

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

TESIS DOCTORAL

JON GONZÁLEZ TORRALBA

TESIS DOCTORAL

Influencia de la fertilización nitrogenada y la conservación post-cosecha sobre las proteínas del gluten y la calidad harino-panadera del trigo blando

Jon González Torralba
Pamplona-Iruña, 2013

Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra



Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra

Memoria presentada por

Jon González Torralba

para optar al grado de Doctor por la Universidad Pública de Navarra

Influencia de la fertilización nitrogenada y la conservación
post-cosecha sobre las proteínas del gluten y la calidad
harino-panadera del trigo blando

Directores:

Dr. Luis Miguel Arregui Odériz

Profesor Sustituto de Docencia

Departamento de Producción Agraria

Universidad Pública de Navarra

Dra. Inmaculada Farran Blanch

Profesor Contratado Doctor

Departamento de Producción Agraria

Universidad Pública de Navarra

Universidad Pública de Navarra

E.T.S. Ingenieros Agrónomos

Pamplona-Iruña, 2013

Miembros del Tribunal

Presidente

Dr. José María Carrillo Becerril
Catedrático de Universidad
Departamento de Biotecnología
Universidad Politécnica de Madrid

Secretario

Dr. Ignacio Irigoyen Iriarte
Profesor Contratado Doctor
Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra

Vocal

Dr. Miguel Quemada Sáenz-Badillos
Catedrático de Universidad
Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia
Universidad Politécnica de Madrid

Suplente

Dra. Miren Edurne Baroja Fernández
Científico Titular
Instituto de Agrobiotecnología - CSIC

Revisores externos

Dr. José María Estavillo Aurre
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Biología Vegetal y Ecología
Universidad del País Vasco

Dr. Ramón Isla Climente
Unidad de Investigación de Suelos y Riegos
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

Dr. LUIS MIGUEL ARREGUI ODÉRIZ, Profesor Sustituto de Docencia, del Área de Producción Vegetal, del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, y

Dra. INMACULADA FARRAN BLANCH, Profesor Contratado Doctor, del Área de Producción Vegetal, del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra

CERTIFICAN,

que la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “**Influencia de la fertilización nitrogenada y la conservación post-cosecha sobre las proteínas del gluten y la calidad harino-panadera del trigo blando**”, elaborada por D. Jon González Torralba, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman el presente documento en Pamplona a 19 de diciembre de 2013.

Fdo. Dr. Luis Miguel Arregui Odériz

Fdo. Dra. Inmaculada Farran Blanch

La realización de la Tesis Doctoral comprendida en este volumen ha sido posible gracias a la Beca Predoctoral concedida a través del Programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador de la Universidad Pública de Navarra, publicado en el B.O.N. nº153, del 17 de diciembre de 2008.

La financiación para la realización de esta Tesis Doctoral procedió de los proyectos “Manejo eficiente del nitrógeno y el azufre en una rotación trigo-colza, bajo criterios medioambientales, de rendimiento y de calidad del producto final”, (RTA2005-00219-C03) y “Eficiencia en el uso del N en trigo en condiciones de clima mediterráneo húmedo: integración de aspectos agroambientales y de calidad del producto” (RTA09-028-C3-2), ambos concedidos por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

La Tesis Doctoral comprendida en este volumen está organizada según el modelo contemplado por las Normas Regulatoras del Doctorado en la Universidad Pública de Navarra, según la Resolución 803/2012, de 8 de mayo, del Rector de la Universidad Pública de Navarra, publicado en el B.O.N. nº98, del 24 de mayo de 2012. De esta manera, los resultados obtenidos durante la realización de la misma se agrupan en capítulos, que se corresponden con los artículos científicos a los que ha dado, o se prevé que dé lugar, el desarrollo de los objetivos planteados. Así, cada capítulo contiene su propio resumen, una introducción específica, la descripción de los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Por lo tanto, cada capítulo agrupa la información necesaria relacionada al tema que en él se desarrolla, permitiendo su lectura de manera independiente del resto de capítulos. Este documento incluye, además, un resumen, una introducción general que describe de manera más amplia los aspectos relacionados, con el cultivo del trigo, la fertilización nitrogenada y su influencia en las proteínas del gluten y la calidad harino-panadera, así como sobre la conservación post-cosecha del grano; los objetivos perseguidos durante la elaboración de la Tesis Doctoral, una discusión general de los resultados obtenidos, la bibliografía generada en la elaboración del documento y, por último, se exponen las conclusiones obtenidas durante el presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que debo agradecerles su ayuda. Sin la colaboración de todas ellas no hubiera sido posible que esta Tesis viera la luz. Por ello, pido perdón de antemano en caso de que alguien se siente injustamente olvidado por no encontrar su nombre en estas líneas.

En primer lugar, quiero agradecer muy especialmente todo el impulso y las enseñanzas que he recibido de mis co-directores de Tesis, Dr. Luis Miguel Arregui Odériz y Dra. Inmaculada Farrán Blanch. Luis, tengo muchas cosas que agradecerte, pero si tuviera destacar algo, me quedaría sobre todo con la confianza que has depositado siempre en mí (no sé si merecidamente), empezando por aquel lejano día en que me llamaste para proponerme que solicitara la beca del Dpto. de Industria que te habían concedido. Imma, desde antes de ser mi co-directora me ofreciste en todo momento tu ayuda desinteresada para resolver cualquier dificultad que tuviera, y lo hiciste siempre transmitiendo tu iniciativa y entusiasmo contagioso para afrontar la investigación. De nuevo, muchas gracias a los dos.

Debo extender el agradecimiento a los Responsables del grupo de investigación durante estos años, Ángel Mingo (D.E.P.) y Jon Veramendi, por haberme acogido y poner en cada momento los medios de todo tipo que necesitaba para poder continuar hacia delante por este camino.

Estoy en deuda con todas las personas que me han ayudado a sacar adelante el trabajo, tanto en la parte campo como en el laboratorio. Quiero agradecer muy especialmente a Arnotegi Armendáriz y a Ander Ezquerria por toda la dedicación y el interés que han puesto siempre en su trabajo. También al resto de personas que han aportado su granito de arena: Uxua, Iván, Eder, José Mari, Oier y Fermín. Sin vosotros hubiera sido imposible.

Sin duda, una de las mejores cosas de todos estos años es el haber tenido la oportunidad de conocer y compartir el laboratorio con tanta gente tan estupenda: Alicia, Luis, Susana, Ruth, María, Patxiku, Lorea, Irantzu, Virginia, Montse, Joncar, Karmele, Ana, Mikel, Iva, Yeosvany, Patricia, Lilian y Pablo. Ojalá que os vaya muy bien a todos en el futuro.

Gracias también a Carmen Jarén y Silvia Arazuri, por su colaboración y sus buenos consejos.

Extiendo igualmente mi agradecimiento a Edurne Baroja, por sus enseñanzas sobre el manejo del HPLC.

No puedo olvidarme tampoco de la aportación del personal de la UPNA en los ensayos realizados en la Finca de Prácticas: Susana, Isabel, Juanjo, Chocarro y Joxepe; gracias también a la gente del Idab, especialmente a Mari Jose e Idoia, por toda su preocupación por las plantas.

Para poder realizar esta tesis ha sido fundamental la colaboración con Intia (anteriormente ITG Agrícola) en la ejecución de los ensayos de regadío. Muchas gracias a Jesús Goñi, y a todas las personas que los han hecho posible, incluyendo, naturalmente, a los agricultores que cedieron sus parcelas: Cooperativa de Artajona, Luis María Ibañez y Pablo Sada.

Gracias igualmente a todas las personas con las que he compartido los proyectos INIA, tanto de NEIKER (Ana Aizpurua, Ander Castellón, Patricia Gallejones, Nerea Villar,...) como de la UPV/EHU (Txema Estavillo, Carmen González-Murua, Begoña González-Moro,...), tanto por las horas de trabajo como por los ratos tan agradables compartidos en varios congresos. Gracias en especial a Teresa Fuertes por toda su ayuda sobre las proteínas del gluten cuando andaba un poco perdido en mis inicios, así como a Sergio Menéndez e Iskander Barrena por todo el frío pasado midiendo la volatilización del amoníaco.

Mi gratitud también para con Marta Rodríguez-Quijano, de la Universidad Politécnica de Madrid, por la determinación de la composición alélica de las gluteninas de alto peso molecular de las variedades en estudio.

Quiero recordar y agradecer muy especialmente al Dr. Francisco Barro el haberme abierto, con enorme generosidad, las puertas de su laboratorio en el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) en Córdoba. Por todo lo que aprendí durante los meses que estuve allí, y también por la increíble acogida que me dispensaron. María José, Fernando, Ana Adela, Tadeo, Javi, Carmen, Racha e Imane, así como tantas otras personas que tuve la oportunidad de conocer: os tengo siempre muy presentes.

No hubiera sido posible llegar hasta aquí sin las enseñanzas, el ejemplo y el apoyo que me ha dado siempre mi familia. Gracias a todos mis amigos, por compartir los buenos momentos y hacer olvidar los malos. Y, por supuesto, gracias a Laura.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX

INTRODUCCIÓN GENERAL 1

1. EL CULTIVO DE TRIGO	1
1.1 Origen y clasificación botánica	1
1.2 La planta de trigo	2
1.3 Situación del cultivo de trigo	6
1.4 Usos del trigo	10
2. GLUTEN Y CALIDAD DE LA HARINA	10
2.1 Composición y localización del gluten en el grano de trigo	10
2.2 Estructura, propiedades e importancia del gluten en la elaboración de productos de panadería	14
2.3 Evaluación de la calidad de la harina	17
2.4 Factores que influyen en la calidad de la harina	19
2.5 Métodos para estudiar la relación entre las proteínas del gluten y la calidad de la harina	22
3. FERTILIZACIÓN NITROGENADA DEL TRIGO	25
3.1 Ciclo del N	25
3.2 Importancia del N en el cultivo del trigo)	29
3.3 Absorción y asimilación del N por la planta de trigo	30
3.4 Requerimientos de N para el cultivo de trigo	31
3.5 Ajuste de la dosis óptima de N	32
3.6 Eficiencia del N y aspectos medioambientales relacionados con la fertilización N	39
4. CONSERVACIÓN POST-COSECHA DEL GRANO DE TRIGO	45
4.1 Necesidad de conservación del grano	45

4.2 Factores y mecanismos de degradación del grano	45
4.3 Consecuencias sobre las propiedades del grano	47
4.4 Tiempo de almacenamiento seguro	49

OBJETIVOS 51

**CAPÍTULO I: Stable quality traits of soft winter wheat
under non-limiting nitrogen conditions 53**

Abstract	53
1. INTRODUCTION	54
2. MATERIALS AND METHODS	56
2.1 Experimental design and plant material	56
2.2 Yield response and N optimum rate (Nop)	59
2.3 Milling, flour N and breadmaking quality	59
2.4 Gliadin and glutenin extraction	59
2.5 RP-HPLC of gliadin and glutenin	60
2.6 Statistical analysis	61
3. RESULTS	61
3.1 Climatic data	61
3.2 Determination of non-limiting N treatments	61
3.3 Flour N vs. gliadins and glutenins	62
3.4 Flour N vs. dough strength (W) and dough extensibility (L)	64
3.5 Gliadins and glutenins vs. dough strength (W) and extensibility (L)	65
4. DISCUSSION	66
4.1 Flour N vs. gliadins and glutenins	66
4.2 Flour N vs. dough strength (W) and dough extensibility (L)	68
4.3 Gliadins and glutenins vs. dough strength (W) and extensibility (L)	68
5. CONCLUSIONS	69

CAPÍTULO II: Nitrogen fertilization in irrigated wheat for bread-making quality: optimum rate and effect on nitrogen efficiency	71
Abstract	71
1. INTRODUCTION	72
2. MATERIAL AND METHODS	74
2.1 Field experiments	74
2.2 Yield response and crop N uptake	75
2.3 Bread-making quality	76
2.4 Nitrate leaching	76
2.5 Soil mineral N content	79
2.6 Nitrate level in irrigation water	79
2.7 Ammonia volatilization	79
2.8 Nitrogen balance	80
2.9 N efficiency and harvest index	80
2.10 Statistical analysis	81
3. RESULTS	81
3.1 Grain yield, grain N yield & grain and flour N concentrations	81
3.2 Bread-making quality	85
3.3 Nitrogen balance	87
4. DISCUSSION	92
4.1 Grain yield, grain N yield & grain and flour N concentration	92
4.2 Bread-making quality	94
4.3 Nitrogen balance	95
4.4 Nitrogen efficiency	96
5. CONCLUSIONS	97

**CAPÍTULO III. New insights into the influence of gliadins
and glutenins on bread-making quality 99**

Abstract	99
1. INTRODUCTION	100
2. MATERIALS AND METHODS	103
2.1 Experimental design and plant material	103
2.2 Milling, Flour Nitrogen and Bread-making quality	103
2.3 Gliadin and glutenin extraction	104
2.4 RP-HPLC of gliadins and glutenins	104
2.5 Statistical analysis	105
3. RESULTS	105
3.1 Response of gliadin and glutenin contents to N fertilization	105
3.2 Relationship between flour N concentration, gliadin and glutenin contents	108
3.3 Relationships between flour N concentration, gliadin and glutenin contents with bread-making properties	108
4. DISCUSSION	115
4.1 Response of gliadin and glutenin contents to N fertilization	115
4.2 Relationship between flour N concentration, gliadin and glutenin Contents	116
4.3 Relationships between flour N concentration, gliadin and glutenin types with bread-making properties	117
5. CONCLUSIONS	121

CAPÍTULO IV: Influence of temperature and relative humidity during storage on wheat bread- making quality	123
Abstract	123
1. INTRODUCTION.....	124
2. MATERIALS AND METHODS	127
2.1 Experimental design	127
2.2 Grain moisture and test weight.....	128
2.3 Quality tests	129
2.4 Extraction and quantification of gliadins and glutenins	129
2.5 Statistical analysis	130
3. RESULTS	131
3.1 Experiment I	131
3.1.1 Relationships between dependent and explanatory variables	131
3.1.2 Grain moisture and test weight	132
3.1.3 Quality tests	137
3.1.4 Gliadin and glutenin content	140
3.2 Experiment II	141
3.2.1 Grain moisture and test weight	141
3.2.2 Quality tests	143
3.2.3 Gliadin and glutenin content	144
4. DISCUSSION	145
4.1 Grain moisture and test weight	145
4.2 Quality tests	147
4.3 Gliadin and glutenin content	149
5. CONCLUSIONS	151
DISCUSIÓN GENERAL	153
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	161
LISTA DE PUBLICACIONES	189

ABREVIATURAS

ABQF	Anti-baking quality factor
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
A-PAGE	Electroforesis en gel ácido de poliacridamida
ARN	Ácido ribonucleico
D	Drenaje
df	Grados de libertad
ET _c	Evapotranspiración del cultivo
ET _o	Evapotranspiración del cultivo de referencia
FCF	Fracción de capacidad de campo
FDR	Frequency Domain Reflectometry
G	Índice de hinchamiento de la masa
gli/glu	Ratio gliadinas/gluteninas
GS	Glutamina sintetasa
HI	Índice de cosecha
HMW-GS	Gluteninas de alto peso molecular
I	Riego
L	Extensibilidad de la masa
LMW-GS	Gluteninas de bajo peso molecular
N _{ab}	N absorbido por la parte aérea
N _{bal}	N resultante de la diferencia entre entradas y salidas
N _f	N aportado con el fertilizante
N _{fl}	Concentración de N en la harina
N _{gr}	Concentración de N en el grano
N _h	N mineral en el suelo en el momento de la cosecha
NHI	Índice de cosecha del N
N _{ini}	N mineral en el suelo en el momento de la siembra
N _{input}	Entradas totales de N en el sistema
N _{lch}	N perdido por lixiviación de nitratos
N _{min}	N mineral en el suelo
N _{mzed}	N mineralizado durante el periodo de cultivo

N_{op}	Dosis óptima de N para el rendimiento
N_{output}	Salidas totales de N en el sistema
N_r	N absorbido por las raíces
NRF	Fracción del N del fertilizante recuperada por la planta
NUE	Eficiencia en el uso del N
N_{up}	N total absorbido por la planta (raíz + parte aérea)
$NUpE$	Eficiencia en la absorción de N
$NUtE$	Eficiencia en la utilización de N
N_w	N aportado con el agua de riego
θ_v	Contenido volumétrico de agua del suelo
θ_{VFC}	Contenido volumétrico del suelo a capacidad de campo
P	Tenacidad de la masa
PCA	Análisis de componentes principales
PVDF	Polyvinylidene fluoride
r.h.	Humedad relative del aire
R_{max}	Máxima resistencia de la masa a la extensión
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrimida con SDS
SF	Scale frequency
SWR	Reserva de agua del suelo
TFA	Ácido trifluoroacético
W	Fuerza de la masa
X	Dosis de referencia

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Table 1. General information of field experiments	56
Table 2. N (kg N ha ⁻¹) and S (kg S ha ⁻¹) fertilizer rates applied each year	57
Table 3. Fitting models of yield (Y) (880 g kg ⁻¹ on dry matter basis), N concentration in whole grain (Ngr) and N concentration in white flour (Nfl) related to N fertilizer (x)	62

CAPITULO II

Table 1. General information of field experiments	74
Table 2. Physical and chemical properties of the experimental soils	74
Table 3. Nitrogen (kg N ha ⁻¹) fertilizer rates applied each year and date of fertilization	75
Table 4. Mean squares from analysis of variance for grain yield (kg ha ⁻¹ , 880 g kg ⁻¹ dry matter), grain N yield (kg N ha ⁻¹), N concentration in grain (%Ngr) and flour (%Nfl) (% of dry matter), tenacity (P) (mm), extensibility (L) (mm) and strength (W) (10 ⁴ J)	82
Table 5. Grain yield (kg ha ⁻¹ , 88 % dry matter), grain N yield (kg ha ⁻¹), N concentration in grain (%Ngr) and flour (%Nfl) (% of dry matter), tenacity (P) (mm), extensibility (L) (mm) and strength (W) (10 ⁴ J)	83
Table 5. Nitrogen balance (kg N ha ⁻¹) (0-0.75 m) from sowing to harvest in Badiel and Berdún in 2009-10 and 2010-11	90
Table 7. Effects of N rate on nitrogen use efficiency (NUE) (kg kg ⁻¹), nitrogen uptake efficiency (NU _p E) (%), nitrogen utilization efficiency (NU _t E) (kg kg ⁻¹), nitrogen recovery fraction (NRF) (%), harvest index (%) and nitrogen harvest index (%) in Badiel and Berdún in 2009-10 and 2010-11	91

CAPÍTULO III

Table 1. Mean squares from analysis of variance for gliadin and glutenin contents (mV min mg^{-1})	106
Table 2. Gliadin (alpha+beta, gamma, omega and total) and glutenin (high (HMW), low (LMW) molecular weight and total) contents (mV min mg^{-1})	107
Table 3. Determination coefficients between the contents of the protein fractions in flour (mV min mg^{-1})	109
Table 4. Determination coefficients between protein fractions, flour N concentration (%), dough extensibility (L) and strength (W)	115

CAPÍTULO IV

Table 1: Evolution of temperature in Experiment II	127
Table 2. Mean and standard error for the variation of grain moisture, test weight, quality tests, gliadin and glutenin content, after 240 days of storage, compared to initial conditions, from Experiment I	133
Table 3. Equilibrium moisture contents (%) obtained from sorption isotherm equations and grain moisture contents (%) and standard error measured after 240 days of storage in Experiment I	135
Table 4. Multiple correlation analysis of changes of grain moisture, test weight, quality test, gliadin and glutenin during a period of 240 days of storage in Experiment I	136
Table 5. Analysis of variance for grain moisture, test weight, quality tests, gliadin and glutenin content, within each sample moment, from Experiment I	137
Table 6. Mean and standard error for the variation of grain moisture, test weight, quality tests, gliadin and glutenin content, after 180 days of storage, compared to initial conditions, from Experiment II	141
Table 7. Mean, standard error and analysis of variance for grain moisture, test weight, quality tests, gliadin and glutenin content, in response to r.h. treatments within each sample moment, from Experiment II	143

