e só raramente com grau elevado de infestação, em quase todo o país com a excepção do interior do Alentejo com uma frequência de 11 % (mapa 2). DORDIO (1970) só tinha anotado este táxone na Estremadura, Beira Litoral e Douro Litoral. Em França, BARRALIS (1961) constatou a distribuição atlântica da *A. sterilis* subsp. *ludoviciana* e mediterrânica para *A. sterilis* subsp. *sterilis*, o que está de acordo com esta prospecção.

Em muitos dos locais apareciam populações das duas subespécies de *A. sterilis* (gráfico 1), contudo no Oeste (Cheleiros, S.João das Lampas, Carreiros) e Serra do Caldeirão (Vale da Rosa e A do Gueno) em algumas estações era impossível separá-las (gráfico 2), admitindo-se a existência de uma forma intermédia. SCHULER (1986) também observou estes tipos de indivíduos em Marrocos e Sul de França.

A. fatua apareceu muito localizada (Terra Fria, Oeste e vale do Tejo e Mondego), normalmente causadora de elevados prejuízos, com uma frequência de 12 % (mapa 3). A importância desta espécie no litoral do Oeste e vale do Tejo e Mondego e ausência na Terra Quente Transmontana podem estar relacionadas com as observações de CHANCELHOR (1976) e BARRALIS (1965) de este táxone ter germinação primaveril, entre Fevereiro e Março, tendo acontecido, no ano da prospecção, no Oeste e na Lezíria do Tejo uma Primavera chuvosa.



Mapa 1 – Distribuição e importância de *A. strerilis* subsp. *sterilis*: ★ ocasional, ● frequente a importante, ☆ muito importante



Mapa 2 – Distribuição e importância de *A. strerilis* subsp. *ludoviciana*: ★ ocasional, ● frequente a importante, ☆ muito importante



Mapa 3 – Distribuição e importância de *A. fatua*: ★ ocasional, ● frequente a importante, ☆ muito importante



Mapa 4 – Distribuição e importância de *A. barbata* s.l.: ★ ocasional, ● frequente a importante, ☆ muito importante



Mapa 5– Distribuição e importância de *A. sativa* ○ e de *A. strigosa*: ★ocasional, ● frequente a importante



Mapa 6– Distribuição e importância de *A. x haussknechtii*: ★ocasional, ● frequente a importante

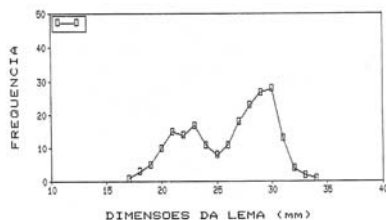


Gráfico 1 – Frequência da dimensão da lema de um local com populações de *A. strerilis* subsp. *sterilis* e *A. sterilis* subsp. *ludoviciana*

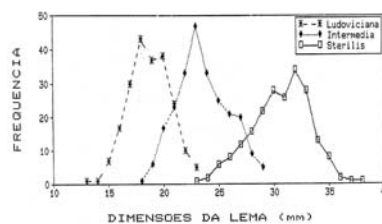


Gráfico 2 – Frequência da dimensão da lema de três locais com populações bem definidas de *A. sterilis* subsp. *ludoviciana*, intermédia e *A. strerilis* subsp. *sterilis*

A. barbata s.l. é uma espécie essencialmente ruderal, não sendo por isso de estranhar a sua baixa frequência nos campos cerealíferos, 4%, e geralmente com o grau de ocasional (mapa 4).

A. sativa (0,2 % frequência) e *A. strigosa* (1,3 % frequência) também só ocorreram esporadicamente (mapa 5).

A. x haussknechtii surgiu ocasionalmente em todo país com uma frequência de 3,3%, especialmente em searas de aveia, tendo sido também colhida em trigo, cevada e pousio (mapa 6). TABORDA DE MORAIS (1936) também observou este híbrido nos Herbários portugueses. VALDÉS *et al.* (1987) consideraram-no

raro na campina de Huelva e BAUM (1977) assinalou-o para França, Alemanha, URSS, Irão, Índia e Portugal.

