

Ingeniería molecular en «Triticum»

F. GARCIA OLMEDO, PILAR CARBONERO, C. ARAGONCILLO
R. FERNANDEZ DE CALEYA, M. RODRIGUEZ LOPERENA,
V. TORRES, ANGELES DELIBES, G. SALCEDO,
ROSA SANCHEZ-MONGE y C. HERNANDEZ LUCAS

RESUMEN

Se resumen las investigaciones realizadas sobre genética bioquímica de la especie alopoloide de *Triticum aestivum* L. (trigo común). Dichas investigaciones abarcan los siguientes aspectos: a) localización cromosómica de genes que controlan sistemas moleculares; b) formas de interacción entre los genomas integrados en dicha especie; c) transferencia genética extraespecífica y extragenérica desde *Aegilops ventricosa*, *Secale cereale* y *Agropyron elongatum* a trigo. Se especula sobre las implicaciones evolutivas de los resultados obtenidos y se enumeran las aplicaciones prácticas.

INTRODUCCION

Se trata en el presente escrito de poner en perspectiva el trabajo realizado en nuestro laboratorio durante el período 1971-75.

La ingeniería genética de plantas cultivadas, es decir, el diseño y obtención de variedades vegetales mejoradas mediante manipulación genética, ha contribuido revolucionariamente a la producción de alimentos. Es bien conocido que, por ejemplo, la obtención y difusión de un tipo de trigo de bajo

porte, tallo ancho y entrenudo de gran resistencia mecánica, que tolera altas dosis de nitrógeno sin encamarse, ha permitido duplicar el rendimiento medio de la producción de trigo en la India en el corto espacio de 3 años (1967-70). Conseguir una planta con las características deseadas implica en unos casos el moldeo de caracteres poligénicos, como lo son, por ejemplo, algunos componentes del rendimiento, y en otros casos la inserción selectiva de un gen o un segmento cromosómico, que introduce en el genomio una característica determinada, por ejemplo, los genes para enanismo o para resistencia a determinadas enfermedades.

La mejora de plantas, que inicialmente se desarrolló en el ámbito de los caracteres morfológicos y macrofisiológicos, se ha extendido en el último decenio hasta un nivel molecular. El perfeccionamiento de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y de regeneración de plantas a partir de ellos ha abierto la posibilidad de aplicar a las plantas superiores técnicas genéticas previamente restringidas a los microorganismos. El esclarecimiento de las bases moleculares de la incompatibilidad y de los modos de superarla está permitiendo ampliar el repertorio de transferencias genéticas extraespecíficas y extragenéricas. Finalmente, se han obtenido resultados positivos en la manipulación de los perfiles moleculares de los productos agrícolas en sí, pudiendo citarse como ejemplos, maíz, sorgo y cebada altos en lisina, maíz con almidón exento de amilosa, cártamo con ácido oleico mayoritario, etc.

El trigo panificable, *Triticum aestivum* L., aunque se comporta como diploide, es en realidad un alopoloide (alohexaploide), y sus 42 cromosomas forman tres grupos de 7 pares. Cada uno de estos grupos representa un genomio duplicado, aportado por una especie ancestral diploide bien diferenciada.

La alopoloidía es un fenómeno muy frecuente en el reino vegetal, que plantea problemas peculiares, tanto evolutivos como de manipulación genética, algunos de los cuales se prestan a ser abordados favorablemente a nivel molecular.

Las investigaciones que se incluyen en la presente revisión están insertadas en el contexto que acabamos de esbozar y se centran esencialmente en el trigo como principal cosecha mundial y como prototipo de alopoloide.

MATERIAL Y METODOS

Descripción del material biológico

En la figura 4-1 se representa el proceso de formación de un alopoloide. Dos especies diferenciadas a partir de un mismo genomio ancestral pueden dar lugar a un híbrido infértil por falta de apareamiento meiótico. La infertilidad puede ser salvada si fortuita o experimentalmente se duplica la dotación cromosómica, y se forma así la nueva especie alopoloide, que se comporta como un diploide funcional y que está al menos parcialmente aislada de las especies parentales. Se emplea el término *homeología* para designar las relaciones de homología existentes entre genomios, cromosomas o genes procedentes de un genomio ancestral común.