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Origen del trigo	2
Figura 2. Ciclo del trigo	3
Figura 3. Distribución de la producción mundial de trigo por países (%) en 2010	7
Figura 4. Distribución de la producción española de trigo por países (%) en 2012	8
Figura 5. Superficie cultivada, producción y rendimiento total y por comarcas agrarias en Navarra de trigo blando en 2012	9
Figura 6. Clasificación tradicional (superior) y basada en su contenido de azufre (inferior) de las proteínas del gluten	14
Figura 7. Modelo estructural para el gluten de trigo	15
Figura 8. Efecto de la hidratación en el comportamiento "loop and train" de las HMW-gluteninas	17
Figura 9. Alveógrafo y alveograma de Chopin	19
Figura 10. Ciclo del nitrógeno	25
Figura 11. Zonas declaradas vulnerables a la contaminación por nitratos en Navarra	44

CAPÍTULO I

Figure 1. Rainfall, irrigation, mean maximum and mean minimum temperature during the crop period, every two weeks	58
Figure 2. Correlation between N concentration in dry matter white flour (Flour N), and gliadin to glutenin ratio (Gli to Glu Ratio), high molecular weight glutenin subunits (HMW), low molecular weight glutenin subunits (LMW), α - plus β - gliadin, γ - gliadin, ω - gliadin, in 2005-06, 2006-07, 2007-08, 2008-09 and 2009-10	63
Figure 3. Correlation between dough strength (W) (10^4 Joules) and nitrogen concentration in dry matter white flour (Flour N), High Molecular Weight glutenin subunits (HMW), Low Molecular Weight glutenin subunits (LMW), α - + β - gliadin, γ - gliadin, ω - gliadin, in 2005-06, 2006-07, 2007-08, 2008-09 and 2009-10	64

Figure 4. Correlation between dough extensibility (L) (mm) and N concentration in dry matter white flour (Flour N), high molecular weight glutenin subunits (HMW), low molecular weight glutenin subunits (LMW), α - + β - gliadin, γ - gliadin, ω - gliadin, in 2005-06, 2006-07, 2007-08, 2008-09 and 2009-10 65

CAPÍTULO II

Figure 1. ET_c and cumulative drainage (mm), F_{cc} at 0.70 m, soil water reserve (in upper 0.70 m) (mm) in Badiel and Berdún , two-week maximum and minimum temperatures ($^{\circ}C$), precipitation and irrigation (mm) in 2009/10 and 2010/11 88

CAPÍTULO III

Figure 1. Correlation between flour N concentration (% of dry matter) and α + β -, γ -, ω -gliadins, total gliadins, HMW-, LMW-glutenins, total glutenins and gliadin-to-glutenin ratio of Badiel, Berdún, Nogal and Osado in 2009/10, 2010/11 and 2011/12 (pag. 110) 110

Figure 2. Chromatograms of gliadin and glutenin extracts of Badiel, Berdún, Nogal and Osado 113

Figure 3. Correlation between flour N concentration (% of dry matter), total gliadins, γ_{SF} , and γ_{SFW} with dough extensibility (L); correlation of flour N concentration (% of dry matter), ω -gliadins, HMW-, and LMW-glutenins with dough strength (W) of Badiel, Berdún, Nogal, and Osado in 2009/10, 2010/11 and 2011/12 114

CAPÍTULO IV

Figure 1. Principal component analysis (PCA) projections on the first (abscissa) and the second (ordinate) PCA component for the dependent variables: grain moisture content (GM), test weight (TW), tenacity (P), extensibility (L), strength (W), falling number (FN), gliadins (Gli) and glutenins (Glu); and for the explanatory variables: temperature (Temp), relative humidity (rh) and time of storage (Time) 132

Figure 2. Evolution of quality tests during storage at 15 $^{\circ}C$ / 55% r.h. 15 $^{\circ}C$ / 75% r.h., 30 $^{\circ}C$ / 55% r.h. and 30 $^{\circ}C$ / 75% r.h. in Experiment I 134

Figure 3. Evolution of quality tests during storage at 55% r.h. and 75% r.h. in Experiment II 142

RESUMEN

Las proteínas del gluten, compuestas por gliadinas y gluteninas, son las responsables de que la masa elaborada con harina de trigo posea unas propiedades viscoelásticas que la distinguen con respecto a la de otros cereales. A su vez, la fertilización nitrogenada, además de su relación con el rendimiento del cultivo, influye de manera fundamental en la síntesis y acumulación de estas proteínas en el endospermo del grano.

El aporte de N por encima de la dosis óptima para el rendimiento en *Triticum aestivum* L. cv. Berdún incrementó la concentración de N en grano y harina, los contenidos de gliadinas y gluteninas, así como la extensibilidad (L) y la fuerza (W) de la masa. Los contenidos de γ -gliadinas y de gluteninas (tanto de alto (HMW) como de bajo peso molecular (LMW)) fueron los que mejor estimaron L y W, respectivamente, independientemente de la campaña y otras condiciones de cultivo.

El cultivo de trigo en regadío permite obtener altos rendimientos pero, sin embargo, puede suponer una reducción de la calidad harino-panadera debido al efecto de dilución de la proteína.

A pesar de la aplicación de dosis altas de N, las pérdidas de N por lixiviación de nitratos fueron en todos los casos inferiores al 5% del N total disponible para la planta, debido a que la moderada lluvia invernal y el ajuste del riego a las necesidades del cultivo limitaron el volumen de drenaje. En general, la eficiencia del N tendió a empeorar al aplicar dosis muy altas, si bien se observaron variaciones entre años de cultivo relacionadas con el aporte de N por el propio suelo.

Tomando las cuatro variedades del ensayo en conjunto, ni el contenido de γ -gliadinas, que se había mostrado como un buen estimador inter-campaña en el caso de cv. Berdún, ni cualquiera de los otros tipos proteicos resultaron de utilidad para explicar el valor de L. Sin embargo, se consiguió mejorar dicha estimación a través de cálculos basados en el contenido de cada una de la tres subfracciones (γ_A , γ_B , γ_C) que componen las γ -gliadinas.

El contenido de HMW-gluteninas se comportó como un buen estimador de W, a pesar de las diferencias entre variedades en su composición alélica. Además, las ω -gliadinas mostraron también una buena correlación con W, que podría estar relacionada con la estrecha asociación entre los loci *Gli-1* y *Glu-3*. Gracias a dicha

correlación, las ω -gliadinas podrían tener utilidad como marcador en programas de mejora genética. Una composición particular de las γ -gliadinas que sea especialmente favorecedora de las propiedades extensibles de la masa podría estar relacionada así mismo con valores bajos de W, aun cuando la composición alélica de las HMW-gluteninas de dicha variedad presente a priori una gran aptitud para destacar por sus cualidades de fuerza.

La humedad del grano de trigo varió durante su almacenamiento hasta alcanzar la humedad de equilibrio en función de la temperatura y humedad relativa de la atmósfera circundante. Condiciones simultáneas de alta temperatura (30°C) y alta humedad relativa (75%) provocaron un importante descenso del peso específico del grano, así como de L, mientras que ocasionaron un aumento de la tenacidad (P) y W. Estos cambios en la calidad harino-panadera pueden estar relacionados con las reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo en los polímeros de gluteninas. Además, la actividad α -amilásica disminuyó bajo cualquier condición de almacenamiento, pero especialmente cuando el grano se mantuvo a una alta temperatura. Por otro lado, el grano almacenado durante varios meses en las condiciones habituales presentes en un clima mediterráneo no experimentó modificaciones de importancia en su calidad harino-panadera.

ABSTRACT

Gluten proteins, consisting of gliadins and glutenins, are responsible for the unique viscoelastic properties of dough made with wheat flour, which distinguishes it from that of other cereals. On the other hand, N fertilization, on top of its relationship with crop yield, has an essential influence on the synthesis and accumulation of gluten proteins in the endosperm of the grain.

N supply above optimum N rate for yield in *Triticum aestivum* L. cv. Berdún increased grain and flour N concentration, together with gliadin and glutenin contents, and, also, dough extensibility (L) and strength (W). The contents of γ -gliadins and glutenins (both HMW- and LMW-glutenins) displayed the best estimation of L and W values, respectively, independently of the cropping season and other growing conditions.

Growing wheat under irrigation allows high yields to be attained. Nevertheless, it can result in a reduction of bread-making quality due to the protein dilution effect. In order to counteract that negative consequence, high N rates were applied to a field experiment comprising varieties of different typology (cvs. Badiel, Berdún, Nogal and Osado). Those N rates above optimum for yield produced an increment of grain and flour N concentration, gliadin and glutenin contents together with L and W in all varieties. Nevertheless, in all cases the observed increment was limited to a N rate ranging between 60-180 kg N ha⁻¹, although more commonly located in the lower part of that range.

Despite the application of high N rates, N losses by nitrate leaching were in all cases lower than 5% of the total amount of N available to the plants, due to the moderate winter rainfall and the adjustment of irrigation to crop requirements, which limited drainage volume. In general terms, N efficiency showed a tendency to worsen when very high N rates were applied, even though variations between cropping years related to different soil N supply were observed.

Taken the four cited varieties as a whole, neither the γ -gliadin content, which showed to be a good estimator of L independently of the cropping season for cv. Berdún, nor any other protein type was able to explain L values. However, the estimation of L improved by the utilization of calculations based on the contents of each γ -gliadin subfraction (γ_A , γ_B , γ_C).

The content of HMW-glutenins was a good estimator of W, in spite of the differences in the allelic composition among varieties. Moreover, ω -gliadins also showed a strong correlation with W, which may be related to the close linkage between *Gli-1* and *Glu-3* loci. Due to that correlation, ω -gliadins might have a useful role as a marker in breeding programs. A particular composition of γ -gliadins being especially favorable for dough extensibility properties could also be related to low W values, even though allelic composition of HMW-glutenins of that variety could initially lead to think of a good aptitude for strength properties.

Grain moisture content was modified throughout storage until equilibrium moisture content was reached depending on the temperature and relative humidity of the surrounding atmosphere. The joint effect of high temperature (30°C) and high relative humidity (75%) conditions promoted a marked decrease of test weight and L, while increased tenacity (P) and W. Those changes in bread-making quality could be related to disulfide-sulfhydryl interchanges in glutenin polymers. Moreover, α -amylase activity decreased under any type of storage conditions, although the modification was more prominent at high temperature. On the other hand, grain kept for several months at the prevailing conditions of a Mediterranean climate underwent only minor changes in bread-making quality.

INTRODUCCIÓN

1 EL CULTIVO DE TRIGO

1.1 Origen y clasificación botánica

El género *Triticum*, perteneciente a la familia *Poaceae* (poáceas o gramíneas), está constituido por plantas herbáceas monocotiledóneas anuales. Dentro del género *Triticum* son varias las especies de trigo que se cultivan, si bien actualmente son dos de ellas las que suman la práctica totalidad del trigo consumido en todo el mundo: *T. aestivum*, denominado comúnmente como “trigo blando”, que representa aproximadamente un 95% de la producción mundial, y *T. durum*, conocido como “trigo duro”, que supone el 5% restante (2009). Si bien persiste el cultivo de otras especies, como *T. spelta*, *T. timopheevii* o *T. monococcum* (denominado escaña cultivada o einkorn), su presencia es muy minoritaria (Wrigley, 2009).

El trigo blando (*T. aestivum*) es una especie hexaploide. Su dotación genética está compuesta por tres genomas, denominados A, B y D, cada uno de ellos compuesto por siete pares de cromosomas ($2n = 6x = 42$). El origen de esta especie se sitúa hace unos 10.000 años, en la hibridación de un trigo tetraploide (genoma AABB), inicialmente silvestre (*T. turgidum ssp. dicoccoides* o *T. dicoccoides*) pero seleccionado y domesticado para su cultivo (*T. dicoccum*), conocido como “emmer”, con la gramínea silvestre *T. tauschii* (también denominada *Aegilops tauschii* o *Aegilops squarrosa*), que aportó el genoma DD (Gooding, 2009) (Fig. 1). A su vez el *T. dicoccoides* procede de la hibridación del *T. urartu* (genoma AA) con una especie silvestre desconocida (genoma BB), pero que parece pertenecer a la sección *Sitopsis* del género *Aegilops*, a la que pertenece también *A. speltoides* (Brenchley et al., 2012).

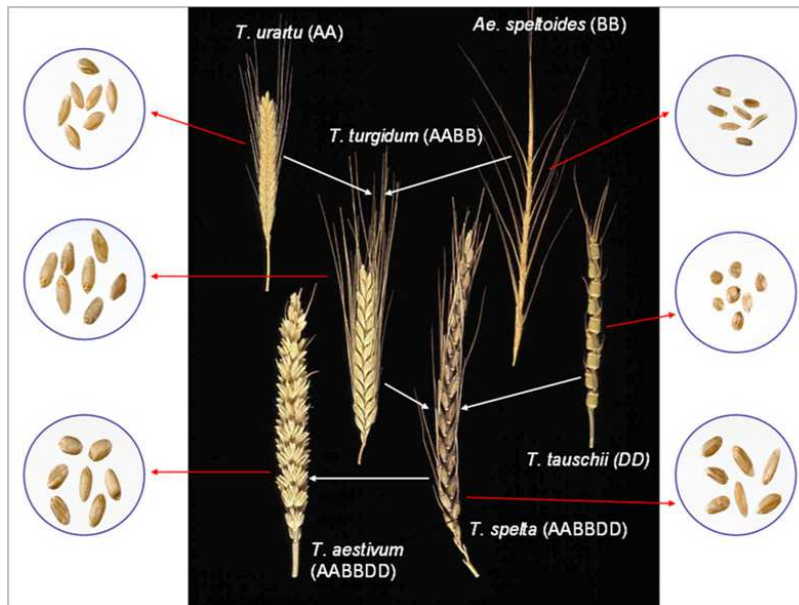


Figura 1. Origen del trigo. Fuente: Shewry (2009) (modificado a partir de Snape y Pánková (2006)).

1.2 La planta de trigo

El trigo es una planta anual, lo que significa que completa su ciclo vital en un periodo inferior a un año. Este ciclo se desarrolla a través de dos fases principales (Fig. 2). La primera de ellas, denominada *fase vegetativa*, comienza con la germinación del embrión en el grano que, en el caso típico de un cultivo de trigo, ha sido previamente enterrado en la tierra durante la siembra. La primera parte del embrión en emerger de la semilla es la radícula, raíz embrionaria o seminal, que está inicialmente protegida por una estructura denominada coleoriza. Posteriormente se desarrollarán las raíces adventicias, que son de tipo fasciculado, es decir, con numerosas ramificaciones. Con posterioridad a la aparición de la radícula, crece y emerge sobre la superficie del suelo el coleoptilo, una vaina con estructura tubular que encierra y protege la plúmula, que es la yema apical a partir de la cual surgen las primeras hojas verdaderas de la planta (Gooding, 2009). Estas hojas están unidas al tallo por medio de nudos, y constan de una vaina que envuelve una porción del tallo situada sobre el nudo de inserción y una lámina

alargada y estrecha. Además, en la zona de unión entre ambas se encuentra una lengüeta membranosa, denominado lígula, y dos apéndices que rodean parcialmente el tallo, conocidas como aurículas. El número total de hojas en el tallo principal depende de factores ambientales como temperatura, fotoperiodo o intensidad de luz (Bos y Neuteboom, 1998; Slafer et al., 1994), pero normalmente se sitúa entre 7 y 12 (Gooding, 2009). Durante el periodo vegetativo el tallo es muy corto y, por tanto, existen muy poca separación entre los nudos.

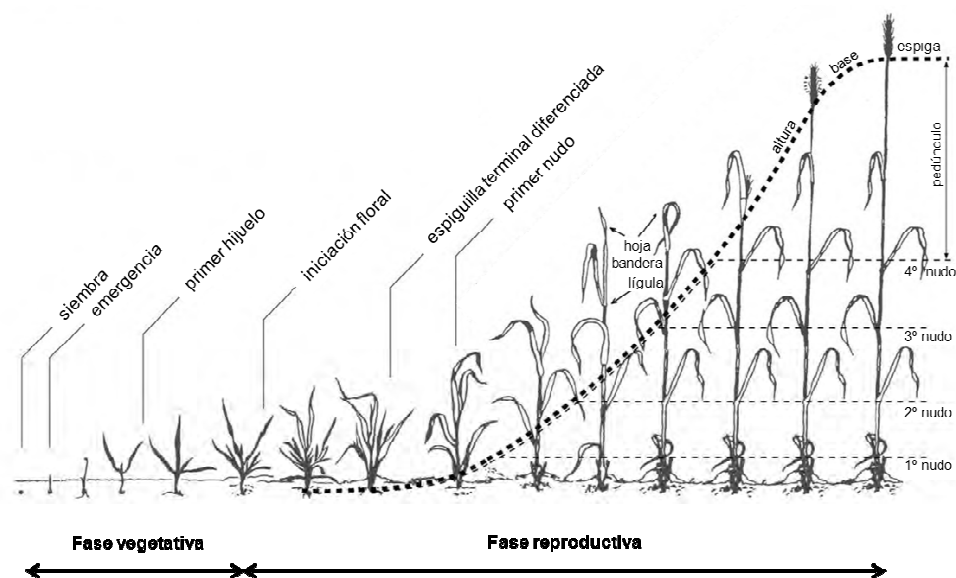


Figura 2. Ciclo del trigo. *Fuente:* adaptado de Stapper (2010).

Una característica particular de los cereales es su capacidad de ahijamiento. Ello significa que desde un nudo situado en la base del tallo principal (nudo de ahijamiento), surgen uno o varios tallos secundarios o hijuelos a partir de las yemas axilares de las hojas. De esta forma, el cultivo puede compensar una baja densidad de plantas causada por condiciones adversas, como una mala germinación, presencia de plagas o daños por frío. El número de hijuelos que se desarrollan en una planta depende de varios factores, como la composición genética de cada variedad (Mitchell et al., 2013), la fecha y densidad de siembra (Dreccer et al., 2013), la temperatura e intensidad de la luz (Bos y Neuteboom,

1998) o la disponibilidad de nutrientes (Alzueta et al., 2012). No obstante, debe tenerse en cuenta que no todos los hijuelos que se desarrollan son fértiles y alcanzan la madurez.

La segunda fase del cultivo, denominada *fase reproductiva*, comienza cuando el ápice del tallo, aunque todavía próximo al nivel del suelo, comienza a producir la espiga (Gooding, 2009). La espiga es la inflorescencia de la planta de trigo. Está compuesta por un tallo central, denominado raquis, en el que se insertan las inflorescencias elementales, denominadas espiguillas. Las espiguillas están compuestas a su vez por un pequeño raquis en el que se insertan las flores, cada una de ellas rodeada de unas brácteas membranosas: lemma, en la parte inferior, y que puede ser aristada o no, y pálea, en la parte superior. A su vez, otras brácteas membranosas, las glumas, rodean todo el conjunto de flores de cada espiguilla. Dentro de cada flor, se encuentra el gineceo, formado por un ovario con un único carpelo, estilo y estigma plumoso cuando es receptivo al polen. Por su parte, el androceo está formado por tres estambres con grandes anteras.

El siguiente paso de la fase reproductiva consiste en el crecimiento del tallo mediante la elongación de los entrenudos. Esta fase se conoce con el nombre de encañado. Mientras tanto, la espiga comienza a crecer en tamaño a la vez que asciende por el interior del tallo. Cuando supera la altura de la última hoja (u hoja bandera) se produce la emergencia de la espiga. Entre tres y ocho días después tiene lugar la floración. La polinización es mayoritariamente autógama, al producirse la apertura de las anteras dentro de la estructura protegida por lemma y pálea, aunque es posible un cierto porcentaje de polinización cruzada (Matus-Cádiz et al., 2004).

Con la fecundación del óvulo se inicia el desarrollo del grano. El grano es el fruto de la planta de trigo. Es de tipo carióspside, como es típico en las gramíneas, lo que significa que contiene una única semilla en la que el tegumento se ha fusionado con el pericarpio del fruto formando una única capa (Betchel et al., 2009). Además del pericarpio, existen otras dos capas de protección, denominadas testa y aleurona. El conjunto de pericarpio, testa y aleurona se conoce comúnmente como salvado, y constituye la fracción que se elimina durante la molienda del grano para la obtención de harina blanca. Protegidos por estas capas se encuentran el embrión, que al germinar iniciará el crecimiento de una nueva

planta, y el endospermo. Éste representa alrededor de un 80% de la masa del grano, y sirve de reserva para el desarrollo del embrión durante su germinación. Está compuesto fundamentalmente por almidón, proteínas, y polisacáridos estructurales, si bien posee igualmente otros componentes minoritarios como lípidos, terpenos, fenoles, minerales y vitaminas (Shewry et al., 2013).