A. x haussknechtii é caracterizada pelas lemas sem *callus*, flores não articuladas, a lema da 1ª flor com pêlos e arista geniculada e a da 2ª flor glabra e mútica. Os resultados obtidos da sementeira deste híbrido encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 - Frequência relativa dos diversos tipos de espiguetas obtidas por sementeira de indivíduos de *A. x haussknechtii*, em 1986 e 1991

Características das espiguetas	Frequências relativas (%)	
	1986	1991
iguais às <i>A. x haussknechtii</i>	18,8	21,4
idênticas à <i>A. sativa</i>	16,5	16,3
idênticas à <i>A. sterilis</i>	15,1	14,3
sem <i>callus</i> , 2 flores com pêlos e com 2 aristas	1,9	0,0
sem <i>callus</i> , 2 flores com pêlos e com 1 arista	6,7	5,1
sem <i>callus</i> , 2 flores com pêlos e sem aristas	2,6	4,1
sem <i>callus</i> , 1 flor com pêlos e sem aristas	32,4	33,7
com <i>callus</i> , 1 flor com pêlos e com 1 arista	3,7	4,1
com <i>callus</i> , 1 flor com pêlos e sem aristas	0,6	0,0
com <i>callus</i> , 2 flores com pêlos e com 1 arista	0,9	1,0
com <i>callus</i> , pêlos só no <i>callus</i> e 1 arista	0,8	0,0

Em ambas ocasiões obteve-se uma segregação na F2 em que os progenitores são *A. sativa* e *A. sterilis* subsp. *sterilis*. Verificou-se em 1986 que, praticamente, não houve dormência e que todas as cariopses da mesma espiguetas germinaram.

O número de cromossomas observados nas raízes de *A. x haussknechtii* foi de $2n=42$, número igual ao da *Avena sativa* e *A. sterilis* subsp. *sterilis*.

Em relação às características bioquímicas encontraram-se para o conjunto dos três táxones um total de 40 bandas isoenzimáticas diferentes, sendo as carboxilesterases as que apresentaram maior polimorfismo. Revelaram-se 21 bandas isoenzimáticas para a carboxilesterase, 11 para a fosfatase ácida e 8 para a glutamato oxaloacetato transaminase (GOT).

A interpretação dos géis para cada indivíduo e para os três sistemas enzimáticos utilizados permitiu a construção dos diagramas sintéticos das figuras 1, 2 e 3. Poucas bandas são comuns a todos os indivíduos.

Da observação dos diagramas verificou-se a existência de três bandas monomórficas isoenzimáticas das carboxilesterase correspondentes aos valores de Rf 0,41, 0,63 e 0,67 e de duas bandas da fosfatase ácida cujos valores de Rf são 0,03 e 0,08.

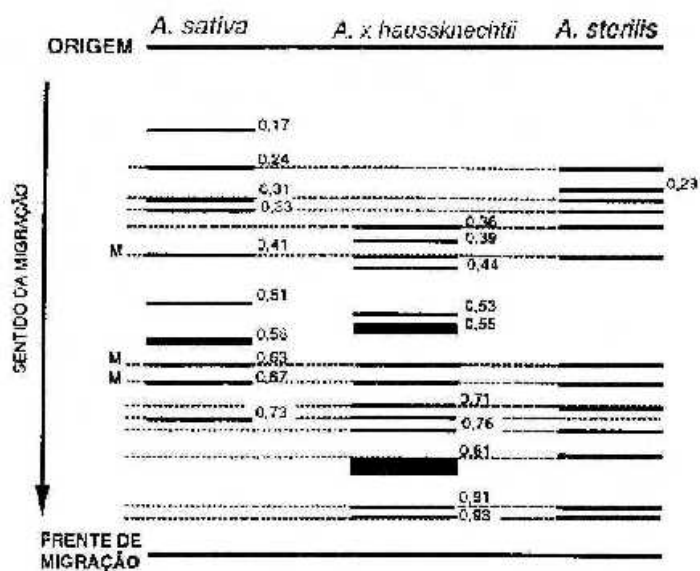


Figura 1 – Diagrama teórico do sistema enzimático da carboxilesterase. M bandas comuns a todos os indivíduos.