En la figura 4-2 se muestran las relaciones evolutivas y la constitución genómica de la amplia gama de especies del complejo alopoloide *Aegilops-Triticum* empleadas en nuestros estudios. Otras *Gramineae* usadas, no incluidas en este complejo, han sido *Agropyron elongatum* (Host.) Beauv. ($2n=14$, AgAg) y *Secale cereale* L. ($2n=14$, RR).

Se han utilizado también los siguientes tipos de aneuploides de *Triticum aestivum* L.cv. Chinese Spring: *nulisómicos*, en los que falta un par determinado de cromosomas homólogos; *monosómicos*, en los que para un cromosoma dado sólo existe una copia; *ditelosómicos*, en los que falta un par de brazos cromosómicos homólogos; *nulitetrasómicos* compensados, en los que la falta de un par de cromosomas homólogos es suplida por doble dosis de un par homeólogo.

Métodos bioquímicos y citológicos

Estos se han descrito debidamente en los trabajos citados en la bibliografía.

RESULTADOS Y DISCUSION

Sistemas bioquímicos estudiados y localización cromosómica de los genes que los controlan

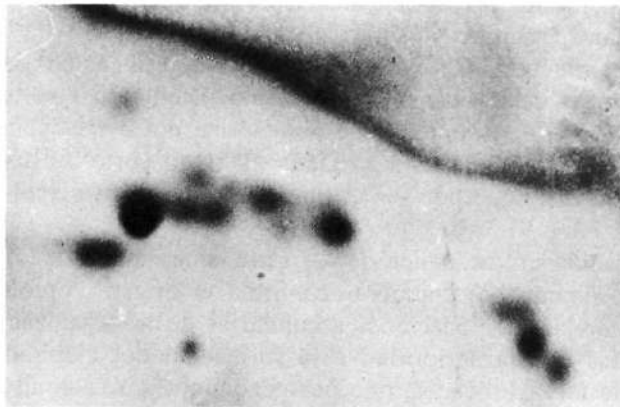
En la tabla 4-1 se consignan los sistemas bioquímicos estudiados y la localización cromosómica de los genes que los controlan. Entre los sistemas homeólogos utilizados se incluyen proteínas que se extraen con disolventes orgánicos, incluidos determinados proteolípidos y lipoproteínas, varios sistemas enzimáticos y el paso metabólico de la esterificación de esteroleos.

Tabla 4-1. Localización cromosómica de genes que regulan sistemas bioquímicos homeólogos

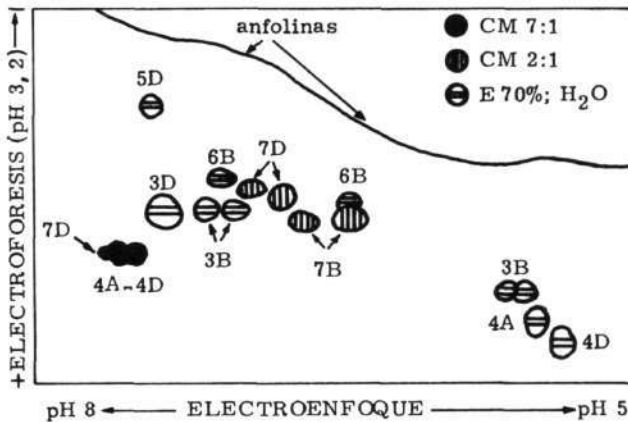
Sistema	Localización cromosómica	Referencias
Proteínas CM (2:1)	7DS, 7BS	1-4
Proteínas CM (7:1)	4A β , 4D	
Proteínas E	3BS, 3D β 4A β , 4D 5D 6BS	3, 4
Lipopurotioninas		
Apoproteína	1AL, 1BL, 1DL	5-7
Lípido	5A, 5B, 5DS	
Alcohol-deshidrogenasa	4A, 4B, 4D	8, 9
Fosfatasa ácida	4A, 4B, 4D	8-10
Esterasas	3A, 3B, 3D 6A, 6B, 6D	11
Peroxidasa	1A, 1B, 1D	9-11
Síntesis de estéril-ésteres	7AB, 7DS	12-16

En la figura 4-3A se muestra el fraccionamiento bidimensional (electroenfoque \times electroforesis) de un grupo de proteínas de un peso molecular medio aproximado de 18.000 daltons que se extraen de endospermo de trigo con etanol al 70 %. Algunas de estas proteínas, las denominadas CM, son proteolípidos que se extraen también con cloroformo:metanol (2:1), y las restantes, denominadas proteínas E, se extraen también con agua, pero no con cloroformo:metanol (fig. 4-3B). Entre las proteínas CM, sólo el grupo señalado en la figura 4-3B es extraíble por cloroformo:metanol (7:1).