En una primera fase tras la fecundación se produce el crecimiento del grano, debido a la multiplicación y expansión celular, y una rápida acumulación de agua en su interior (Pepler et al., 2006). También comienza la síntesis de gránulos de almidón. Esta primera fase posee una duración de entre 10 y 15 días. Posteriormente, en una segunda fase, se produce un incremento lineal en el contenido de materia seca, que se prolonga durante un periodo de entre 15 y 30 días, en función de la temperatura (Gooding, 2009). Cuando el grano ha logrado su máxima acumulación de materia seca se considera que ha alcanzado la madurez fisiológica. En una tercera fase iniciada a partir de ese momento, el grano pierde rápidamente humedad hasta alcanzar un punto óptimo para su recolección, conocido como madurez de cosecha.

Para describir el desarrollo de la planta de trigo se han elaborado varias escalas, siendo la de Zadoks la más utilizada (Zadoks et al., 1974). Dicha escala considera el desarrollo de la planta como una sucesión de diez fases principales, a su vez divididas en otras tantas sub-fases. La clasificación se basa en la observación visual de las plantas. A cada estadio de desarrollo le asigna un número de dos cifras, en la que la cifra de las decenas corresponde a la fase y la de las unidades está referida a la sub-fase. Para nombrarlo se añade dicho número a continuación de la letra Z (Zadoks) o de GS (growth stage).

Existe un tipo de variedades de trigo que necesitan acumular durante su fase vegetativa un determinado número de horas de frío, esto es, un cierto tiempo con una temperatura ambiental por debajo de un cierto umbral, para que la planta pueda llevar a cabo su fase reproductiva. Dicho proceso se denomina *vernalización*, y en el trigo está regulado por tres genes, denominados *VRN1*, *VRN2* y *VRN3* (Yan et al., 2004; Yan et al., 2006). El gen *VRN2* codifica una proteína que inhibe la floración, pero la actividad de este gen es a su vez inhibida por la acumulación de un determinado número de horas de frío. De esta forma ofrece protección a los órganos reproductivos frente a los daños causados por

bajas temperaturas. Por el contrario, el gen *VRN3*, regulado positivamente por fotoperiodo largo, induce la actividad del gen *VRN1*, el cual inicia la transición de la fase vegetativa a la reproductiva. De acuerdo al compendio de estudios analizados por Porter y Gawith (1999), se han descrito temperaturas efectivas para la vernalización del trigo en un rango muy amplio, que va desde -1,3°C a 15,7 °C, aunque la temperatura óptima media se situó, según dicho estudio, en 4,9°C. El número de horas necesarias depende de cada variedad. Aquellas variedades de trigo que poseen requerimientos de vernalización se denominan “de invierno” o “de otoño”, y se siembran en esta última estación, preferentemente en octubre y la primera quincena de noviembre. Por el contrario, las variedades que no tienen necesidad de un periodo de vernalización para su floración se denominan “de primavera”. Estas últimas se pueden sembrar durante los meses de enero y febrero, aunque algunas de ellas son también aptas para su siembra en la segunda mitad del otoño, especialmente entre finales de noviembre y principios de diciembre.

1.3 Situación del cultivo de trigo

Situación mundial

El trigo es un cultivo con amplia distribución mundial debido a que su variabilidad genética ha permitido el desarrollo de variedades adaptadas a diferentes condiciones climáticas. Es el principal cereal en las zonas templadas de ambos hemisferios, pero, además, su cultivo se extiende desde el círculo polar ártico hasta el ecuador, desde el nivel del mar hasta 3.000 m de altitud y en áreas con pluviometrías que oscilan entre los 250 y los 1.800 mm de precipitación (Gooding, 2009). La producción mundial de trigo alcanzó 653 millones de t en 2010 y 687 millones de t en 2009 (FAO, 2013), lo que sitúa a este cultivo como el tercero en importancia tras otros dos cereales: arroz y maíz. No obstante, es el segundo en términos de consumo humano tras el arroz, ya que en el caso del maíz hay una mayor parte proporcional de su producción dedicada a la alimentación animal. En la década 2000-2010, el incremento en la producción mundial fue ligeramente inferior al 2%. La superficie ocupada en 2010 superó las 217 millones de ha, lo que

supone un rendimiento medio aproximado de 3 t ha⁻¹. El mayor productor mundial es China, con una producción anual de 115 millones de t, seguido de la India, con 81 millones de t y Estados Unidos, que sumó 60 millones de t (Fig. 3). Dentro de la Unión Europea, Francia se situó como principal país productor, con casi 41 millones de t en 2010.

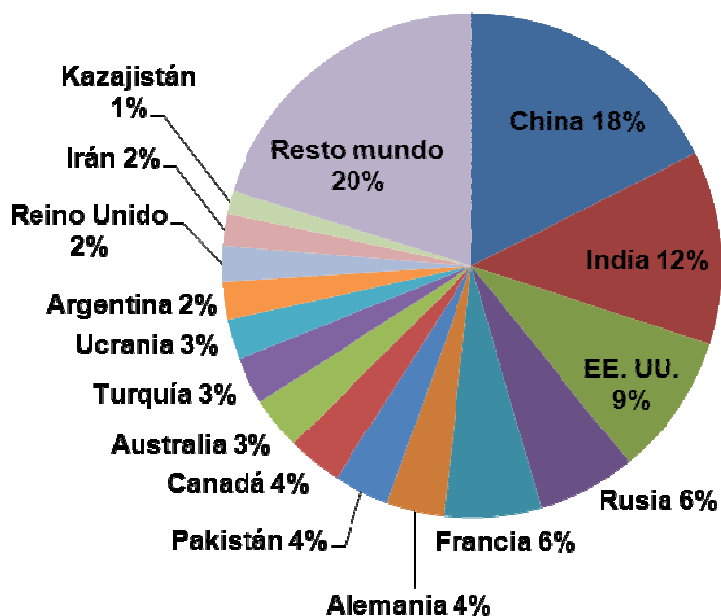


Figura 3. Distribución de la producción mundial de trigo por países (%) en 2010. Elaboración propia a partir de los datos de FAO Statistical Yearbook 2013.

Situación en España

La producción de trigo en España fue de 5,6 millones de t en 2010 y 4,7 millones de t en 2009, con una superficie cultivada en 2010 de 1,9 millones de ha, por lo que el rendimiento medio alcanzó las 2,9 t ha⁻¹ en dicho año. Esto coloca a España en el puesto nº 22 de la lista de países productores de trigo (FAO, 2013). Según los datos provisionales correspondientes a 2012 ofrecidos por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Magrama), las Comunidades Autónomas con mayor producción fueron Castilla y León (2,282 millones de t, lo que supuso un 44,8% del total), Castilla-la Mancha (603.000 t, el 11,8%) y

Andalucía (488.000 t, el 9,6 %) (Magrama, 2013) (Fig. 4). No obstante, los mayores rendimientos se obtuvieron en País Vasco ($6,2 \text{ t ha}^{-1}$), Navarra ($4,3 \text{ t ha}^{-1}$) y La Rioja ($4,1 \text{ t ha}^{-1}$). El 91,3% del trigo producido en España fue trigo blando, mientras que el 8,7% restante correspondió a trigo duro, concentrándose la mayor parte de la producción de este último en Andalucía y Aragón.

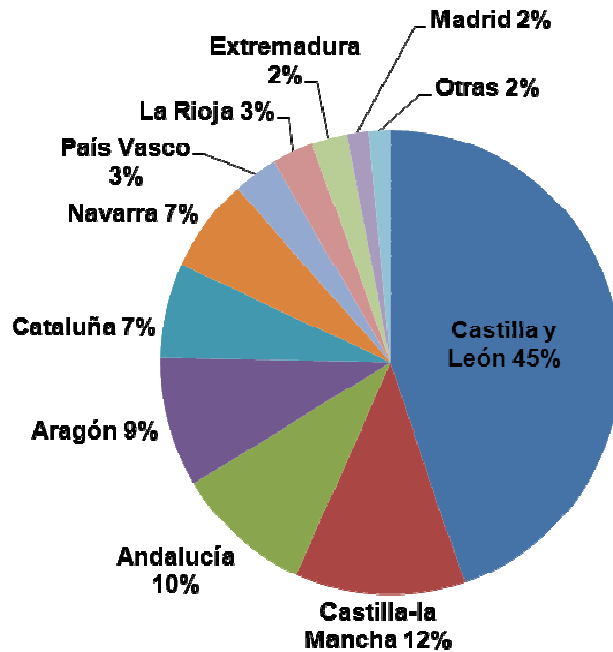


Figura 4. Distribución de la producción española de trigo por países (%) en 2012. Elaboración propia a partir de los datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2013).

Situación en Navarra

La superficie de trigo cultivada en Navarra en 2012 fue de 78.175 ha, de la que se obtuvo una producción total de 326.952 t, con un rendimiento medio de $4,3 \text{ t ha}^{-1}$, como se ha indicado en el apartado 1.3.2. El trigo blando representó un 99,4% de la producción mientras que el trigo duro únicamente el 0,6% restante (Gobierno de Navarra, 2013). Los datos referidos específicamente a trigo blando indican que

el 82% de la superficie y el 80% de la producción correspondieron a cultivo en secano, frente a un 18% y un 20%, respectivamente, en regadío. Los rendimientos medios obtenidos fueron 4,2 t ha⁻¹ en secano y 4,8 t ha⁻¹ en regadío. No obstante, dentro de Navarra existen variaciones muy importantes en el rendimiento entre las distintas comarcas agrarias, debido a la gran diferencia en las condiciones climáticas entre unas y otras zonas. Lógicamente, estas diferencias fueron más determinantes en condiciones de secano, provocando que los rendimientos medios variaran entre las 6,4 t ha⁻¹ de la Comarca I y las 0,4 t ha⁻¹ de la Comarca VII. Las Comarcas II y III fueron las de mayor importancia en el cultivo de trigo blando en Navarra, ya que entre ambas sumaron un 44,6% de la superficie cultivada y un 50,8% de la producción (Fig. 5). No obstante, en lo que se refiere al cultivo en regadío, un 89% de la superficie y un 88% de la producción se concentró en las Comarcas V, VI y VII. Hay que destacar que, en 2002, la superficie dedicada al cultivo de trigo blando en regadío en Navarra fue de 7.598 ha, de la que se obtuvo una producción de 33.954 t. Por tanto, en la última década, la superficie y la producción de trigo blando en regadío han aumentado un 79% y un 93%, respectivamente, debido fundamentalmente a la transformación en regadío de nuevas áreas de cultivo.

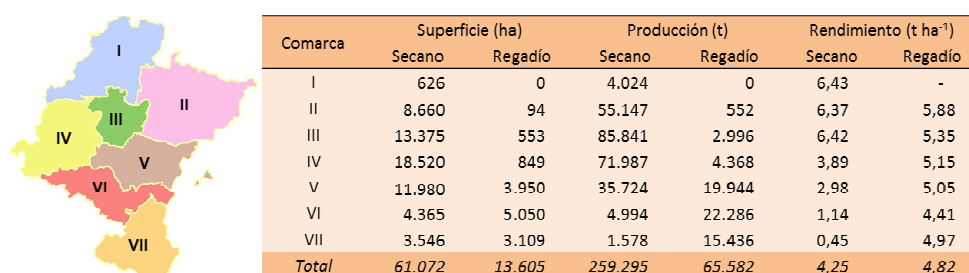


Figura 5. Superficie cultivada, producción y rendimiento total y por comarcas agrarias en Navarra de trigo blando en 2012. Fuentes: Mapa de cultivos y aprovechamientos de Navarra. Tabla de elaboración propia a partir de los datos de Producciones Anuales de los Cultivos (Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local, 2013).

1.4 Usos del trigo

La mayor parte de la producción mundial de trigo (65%) va destinada a la alimentación humana. Le sigue en importancia el dirigido a la alimentación animal (17%), y en tercer lugar el que va destinado a diversos usos industriales (12%), incluyendo la producción de bioetanol (FAO, 2013).

Dentro de la alimentación humana, existe una amplísima variedad de productos elaborados con trigo, debido a que se trata de un cereal presente desde la Antigüedad en numerosas culturas a lo largo de todo el mundo. Por tanto, su uso se ha adaptado a los requerimientos y gustos particulares de cada zona. Los alimentos elaborados con trigo incluyen los distintos tipos de pan (hogaza, de molde, al vapor, pita, chapatti... etc.), pasta, fideos asiáticos, galletas, bollería, pastelería, empanado de otros alimentos... etc. En la mayor parte de los alimentos de los que forma parte hoy en día, el trigo se utiliza molido, bien con todos sus componentes, como harina integral, o bien con algún tipo de refinado para eliminar el salvado, en forma de harina blanca (Ross y Bettge, 2009). Casi todos estos productos se elaboran con trigo blando; la excepción la constituye la pasta, que se elabora en casi todos los casos a partir de trigo duro.

2 GLUTEN Y CALIDAD DE LA HARINA

2.1 Composición y localización del gluten en el grano de trigo

El gluten puede ser definido como la sustancia gomosa que permanece cuando la masa elaborada con harina de trigo es lavada para eliminar los gránulos de almidón y otros constituyentes solubles en agua (Wieser, 2007). Está formado por el conjunto de proteínas de reserva depositadas en el endospermo del grano de trigo (Shewry et al., 2002), y cuya finalidad biológica es la de proporcionar al embrión el carbono, nitrógeno y azufre que necesita para su crecimiento durante la germinación (Anjum et al., 2007). Se conocen también con el término de "prolaminas" debido a su alto contenido de los aminoácidos prolina y glutamina (Shewry y Tatham, 1990).

Las proteínas del gluten han sido estudiadas desde muy antiguo. Ya en 1745, J. B. Beccari describió por primera vez el procedimiento para el aislamiento del gluten mediante el lavado del almidón a partir de una bola de masa (Beccari, 1745). Posteriormente, T.B. Osborne, en 1907, realizó un avance fundamental al fraccionar y clasificar el conjunto de proteínas presentes en los cereales en cuatro categorías en función de su solubilidad: *albúminas*, solubles en agua, *globulinas*, solubles en soluciones salinas diluidas, *prolaminas*, solubles en una mezcla de alcohol (70-90%) y agua (si bien posteriormente se denominaron *gliadinas*, ya que el término *prolaminas* pasó a designar el conjunto de proteínas del gluten) y, *glutelinas* (conocidas actualmente como *gluteninas* en el caso del trigo), solubles en diluciones de ácidos y álcali (Osborne, 1907).

Las dos últimas fracciones de la clasificación de Osborne, gliadinas y gluteninas, son las que componen el gluten. Las gliadinas constituyen un grupo heterogéneo de pequeñas proteínas, con un tamaño entre los 30 y los 75 kDa (Fido et al., 1997). Se clasifican en cuatro grupos en función de su movilidad electroforética en un gel ácido (pH 3,1) de poliacrilamida. De mayor a menor movilidad se distinguen α -, β -, γ - y ω -gliadinas (Rumbo et al., 1999; Woychik et al., 1961). Están presentes en la harina de trigo siempre en forma monomérica debido a que, o bien no forman puentes disulfuro de ningún tipo (ω -gliadinas), o estos son únicamente intramoleculares (α -, β - y γ -gliadinas) (Barak et al., 2013b). No obstante, en posteriores investigaciones se ha observado que las secuencias de ADN y aminoácidos de α y β -gliadinas son muy similares, por lo que en numerosos estudios se las considera como un único tipo de proteínas (Bietz et al., 1977; Kasarda et al., 1983). Además, de acuerdo con su movilidad en A-PAGE y su secuencia N-terminal, las ω -gliadinas han sido divididas en tres tipos: ω -1, ω -2 y ω -5 (Kasarda et al., 1983).

Los genes que codifican las gliadinas se encuentran estrechamente ligados entre sí formando clústeres en varios loci situados en el brazo corto de los grupos 1 y 6 de cromosomas. Por un lado, en el loci *Gli-1*, localizado en los cromosomas homólogos 1A, 1B y 1D, se encuentran los genes que codifican la mayor parte de las γ - y ω -gliadinas. Por otro lado, el loci *Gli-2* se encuentra en los cromosomas 6A, 6B y 6D y en él se localizan los genes responsables de la síntesis de todas las α - y

β -gliadinas y de algunas de las γ -gliadinas (Barak et al., 2013b). Se han localizado también algunos loci de menor relevancia en el brazo corto del grupo 1 de cromosomas: *Gli-A3*, *Gli-A5* (Pogna et al., 1995), *Gli-A4* (Redaelli et al., 1992), *Gli-A6* (Metakovsky et al., 1996), *Gli-B3* (Galili y Feldman, 1984; Metakovsky et al., 1986), *Gli-B5* (Pogna et al., 1993), *Gli-D3* (Anderson et al., 2009), *Gli-D4* y *Gli-D5* (Rodríguez-Quijano y Carrillo, 1996). Los genes situados en dichos loci codifican ω -gliadinas, con la excepción del locus *Gli-D4*, a partir del cual se sintetiza una γ -gliadina.

Las gluteninas, a diferencia de las gliadinas, constituyen una mezcla heterogénea de polipéptidos unidos entre sí mediante puentes disulfuro intermoleculares formando grandes polímeros (Gupta et al., 1992). De hecho, se considera que los polímeros de gluteninas constituyen las moléculas de mayor tamaño presentes en la Naturaleza, pudiendo alcanzar pesos moleculares de hasta varios millones de Daltons (Wrigley, 1996). Las gluteninas se clasifican en dos tipos en función de su tamaño: gluteninas de alto peso molecular (70-90 kDa) y gluteninas de bajo peso molecular (20-45 kDa) (D'Ovidio y Masci, 2004).

Los genes que codifican las gluteninas, al igual que en el caso de las gliadinas, están localizados en varios loci. El loci *Glu-1* se sitúa en el brazo largo de los cromosomas homólogos 1A, 1B y 1D, denominándose *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, respectivamente. Es el responsable de la síntesis de las gluteninas de alto peso molecular. En cada cromosoma, el loci *Glu-1* está formado por dos genes: uno de ellos codifica la subunidad de tipo x, mientras que el segundo lo hace con la subunidad de tipo y, siendo la subunidad de tipo x de mayor tamaño que la subunidad de tipo y. Por tanto, existen un total de seis genes correspondientes a gluteninas de alto peso molecular, si bien únicamente se expresan entre tres y cinco, dependiendo de la variedad de trigo de que se trate. Cada subunidad se identifica mediante un número que le ha sido asignado. Inicialmente esta numeración se basaba en su movilidad en un gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras (SDS-PAGE) (siendo 1 la subunidad con menor peso molecular y, por tanto, menor movilidad y 12 la de mayor) (Payne y Lawrence, 1983), pero el descubrimiento posterior de nuevas subunidades de gluteninas de alto peso molecular ha imposibilitado la continuidad de este criterio. Para indicar a

qué cromosoma pertenece cada subunidad se indica, junto a su número identificativo, el cromosoma y el tipo (x o y) (p. ej. Ax1).

Los genes que sintetizan las gluteninas de bajo peso molecular se encuentran mayoritariamente en el loci *Glu-3*, localizado en el brazo corto de los cromosomas homólogos 1A, 1B y 1D, denominándose por tanto cada loci como *Glu-A3*, *Glu-B3* y *Glu-D3*, respectivamente. Este loci *Glu-3* se encuentra próximo y muy ligado al loci *Gli-1*. Las gluteninas de bajo peso molecular sintetizadas por estos genes son denominadas como de tipo B. No obstante, se ha observado también la existencia de otras gluteninas de bajo peso molecular con secuencias aminoacídicas similares a las de las gliadinas, tanto α - y γ -gliadinas (tipo C), como ω -gliadinas (tipo D), ya que proceden de una mutación de dichas gliadinas que les ha hecho ganar una cisteína adicional. Esta modificación les permite unirse a otras proteínas mediante puentes disulfuro intermoleculares y, por tanto, formar parte de los polímeros de gluteninas. Los genes que codifican estas gluteninas se encuentran, por consiguiente, en los grupos de cromosomas 1 y 6. Debido a que son prácticamente idénticas a las α - y γ -gliadinas, es muy posible que las gluteninas de bajo peso molecular tipo C estén codificadas por genes situados en un loci íntimamente ligado a los loci *Gli-1* y *Gli-2*, o bien incluso dentro de estos mismos loci (Masci et al., 2002). Por otro lado, se ha observado la síntesis de subunidades tipo D en un loci denominado *Glu-2*, situado en el brazo corto del cromosoma 1B (Jackson et al., 1985), si bien también se ha observado la presencia de gluteninas de este tipo en el loci *Glu-3* (Nieto-Taladriz et al., 1998).