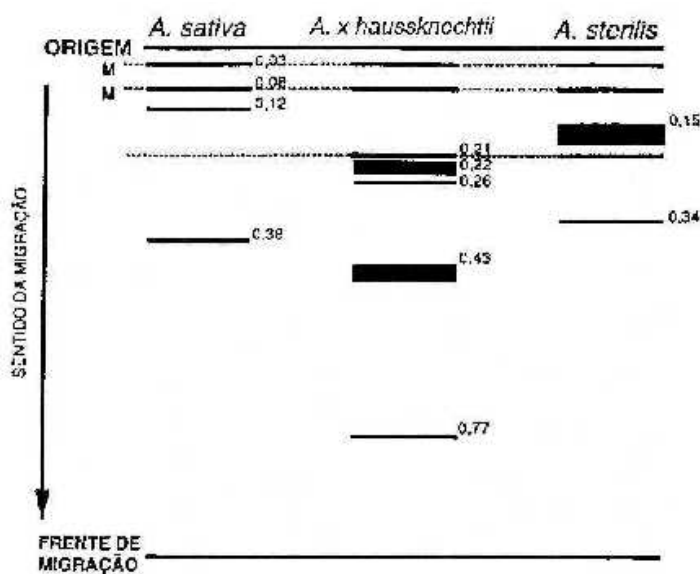


Figura 2 – Diagrama teórico do sistema enzimático da fosfatase ácida. M bandas comuns a todos os indivíduos.

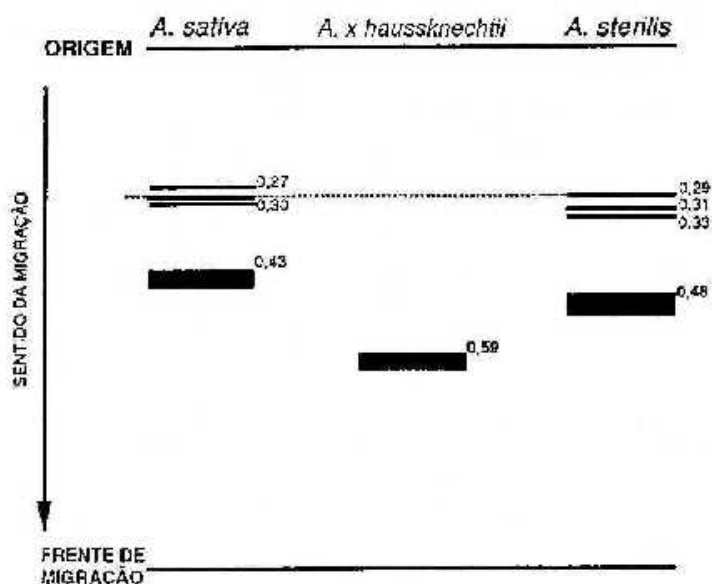


Figura 3 – Diagrama teórico do sistema enzimático da glutamato oxaloacetato transaminase (GOT).

Existem também várias bandas comuns a dois táxones. Assim, duas bandas isoenzimáticas comuns entre *Avena sativa* e *A. x haussknechtii* (ICMI), a Rf 0,73 para a carboxilasterase e a Rf 0,29 para GOT; entre *A. sterilis* e *A. x haussknechtii* encontrou-se uma para a fosfatase ácida, a Rf 0,21 e seis bandas para carboxilesterase, correspondentes aos valores de Rf 0,36; 0,71; 0,76; 0,81; 0,91 e 0,93. Entre a *A. sativa* e *A. sterilis* só ocorreram três bandas comuns nas carboxilesterase correspondentes aos valores de Rf 0,24, 0,31 e 0,33.