Las lipopurotioninas son complejos de polipéptidos básicos y lípidos polares que se extraen del endospermo con éter de petróleo. La apoproteína presenta dos variantes electroforéticas, designadas purotioninas α y β . Las purotio-



A



B

Fig. 4-3. A) Fraccionamiento bidimensional (electroenfoque \times electroforesis) de proteínas con peso molecular medio de alrededor de 18.000 daltons extraídas con etanol al 70 %. B) Representación esquemática del fraccionamiento anterior, indicándose los distintos tipos de proteínas incluidas en el grupo.

ninas tienen propiedades antimicrobianas, inhiben la papaína y provocan la contracción del útero de cobaya. La parte lipídica, de la cual depende la solubilidad de las lipopurotioninas en disolventes no polares, está controlada por un grupo de cromosomas homeólogos distinto del que regula las apoproteínas.

La alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) de endospermo de trigo es un enzima dimérico, y pueden encontrarse variantes genéticas de las subunidades controladas por *loci* homeólogos de los cromosomas del grupo 4.

La fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) de endospermo de trigo hexaploide presenta 6 isoenzimas, de los que corresponden 2 al cromosoma 4 de cada genomio.

Las esterases (EC 3.1.1.1) de endospermo presentan numerosos isoenzimas asociados al grupo cromosómico 3.

Los isoenzimas de peroxidasa (EC 1.11.1.7) de hoja madura están asociados al grupo cromosómico 1. La localización cromosómica de los genes que controlan los de endospermo no ha sido realizada todavía.

Se han identificado *loci* que controlan la esterificación de esteroides en las fases finales del desarrollo del endospermo. Dichos *loci* pertenecen al grupo cromosómico 7. La variante PL se caracteriza por ser el palmitato el éster principalmente sintetizado, y está asociada al brazo corto del cromosoma 7D. La variante L se distingue por ser el linoleato el éster principal sintetizado, y está asociada a 7A ó 7B.

La distribución cromosómica de los genes que controlan los sistemas moleculares que acabamos de enumerar confirma el origen alopoloide del trigo y permite constatar las modificaciones secundarias de la organización de los genomios ocurridas con posterioridad a la formación del alopoloide (tabla 4-1). La existencia de *loci* triplicados, uno por genomio, para cada sistema no es general, y existen genes duplicados y genes únicos (diploidizados).

La redundancia genética generalizada existente en un alopoloide recién formado debe implicar una menor restricción a los cambios mutacionales en genes repetidos y a la pérdida de material genético. Este último proceso sería el responsable de la existencia de genes duplicados y diploidizados. Los datos de distribución de las variantes genéticas de purotioninas y de la esterificación de esteroides en las especies del complejo *Aegilops-Triticum* (fig. 4-2) sugieren que efectivamente la pérdida de información genética redundante ocurre con cierta frecuencia.

Evidencia bioquímica de interacción genómica

Los estudios bioquímicos iniciales indicaban claramente que la actividad metabólica asociada a un genomio se mantiene al integrarse éste en un alopoloide, y sugerían que la expresión de los genomios era aditiva. Sin embargo, un estudio más detallado de la expresión cuantitativa de los sistemas moleculares homeólogos ha puesto de manifiesto diversas modalidades de integración metabólica intergenómica, que suponen formas de interacción más complejas que la simple expresión aditiva *.