Además de esta clasificación de las proteínas del gluten en gliadinas y gluteninas, con sus consiguientes subdivisiones, existe otra clasificación muy extendida basada en su contenido de azufre (Shewry y Tatham, 1990). Así, se puede distinguir entre prolaminas ricas en azufre, prolaminas pobres en azufre y gluteninas de alto peso molecular, que se encuentran en una situación intermedia entre ambos grupos. Las prolaminas ricas en azufre incluyen las α -, β - y γ -gliadinas, así como las gluteninas de bajo peso molecular, mientras que las prolaminas pobres en azufre están constituidas por las ω -gliadinas (Fig. 6).

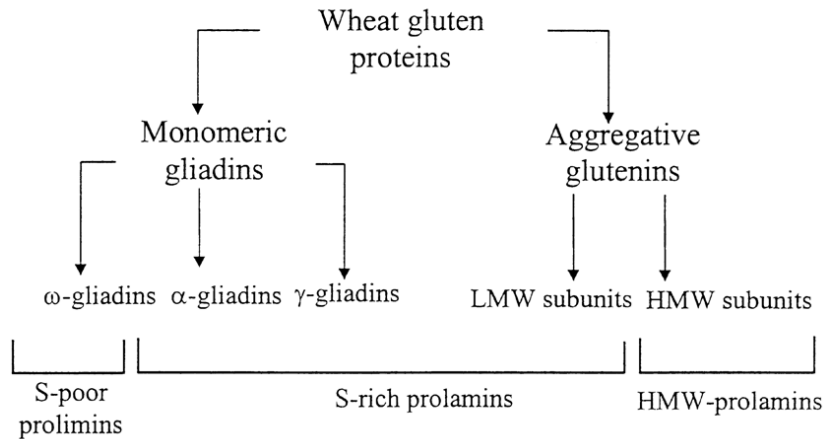


Figura 6. Clasificación tradicional (superior) y basada en su contenido de azufre (inferior) de las proteínas del gluten. *Fuente:* Shewry et al. (1986).

2.2 Estructura, propiedades e importancia del gluten en la elaboración de productos de panadería.

La masa hecha con harina de trigo posee unas propiedades singulares que la distinguen de la elaborada con cualquier otro cereal. Son las denominadas propiedades viscoelásticas (Branlard et al., 2001). Esto quiere decir que la masa es, por un lado, elástica, es decir, al sufrir una deformación tiende a recuperar su forma inicial; y, por otro lado, que es viscosa, por lo que se puede estirar, dentro de un rango, sin que llegue a romperse. La suma de estas dos propiedades es la que permite que, durante el proceso de elaboración de pan, el dióxido de carbono generado durante la fermentación la masa no se escape, sino que quede retenido formando alveolos en su interior, dando lugar a la estructura típica de la miga de una hogaza de pan (Day et al., 2006; Dobraszczyk, 2004).

Lo que diferencia a la harina de trigo de otros cereales y le proporciona esas características particulares es el gluten. Por un lado, las gliadinas, son las responsables de la viscosidad de la masa, haciendo que esta sea más extensible (Wieser, 2007). Las gluteninas, en cambio, son las que aportan, gracias a su estructura polimérica, las propiedades elásticas, relacionadas con lo que se conoce

como “fuerza” de la masa (Shewry et al., 2002), que está relacionada con el trabajo necesario para deformarla (Torres et al., 2000). Esta estructura polimérica estaría formada por subunidades de gluteninas de alto peso molecular unidas “de cabeza a cola” mediante puentes disulfuro formando la “columna vertebral” del polímero, de la que saldrían ramificaciones constituidas por gluteninas de bajo peso molecular, también unidas mediante puentes disulfuro a las de alto peso molecular (Graveland et al., 1985) (Fig. 7). Además de los puentes disulfuro, existen otros enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que intervienen en la conformación y propiedades de estos polímeros de gluteninas (Lindsay y Skerritt, 1999). Se cree, además, que las gliadinas interaccionan con estos polímeros mediante enlaces no covalentes (Shewry et al., 2001b).

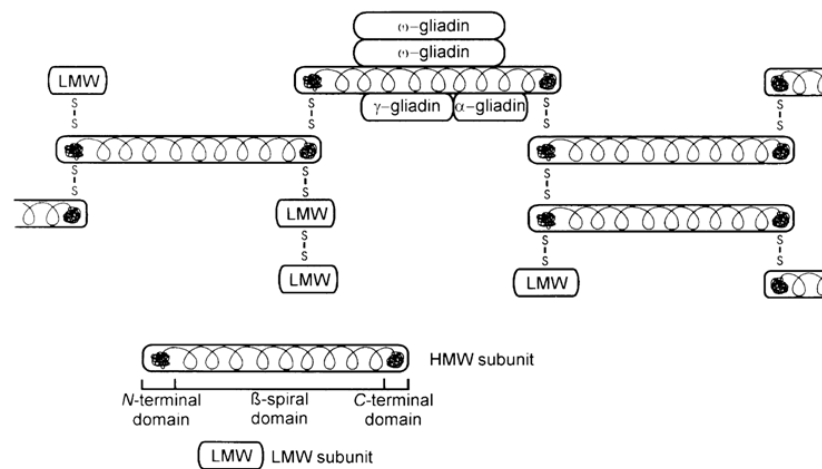


Figura 7. Modelo estructural para el gluten de trigo en el que las HMW-gluteninas forman la columna vertebral mediante puentes disulfuro, interaccionando del mismo modo con las LMW-gluteninas y mediante enlaces no covalentes con las gliadinas. *Fuente:* Shewry et al. (2001b).

Existen diversos modelos que tratan de explicar el mecanismo por el cual las interacciones entre estos polímeros aportan a la masa sus propiedades elásticas. Belton (1999) propuso el modelo denominado “loop and train” (Fig. 8). Según dicho modelo, en un estado inicial de baja hidratación, existen numerosos puentes de hidrógeno entre las cadenas de gluteninas. Al hidratarse la harina, una

parte de estas interacciones entre proteínas se rompen para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, existiendo al final un equilibrio entre ambos tipos de enlaces. Las regiones hidratadas forman unos grandes bucles (“loops”) que, como consecuencia de la fuerza ejercida durante el amasado son capaces de estirarse, a la vez que se abren las zonas de unión entre cadenas (“trains”), volviéndose a formarse la estructura inicial una vez cesa la fuerza. La tenacidad, o resistencia a la extensión, dependerá del ratio entre “loops” y “trains”, que está condicionado por el contenido de agua. Como la energía necesaria para deformar los “loops” es menor que para abrir los “trains”, un aumento del contenido de agua facilitará la deformación (Shewry et al., 2001b). Este mecanismo de cadenas extendidas puede que sea el que permite almacenar en la masa la energía elástica (Anjum et al., 2007). Otra hipótesis diferente para explicar las propiedades reológicas del gluten está basada en su presencia en la harina en forma de partículas (Lefebvre et al., 2003). Según estos autores, el gluten debería considerarse como un tipo de gel coloidal, una red formada por la agregación de partículas de gluteninas mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Esta organización estructural de las gluteninas en forma de partículas tendría como origen su deposición en cuerpos proteicos densos al formarse en el endospermo inmaduro (Don et al., 2003). La estructura interna de estas partículas sería la descrita anteriormente como una columna vertebral de gluteninas de alto peso molecular con ramificaciones de gluteninas de bajo peso molecular (Don et al., 2006). Según esta hipótesis, los puentes disulfuro no participarían directamente en la conectividad de esta red a nivel macroscópico.

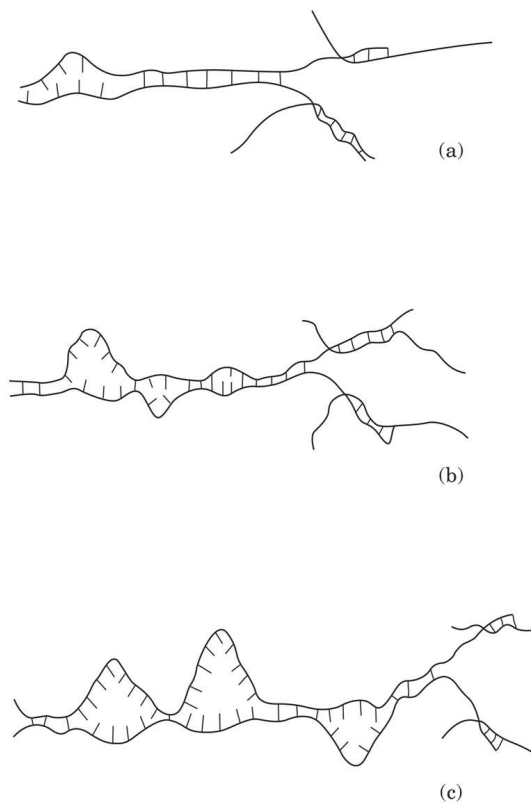


Figura 8. Efecto de la hidratación en el comportamiento “loop and train” de las HMW-gluteninas: (a) bajos niveles de hidratación: puentes de hidrógeno principalmente entre cadenas; (b) niveles intermedios de hidratación: se forman algunos “loops”; (c) altos niveles de hidratación: el sistema contiene muchos “loops”, pero existen suficientes enlaces entre cadenas para mantener el contacto. *Fuente:* Belton (1999)

2.3 Evaluación de la calidad de la harina

Existe una gran variabilidad en la composición y en el contenido de proteínas del gluten entre unos trigos y otros, motivada por causas tanto genéticas como ambientales. Dicha variabilidad tiene como consecuencia que existan grandes diferencias entre las propiedades reológicas de unas y otras harinas. Por tanto, a la hora de llevar a cabo un proceso industrial de panificación, resulta

fundamental precisar qué características concretas posee la harina que se va a utilizar. De esta manera, será posible conocer en qué medida se ajusta dicha harina a las necesidades establecidas para obtener el producto final deseado. Para ello existen varios equipos de laboratorio que permiten simular a pequeña escala algunos de los procesos de elaboración de productos de panadería y medir sobre ellos algunos parámetros que permitan caracterizar el comportamiento de la masa. Entre estos equipos se encuentran el Mixógrafo, Extensógrafo o Farinógrafo. Uno de los más utilizados es el Alveógrafo de Chopin (Chopin Technologies, Villeneuve-la-Garenne, Francia). Este equipo permite simular el comportamiento de la masa al hincharse durante el proceso de fermentación (Fig. 9). Para ello se amasa con agua una pequeña cantidad de harina y se coloca una porción circular de dicha masa en un soporte. Por la parte inferior de la masa se le comienza a insuflar aire. En un primera fase, la masa ofrece la máxima resistencia a la deformación; posteriormente, continua inflándose hasta que en un determinado momento se rompe, momento en el que finaliza el ensayo. Todo ese comportamiento de la masa queda registrado en una curva, denominada alveograma, de la que se obtienen una serie de parámetros: la tenacidad (representada como P y expresada en mm), que indica la resistencia máxima a la deformación ejercida por la masa, y que está relacionada por lo tanto con sus propiedades elásticas; la extensibilidad (representada como L y expresada en mm), que es la capacidad que tiene la masa para ser sometida a extensión sin romperse, y está relacionada con sus propiedades viscosas; y la fuerza (representada como W y expresada en 10^{-4} J), que se calcula a partir del área encerrada por esta curva, recoge el trabajo necesario para realizar la deformación de la masa y es una medida de la capacidad de ésta para resistir la deformación mecánica. También es frecuente el uso de la relación P/L, que indica el equilibrio entre las propiedades elásticas y viscosas de la masa. En España, el Real Decreto 1615/2010, en el que se aprobó la norma de calidad del trigo, utiliza, entre otros, los parámetros del alveograma para definir las características que determinan la inclusión de un trigo en alguno de los grupos de calidad definidos en dicha norma.

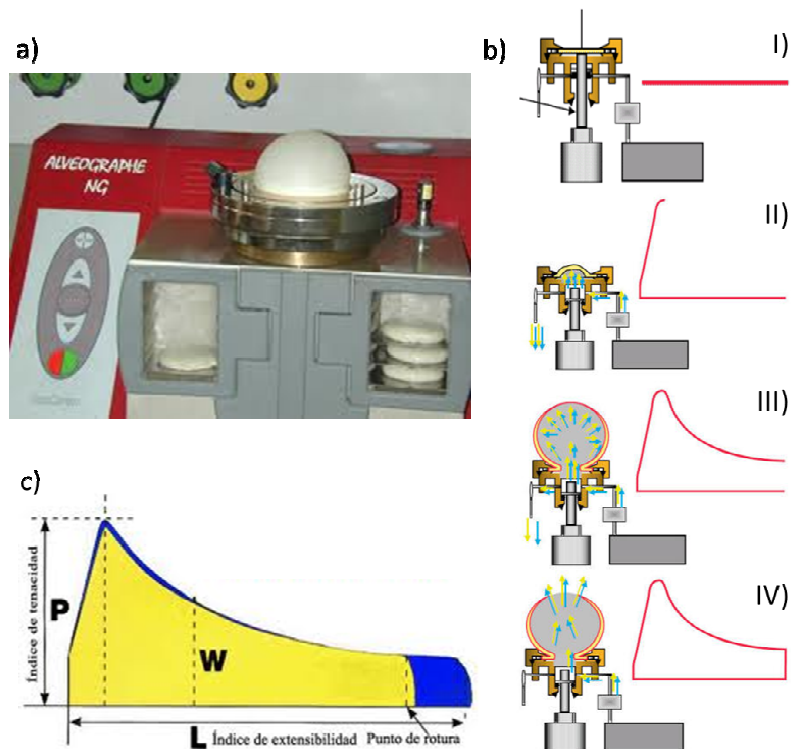


Figura 9. Alveógrafo y alveograma de Chopin: a) Imagen parcial del alveógrafo durante el proceso de inflado de la masa; b) Esquema del desarrollo del ensayo: I) Situación de partida; II) Fase inicial del inflado, en el que la masa ofrece la máxima resistencia (tenacidad); III) la masa se expande en forma de burbuja (extensibilidad); IV: ruptura de la masa (fin del ensayo); c) Representación gráfica del alveograma en la que se indican los parámetros de tenacidad (P) (mm), extensibilidad (L) (mm) y fuerza (W) (J).

2.4 Factores que influyen en la calidad de la harina

Genéticos

Como se ha indicado anteriormente, no todas las harinas tienen las mismas propiedades reológicas, sino que por el contrario muestran diferencias muy importantes entre sí. Existen diversas causas que explican dichas diferencias. La

más importante de ellas es la variabilidad genética, que tiene como consecuencia una diferente composición alélica de las proteínas del gluten entre las distintas variedades. En este aspecto, las proteínas que han sido mejor estudiadas y caracterizadas han sido las gluteninas de alto peso molecular. Basándose en los resultados obtenidos en el SDS Sedimentation test (que mide el volumen floculado y sedimentado de una suspensión de harina en una solución ácida con presencia de detergente), Payne et al. (1987) asignaron una puntuación a cada par de alelos correspondiente a cada uno de los loci *Glu-1*. La suma de las puntuaciones asignadas a los alelos presentes en *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, da como resultado la puntuación total de una determinada variedad de trigo, que es indicativa de su calidad. Por otro lado, son numerosos los trabajos que indican que las variedades que poseen el par 5+10 en el loci *Glu-D1* producen una harina con más fuerza que aquellas que poseen el par 2+12 (Giraldo et al., 2010; Johansson y Svensson, 1999; Saint Pierre et al., 2008). En este caso, la diferencia podría ser debida a una cisteína adicional que posee la subunidad 5, lo que le permitiría formar un puente disulfuro adicional (Kasarda, 1999). Otro aspecto cualitativo importante, y que viene determinado fundamentalmente de forma genética, es el ratio entre distintas proteínas, especialmente el ratio entre gliadinas y gluteninas. Dicho ratio ha sido relacionado con el equilibrio entre las propiedades elásticas y viscosas de la masa (Khatkar et al., 1995).

Además de las diferencias cualitativas derivadas de la diferente composición alélica, el genotipo puede influir también en la cantidad de proteína que sea acumulada en el grano. Un mayor contenido de proteínas incrementará, de forma general, la calidad de la harina, si bien este aumento puede depender, como se ha indicado anteriormente, tanto de la composición como de los ratios entre distintos tipos de proteínas.

Ambientales

Diversos factores medioambientales pueden modificar el contenido y la composición proteica del grano de trigo y la harina. El más importante de ellos es la temperatura, especialmente durante el periodo post-floración. En condiciones de alta temperatura (por encima de 30°C), la cantidad de N orgánico acumulada en

cada grano se ve poco afectada, ya que tanto la tasa diaria del flujo de N como su duración experimentan variaciones de escasa importancia. Además, ambas variables están correlacionadas negativamente entre sí, lo que implica un fenómeno de compensación (Triboi y Triboi-Blondel, 2002). Por el contrario, tanto la tasa de deposición de almidón en el endospermo del grano como su duración disminuyen con altas temperaturas (Jenner, 1994). En consecuencia, aumenta la concentración de proteína por efecto de la reducción del contenido de materia seca. No obstante, éste no es el único efecto de la temperatura: se ha descrito en varios estudios que el stress térmico durante el llenado del grano puede provocar una disminución de la síntesis de gluteninas (Don et al., 2005), una reducción del tamaño de sus polímeros (Blumenthal et al., 1995; Blumenthal et al., 1993) y un aumento del contenido de gliadinas (Blumenthal et al., 1991). Dicho aumento puede estar relacionado con la presencia de elementos de respuesta al stress térmico en los promotores de los genes de gliadinas (Blumenthal et al., 1990). Otro factor ambiental con incidencia en la proteína del grano es el stress hídrico, que al igual que la temperatura, aumenta la concentración de proteína en el grano al reducir la deposición de almidón (Gooding et al., 2003). Se ha observado también un incremento del ratio gliadinas/gluteninas (Saint Pierre et al., 2008), si bien Singh et al. (2008) describieron la existencia de diferencias varietales en la sensibilidad tanto de gliadinas como de gluteninas al stress hídrico.

Fertilización

Uno de los factores más importantes que afectan al contenido proteico de la harina, y por tanto a su calidad, es la disponibilidad de N inorgánico en el suelo para la planta. Puede tener varios efectos distintos: por un lado, un mayor aporte de N al cultivo aumentará la síntesis y acumulación de proteínas en el grano, y con ello la calidad de la harina (Johansson et al., 2001; Wieser y Seilmeier, 1998). Por otro lado, puede modificar la composición de dicha proteína al variar los ratios entre los distintos tipos que forman el gluten. Así, varios autores han descrito un aumento del ratio gliadinas/gluteninas al aumentar el contenido proteico como consecuencia de un aumento de la fertilización nitrogenada (Doekes y Wennekes,

1982; Hurkman et al., 2013; Saint Pierre et al., 2008), si bien esta es una tendencia no observada en otros casos (Pechanek et al., 1997).

Otro elemento mineral que posee una influencia clave sobre la composición del gluten es el azufre. Como se ha comentado en el apartado 2.1, existen diferencias entre las distintas proteínas del gluten en cuanto a su contenido de azufre. Por tanto, una mayor disponibilidad de azufre para la planta puede modificar la síntesis de proteínas del gluten, aumentando el contenido de aquellas que poseen un mayor número de aminoácidos sulfurados en su estructura y viceversa (MacRitchie y Gupta, 1993). Como resultado, se ha descrito un aumento del ratio gliadinas/gluteninas en situaciones de deficiencia de azufre (Wieser et al., 2004).

2.5 Métodos para estudiar la relación entre las proteínas del gluten y la calidad de la harina

El conocimiento sobre qué función tiene cada uno de los componentes del gluten sobre las propiedades reológicas de la masa de harina de trigo ha sido objeto de numerosos estudios. Los procedimientos utilizados para ello pueden agruparse en cuatro categorías (Weegels et al., 1996): i) fraccionamiento y cuantificación de los componentes del gluten para establecer correlaciones estadísticas con los parámetros de calidad, ii) estudios de fraccionamiento y reconstitución/fortificación de la harina para observar la contribución de la fracción añadida sobre la calidad, iii) mejora convencional y manipulación genética para estudiar el efecto de la adición o delección de un determinado componente y iv) determinación de la función de una proteína basada en su estructura.