O zimograma de um híbrido pode resultar da soma dos pertencentes aos progenitores ou pode incluir uma banda híbrida e algumas bandas dos progenitores podem desaparecer (MOORE & COLLINS 1983). Existem muitas bandas características de apenas um táxone. Podemos afirmar que é possível distinguir estes três táxones através de qualquer dos sistemas enzimáticos testados, pois todos eles apresentam perfis isoenzimáticos que lhe são característicos.

Para se conhecer o grau de uniformidade e estabilidade existente quantificou-se o nível de polimorfismo de cada táxone através do índice de polimorfismo (PI) pela fórmula de MARSHALL & ALLARD (1970) para cada sistema enzimático. Este índice relaciona a frequência relativa de cada banda com o número total de bandas por sistema enzimático e táxone. É susceptível de variar

entre 0 e 0,25 tendo em consideração a proporção das bandas monomórficas e polimórficas e o grau de polimorfismo de cada uma das bandas variáveis. A fosfatase ácida e GOT apresentam um índice de polimorfismo nulo (Quadro 2). Os indivíduos de *A. x haussknechtii* apresentam de longe o nível de polimorfismo mais elevado (Quadro 2). *A. sterilis* subsp. *sterilis* também apresentou valores diferentes de zero para o índice de polimorfismo no sistema enzimático carboxilesterase, mostrando alguma heterogeneidade (Quadro 2). *Avena sativa* apresenta-se completamente homogênea para qualquer dos sistemas enzimáticos estudados (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores do índice de polimorfismo para cada táxone e para cada sistema enzimático

Sistema enzimático	<i>A. sativa</i>	<i>A. x haussknechtii</i>	<i>A. sterilis</i>
Carboxilesterases	0,000	0,116	0,032
Fosfatase ácida	0,000	0,000	0,000
GOT	0,000	0,000	0,000

Os aspectos morfológicos e bioquímicos de *A. x haussknechtii* mostraram-se intermédios entre a *A. sativa* e a *A. sterilis* subsp. *sterilis*. Cada um dos sistemas enzimáticos utilizados permite reconhecer e confirmar a diferenciação morfológica, já que os perfis isoenzimáticos são diferentes entre si e incluem bandas que lhe são características e como tal não estão presentes nos perfis obtidos para os restantes táxones. Atendendo aos valores encontrados para os índices de polimorfismo, a *A. x haussknechtii* é a que apresenta maior heterogeneidade. Estes resultados permitem concluir que a *A. x haussknechtii* é um híbrido natural entre *A. sativa* e *A. sterilis* subsp. *sterilis*. Este híbrido que apresenta interesse agronómico por produzir maior número de sementes do que a aveia, sofre uma degeneração na F2. BAUM (1977), levando isto em consideração, denominou-o *Avena sativa x sterilis* F1, evitando usar qualquer epíteto específico.

BIBLIOGRAFIA

- ALMGARD, G. & CLAPHAM, D. (1975) - Isozyme variation distinguishing 18 *Avena* cultivars grown in Sweden. *Swed. J. Agric. Res.* **5**: 61-67
- AUJAS, C. & DARMENCY, H. (1984) - Le concept d'espèce chez folles avoines: *Avena fatua* L. et *A. sterilis* L. *VIIème Col. Int. Ecol. Biol. Syst. des Mauvaise Herbes*: 219-227.
- BARRALIS, G. (1961) - Distribution des diverses espèces de folle avoine en France. *Ann. Physiol. Vég.* **3** (1): 39-53.