El caso de la alcohol-deshidrogenasa podría ilustrar cómo una actividad

genética aditiva de los genomios puede resultar en efectos funcionales no aditivos. Los tres *loci* para este enzima, correspondientes a los tres genomios del trigo hexaploide (ABD), dan lugar a cantidades equivalentes de sus subunidades específicas (α , β , δ) que por asociación al azar generan los 6 dímeros posibles en las proporciones esperadas (2/9 cada heterodímero; 1/9 cada homodímero). En maíz, Schwartz¹⁷ ha mostrado que una variante alélica F de alcohol-deshidrogenasa da lugar a un homodímero activo, pero fácilmente desnaturalizable, mientras que el correspondiente a la variante Cm es más estable, pero presenta baja actividad. El heterodímero Fcm presenta una actividad análoga a FF y una estabilidad próxima a la de CmCm. Es claramente posible que esta complementación entre subunidades enzimáticas pueda darse en los heterodímeros intergenómicos. Es de señalar que la obtención de patrones electroforéticos aditivos en condiciones que pueden ser disociantes, no excluye interacciones no aditivas *in vivo*.

El control cromosómico de lipopurotioninas representa un modo más complejo de complementación entre genomios⁵⁻⁷. Los tres genes estructurales para purotioninas dan lugar a cantidades de producto génico equivalentes y, en consecuencia, se compensan recíprocamente en los nulitetrasómicos del grupo 1. Sin embargo, éste no es el caso con el sistema genético que controla la parte lipídica, que está asociado al grupo cromosómico 5. Los cromosomas homeólogos de este grupo pueden ordenarse respecto a su efectividad en la producción de lipopurotioninas, 5D>5B>5A, constatándose que afectan por igual a las tres variantes genéticas de la apoproteína.

Posiblemente de mayor trascendencia, desde el punto de vista de las interacciones entre genomios, sea la interdependencia de las respuestas a la dosis génica de sistemas homeólogos. La medida de las cantidades absolutas y relativas de las distintas proteínas que se muestran en la figura 4-3, en diversas líneas nulitetrasómicas aneuploides, puso de manifiesto que todas ellas responden casi linealmente a la dosis génica, y que dicha respuesta puede verse deprimida por la presencia del cromosoma que regula el sistema homeólogo, tal como se representa en la figura 4-4. Este efecto es recíproco entre sistemas homeólogos, en unos casos, mientras que en otros parece ser unilateral. Esto último implica la evolución divergente de elementos reguladores hasta diploidizarse.

Finalmente, el sistema genético que controla la esterificación de esteroides representa un caso de dominancia de un gen sobre sus homeógenos. El alelo *Pln*, que da lugar a palmitato como éster principal y a un bajo nivel de esteroles libres en la madurez, ejerce el mismo efecto fenotípico en 1, 2 ó 3 dosis, con independencia de los genomios adicionales (0, 1 ó 2 genomios)¹²⁻¹⁶.

Un alopoloide es de hecho un *heterocigoto permanente*, en el cual las posibles interacciones heteróticas positivas y negativas estarían fijadas. Las diversas teorías sobre la heterosis pueden agruparse de un modo general en las que se basan en la dominancia y las que lo hacen en la sobredominancia o, en otras palabras, las basadas en la complementación intergénica y las basadas en la complementación interalélica. Ambos tipos de teorías no son mutuamente excluyentes y es posible que los dos tipos de fenómenos sean responsables de la relación observada entre heterosis y heterocigosidad. Ambas formas de comple-

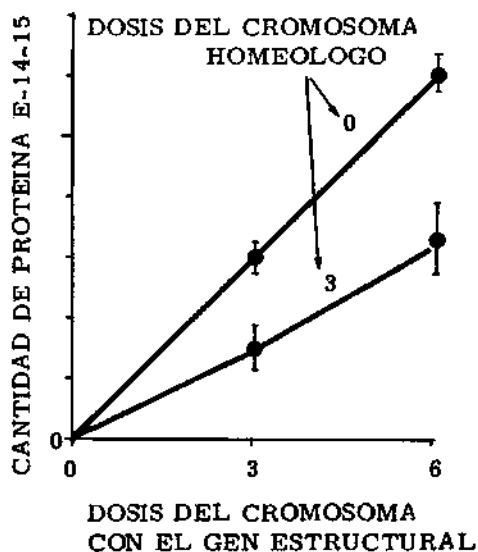


Fig. 4-4. Cantidad de la proteína -E-14-15 controlada por el cromosoma 3B en función de la dosis de dicho cromosoma y de la de su homeólogo 3D.

mentación están representadas entre los modos de interacción genómica que acabamos de considerar.