Los *estudios de correlación* han sido utilizados en numerosas ocasiones para relacionar el contenido de una determinada proteína con diversos parámetros de calidad. Este tipo de estudios ha sido particularmente frecuente en el caso de las gluteninas de alto peso molecular (Ahmad, 2000; Campbell et al., 1987; Hou et al., 1996; Ng y Bushuk, 1988). Hay que tener en cuenta que la relación no tiene por qué ser necesariamente lineal, ya que puede existir un óptimo (Weegels et al., 1996). No obstante, se debe tener en cuenta que la correlación no implica una

relación causa-efecto. De esta forma, pueden existir otro u otros factores adicionales que sean los verdaderos responsables de las variaciones de calidad.

En los *ensayos de reconstitución/fortificación* se añade a la harina un extracto de un determinado tipo de proteína que ha sido previamente aislado de otra muestra de harina, lo que permite medir la funcionalidad de ese componente en condiciones controladas (Chakraborty y Khan, 1988; Fido et al., 1997; Khatkar et al., 2013). Aunque, a priori, dicha variación de la calidad medida podría ser atribuida inequívocamente a la fracción añadida, este tipo de ensayos presenta también algunos inconvenientes. Una de sus limitaciones reside en el hecho de las proteínas aportadas interaccionan con las presentes en la harina base, luego dependiendo de la composición de dicha harina base se obtendrán distintos niveles de “ruido” en las mediciones que se hagan (Oszvald et al., 2008). Para tratar de evitar ese inconveniente, se ha utilizado en algún estudio harina de arroz como harina base, debido a la diferente funcionalidad de las proteínas de este cereal (Oszvald et al., 2009). Otra cuestión clave es la necesidad de asegurar que la funcionalidad de la proteína se mantenga intacta con respecto a su situación original en la harina (Skerritt et al., 1996). Esta funcionalidad puede verse alterada por desnaturalización, agregación, cambios en la conformación o proteólisis durante un proceso prolongado de extracción o diálisis (Weegels et al., 1996). En este sentido, es conocido, por ejemplo, que el etanol afecta negativamente a la funcionalidad de las gliadinas (Chakraborty y Khan, 1988), por lo que no se puede utilizar como extractante en estudios de este tipo. Por otro lado, en los estudios de adición de gluteninas es necesario tener en cuenta que estas proteínas desarrollan su función como parte de grandes polímeros. Por tanto, su adición en forma monomérica no proporciona una información veraz sobre su función real (Schropp y Wieser, 1996), sino que deben ser oxidadas para que puedan entrar a formar parte de los polímeros de gluteninas (Békés et al., 1994).

La *manipulación genética* permite introducir o eliminar algún componente del gluten. Puede realizarse de forma convencional mediante cruzamientos (Pirozi et al., 2008), siendo frecuente el estudio de líneas casi isogénicas (Jin et al., 2013; Mondal et al., 2007), o por métodos biotecnológicos. El estudio de dichas plantas

permite analizar las variaciones de la calidad que van asociadas a esa modificación. En el caso de las gluteninas, la aplicación de la biotecnología se ha dirigido fundamentalmente a las de alto peso molecular por medio de su sobreexpresión (Barro et al., 1997; Pierucci et al., 2009), silenciamiento mediante ARN de interferencia (Yue et al., 2008), o bien a través de la introducción de otras subunidades inicialmente no presentes (León et al., 2009). En algún caso, al introducir nuevas gluteninas de alto peso molecular se ha observado el silenciamiento de las endógenas (Alvarez et al., 2000). En lo referente a las gliadinas, es especialmente relevante el uso de la tecnología del ARN de interferencia para el silenciamiento parcial (Gil-Humanes et al., 2008) o total (Gil-Humanes et al., 2010) de estas proteínas. No obstante, existen algunos inconvenientes. Por un lado, en el caso de la mejora convencional, junto con el gen de interés pueden verse introducidos o eliminados otros genes ligados (Weegels et al., 1996). Por otro lado, al eliminarse una proteína por métodos biotecnológicos puede verse modificada la síntesis de otras (Pistón et al., 2011), enmascarando el efecto real de la proteína delecionada.

Relación estructura – función: El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido obtener secuencias de ADN de todos los grupos principales de proteínas del gluten, a partir de las que se puede deducir sus secuencias aminoacídicas. Conociendo dichas secuencias se pudieron llevar a cabo modelizaciones de su estructura secundaria, particularmente en el caso de las gluteninas de alto peso molecular (Shewry et al., 2002). Un aspecto de gran importancia en estas estructuras es el número y distribución de los puentes disulfuro (Shewry y Tatham, 1997). Varios estudios han demostrado su influencia sobre las propiedades elásticas al ser modificadas estas mediante la aplicación de sustancias oxidantes o reductoras a la masa (Pareyt et al., 2010; Tsen, 1969). No obstante, el conocimiento sobre su impacto en las propiedades biomecánicas es todavía incompleto (Anjum et al., 2007). Otros estudios acerca de las relaciones entre la estructura y la función del gluten se han centrado en comprender el motivo por el que los polímeros de gluteninas tienen una influencia tan importante sobre las propiedades de la masa. En este ámbito se podrían incluir los modelos de (Belton, 1999) y (Lefebvre et al., 2003) comentados en el apartado 2.2.

3. FERTILIZACIÓN NITROGENADA DEL TRIGO

3.1. Ciclo del N

El N que se aporte al cultivo en forma de fertilizante orgánico o mineral entrará a formar parte del complejo ciclo que desarrolla este elemento en el conjunto suelo-planta-atmósfera (Fig. 10). El conocimiento de este ciclo y de los factores que influyen sobre cada uno de los procesos que lo componen es fundamental para poder realizar una fertilización que se ajuste a las necesidades del cultivo y que permita un aprovechamiento eficiente del N aportado.

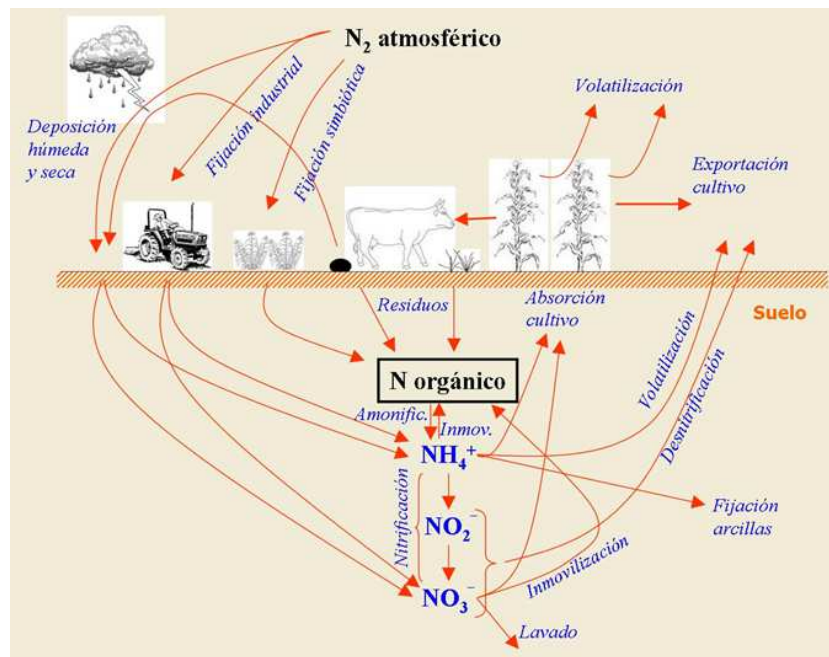


Figura 10. Ciclo del nitrógeno. Fuente: adaptado de Stevenson (1982).

La mayor parte del N está presente en forma de dióxido de N (N_2) en la atmósfera. Este gas no es utilizable por la plantas. Sin embargo, existen unas bacterias que son capaces de realizar una *fijación biológica* del N_2 . Las pertenecientes a los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* son las responsables de la mayor parte de esta fijación biológica (Freiberg et al., 1997).

Estas bacterias realizan una *fijación simbiótica* al establecer una asociación de estas características con las raíces de las plantas de la familia *Leguminosae*. Son capaces de reducir el N_2 a amonio (NH_4^+), que sí es una forma aprovechable para las plantas. Las plantas de la familia *Poaceae* no son capaces de formar naturalmente asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de N. Sin embargo, sí pueden obtener N por medio de otro tipo de fijación biológica, en este caso no simbiótica. Esta fijación se denomina *asociativa*, cuando las bacterias ocupan la superficie de la raíz, y *endofítica* cuando colonizan los tejidos internos de las raíces (Santi et al., 2013). En el caso particular del trigo, se ha observado que bacterias de los géneros *Azospirillum* (Baldani et al., 1983; Boddey et al., 1986), *Azotobacter* (Zambre et al., 1984) y de la especie *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986) pueden interactuar con el trigo mejorando el crecimiento de la planta. No obstante, estas asociaciones, que se dan principalmente en climas tropicales, no son tan eficientes como la fijación simbiótica existente en el caso de las leguminosas, siendo además muy variable en función de la cepa bacteriana, genotipo de la planta y condiciones ambientales (Santi et al., 2013). Existe también una *fijación abiótica*, por efecto de los rayos, la luz ultravioleta, la actividad volcánica y los motores de combustión interna, que provocan la reacción del N_2 con el oxígeno del aire y el hidrógeno del vapor de agua produciendo diversos compuestos que son arrastrados al suelo por el agua de lluvia (Newton, 2000). Además, puede haber un aporte de N orgánico al suelo mediante los *excrementos* y *deyecciones* del ganado o mediante el aporte de *abonos orgánicos*. También es habitual en los sistemas agrarios la utilización de *fertilizantes inorgánicos*, que proceden de la síntesis industrial a partir de N_2 atmosférico mediante el proceso de Haber-Bosch.

En el suelo, la mayor parte del N suele encontrarse en forma orgánica, como parte de los seres vivos, de la materia orgánica libre o bien formando parte de los compuestos húmicos. Una pequeña fracción restante está en forma de N mineral. Las dos formas más comunes de N mineral en el suelo son el nitrato (NO_3^-) y el NH_4^+ . La materia orgánica sufre un proceso de *mineralización* o *amonificación* por la acción de los microorganismos del suelo, por el que se transforma en NH_4^+ . Dicho proceso se ve influido positivamente por la biomasa microbiana del suelo, el contenido de arcilla, la concentración de C en el suelo, alta

temperatura y elevada precipitación (Booth et al., 2005; Colman y Schimel, 2013). A su vez una parte del NO_3^- y el NH_4^+ pueden ser *inmovilizados* por las bacterias del suelo y pasar a formar parte de la materia orgánica. Esto sucede cuando la materia orgánica en descomposición posee una alta relación C/N, como es el caso de la paja de cereal. Se denomina como *mineralización neta* a la diferencia entre la cantidad de N mineralizado y el inmovilizado.

Por otra parte, el NH_4^+ puede sufrir un proceso de oxidación, por acción de las bacterias del grupo *Nitrosomonas*, por el que se transforma en nitrito (NO_2^-). Normalmente, este compuesto químico es muy poco estable en el suelo, oxidándose rápidamente a NO_3^- por la acción de bacterias del género *Nitrobacter*. Este proceso se denomina en conjunto como *nitrificación*. Normalmente va asociado a la mineralización de la materia orgánica, por lo que no es habitual la acumulación de cantidades importantes de NH_4^+ en el suelo. La excepción se produce en suelos encharcados o ácidos, ya que los microorganismos nitrificantes son estrictamente aerobios y requieren para su actividad un pH superior a 5,0. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la nitrificación son humedad del suelo a capacidad de campo, pH superior a 6,0 y temperaturas entre 25-35°C (Sahrawat, 2008).

El NO_3^- , debido a su carga negativa, es poco retenido por las arcillas del suelo. En consecuencia, queda libre en la solución de agua del suelo, por lo que cuando se producen precipitaciones o riegos importantes que superan la capacidad de campo del suelo, se puede producir su *lixiviación* hacia horizontes más profundos. Esto supone un peligro de contaminación de acuíferos o de aguas superficiales en las que se pueda acumular el agua drenada, produciéndose en estas últimas el fenómeno de la eutrofización (Verhoeven et al., 2006).

Además, el NO_3^- también puede sufrir un proceso de *desnitrificación*, en el que es reducido parcial o completamente, transformándose en diversas formas gaseosas (óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), N_2). Esto posee igualmente consecuencias negativas desde un punto de vista medioambiental, ya que tanto el N_2O como el NO son gases de efecto invernadero (Groffman et al., 2006). Este proceso lo realizan microorganismos anaerobios del suelo (*Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*) y está favorecido por valores de pH del suelo ligeramente básicos (pH 7-8). Aquellas condiciones del suelo que favorezcan una

disponibilidad de O_2 baja, como exceso de humedad, temperatura elevada (Ludwig et al., 2001), o textura pesada (D'Haene et al., 2003) favorecerán la desnitrificación. También es importante que exista un suministro de C orgánico como fuente de energía para los microorganismos (Luo et al., 1998). Hay que tener en cuenta, no obstante, que para que este proceso pueda darse no es necesario que esas condiciones de pH y baja disponibilidad de O_2 sean la condición general del suelo, sino que basta con que tengan lugar en determinados “micrositios” o “puntos calientes” dentro del suelo. Es en esas pequeñas zonas donde se produce la mayor parte de la desnitrificación (Groffman et al., 2006).

El NH_4^+ , por el contrario, es retenido por las cargas negativas de las arcillas del suelo. De hecho, una parte puede ser *fijada de forma no intercambiable* por las arcillas del tipo 2:1 (illita, caolinita, vermiculita y montmorillonita), al ocupar un hueco libre entre las láminas de las arcillas (Juang et al., 2001). No obstante, el NH_4^+ también puede perderse por vía gaseosa al transformarse en amoníaco (NH_3) en el proceso conocido como *volatilización*. Se trata de una reacción puramente química, sin intervención de microorganismos, y que se ve favorecida por condiciones de alcalinidad, humedad y alta temperatura del aire y el suelo, así como por una alta velocidad del viento (Zhang et al., 2011). Aun cuando la humedad del suelo es un requisito necesario para la volatilización, una entrada importante de agua al suelo en forma de lluvia o riego puede reducir el potencial de volatilización tras la aplicación de un fertilizante, al favorecer su movimiento hacia capas más profundas del suelo (Misselbrook et al., 2004). Por otro lado, al igual que en el proceso de desnitrificación, condiciones puntuales de alcalinidad, como las que pueden darse como consecuencia de la hidrólisis de los gránulos de urea aplicada como fertilizante, pueden provocar pérdidas importantes por volatilización aun cuando el pH general del suelo muestre valores inferiores (Fan y Mackenzie, 1993).

La planta toma el N del suelo a través de las raíces. Únicamente puede *absorber* las formas inorgánicas de N (NO_3^- y NH_4^+), no siendo directamente aprovechable la fracción orgánica. El N mineral es transformado en orgánico dentro de la planta y utilizado por ésta en la síntesis de sus diferentes órganos, y será exportado posteriormente con la cosecha del cultivo. No obstante, también se producen *emisiones gaseosas* en forma de N_2O a través de las hojas (Smart y

Bloom, 2001). Al mismo tiempo, una pequeña fracción de esos compuestos orgánicos puede ser exportada al suelo a través de los exudados de las raíces, lo que se conoce como *rizodeposición* (Jones et al., 2004). Por otro lado, los residuos que deje el cultivo tras su cosecha sufrirán un proceso de descomposición. Parte del N presente en ellos pasará a forma mineral o gaseosa. Sin embargo, otra fracción evolucionará a través de un proceso de *humificación* hasta pasar a formar parte de la materia orgánica estable del suelo (Nicolardot et al., 2001).

3.2. Importancia del N en el cultivo del trigo

De igual manera que para el común de organismos vegetales, el N es un macronutriente para la planta de trigo, lo que indica que se requiere en grandes cantidades. El N está presente en todos los órganos de la planta: raíces, tallo, hojas y espiga, si bien la concentración varía de forma importante entre unos y otros, siendo mayor en las hojas que en el resto de órganos (Grindlay, 1997). Sólo se pueden generar nuevos tejidos de hoja si hay suficiente N disponible, bien mediante absorción del suelo o bien a través de la removilización del N almacenado en otros tejidos de la planta (Jamieson y Semenov, 2000). Por otro lado, las plantas de trigo con deficiencia de N senescen antes que las que están bien nutridas (Evans, 1983). La importancia del N radica en que forma parte de numerosos componentes esenciales para la planta, como proteínas, ácidos nucleicos o clorofila, entre otros. Esto hace que exista una correlación positiva muy estrecha entre el contenido de N de la hoja y el de clorofila (Evans, 1983). Por tanto, la respuesta de la fotosíntesis de la hoja a la radiación dependerá en gran medida del contenido de N de la hoja (Gastal y Lemaire, 2002). De esta manera, un aumento del contenido de N de la hoja supone un incremento de la asimilación de CO₂ por unidad de superficie foliar, si bien esta relación no es lineal (Evans, 1983). En consecuencia, un mayor contenido de N permite una mayor acumulación de fotoasimilados que se traduce en un mayor desarrollo de la biomasa. Esto implica un mayor número de tallos secundarios por planta, un mayor porcentaje de espigas viables con respecto al número total de tallos y un mayor número de granos por espiga, al reducirse el número de abortos florales (Diekmann y Fischbeck, 2005). Además, se puede acumular en determinados tejidos u órganos

en lo que se denomina como “consumo de lujo” (Herrmann y Taube, 2005). Aunque en muchos otros cultivos (por ejemplo, en hortalizas de hoja) este consumo de lujo puede tener un efecto negativo como consecuencia de la acumulación de nitratos (Blom-Zandstra, 1989), en el caso del trigo dicha absorción extra de N es positiva, ya que implica una mayor síntesis y acumulación de proteínas del gluten en el endospermo y, por consiguiente, una mayor calidad del grano.

3.3. Absorción y asimilación del N por la planta de trigo

El N es absorbido por la raíz en forma de NO_3^- o NH_4^+ , siendo la primera de estas dos formas, en general, la dominante (Crawford y Chalk, 1993; Lasa et al., 2001). Se ha considerado que en algunos casos la acumulación de amonio puede resultar tóxica para la planta, si bien los motivos que lo provocan todavía no son completamente comprendidos (ver revisiones de Britto y Kronzucker (2002 y 2013)). Además de la raíz, la entrada del N en la planta puede realizarse por vía foliar (Abad et al., 2004; Bly y Woodard, 2003; Woolfolk et al., 2002). La mayor parte del N es absorbida durante la fase vegetativa. Se calcula que un 80% del N total que se encuentra en la planta en la madurez está ya presente en el momento de la antesis o floración (Delogu et al., 1998). Una vez absorbido, el NO_3^- es reducido a NH_4^+ en un proceso que consta de dos fases. En la primera de ellas, el NO_3^- se transforma en NO_2^- mediante la acción de la enzima citosólica nitrato reductasa. En una segunda fase, el NO_2^- es reducido a NH_4^+ por medio de la enzima nitrito reductasa, localizada en el cloroplasto. Este proceso de reducción del NO_3^- puede tener lugar tanto en las propias células de la raíz como en las hojas, después de que el NO_3^- sea transportado por el xilema (Beevers y Hageman, 1969). Posteriormente, el NH_4^+ es incorporado a compuestos orgánicos mediante el ciclo GS-GOGAT (Lea y Mifflin, 1974), en el que es utilizado como sustrato para la transformación de glutamato a glutamina. A partir de la glutamina se sintetiza el resto de aminoácidos, así como también ácidos nucleicos y compuestos del metabolismo secundario. Este proceso de asimilación del NH_4^+ está catalizado por la enzima glutamina sintetasa (GS). Esta enzima posee dos isoformas: GS1 (citosólica) y GS2 (plastidial). La isoforma GS1 parece estar

relacionada fundamentalmente con procesos de translocación y removilización del N dentro de la planta, como los relacionados con la senescencia foliar; a su vez, GS2 posee como función principal la asimilación del NH_4^+ procedente de la reducción del NO_3^- absorbido por la raíz además de la reasimilación del NH_4^+ fotorrespiratorio (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Durante la fase vegetativa, el N se acumula en las hojas, fundamentalmente en forma de la enzima Rubisco (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), cuya actividad carboxilasa cataliza la fijación del CO_2 a una forma orgánica en el ciclo de Calvin. Posteriormente, durante la fase reproductiva, con el dismantelamiento del aparato fotosintético, una parte importante del N asimilado es removilizado (Gregersen et al., 2008) y utilizado de nuevo para la síntesis de Rubisco en hojas más jóvenes o bien transportado al grano donde se acumula en forma de proteínas metabólicas, estructurales y de reserva (Feller et al., 2008). Se calcula que entre un 65-90% del N presente en el grano procede de la removilización (Hirel et al., 2007), mientras que el resto correspondería al N absorbido tras la antesis. No obstante, la contribución de cada órgano de la planta al N translocado se ve influida por la dosis y el momento de aplicación del fertilizante nitrogenado (Fuertes-Mendizábal et al., 2012).