- BARRALIS, G. (1965) - La germination des folles avoines. *Ann. Épiphyt.* **16** (4):295-314.
- BAUM, B.R. (1969) - The role of the lodicule and epiblast in determining natural hybrids of *Avena sativa* x *fatua* in cultivated oats. *Canad. J. Bot.* **47**: 85-91.
- BAUM, B.R. (1977) *Oats: wild and cultivated. A monograph of the genus Avena L. (Poacea L.)*. Minister of Supply and Services of Canada. Ottawa.
- CABRAL, F. (1990) *Polimorfismo isoenzimático em Lupinus L. e caracterização de populações (L. albus e L. luteus L.)*. Dissertação apresentada para obtenção de grau de Doutor. I. S. Agronomia. Lisboa.
- CADAHIA, E. & GARCIA-BAUDIN, J.M. (1978) - Diferenciación de la *Avena sterilis* L., por electroforesis de proteínas de grano. *Symposium Mediterraneo de Herbicidas 1*: 60-67. Madrid.
- CADAHIA, E., GASQUEZ, J., COMPOINT, J.P. & GARCIA-BAUDIN, J.M. (1980) - Differences enzymatiques chez *Avena fatua* L. et *Avena sterilis* L. *VIème Col. Int. Ecol. Biol. Syst. des Mauvaise Herbes 2*: 295-302.
- CHANCELLOR, R.J. (1976) - Seed behaviour. *Wild Oats in World Agriculture*: 65-88. Agricultural Research Council. Londres.
- COSTA, J.C. (1988) - Types morfológicos des folles avoines au Portugal. *VIIIème Col. Int. Ecol. Biol. Syst. des Mauvaise Herbes*: 315-323.
- COSTA, J.C., AGUIAR, C., CAPELO, J., LOUSÁ, M. & NETO, C. (1999) - Biogeografia de Portugal continental. *Quercetea 0*: 5-56.
- COSTA, J.C., MOREIRA, I., FRANCO, J.A. & GARCIA-BAUDIN (1988) - *Balancos das searas de Portugal. Distribuição, importância e caracterização infraespecífica*. C.B.A.A. da U.T.L. Lisboa
- DARMENCY, H. (1982) - Etude du polymorphisme des prolamines chez une population d'*Avena fatua* L. *Weed Res.* **22**: 237-243.
- DAVIS, B.J. (1964) - Disc electrophoresis. II Method na application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- DORDIO, J.J. (1970) - *Balancos infestantes das searas de trigo*. Rel. Fin. Cur. Eng. Agron. I.S. Agronomia. Lisboa.
- FRANCO, J.A. & ROCHA AFONSO, M.L. (1998) - *Nova Flora de Portugal*. 3º vol. 2º fasc. Escolar Editora. Lisboa.
- GARCIA-BAUDIN, J.M. & SALTO, T. (1979) - Distribución y importancia del genero *Avena* como planta adventicia en España. *Symposium Mediterraneo de Herbicidas 1*: 43-61.
- GARCIA-BAUDIN, J.M., SALTO, T. & AGUIRRE, R. (1981) - Different types morfológicos chez *Avena sterilis* L. *Fragm. Herbol. Jugoslav.* **19** (1): 57-71.
- GATES, P. & BOULTER, D. (1979) - The use of the seed isoenzymes as an aid to breeding of field beans (*Vicia faba* L.). *New Phytol.* **83**: 783-791.
- GOTTLIEB, L.D. (1984) - Genetics and morfológica evolution in plants. *Amer. Naturalist* **123**: 681-709.
- IMAM, A.G. & ALLARD, R.W. (1965) - Population studies in predominantly self-pollinated. IV. Genetic variability between and within natural populations of wild oats from differing habitats in California. *Genetics* **51**: 49-62.
- JAIN, S.K. & MARSHALL, D.R. (1974) - Population studies in predominantly self-pollinating species. X. Variation in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Amer. Naturalist* **101**: 19-33.