Es verosímil, por tanto, que en la posibilidad de fijar interacciones heteróticas estribe en parte la razón del éxito evolutivo de la alopoloidía.

Transferencia genética extraespecífica y extragenérica

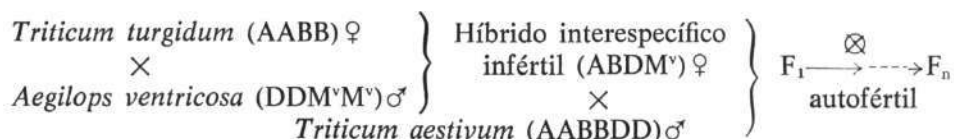
La transferencia de material genético extraespecífico o extragenérico a plantas cultivadas ha venido suscitando interés tanto desde un punto de vista evolutivo como desde un punto de vista práctico. Esta transferencia puede implicar desde la sustitución de cromosomas enteros hasta la inserción de un pequeño segmento cromosómico.

El proceso de transferencia requiere, en primer lugar, salvar los impedimentos que se presentan al acceso del material genético de la especie dadora, al núcleo de la receptora y, posteriormente, lograr la integración estable del material genético extraño. En relación con la primera fase de la transferencia, se han obtenido resultados más o menos satisfactorios por diversos métodos, tales como el uso de alopoloides o de híbridos puente, la polinización con polen extraño viable mezclado con polen homólogo irradiado, el tratamiento del tejido femenino con hormonas, con fármacos inmunosupresores o dañándolo mecánicamente, fusión de células somáticas, etc. La integración estable del material genético transferido suele conseguirse ya sea por sustitución de uno o varios cromosomas por sus homeólogos o por inserción de un segmento cromosómico más o menos grande de la especie dadora en un cromosoma de la aceptora. Esto úl-

timo puede ocurrir de forma natural con baja frecuencia, o puede inducirse por irradiación o por supresión de genes que regulan el comportamiento meiótico diploide de los aloploides.

Nuestras investigaciones, que resumiremos a continuación, se refieren a transferencias genéticas de *Aegilops ventricosa*, *Secale cereale* y *Agropyron elongatum* a trigo hexaploide.

Se ha investigado un método de transferencia a trigo alohexaploide que consiste en la obtención de híbrido infértil entre la especie dadora y trigo alo-tetraploide, seguida de la polinización del híbrido con polen de trigo alohexaploide, tal como representamos para el caso de *Aegilops ventricosa* en el siguiente esquema:



Se ha demostrado la integración de sistemas moleculares homeólogos asociados a los genomios D y M^v de *Ae. ventricosa* a líneas alohexaploides de trigo (42 cromosomas). La integración de sistemas correspondientes a M^v, que es el objetivo principal de la transferencia, ha supuesto, en unos casos, la sustitución de cromosomas completos y, en otros, la inserción de segmentos cromosómicos¹⁸. En la fig. 4-5 se muestra la metafase 1 del híbrido entre una línea que lleva un cromosoma del genomio M^v y el trigo hexaploide aceptor.

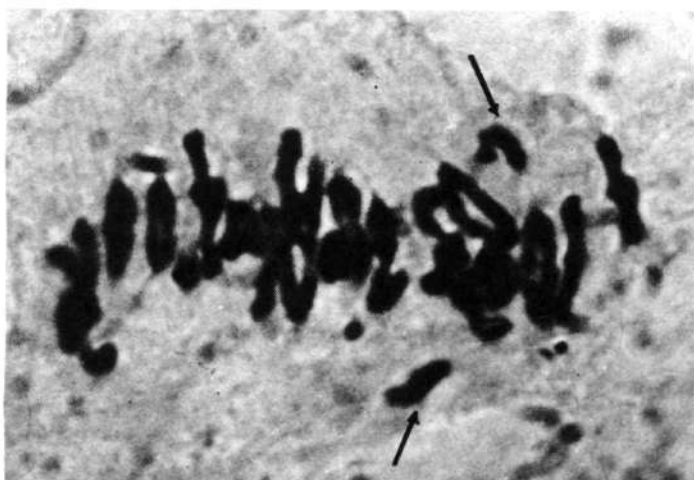


Fig. 4-5. Metafase 1 de un híbrido entre una línea portadora de un cromosoma del genomio M^v y el trigo aceptor. Las flechas indican los univalentes correspondientes al cromosoma del genomio M^v y su homeólogo del D, con el cual no aparea en condiciones normales.