3.4. Requerimientos de N para el cultivo de trigo

Debido al papel fundamental que desempeña en el metabolismo del trigo y a sus altos requerimientos por la planta, el N es, en la mayor parte de las situaciones, el factor limitante que determina el rendimiento del cultivo (Fageria et al., 2005). Se ha calculado que el trigo necesita absorber aproximadamente 30 kg N ha^{-1} para producir una tonelada de materia seca de grano (Gooding y Davis, 1997). Por tanto, en la mayor parte de los sistemas agrarios es necesario realizar un aporte externo de N en forma de fertilizante orgánico o mineral para que el cultivo pueda desarrollar todo su potencial productivo, como ha sido observado en numerosos experimentos (Arnall et al., 2013; Arregui y Quemada, 2008; Fowler, 2003; Fuertes-Mendizábal et al., 2010; Garabet et al., 1998; Guarda et al., 2004; López-Bellido et al., 2012; Mengel et al., 2006; Miransari y Mackenzie, 2010; Mohammed et al., 2013; Varga y Svecnjak, 2006; Woolfolk et al., 2002). Sin

embargo, al aplicar dosis de N crecientes, el incremento adicional del rendimiento tiende a ser cada vez menor, hasta llegar a una determinada dosis umbral a partir de la cual ya no se produce ningún incremento (Cui et al., 2010; Gallejones et al., 2012; Garrido-Lestache et al., 2004; Ortuzar-Iragorri et al., 2010). Es posible, incluso, que dosis excesivamente altas puedan producir una reducción del rendimiento, al favorecer el encamado (Marino et al., 2011; Tripathi et al., 2003). Puede haber casos, no obstante, en los que no exista una respuesta del cultivo a la fertilización. Esto se debe a que el N no es en esos casos un elemento limitante, bien porque hay una alta disponibilidad de N mineral en el suelo que excede las necesidades del cultivo, bien porque hay otro elemento mineral cuya escasez en el suelo lo convierte en limitante, o bien por la presencia de factores de stress bióticos (plagas, enfermedades) o abióticos, como la disponibilidad de agua (Hawkesford, 2011). Por este motivo es necesario conocer cuál es la dosis apropiada de N que necesitamos aportar al cultivo. Una dosis insuficiente o excesiva puede provocar pérdidas económicas por la reducción del rendimiento o por un gasto injustificado en fertilizante (Aizpurua et al., 2010; Baker et al., 2004). Por otro lado, la disponibilidad de N para la planta está relacionada con el contenido de proteínas de reserva del grano, lo que resulta de gran interés desde el punto de vista de su utilización en panadería. Se ha observado que el contenido de estas proteínas aumenta cuando se aplican dosis de N superiores a la dosis óptima para el rendimiento (Borghini et al., 1997). Por tanto, en función de la utilización posterior del grano, puede considerarse que los requerimientos del cultivo son superiores a los que podrían considerarse estrictamente desde el punto de vista del rendimiento.

3.5. Ajuste de la dosis óptima de N

No es sencillo conocer a priori cuál es la dosis óptima de N a aplicar al cultivo para obtener el máximo rendimiento con el mínimo aporte de fertilizante. Por un lado, existe una incertidumbre sobre cuál puede ser el rendimiento que se obtenga, debido a la variabilidad meteorológica entre campañas, especialmente en lo referente a la precipitación. Por otro lado, se desconoce la disponibilidad de N en el propio suelo antes de la fertilización (Babcock, 1992). Esto puede depender de muchos factores, relacionados con las prácticas agronómicas realizadas

anteriormente y con la enorme complejidad del ciclo del N. Entre estos factores destacan el contenido de materia orgánica del suelo, su tasa de mineralización e inmovilización, aportes de abonos orgánicos y minerales en años anteriores, cultivo precedente, procesos de lavado de nitratos y pérdidas gaseosas, fundamentalmente.

Son varios los métodos que se utilizan para el cálculo de la dosis óptima de N:

Curvas de respuesta

El método de las curvas de respuesta se basa en la obtención de una función que relacione el rendimiento del cultivo con la dosis de N aportada para conseguirlo. El máximo de dicha función nos indica en este caso cuál es la dosis óptima. Existen diversos tipos de formulaciones matemáticas para las curvas de respuesta: cuadrática, lineal-meseta, cuadrático meseta, exponencial o raíz cuadrada, si bien estas dos últimas no ofrecen un buen ajuste (Cerrato y Blackmer, 1990). Entre los tres modelos restantes, el cuadrático es el que tiende a ofrecer valores más altos para la dosis óptima de N, seguido por el cuadrático-meseta, siendo el lineal-meseta el que arroja los valores más bajos (Cerrato y Blackmer, 1990; Henke et al., 2007). La elección del modelo estadístico, por tanto, puede afectar considerablemente a la estimación de la dosis óptima. En general, se considera que el modelo cuadrático-meseta es preferible al cuadrático, ya que este último tiende a ofrecer recomendaciones de dosis excesivas (Bullock y Bullock, 1994). Un inconveniente de la utilización de curvas de respuesta es que la determinación *ex post* de la dosis óptima de fertilizante no tiene en cuenta la inevitable incertidumbre que resulta de la variabilidad entre los diferentes años y localizaciones del cultivo como consecuencia de las especificidades del clima y el suelo (Henke et al., 2007).

Métodos basados en el análisis del suelo

Estos métodos se basan en el análisis de alguno de los componentes del N orgánico y/o mineral del suelo para estimar cuál es el aporte de N que va a recibir

el cultivo y, basado en ese dato, calcular la dosis complementaria de N que se necesita aplicar por medio del fertilizante para maximizar el rendimiento. El inconveniente de estos métodos es que es necesario definir un determinado “rendimiento esperado” o “rendimiento objetivo”, que es difícil de predecir, incluso para una determinada localización (Olf et al., 2005). Los más utilizados son:

- *Método del balance* (Rémy y Hébert, 1977): fue inicialmente desarrollado en Francia para el cálculo de la dosis en cereal y otros cultivos. Se basa en evaluar, por un lado, los requerimientos de N para un determinado cultivo y con un objetivo de rendimiento particular, y por otro lado el aporte de N del suelo durante todo el ciclo de cultivo, que se estima en función de las características físico-químicas del suelo y el historial de la parcela. La diferencia entre los requerimientos del cultivo y el aporte del suelo será la cantidad de N a suministrar mediante la aplicación del fertilizante.

- *Método del N_{min}* (Wehrmann y Scharpf, 1979): desarrollado en Alemania para trigo de invierno, este método se basa en la medición del contenido de N mineral ($N-NO_3^- + N-NH_4^+$) en el momento en que se hace la aplicación de fertilizante tras la parada invernal del cultivo. Se asume que dicho N mineral puede ser absorbido por las plantas. Por tanto, la dosis de fertilizante N se calcula como la diferencia entre la cantidad óptima de N y el N_{min} suministrado por el suelo dentro de la profundidad explorada por las raíces (Wehrmann y Scharpf, 1986). No tiene en cuenta la mineralización neta posterior a la fecha del muestreo de suelo.

- *Test de nitratos*: El más importante de ellos es el Test de Nitratos en Precobertera (“Presidedress Soil Nitrate Test” o PSNT) (Magdoff et al., 1984), aunque también es utilizado el Test de Nitratos en Primavera Tardía (“Late Spring Nitrate Test” o LSNT) (Blackmer et al., 1997; Jaynes et al., 2004). Estos tests fueron desarrollados en EE. UU. para el cultivo de maíz y son similares al método del N_{min} , aunque en este caso se analiza únicamente el contenido de $N-NO_3^-$ en el suelo. Se han establecido valores críticos de 20-30 mg de $N-NO_3^- \text{ kg}^{-1}$ en varias regiones de EE. UU. por encima de los cuales no habría una respuesta a la aplicación de fertilizante (Olf et al., 2005). Posteriormente, estos métodos han sido

aplicados al trigo. Cui et al. (2010) ajustaron la dosis a lo largo del ciclo de cultivo basándose en el contenido de N-NO_3^- en la zona radicular (0-30 cm en presiembr y 0-90 cm en el estadio de encañado). Además, Miransary y Mackenzie (2011) indicaron que la medición del N-NO_3^- en el suelo (0-30 cm, o hasta 60 cm en zonas con alta precipitación) en el momento de la siembra podía ser igualmente un buen indicador de la dosis óptima.

- *Método de Electro-Ultra-Filtración (EUF)* (Mengel et al., 1999; Nemeth, 1979): este método fue desarrollado en Alemania, y se utiliza actualmente para la determinación de las necesidades de varios nutrientes, además del N (Mengel et al., 2006). Tiene en cuenta tanto el N orgánico como el mineral extraíble mediante EUF medido en muestras de suelo tomadas en otoño en la capa superficial (0-30 cm) del suelo. Se ha observado que la cantidad de N orgánico extraída mediante EUF es un buen indicador de la mineralización neta (Mengel et al., 1999). Para calcular la dosis de fertilizante nitrogenado asume que 1 mg N kg^{-1} de suelo, orgánico o inorgánico, equivale a una disponibilidad de 45 kg N ha^{-1} .

Métodos basados en el análisis de la planta

Estos métodos se basan en la consideración de que la planta en sí misma es el mejor indicador de la disponibilidad de N durante el periodo de cultivo (Olf et al., 2005). Los métodos más utilizados habitualmente son:

- *N-nutrition index (NNI)*: se basa en la asunción de que hace falta una concentración mínima determinada de N en la materia seca en el conjunto de la planta para conseguir el máximo crecimiento del cultivo. El NNI se calcula como el ratio entre el contenido real de N de la planta y el valor considerado como crítico (Lemaire et al., 2008). Dicho valor crítico decrece conforme va aumentando la acumulación de biomasa durante el ciclo de cultivo. Esto ha llevado a la determinación de una "Curva de Dilución del N", que indica la concentración crítica de N en cada estadio de desarrollo del cultivo (Justes et al., 1994).

- *Concentración de N-NO₃⁻ en la base del tallo:* dicha concentración sirve como indicación del status de la nutrición nitrogenada del cultivo. La determinación puede hacerse en varios estadios de desarrollo de la planta. Papastylianou et al. (1982) consideraron como valor crítico aquella concentración de N-NO₃⁻ con la que el rendimiento del cultivo alcanzaba un 90% del rendimiento máximo, si bien el valor crítico en un momento determinado puede depender también de cómo se haya previsto el reparto de la dosis de N (Hoel, 1999). El método JUBIL[®] (Justes et al., 1997), desarrollado en Francia, combina la medición de la concentración de N-NO₃⁻ en la base del tallo con el método de los balances.

- *Concentración de N en la hoja superior:* este método tiene en cuenta que durante el crecimiento de la planta se produce una redistribución del N hacia aquellas partes mejor iluminadas. En consecuencia, mientras que la concentración total de N disminuye al aumentar la biomasa, el contenido de N por unidad de área foliar en la parte superior de la planta se mantiene aproximadamente constante en condiciones de disponibilidad regular de N (Lemaire et al., 1997). Este método ha sido utilizado fundamentalmente en praderas, donde se ha obtenido una buena correlación con el NNI (Farruggia et al., 2004).

- *Evaluación visual mediante parcelas de referencia:* se basa en la aplicación en presiembra de dosis crecientes de N a lo largo de una franja del terreno ("*Ramped Calibration Strip*" (RCS) (Raun et al., 2005; Raun et al., 2008)). El análisis visual de las diferencias en crecimiento y color entre esas parcelas permite al agricultor conocer cuál es la dosis óptima, que será aquella por encima de la cual no se observen diferencias en el crecimiento del cultivo.

- *Medidores de clorofila:* como se ha comentado anteriormente, el contenido de N de la hoja y la concentración de clorofila están fuertemente correlacionados. Para estimar el contenido de clorofila se utilizan diversos tipos de lectores ópticos portátiles que, en contacto con la hoja, miden la transmitancia de la luz a través de ella. Los equipos empleados son el N-Tester (Yara Internacional, Dülmen, Alemania) y el SPAD 502 (Konica Minolta, Tokio, Japón). Esta medición se realiza en dos longitudes de onda: 650 nm (rojo), que se corresponde con la absorción por

la clorofila y 940 nm (infrarrojo), que sirve para corregir la primera lectura en función del grosor de la hoja. Se ha comprobado que existe una buena correlación entre las lecturas realizadas con el SPAD y el rendimiento en un amplio número de cultivos, entre ellos el trigo (Reeves et al., 1993). Además, el uso de lecturas normalizadas, es decir, aquellas obtenidas relacionando cada lectura del equipo con respecto a las mediciones realizadas en plantas que han recibido una dosis óptima de N, permite comparar los resultados obtenidos en diferentes variedades (Arregui et al., 2006).

- *Reflectancia del cultivo mediante sensores remotos*: este método emplea sensores remotos que miden la intensidad de la luz reflejada por el cultivo, lo que está relacionado también con el contenido de clorofila (Daughtry et al., 2000). Se pueden clasificar en dos tipos: sensores *pasivos*, que son aquellos que miden únicamente la luz solar reflejada y *activos*, que poseen su propia fuente de iluminación. Existen diversos tipos de equipos. Algunos de ellos son portátiles, como el GreenSeeker (NTech Industries, Ukiah, Estados Unidos) o el Crop Circle ACS-470 (Holland Scientific, Lincoln, Estados Unidos). Ambos son equipos activos que utilizan diodos emisores de luz (LEDs) y miden la reflectancia en el rango del visible y en el del infrarrojo cercano. La reflectancia en el visible depende del contenido de clorofila en el parénquima empalizada de las hojas, y está negativamente correlacionada con el contenido de N de la hoja. La reflectancia en longitud de onda del infrarrojo cercano depende de la estructura de las células del mesófilo y está correlacionada positivamente con la biomasa y el contenido de N de la hoja (Campbell, 2002). A diferencia de estos equipos, el N-Sensor (Yara Internacional, Dülmen, Alemania) es un escáner multiespectral en tiempo real que va instalado sobre la cabina del tractor. Puede ser de tipo activo o pasivo. Mediante las lecturas de reflectancia en el visible e infrarrojo se calcula el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NVDI, por sus siglas en inglés) (Rouse et al., 1973), que es un indicador del estatus nitrogenado del cultivo. El N-Sensor permite, si se dispone de la maquinaria apropiada, realizar aplicaciones variables dentro de una misma parcela que den respuesta a la heterogeneidad del suelo. Los sensores remotos pueden ir también instalados en aviones o satélites. De esta forma pueden cubrir superficies más amplias, si bien están limitados para su

aplicación en agricultura por su necesidad de ser utilizados en condiciones de ausencia de nubosidad (Shanahan et al., 2008).

- *Análisis de imágenes digitales a color*: las imágenes obtenidas con una cámara fotográfica digital convencional también se pueden utilizar para conocer el status de la nutrición nitrogenada de una planta. Dichas imágenes permiten detectar posibles deficiencias que puedan afectar al rendimiento, mediante el análisis del color de la imagen a partir del cual se calcula un “índice de verdor” (Pagola et al., 2009).

Modelización

Se han desarrollado numerosos modelos que tratan de simular e integrar diversos procesos del ciclo del N a partir de una serie de datos edafo-climáticos que es necesario suministrarles. Algunos de estos modelos pueden utilizarse para estimar las necesidades de N del cultivo. Entre los más utilizados, se encuentran: AZODYN (Jeuffroy y Recous, 1999), basado en el método del balance complementado con conceptos relativos a la curva de dilución crítica. Este modelo es aplicable a cultivos de trigo de invierno en climas templados, y permite predecir la fecha en la que el cultivo empezará a sufrir una deficiencia de N; STICS (Brisson et al., 1998), que simula las dinámicas del agua, carbono y nitrógeno en el sistema suelo-planta de forma diaria, ha sido también evaluado satisfactoriamente en su capacidad para evaluar diferentes estrategias de fertilización nitrogenada (Houlès et al., 2004), o NDICEA (Van der Burgt et al., 2006) que, basándose en datos sobre el tipo de suelo, temperatura y precipitación, calcula la mineralización, lixiviación y desnitrificación, y, además, compara el N neto disponible en el suelo con los requerimientos del cultivo para un periodo de una semana.

3.6. Eficiencia del N y aspectos medioambientales relacionados con la fertilización N

La variabilidad de los factores edafo-climáticos que afectan al desarrollo del cultivo y al ciclo del N genera incertidumbres a la hora de determinar correctamente la dosis de N que es necesario aportar en forma de fertilizante. Dichos factores pueden provocar grandes variaciones en el uso que las plantas hagan del N disponible. Resulta esencial tener en cuenta este aspecto, ya que una mala eficiencia del N, que puede estar causada por aplicaciones excesivas o realizadas en momentos inadecuados, resulte posiblemente en pérdidas económicas y daños medioambientales. Dichos efectos negativos sobre el medio ambiente son los relacionados con la lixiviación de nitratos o la emisión de gases con efecto invernadero.

Eficiencia del N

Para poder conocer si el manejo que se ha realizado de la fertilización nitrogenada en el cultivo ha sido correcto, se han creado varios índices basados conceptualmente en procesos que tienen lugar en el suelo y la planta, y que afectan al uso del N (Huggins y Pan, 1993). Algunos de los índices más utilizados son:

- *Eficiencia en el uso del N* (NUE, por sus siglas en inglés; kg kg^{-1}): se calcula como los kg de materia seca de grano producidos por cada kg de N suministrado al cultivo. El concepto de N suministrado (Moll et al., 1982) recoge la suma del N presente en el momento de la siembra, el N aportado con el fertilizante y el N mineralizado durante el periodo de cultivo.

- *Eficiencia en la absorción del N* (NUpE; kg kg^{-1}): representa el ratio entre el N absorbido por la planta con respecto al N suministrado.

- *Eficiencia en la utilización del N* (NUtE; kg kg^{-1}): se calcula como los kg de materia seca de grano producidos por cada kg de N absorbido por la planta.

- *Fracción de recuperación del N* (NRF; %): indica el porcentaje del N aportado con el fertilizante que es absorbido por el cultivo. Se calcula como $(N_{upi} - N_{upo}) / N_i$, siendo N_i los kg N ha⁻¹ aportados a la parcela i , N_{upi} los kg N ha⁻¹ absorbidos por el cultivo en la parcela i y N_{upo} los kg N ha⁻¹ absorbidos por un testigo no fertilizado.

- *Índice de cosecha del N* (NHI; %): representa el ratio entre el N acumulado en el grano con respecto al total del N absorbido por la planta.

Si bien no está relacionado con la eficiencia del N, existe otro índice muy utilizado, denominado *Índice de cosecha* (HI; %), que evalúa la eficiencia del cultivo a la hora de convertir sus fotoasimilados en materia seca del grano. Se calcula como el ratio entre la materia seca del grano con respecto a la biomasa total de la planta.

Balance de N

Para poder evaluar las pérdidas de N y poder calcular algunos de los índices de eficiencia del N mencionados en el apartado 3.5, es necesario cuantificar previamente todas las entradas y salidas de N en el sistema suelo-planta-atmósfera, o al menos las más relevantes, mediante un balance de N.