- JENSEN, N.F. (1961) - Genetics and inheritance in oats. In F. Coffman, (ed.). *Oats and oat improvement*:125-206. Amm. Soc. Agron. Madison.
- LAEMMLI, U.K. (1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 4. *Nature* **227**: 680-685.
- MAILLET, J. (1980) - Contribution à une étude des variétés d' *Avena fatua* et *Avena sterilis*. *Fragm. Herbol. Jugoslav.* **9** (3): 61-67
- MALAZEW, A.I. (1930) - Wild and cultivated oats. *Bull. Appl. Bot. Gen. Plant. Breed.*
- MARKERT, C.L. & HUNTER, R.L. (1959) - The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **7**: 42-49.
- MARSHALL, D.R. & ALLARD, R.W. (1969) - The genetics of electroforetic variants in *Avena*. 1. The esterase E₄, E₉, E₁₀, phosphatase P₅ and anodal peroxidase APX₅ loci in *Avena barbata*. *J. Heredity* **60**: 17-19.
- MARSHALL, D.R. & ALLARD, R.W. (1970) - Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* and *Avena barbata*. *Heredity* **25**: 373-382.
- MARSHALL, D.R. & ALLARD, R.W. (1970) - Maintenance of isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena barbata*. *Genetics* **65**: 393-399.
- MITTAL, R., SINGH, M. & MAHERCHANDANI, N. (1987) - Isoenzymic diversity index of vigna parents in relation to heterosis for seed yield in green gram (*Vigna radiata* (L.)Wilczec). *Euphytica* **36**: 61-68.
- MOORE, G.A. & COLLINS, G.B. (1983) - New chalanges confronting plant breeders. In S.D. Tanksley, and T.J. Orton ed. *Isozymes in plants genetics and breeding, Part A*: 25-58. Elsevier Science Publishers. Amesterdão.
- ORNSTEIN, L. (1964). - Disc electrophoresis. I Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 321-347.
- ROCHA AFONSO, M.L. (1980) - *Avena* L. in T.G. Tutin *et al.*, *Flora Europaeae* Vol. **V**. Cambridge University Press.
- SCANDALIOS, J.G. (1969) - Genetic control of multip molecular forms of enzymes of wheat in plants: a review. *Biochem. Genet.* **3**: 37-49
- SCHIAVO, F.L., MELA, L., NUTIRONCHI, V. & TERZI, M. (1980) - Electrophoretic mobility of isozymes from different plant species and its possible use in identifying cell hybrids. *Pl. Sci. Lett.* **18**: 45-55.
- SCHULER, B. (1986) - Taxonomie ökologie und verbreitung von *Avena sterilis* L. und *Avena*-arten unter besonderer Berücksichtigung des getreidebaus im westlichen mittelmeergebiet. *Plits* **4** (5).
- SCHWARTZ, M.K. *et al.* (1963) - Procedure for staining zones of activity of glutamic oxaloacetic trasaminase following eletrophoresis with starch gel. *Amer. J. Clin. Pathol.***40**: 103-106.
- SHORTER, R., GIBSON, P. & FREY, K.J. (1978) - Outcrossing rates in oat species (*Avena sativa* L. x *A sterilis* L.). *Crop Sci.(Madison)* **18**: 877-878.
- TABORDA DE MORAIS, A: (1936) - Estudo das aveias – I as aveias portuguesas da secção *Euvena* Gris. *Bol. Soc. Brot.*, série 2, **11**: 49-86.
- TABORDA DE MORAIS, A: (1939) - Estudo das aveias – II as aveias portuguesas da secção *Euavena* Griseb. *Bol. Soc. Brot.*, série 2, **13**: 573-709.
- TANKSLEY, S.D., JONES, R.A. (1981) - Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. *Hort. Sci.* **16**: 179-181.

- THURSTON, J. (1957) - Morphological variation in wild oats (*Avena fatua* L. and *A. ludoviciana* Dur.) and hybrids between wild and cultivated oats. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* **49**: 259-274.
- VALDÉS, B., TALAVERA, S. & GALIANO, E.F. (1987) - *Flora vascular da Andalucía Occidental*. Ketres. Barcelona.
- VECCHIO, V., GASQUEZ, J. & COMPOINT, J.P. (1982) - Variabilité morphologique et enzymatic chez une population mixte de *Avena fatua* L. et *Avena sterilis* L. *Weed. Res* **22**: 263-269.