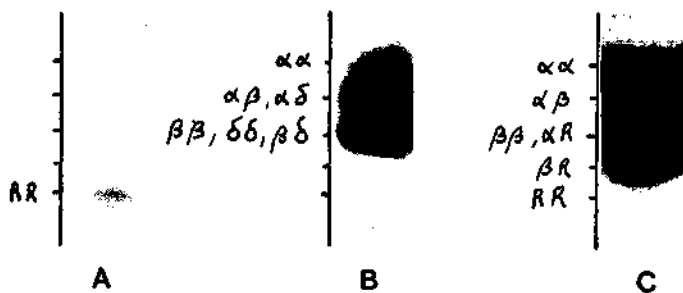


Fig. 4-6. Isoenzimas de alcohol-deshidrogenasa en: A) *Secale cereale*; B) *Triticum aestivum*; C) líneas de *T. aestivum* en que se ha sustituido el cromosoma 4D por el 4R.

En el estudio de la transferencia de *Secale cereale* (RR) a trigo hexaploide (AABBDD) se han utilizado semillas con 42 cromosomas de una F_3 resultante de un cruzamiento de trigo hexaploide por el alopoloide sintético *Triticale hexaploide* (AABRRR), obtenido por E. Sánchez-Monge. De este modo se obtienen líneas hexaploides con sustituciones de cromosomas del genomio D por cromosomas del genomio R de *Secale cereale*. La caracterización de la composición cromosómica del tercer genomio se realiza mediante marcadores bioquímicos de los cromosomas de D y R. Esto se ilustra en la fig. 4-6.

En colaboración con E. R. Sears¹⁹⁻²¹ se ha abordado el problema de la inserción de segmentos cromosómicos de *Agropyron elongatum* (AgAg) en cro-

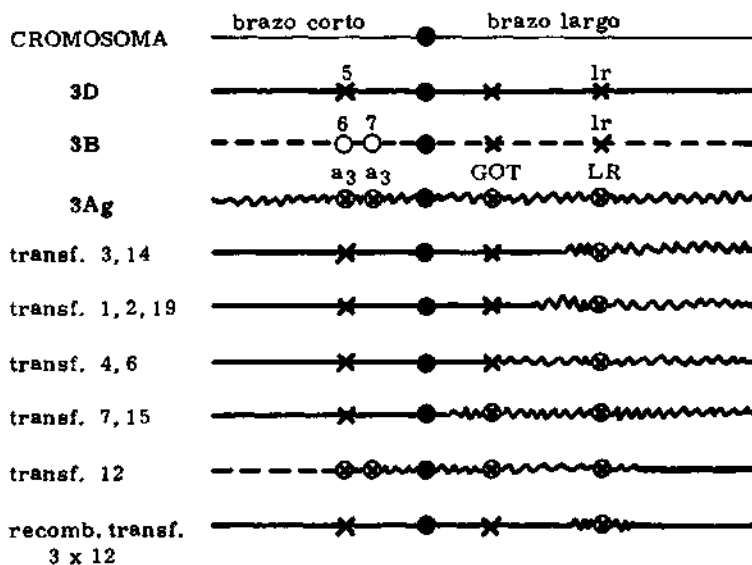


Fig. 4-7. Representación de diversas líneas de transferencia del cromosoma 3Ag de *Agropyron elongatum* a *Triticum aestivum* y una línea obtenida por recombinación de dos líneas de transferencia (3 y 12).

mosomas de los grupos homeológicos 3 y 7 de *Triticum aestivum*²². En este caso las inserciones se consiguen por recombinación entre cromosomas no homólogos, promovida por la ausencia de un gen diploidizante asociado al cromosoma 5B. En la fig. 4-7 se consignan los tipos de líneas de transferencia conseguidos y cómo se obtiene la inserción de un pequeño segmento interno del cromosoma 3Ag en el 3D. Esta investigación ha puesto también de manifiesto la similitud estructural entre los cromosomas homeólogos de *Agropyron* y *Triticum*, al constatarse que los *loci* que controlan proteínas CM, proteínas E y la esterificación de esteroides ocupan posiciones equivalentes en los cromosomas de los grupos 3 y 7.