El balance de N se basa en la aplicación del principio de conservación de la masa a un sistema de cultivo. Aplicando dicho principio, la diferencia entre las entradas y salidas de N equivale a la variación en el N almacenado en el sistema (Meisinger y Randall, 1991) (Eq. [1]):

$$N_{\text{entradas}} \text{ (kg N ha}^{-1}\text{)} - N_{\text{salidas}} \text{ (kg N ha}^{-1}\text{)} = \Delta N \text{ (kg N ha}^{-1}\text{)} \quad [1]$$

Este balance podemos describirlo según la ecuación propuesta por Legg y Meisinger (1982) (Eq. [2]):

$$\Delta N = (N_f + N_r + N_{mzdo} + N_{fb} + N_{da} + N_a + N_{ini}) - (N_{lix} + N_p + N_d + N_v + N_{fij} + N_{fin}) \quad [2]$$

donde:

N_f : N aportado con el fertilizante

N_r : N aportado con el agua de riego

N_{mzdo} : N aportado por la mineralización neta durante el periodo de cultivo

N_{fb} : N aportado por la fijación biológica

N_{da} : N aportado por la deposición atmosférica

N_a : N liberado desde el espacio interlaminar de las arcillas del suelo

N_{ini} : N presente en el suelo en el momento de la siembra

N_{lix} : N lixiviado en el agua de drenaje

N_p : N extraído por la planta

N_v : N volatilizado

N_{fij} : N fijado por las arcillas del suelo

N_{fin} : N presente en el suelo en el momento de la cosecha

La determinación de todos estos procesos es muy costosa, por lo que suelen utilizarse simplificaciones que tengan en cuenta sólo aquellos componentes del balance considerados como más relevantes. Estas simplificaciones, junto con los errores asociados a las mediciones realizadas, provocan que habitualmente los valores resultantes de la diferencia entre las entradas y salidas de N no coincidan con la variación del N almacenado. Esto es lo que se denomina como N no computado (Quemada, 2006).

Si el valor del N no computado es positivo indica que los procesos de salida de N no contabilizados superan a los de entrada. Cuando el N no computado es negativo la situación es la opuesta. En caso de que suponga una cantidad relevante, puede ser conveniente cuantificar alguno de los procesos que no hayan sido tomados en consideración inicialmente.

Balance hídrico

Dado que una de las salidas de N del sistema contempladas en el balance de N lo constituye la lixiviación de NO_3^- con el agua de drenaje, para el cálculo de

esta fracción resulta imprescindible conocer tanto la concentración de NO_3^- como el volumen total drenado. Para cuantificar dicho volumen, será necesario calcular previamente el balance hídrico. Este balance recoge las entradas y salidas de agua en el volumen de suelo explorado por las raíces (Ec. [3]):

$$P + R = ET_c + D + E + VR \quad (\text{mm}) \quad [3]$$

donde:

P: precipitación

R: riego

ET_c : evapotranspiración del cultivo

D: drenaje

E: escorrentía superficial

VR: variación de la reserva de agua del suelo

Tanto la precipitación como el riego pueden medirse mediante pluviómetros instalados en la parcela o bien, en el primer caso, tomar los datos registrados por una estación meteorológica cercana. La evapotranspiración del cultivo se calcula mediante la ecuación de Penmann-Monteith y los valores de coeficiente de cultivo (Allen et al., 2006). La escorrentía superficial puede ser ignorada si la pendiente de la parcela es baja. La variación en la reserva de agua puede ser calculada mediante diversos equipos que midan el contenido de agua del suelo, siendo los más comunes aquellos basados en la técnica FDR (Frequency Domain Reflectometry), como el Enviroscan® (Fares y Alva, 2000). De esta forma, al ser conocidos el resto de términos de la ecuación, es posible obtener el valor del drenaje.

Problemática medioambiental y de salud pública relacionada con la lixiviación de NO_3^-

El agua drenada por debajo de la profundidad radicular contiene en disolución nitratos lavados en su recorrido a lo largo del perfil del suelo. Estos NO_3^- pueden acabar siendo depositados en acuíferos subterráneos o bien en aguas superficiales. Esta presencia de NO_3^- en las aguas se considera como contaminante, ya puede ocasionar diversos problemas medioambientales.

Por un lado se considera que un contenido excesivo de NO_3^- en el agua utilizada para consumo humano es perjudicial para la salud. Diversos autores han relacionado la ingesta de NO_3^- con la aparición de metahemoglobinemia (Greer et al., 2005) y cáncer de estómago (Correa, 1992), ya que, aunque el NO_3^- no es tóxico de por sí, es reducido a NO_2^- dentro del organismo, siendo este compuesto y otros generados a partir de él, como las nitrosaminas, los que originan estas enfermedades (Santamaria, 2006). No obstante, existe una amplia controversia a este respecto, puesto que recientes trabajos han discutido la relación entre la ingesta de NO_3^- y la aparición de estas enfermedades (Avery, 1999; Bryan et al., 2012). Algunos autores, incluso, consideran que el consumo de NO_3^- puede tener un efecto beneficioso al actuar como precursor de la formación de N_2O en el estómago, que constituye una defensa efectiva contra los patógenos gastrointestinales (Addiscott, 2006; McKnight et al., 1999).

Otro problema causado por la contaminación por NO_3^- consiste en la eutrofización de las masas de agua dulce, como lagos o embalses, así como de estuarios y aguas marinas costeras (Fenn et al., 1998). En este proceso, el enriquecimiento en nutrientes del agua, fundamentalmente nitrógeno y fósforo, favorece un gran crecimiento de algas, que al morir y ser descompuestas provocan una drástica reducción del contenido de O_2 , limitando la supervivencia de los seres vivos presentes en ellas (Schindler, 2006). Además, la descomposición de la materia orgánica puede generar otros problemas adicionales como malos olores o turbidez del agua (He et al., 2007).

La legislación de la Unión Europea considera que los NO_3^- procedentes de fuentes agrarias son la causa principal de contaminación por fuentes difusas de las aguas en la UE. A través de la Directiva 91/676/CEE se limitó su concentración

admisibles a 50 mg l^{-1} , tanto en aguas superficiales como subterráneas. Se declararon como aguas afectadas aquellas que superasen o estuvieran en riesgo de superar dicha concentración, y aquellas aguas superficiales eutróficas o con riesgo de eutrofizarse. Aquellas superficies cuya escorrentía fluya hacia aguas afectadas son consideradas como “Zonas Vulnerables”, y sometidas a una especial vigilancia. En dichas zonas está vigente un Código de Buenas Prácticas Agrarias de obligatoria aplicación y unos Programas de Acción plurianuales que recogen, entre otras cuestiones, una serie de limitaciones relativas a las cantidades y fechas de aplicación de fertilizantes, tanto orgánicos como minerales. En el caso de Navarra aparecen recogidas en la Orden Foral 518/2009. Actualmente están designadas en Navarra tres áreas como zonas vulnerables (Orden Foral 128/2009): el aluvial del Ebro en Mendavia, el aluvial del Cidacos entre Tafalla y Murillo el Cuende y el aluvial del Ebro entre Tudela y Alagón (Fig. 11).

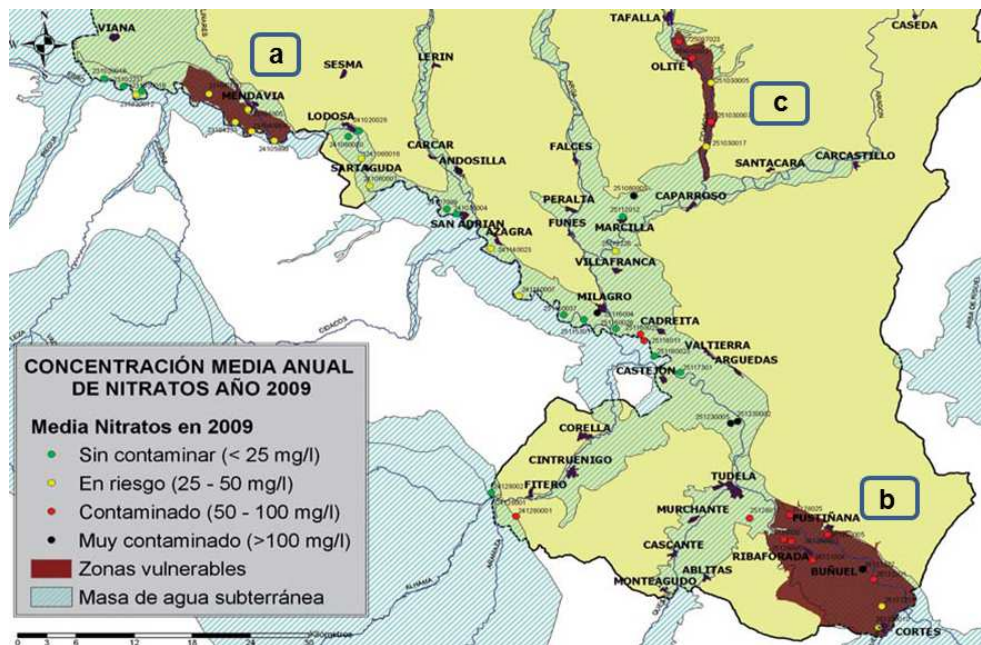


Figura 11. Zonas declaradas vulnerables a la contaminación por nitratos en Navarra: a) aluvial del Ebro en Mendavia; b) aluvial del Ebro entre Tudela y Alagón y c) aluvial del Cidacos entre Tafalla y Murillo el Cuende. *Fuente:* Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local.

4. CONSERVACIÓN POST-COSECHA DEL GRANO DE TRIGO

4.1. Necesidad de conservación del grano

El grano de trigo es cosechado durante un periodo corto de tiempo. Sin embargo, su consumo se distribuye uniformemente a lo largo de todo el año. Por tanto, resulta necesario conservarlo en buenas condiciones para que pueda ser procesado y consumido al menos hasta que se produzca la siguiente cosecha. El grano de trigo puede considerarse como una forma natural de conservación gracias a su estructura física (protección por las cubiertas) y a su bajo contenido de humedad, que hace que su metabolismo sea extremadamente lento (Multon, 1988). Se trata, por tanto, es un alimento apto para su almacenamiento. No obstante, es fundamental que este almacenamiento se desarrolle en condiciones adecuadas. De lo contrario, pueden producirse pérdidas de su calidad sanitaria, valor nutricional, capacidad germinativa y calidad harino-panadera (Magan et al., 2003). En cualquier caso, incluso bajo las condiciones más favorables, el grano experimenta cambios bioquímicos y fisiológicos, ya que las semillas son organismos vivos que respiran y envejecen (Tipples, 1995). Se puede considerar, por tanto, que el grano comienza a deteriorarse desde el momento mismo de la cosecha (Mason et al., 1997). En las zonas con clima Mediterráneo, la cosecha se produce normalmente al comienzo del verano. En ese momento, es habitual que el grano esté a una alta temperatura. Así mismo, deberá soportar también elevadas temperaturas durante los primeros meses de almacenamiento, que irán gradualmente descendiendo al ir avanzando los meses de otoño e invierno. Este descenso podrá ser más o menos rápido en función de las características del recinto donde se almacena el grano, y especialmente de si dispone de ventilación mecánica forzada o no.

4.2. Factores y mecanismos de degradación del grano

Un lote de grano almacenado puede considerarse como un ecosistema creado artificialmente por el hombre (Sinha, 1973). Los cambios que se producen en él son el resultado de las interacciones que se producen en ese sistema

complejo (Tipples, 1995). Los factores que influyen en el deterioro del grano almacenado se pueden clasificar en bióticos y abióticos o ambientales. Los factores bióticos incluyen los microorganismos (levaduras, hongos y mohos), insectos (tanto en forma larvaria como adulta) y pequeños vertebrados (aves y roedores) que entran en contacto con el grano (Multon, 1988; Tipples, 1995). Los factores abióticos están constituidos por la temperatura, humedad relativa del aire, concentración de oxígeno y dióxido de carbono y la duración del tiempo de almacenamiento (Multon, 1988). Su efecto sobre el grano puede ser tanto directo como indirecto, ya que tienen una gran influencia sobre el desarrollo y la actividad de microorganismos e insectos (Wallace et al., 1983).

Los mecanismos de degradación del grano a través de los que actúan los factores tanto bióticos como abióticos pueden ser químicos, enzimáticos, biológicos o mecánicos (Multon, 1988). Las reacciones químicas pueden consistir en desnaturalización de proteínas, gelatinización del almidón, destrucción de vitaminas, reacciones de Maillard y oxidación de ácidos grasos, principalmente. Las enzimas del grano que pueden afectar negativamente durante el almacenamiento son proteasas, lipasas, amilasas, así como los complejos que intervienen en la respiración y fermentación. El daño biológico está causado por el metabolismo de todos los organismos vivos que están en contacto con el grano y por el del grano mismo, especialmente el del germen. Por último, el daño físico se produce por choques que fracturan el grano, facilitando la acción del resto de mecanismos de degradación mencionados anteriormente.

La influencia de los factores abióticos sobre estos mecanismos es variada. Así, la temperatura afecta a la velocidad de las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas y, a partir de ciertos umbrales, puede tener un efecto desnaturalizante sobre las proteínas. La humedad del aire afecta a la actividad de agua del grano, que es probablemente el factor más importante (Multon, 1988; Tipples, 1995). Por un lado, participa en los procesos de hidrólisis. Además, es el medio en el que se producen las reacciones químicas y enzimáticas. Por último, afecta también a la velocidad de desarrollo de mohos e insectos (Boxall, 2001; Magan et al., 2003). Debido a esto, se ha observado que por debajo de un cierto umbral de actividad de agua, y para una temperatura dada, los mecanismos de degradación se ven inhibidos (Multon, 1988). La composición de la atmósfera (en

el espacio intergranular) puede afectar al tipo de microorganismos que se desarrollen, en función de que su metabolismo sea aerobio o anaerobio, y a los procesos de oxidación. Por último, el tiempo de almacenamiento, en combinación con la velocidad de reacción, determinará el grado de desarrollo que alcancen los distintos procesos de degradación.

4.3. Consecuencias sobre las propiedades del grano

- *Contenido de humedad*: cuando el grano está en contacto con la atmósfera se produce un intercambio de calor y vapor de agua. De esta forma, el grano gana o pierde humedad hasta que se alcanza el equilibrio termodinámico con dicha atmósfera (Pixton y Warburton, 1968). En esta situación de equilibrio, y para una temperatura dada, existe teóricamente una relación unívoca entre la humedad del grano y la humedad relativa de la atmósfera (Multon, 1988). No obstante, se ha comprobado que dicha relación depende de que el equilibrio se alcanza por adsorción o desorción de vapor de agua (Cenkowski y Zhang, 1995). Otros factores que pueden influir son la variedad, las características edafo-climáticas de la parcela y el año en que se ha cultivado el trigo (Sun y Woods, 1993). Esta relación entre el contenido de humedad del grano y la humedad del aire para cada temperatura se puede expresar gráficamente en forma de *curvas isotermas de adsorción y desorción* (Pixton y Warburton, 1971). Para el cálculo de los valores que describen estas curvas se han propuesto varias ecuaciones (ASAE, 2009). Entre ellas, la ecuación modificada de Chung-Pfost y la ecuación modificada de Oswin han sido consideradas como las que presentan un mejor ajuste con los datos experimentales obtenidos en trigo (Li et al., 2011; Sun y Woods, 1994), si bien Chen y Morey (1989) indicaron que la ecuación de Henderson modificada era igualmente adecuada para granos con alto contenido en almidón.

- *Peso específico ($kg\ hf^{-1}$)*: es un indicador de la calidad del grano, al estar relacionado con su densidad, aunque depende de factores como el tamaño y la forma de los granos, y la presencia de granos rotos e impurezas. Se utiliza como una medida aproximada del rendimiento de harina previsto (Halverson y Zeleny, 1988). Un descenso del peso específico puede ser síntoma de un almacenamiento

en malas condiciones, posiblemente relacionado con un exceso de humedad (Multon, 1988).

- *Calidad harino-panadera*: se ha observado que, en general, el grano almacenado, incluso en condiciones óptimas, experimenta un proceso de “envejecimiento”. Como resultado de este proceso tiende a aumentar la tenacidad de la masa (Godon, 1988) y el tiempo de amasado requerido, así como a reducirse la extensibilidad (Gras et al., 2001), si bien el efecto interactivo de la temperatura y la humedad del grano puede desempeñar un papel importante (Wrigley, 2007). Esta alteración parece estar relacionada con la oxidación de los grupos sulfhidrilo (-SH) y la consiguiente formación de puentes disulfuro (S-S) (Gras y O’Riordan, 1998; Rao et al., 1978). Por otro lado, en algunos casos, la calidad harino-panadera podría verse afectada positivamente por un incremento de la concentración de proteína causada por la respiración de los carbohidratos, o bien negativamente por efecto de la proteólisis (Tipples, 1995).

- *Actividad α -amilásica*: para el correcto desarrollo del proceso de panificación es necesario que exista una cierta actividad α -amilásica que proporcione una cantidad suficiente de azúcares fermentables. Sin embargo, cuando la actividad es excesiva, da como resultado una miga pegajosa (McCleary et al., 2002). Esta situación se produce normalmente cuando el grano ha pregerminado en la espiga (“sprouting”). Se ha observado que la actividad α -amilásica tiende a disminuir durante el almacenamiento (Rehman y Shah, 1999), probablemente debido a un proceso químico (Gras et al., 1994). La forma más habitual para medir esta actividad la constituye el Índice de Caída de Hagberg (también denominado habitualmente por su nombre en inglés, Falling Number). El Índice de Caída se define como el tiempo en segundos empleado en agitar y en dejar caer una distancia determinada a un viscosímetro-agitador a través de un gel acuoso de harina en proceso de licuefacción (AACC, 2009). Cuanto mayor sea la actividad α -amilásica más fluida será la suspensión y, en consecuencia, menor el tiempo que tarda en caer (Godon, 1988).

4.4. Tiempo de almacenamiento seguro

El tiempo de almacenamiento seguro se puede definir como el periodo de tiempo durante el cual se puede conservar el grano antes de que se produzca en él un deterioro inaceptable (Fourar-Belaifa et al., 2011). La duración de dicho periodo depende de las condiciones de almacenamiento, especialmente de la temperatura y el contenido de humedad del grano (Jayas y White, 2003; Karunakaran et al., 2001; Nithya et al., 2011). No obstante, resulta imposible dar un valor preciso de contenido de humedad y temperatura con el que se pueda garantizar una buena conservación del grano, ya que para unas mismas condiciones la degradación será mucho mayor en el caso de los trigos contaminados por microorganismos, en comparación con aquellos otros que estén microbiológicamente sanos y libres de plagas (Godon, 1988).

OBJETIVOS

1. Identificar aquellas proteínas del gluten relacionadas con parámetros de calidad de la harina en condiciones de fertilización nitrogenada no limitante para el rendimiento, independientemente de otros factores ambientales del cultivo, en la variedad con mayor presencia en Navarra (*Triticum aestivum* L. cv. Berdún).
2. Determinar la posibilidad de incrementar el contenido de proteínas del gluten y la calidad de la harina en cuatro variedades de trigo blando (*Triticum aestivum* L.) de diferente tipología, mediante la fertilización nitrogenada por encima de la dosis óptima para el rendimiento en un cultivo en regadío, evaluando, además, el efecto de dicha práctica sobre la eficiencia del nitrógeno y la lixiviación de nitratos.
3. Analizar, en dichas variedades, la aptitud de cada tipo de proteína del gluten para estimar los parámetros de calidad de la harina independientemente de la variedad, campaña y localización del cultivo.
4. Estudiar el efecto de la temperatura y la humedad relativa ambiental sobre la calidad del grano y la harina durante el periodo de almacenamiento, así como la influencia de las condiciones estándar de conservación del grano en un área de clima mediterráneo.

CAPÍTULO I

Stable Quality Traits of Soft Winter Wheat under Non- Limiting Nitrogen Condition

ABSTRACT

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) quality is determined by genotype and environment. The aim of this work was to find gluten proteins related to wheat quality, independently of crop environment and under non-limiting N conditions for wheat yield. Field experiments assessing the effect of N rate in soft winter wheat quality parameters were carried out in three locations in Navarra (Northern Spain) during five years, with a randomized complete block design and four replications. The minimum N rate that produced maximum grain yield (Nop) was determined for each year. Grain samples from N treatments equal to or above Nop were milled. Gliadins and glutenins were extracted from white flour and later separated into $\alpha+\beta$ -, γ -, ω -gliadins, HMW-GS and LMW-GS. Gliadins and glutenins were quantified by RP-HPLC. Although an increase in N fertilizer rate led to increases in gliadin and glutenin contents, as well as dough strength and extensibility, environmental variability affected differentially the synthesis or polymerization of each gliadin and glutenin type. In terms of protein fractions, both HMW-GS and LMW-GS glutenins were determined to be the protein fractions best correlated to W ($R^2=0.78$) whereas γ -gliadins were the best correlated to L ($R^2=0.72$) independent of N nutrition, environmental conditions and water availability.