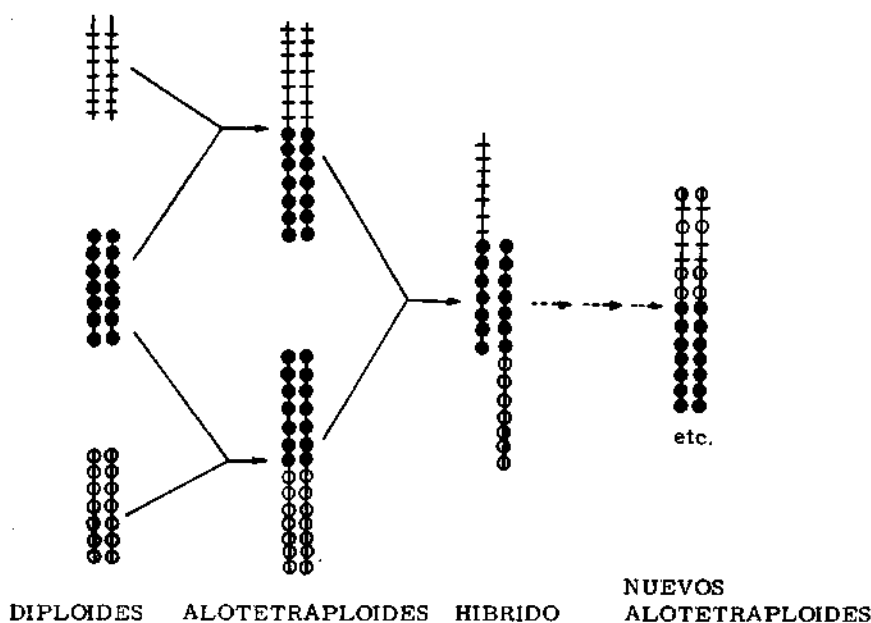


Fig. 4-8. Modificación secundaria de un alopoloide por hibridación con otro que posea un genoma común.

Es de señalar que intercambios génicos entre alopoloides con un genoma común pueden darse de forma natural, análogamente a algunos de los intercambios experimentales que acabamos de enumerar (fig. 4-8). Han sido descritos numerosos casos de hibridación espontánea entre alopoloides que, a pesar de ser generalmente infértiles, podrían ocasionalmente generar un alopoloide modificado. En este contexto es interesante el hecho de que todos los supuestos casos de pérdida de sistema redundante que se consignan en la fig. 4-2 afectan al genoma no común, pudiendo ser un mecanismo como el esquematizado en la fig. 4-8 el responsable de la eliminación.

Aplicaciones prácticas

Aunque evidentemente las implicaciones prácticas no han sido el único norte de nuestra investigación, es indudable que de ella se derivan numerosas aplicaciones, de las que citaremos a título de ejemplo las siguientes:

a) Identificación de especies y variedades mediante el uso de marcadores bioquímicos. Este es un problema relevante en relación con la certificación de semillas y con la identificación de materias primas en productos alimenticios elaborados ²³⁻²⁶.

b) Identificación de cromosomas del genomio D en líneas de *Triticale*, lo que interesa para la adecuada elección de parentales en programas de mejora ⁹.

c) Transferencia desde el genomio D de *Aegilops ventricosa* a trigo de genes para resistencia a *Cercospora herpotricoides* (mal de pie), obteniéndose una decena de líneas que son las más resistentes que se conocen ²⁷.

d) Transferencia no homóloga desde el genomio M^v de *Aegilops ventricosa* a trigo de resistencia a *Erisiphe graminis* (oidio) obteniéndose tres líneas portadoras ²⁷.

e) Obtención de una línea alta en proteína y potencialmente alta en lisina procedente del cruzamiento *Ae. ventricosa* × *T. turgidum* × *T. aestivum* ⁹.

f) Inserción de un pequeño segmento interno del cromosoma 3Ag de *Agropyron elongatum*, que lleva un gen para resistencia a *Puccinia recondita* (roya de la hoja) en el cromosoma 3D de trigo, siguiendo el procedimiento que se representa ²² en la figura 4-7.

g) Caracterización de un grupo de antibióticos sintetizados por plantas superiores activos contra bacterias fitopatógenas y levaduras ⁵⁻⁷.

AGRADECIMIENTOS

Reconocemos la colaboración en distintos momentos de esta investigación de Pilar Gil, Antonio Jiménez, Anastasio Rodado, Dolores Lamonedá, C. Rojas, Angel García Herranz y Felicitas García Arroyo, así como el apoyo material de las siguientes instituciones: USDA, MEC, JEN, Fundación Juan March y Joint Division IAEA/FAO.

BIBLIOGRAFIA

1. García-Olmedo, F., y Carbonero, P. (1970): *Phytochemistry*, 9:1495-97.
2. Aragoncillo, C.; Rodríguez-Loperena, M. A.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1975): *Anal. Biochem.*, 63:603-606.
3. Rodríguez-Loperena, M. A.; Aragoncillo, C.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1975): *Phytochemistry*, 14:1219-1223.
4. Aragoncillo, C.; Rodríguez-Loperena, M. A.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1975): *Theoret. Appl. Genetics*, 45:322-326.
5. Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1969): *Experientia*, 25:1110.
6. García-Olmedo, F.; Carbonero, P.; Aragoncillo, C.; Fernández de Caleyá, R., y Torres, J. V. (1974): en *Heterosis in Plant Breeding. Section I: The Genetic*

- Basis of Heterosis* (A. Janossy, dir.), EUCARPIA, 1974, Hungarian Acad. of Sciences, págs. 51-57.
7. Fernández de Caleyra, R.; Hernández-Lucas, C.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1976): *Genetics*, 83:687-699.
 8. Hart, G. E. (1973): en *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* (dirs. E. R. Sears y L. M. S. Sears), Columbia, Mo., págs. 805-810.
 9. Delibes, A., y Sánchez-Monge, R.: resultados sin publicar.
 10. Brewer, C. J.; Sing, C. F., y Sears, E. R. (1969): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64:1224-1229.
 11. May, C. E.; Vickery, R. S., y Driscoll, C. J. (1973): en *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* (dirs. E. R. Sears y L. M. S. Sears), Columbia, Mo., págs. 843-849.
 12. García-Olmedo, F. (1968): *Nature*, 220:1144-1145.
 13. Torres, J. V., y García-Olmedo, F. (1974): *Plant. Sci. Lett.*, 3:213-217.
 14. Torres, J. V., y García-Olmedo, F. (1975): *Biochim. Biophys. Acta*, 409:367-375.
 15. Carbonero, P.; Torres, J. V., y García-Olmedo, F. (1975): *FEBS Lett.*, 56:198-201.
 16. Torres, J. V.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1976): *Phytochemistry*, 15:677-680.
 17. Schwartz, D. (1960): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46:1210-1215.
 18. Delibes, A., y García-Olmedo, F. (1973): en *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* (dirs. E. R. Sears y L. M. S. Sears), Columbia, Mo., págs. 161-166.
 19. Sears, E. R. (1972): *Can. J. Genet. Cytol.*, 14:736.
 20. Sears, E. R. (1973): en *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* (dirs. E. R. Sears y L. M. S. Sears), Columbia, Mo., págs. 191-199.
 21. Sears, E. R. (1975): Comunicación personal.
 22. Rodríguez-Loperena, M. A.; Aragoncillo, C.; Torres, J. V.; Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1975): *Plant. Sci. Lett.*, 5:387-393.
 23. García-Faure, R.; García-Olmedo, F., y Vallejo, M. (1968): *J. Sci. Fd. Agric.*, 19:322-324.
 24. García-Faure, R.; Merck-Luengo, J. G., y García-Olmedo, F. (1969): *Cereal Chem.*, 46:621-625.
 25. García-Olmedo, F., y García-Faure, R. (1969): *Lebensm. Wiss und Technol.*, 2:94-96.
 26. García-Olmedo, F., y Carbonero, P. (1970): en *Bericht V Welt Getreide und Brotkongress*, Dresden, págs. 6/197-6/201.
 27. Doussinault, G.; Dosba, F.; Delibes, A., y García-Olmedo, F.: Resultados sin publicar.