This Chapter has been published in *Crop Science* as: González-Torralba, J., Arazuri, S., Jarén, C. y Arregui, L.M. 2011. Stable Quality Traits of Soft Winter Wheat under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Crop Science* 51(6):2820-2828.

El capítulo I no puede ser consultado en abierto por restricciones de derechos de autor.

CAPÍTULO II

Nitrogen fertilization in irrigated wheat for bread-making quality: optimum rate and effect on nitrogen efficiency

ABSTRACT

A correct management of nitrogen (N) fertilization is essential for irrigated crops to maximize yield and grain quality, while minimizing adverse environmental effects caused by nitrate leaching. A three-year field experiment (at three different locations) was conducted to evaluate the effects of mineral fertilizer N rate on four wheat varieties under irrigated conditions in a Mediterranean climate setting. Grain yield was higher than 9 t ha⁻¹. In general, yield increased with fertilizer-N application, although a high soil N supply prevented a N fertilizer response in some cases. Grain and flour N concentration, together with dough extensibility and strength were mostly enhanced by the application of higher than optimum N rates for grain yield. Nevertheless, a plateau for all these quality parameters seemed to be reached once the applied N rate surpassed a determined threshold value. Optimum N rates to obtain maximum strength and extensibility ranged from 60-180 kg N ha⁻¹ higher than optimum N rates for yield, yet in most cases concentrated around 60 kg N ha⁻¹. N losses caused by nitrate leaching accounted for less than 5% of the total amount of N available to crops due to minor drainage volumes. In general, N use efficiency and N utilization efficiency decreased with N rate, while the effect on N uptake efficiency varied according to the soil N supply. Although the N recovery fraction and the N harvest index tended to decrease with increasing N rates, the correlations were less clear. Results suggest that applying higher than optimum N rates for grain yield can help to limit quality losses caused by protein dilution effects even when high grain yields are recovered. Moreover, N leaching can be restrained if irrigation is adjusted to specific crop requirements. Nonetheless, soil N content at harvest should be properly managed to avoid N losses during the intercropping period.

This Chapter has been submitted for publication in *Field Crops Research* as: González-Torralba, J., Goñi J. y Arregui, L.M. Nitrogen fertilization in irrigated wheat for bread-making quality: optimum rate and effect on nitrogen efficiency.

El capítulo II no puede ser consultado en abierto por restricciones de derechos de autor.

New insights into the influence of gliadins and glutenins on bread-making quality

ABSTRACT

Bread-making properties of wheat flour are largely influenced by gluten proteins. Gliadin and glutenin contents and composition are determined by genetic and environmental factors, including N supply. In the present study, we assessed (i) the effect of N fertilizer rate on the contents of each gliadin and glutenin types of four wheat varieties grown under irrigation in a Mediterranean climate, (ii) the modification of the content of each gluten protein type regarding variations of the flour N concentration and (iii) the relationships among the contents of gluten proteins and the bread-making quality parameters. Gliadin and glutenin contents increased with higher N rates. Nonetheless, the ability to increase flour gluten content by increasing N fertilizer rate was circumscribed to a plateau of maximum response once a threshold N rate was exceeded. Moreover, gliadin-to-glutenin ratio was not modified by N supply. Both gliadins and glutenins were highly correlated with flour N concentration. New calculations based on the subfractions of γ -gliadins provided a markedly better estimation of dough extensibility compared to any other gluten protein content. HMW-glutenins and ω -gliadins showed the best correlation with dough strength. Specific γ -gliadin composition of a variety could be responsible for low strength values even though that particular variety possessed high-score alleles of HMW-glutenins.

El capítulo III no puede ser consultado en abierto por restricciones de derechos de autor.

Influence of temperature and relative humidity during storage on wheat bread-making quality

ABSTRACT

Wheat grain is commonly stored for a period of several months from harvest up to processing. During storage grain can experience variations in composition and quality, especially if ambient conditions are unfavorable. In this study, we have assessed the effects of i) two temperatures (15°C and 30°C) and two ambient relative humidities (55% and 75%) during a storage period of 240 days and ii) two ambient relative humidities (55% and 75%) following a decreasing temperature gradient to simulate the typical storage conditions prevailing in a Mediterranean region during a storage period of 180 days. Effects were assessed on grain moisture, test weight, alveograph parameters, falling number and gliadin and glutenin contents (extracted from white flour and quantified by RP-HPLC). Grain moisture reached equilibrium contents similar to those predicted by several isotherm sorption equations (modified Chung-Pfost, modified Oswin and modified Henderson). Test weight decreased as grain moisture increased, although the most marked variation was caused by a joint effect of high temperatures and relative humidities. Dough tenacity and strength tended to decrease, except when grain was stored at high temperatures and relative humidities, while extensibility showed an opposite response. Falling number increased with time, especially at high temperatures. Variations in gliadin and glutenin contents were observed, although they were probably related to changes in protein aggregation and solubility. Grain stored under the typical storage conditions prevailing in a Mediterranean region conditions experienced only minor changes in alveograph parameters after 180 days of storage; however, variations in moisture content, test weight and falling number were more relevant. In general terms, although high temperature and relative humidity constitute unfavorable conditions for grain conservation, they caused an increase of dough strength properties that could be favorable for the bread-making process. Therefore, they could be taken into consideration provided that grain soundness is secured.

This Chapter has been published in *Journal of Stored Products Research* as: González-Torralba, J., Arazuri, S., Jarén, C. y Arregui, L.M. 2013. Influence of temperature and r.h. during storage on wheat bread making quality. *Journal of Stored Products Research* 55:134-144.

El capítulo VI no puede ser consultado en abierto por restricciones de derechos de autor.

DISCUSIÓN GENERAL

Las proteínas del gluten son consideradas como las principales responsables de las singulares propiedades viscoelásticas de la masa hecha con harina de trigo (Branlard et al., 2001). Así, se ha relacionado a las gliadinas con las características viscosas, mientras que las gluteninas aportan la elasticidad (Shewry et al., 2002; Wieser, 2007). No obstante, el efecto preciso que posee cada tipo de proteína perteneciente a estos dos grandes grupos continúa sin ser plenamente conocido.

Por otro lado, la disponibilidad de N en el suelo para la planta va a influir de manera muy importante en la síntesis y acumulación de las proteínas del gluten en el endospermo del grano, y por tanto en su calidad (Wieser et al., 1998). Por tanto, resulta fundamental definir cuál es el manejo adecuado de la fertilización nitrogenada que permita obtener, además del máximo rendimiento del cultivo, unos valores de calidad óptimos.

En el capítulo I del presente trabajo se tomó la variedad Berdún (*Triticum aestivum* L. cv. "Berdún") como objeto de análisis. Se trata de una variedad de invierno, valorada por la industria harinera por su extensibilidad, y que durante muchos años ha sido, con gran diferencia, la variedad que ha tenido una mayor presencia en Navarra. Al aplicar dosis superiores al óptimo para el rendimiento, se observó un incremento de la concentración de N del grano y la harina, lo que se tradujo, además, en un aumento de los contenidos de gliadinas y gluteninas, así como de la extensibilidad (L) y la fuerza de la masa (W). La relación entre la concentración de N de la harina y los contenidos de cada tipo de gliadinas y gluteninas se vieron modificados por otros factores ambientales. Por un lado, una baja disponibilidad de azufre en el suelo causó la reducción de la síntesis de γ -gliadinas y de las gluteninas de bajo peso molecular. Por otra parte, el estrés térmico fue responsable de la disminución de la síntesis de gluteninas. Tanto L como W se correlacionaron positivamente con la concentración de N en la harina. No obstante, se observaron grandes diferencias entre campañas, por lo que la concentración de N en la harina no fue una herramienta válida para estimar la calidad de manera independiente del año de cultivo. Por el contrario, las γ -gliadinas y las gluteninas (tanto de alto como de bajo peso molecular) sí mostraron una alta

correlación con los valores de la L y W, respectivamente, considerando todos los resultados obtenidos en el conjunto de años en estudio.

La obtención de altos rendimientos, como puede ser el caso del cultivo en regadío, presenta como inconveniente una reducción del contenido de proteína del grano y, en consecuencia, de la calidad harino-panadera (Triboi y Triboi-Blondel, 2002). Con objeto de conocer en qué medida es posible evitar dicha disminución mediante un uso adecuado de la fertilización nitrogenada, se planteó un ensayo en regadío, que se describe en el Capítulo II. Para lograr una buena representatividad, el estudio incluyó cuatro variedades, dos de invierno (Berdún y Nogal) y dos de primavera, aunque adaptadas a siembras otoñales tardías (Badiel y Osado). A su vez, dos variedades eran de tipo extensible (Berdún y Osado), mientras que las otras dos eran variedades de fuerza (Badiel y Nogal). En general se obtuvieron rendimientos altos en todas las variedades (superiores a 9000 kg ha^{-1}), si bien en algunos casos se vieron reducidos por la acción de factores adversos. La respuesta a la dosis de N estuvo limitada a un cierto valor por encima del cual no se observaron incrementos en el rendimiento. Aunque la aplicación del método del N_{\min} permitió ajustar mejor la dosis de fertilizante, para conseguir una mayor precisión en condiciones de regadío en un clima mediterráneo resulta necesario tener en cuenta la mineralización que se produce con posterioridad a la aplicación del abono nitrogenado. Al igual que para el rendimiento, las respuestas a la dosis de N de las extracciones de N del grano (kg N ha^{-1}), concentración de N en el grano y la harina (%), L y W también estuvieron limitadas a una cierta dosis de N. Dicha dosis se situó, en general, entre $60\text{-}180 \text{ kg N ha}^{-1}$ por encima de la dosis estimada como óptima para el rendimiento, si bien se situaron en general en la parte inferior de dicho rango. Sin embargo, la respuesta de la tenacidad (P) fue menos importante, estando limitada en casi todos los casos a la misma dosis que para el rendimiento. Además, la dosis óptima para L fue, en general, superior a la óptima W. En el caso de la variedad Berdún, los valores de concentración de N en la harina y de L obtenidos en regadío fueron similares a los observados en la mayor parte de los ensayos realizados en secano (Capítulo I), en los que se obtuvieron rendimientos sensiblemente inferiores, lo que refleja la capacidad para compensar un posible efecto de dilución del contenido proteico del grano mediante la fertilización nitrogenada.

A pesar de las altas dosis de N empleadas, las pérdidas por lixiviación de nitratos fueron muy pequeñas (menos de 10 kg N ha^{-1}), debido a que el volumen de agua drenada fue muy reducido al ser escasas las precipitaciones y ajustarse el riego a las necesidades del cultivo. No obstante, el contenido de N_{min} en el suelo en el momento de la cosecha fue alto en algunos casos, lo que exige un manejo adecuado para evitar pérdidas en el periodo intercultivo. La eficiencia del N tendió a descender cuando las dosis más altas fueron aplicadas, siendo dicha tendencia más evidente en el caso de la eficiencia en el uso (NUE) y en la utilización (NUE) y menos en el de la absorción (NUpE) y la fracción de fertilizante recuperada (NRF). La variabilidad observada entre campañas pudo deberse al diferente aporte de N_{min} por el propio suelo en cada situación. En la mayor parte de los casos, ni el índice de cosecha (HI) ni el índice de cosecha de N (NHI) se vieron modificados por la dosis de N aportada.

En este ensayo se analizó también la capacidad de incrementar el contenido de las proteínas del gluten mediante el uso de la fertilización nitrogenada (Capítulo III). En general, se produjo un aumento del contenido de todos los tipos de gliadinas y gluteninas al aumentar la dosis de N, si bien influyó en la respuesta el aporte propio del suelo en cada campaña. Además, en todos los casos, dicho incremento se interrumpió a partir de una cierta dosis de N, lo que representa una limitación a la capacidad para aumentar el contenido de proteínas del gluten en la harina. Por otro lado, se observó una buena correlación, independiente de la campaña y variedad, entre la concentración de N en la harina y el contenido tanto de gliadinas como de gluteninas (aunque mejor en el primer caso). No obstante, el ratio gliadinas/gluteninas no se vio modificado por efecto de la dosis de N.

Al relacionar los contenidos de las distintas proteínas del gluten con los parámetros de calidad del alveograma se observó que el contenido de γ -gliadinas, que en el caso de la variedad Berdún se había comportado como un buen estimador de L independientemente de la campaña (Capítulo I), no era útil, sin embargo, cuando se comparaban muestras de distintas variedades. Las correlaciones observadas considerando la concentración de N de la harina o cualquiera de los tipos de proteína del gluten, fueron en general, muy bajas. Sin embargo, se consiguió obtener una mejor correlación al utilizar un cálculo realizado a partir de la cuantificación de las tres subfracciones (γ_A , γ_B y γ_C) que componen las

γ -gliadinas. Este cálculo ($\gamma_A - \gamma_B + \gamma_C$) estuvo basado en la observación de que una de estas subfracciones (γ_B) posee un efecto negativo sobre la extensibilidad (Huebner y Bietz, 1986). No obstante, aunque utilizando el resultado de dicho sumatorio se obtuvo una correlación con L muy buena para el conjunto de Badiel, Berdún y Osado, no resultó adecuada para Nogal. En cambio, al tomar en consideración la proporción que el sumatorio ($\gamma_A - \gamma_B + \gamma_C$) representa con respecto al contenido total de gliadinas sí se obtuvo una mejor correlación para el conjunto de las cuatro variedades. Este resultado pone de manifiesto la complejidad de las interacciones entre proteínas que determinan la calidad harino-panadera.

Se observó que el contenido de ω -gliadinas fue la fracción proteica mejor correlacionada con W, independientemente de la variedad y la campaña. Este resultado pudo estar relacionado con la alta correlación existente entre la síntesis de esta fracción de las gliadinas y de gluteninas de bajo peso molecular, debido a la asociación entre los loci *Gli-1* y *Glu-3*. En cualquier caso, el contenido de ω -gliadinas puede resultar de interés como marcador de calidad. El contenido de gluteninas de alto peso molecular (HMW) se comportó también como un buen estimador de W, independientemente de la variedad y la campaña, a pesar de la diversidad de su composición alélica entre las distintas variedades. No obstante, esto pudo deberse a que aquellas variedades que poseían una composición de HMW-gluteninas con mayor puntuación de calidad de acuerdo con el sistema ideado por Payne et al. (1987), acumularon también mayores contenidos de estas proteínas. Sin embargo, Osado se desmarcó del comportamiento del resto de variedades, ya que a pesar de su composición y altos contenidos de HMW-gluteninas mostró valores bajos de W. Esto puede estar relacionado con su particular composición de γ -gliadinas, que podrían estar limitando la formación de puentes disulfuro o de hidrógeno entre subunidades de gluteninas.

El trigo se cosecha durante un periodo reducido del año, por lo que debe ser almacenado en condiciones adecuadas para poder ser procesado y consumido al menos hasta que se produzca la siguiente cosecha. Existen una serie de factores ambientales que pueden favorecer su deterioro, entre los que destacan la humedad relativa del aire (h.r.), la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Multon, 1988), que fueron estudiados en el Capítulo IV. La humedad del grano tras varios meses de almacenamiento se correlacionó positivamente con la h.r. y

negativamente con la temperatura, alcanzando en todos los casos el equilibrio con la atmósfera circundante. Por tanto, la humedad del grano depende más de las condiciones de almacenamiento que de la situación inicial del grano. El peso específico tendió a descender, especialmente con alta temperatura (30°C) y alta h.r. (75%). Se observó, además, que una alta temperatura junto con alta h.r. estimularon una tendencia a la reducción de L y a un aumento de P y W. A baja temperatura se produjo el efecto opuesto, independientemente de la h.r. Estos cambios pueden estar relacionados con cambios en el equilibrio entre grupos sulfhidrilos libres (-SH) y puentes disulfuro (S-S). Éste puede ser también el motivo de los pequeños cambios detectados en el contenido medido de gliadinas y gluteninas, al afectar a su solubilidad. La actividad α -amilásica descendió en todos los casos, pero especialmente con alta temperatura, no viéndose afectada por la h.r. En los casos en que se producen los descensos más relevantes podría llegar a afectar negativamente al proceso de panificación. El trigo almacenado en las condiciones habituales de temperatura de un clima mediterráneo experimentó únicamente pequeñas modificaciones en la calidad harino-panadera tras seis meses de almacenamiento, aunque en un periodo más corto podría verse afectado por las altas temperaturas del verano.

CONCLUSIONES

1. Bajo condiciones de N no limitantes para el rendimiento del trigo, dosis crecientes de fertilizante nitrogenado incrementaron la concentración de N en el grano y la harina, el contenido de gliadinas y gluteninas, así como la extensibilidad (L) y la fuerza de la masa (W) en *Triticum aestivum* cv. "Berdún".
2. Independientemente de las condiciones ambientales, gluteninas (tanto de alto como de bajo peso molecular) y γ -gliadinas mostraron una alta correlación con W y L, respectivamente. Dado que Berdún es una variedad apreciada por su extensibilidad, es particularmente interesante haber encontrado un parámetro de calidad estable (γ -gliadinas) para L.
3. Cuando dosis de N superiores al óptimo para el rendimiento se aplicaron a las variedades de trigo blando Badiel, Berdún, Nogal y Osado cultivadas en condiciones de regadío en clima mediterráneo, se incrementaron en todas ellas el rendimiento de N en grano, la concentración de N en grano y harina, L y W. No obstante, dicho crecimiento estuvo limitado a una cierta dosis de N, generalmente entre 60-180 kg N ha⁻¹ por encima de la dosis óptima para el rendimiento, si bien en la mayor parte de los casos se situó en 60 kg N ha⁻¹. Esto permitió obtener altos rendimientos y, al mismo tiempo, limitar la pérdida de calidad limitada por el efecto de dilución de la proteína.
4. Debido a la moderada cantidad de lluvia recibida durante el invierno en un clima mediterráneo, y si el riego se ajusta según los requerimientos del cultivo, es posible limitar de forma importante las pérdidas de N por lixiviación de nitratos aun cuando se aporten altas dosis de fertilizante. No obstante, la posible presencia de altas concentraciones de N en el suelo en el momento de la cosecha requeriría de un manejo adecuado durante el periodo intercultivo.
5. Los contenidos de gliadinas y gluteninas en la harina se incrementaron con el aporte de dosis de N por encima del óptimo del rendimiento. No obstante, se

observó una meseta de máxima respuesta a partir de cierta dosis umbral de N. Esto representa una limitación para aumentar el contenido del gluten por medio de la fertilización nitrogenada.

6. Se han propuesto nuevos cálculos basados en el efecto cada subfracción de γ -gliadinas para mejorar la estimación de L en un rango de diferentes variedades y años de cultivo. Además, aun cuando las gluteninas de alto peso molecular estuvieron altamente correlacionadas con W, las ω -gliadinas mostraron la mejor correlación, y podrían ser utilizadas como marcador en programas de mejora genética. La composición específica de las γ -gliadinas de una determinada variedad podría ser responsable de bajos valores de W aun cuando dicha variedad contuviera alelos de gluteninas de alto peso molecular con elevada puntuación.
7. Durante el almacenamiento, la humedad del grano tendió a un valor de equilibrio con la atmósfera similar al previsto por las ecuaciones de isothermas de sorción. El peso específico descendió, especialmente bajo el efecto conjunto de alta temperatura y alta humedad relativa (h.r.). Por el contrario, el índice de caída aumentó con el tiempo, especialmente a alta temperatura. La tenacidad (P) y W aumentaron y L disminuyó con alta temperatura y alta h.r. Por tanto, aunque éstas son condiciones desfavorables para la conservación, podrían tomarse en consideración para modificar la calidad harino-panadera siempre que se mantenga un estado sanitario del grano adecuado.
8. El grano almacenado bajo las condiciones típicas de un clima mediterráneo experimentó cambios de poca importancia en los parámetros del alveograma tras 180 días de almacenamiento, si bien pueden observarse cambios en plazos más cortos por efecto de las altas temperaturas del verano. Además, las variaciones en la humedad del grano, peso específico e índice de caída pueden ser relevantes.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC.** 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, Vol. AACC 54-30A Alveograph Method for Soft and Hard Wheat Flour. . Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, E.E.U.U.
- AACC.** 2009. AACCI Method 56-81.03 Determination of Falling Number. AACC International Approved Methods of Analysis. 11 ed. Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, EE. UU.
- Abad, A., Lloveras, J. y Michelena, A.** 2004. Nitrogen fertilization and foliar urea effects on durum wheat yield and quality and on residual soil nitrate in irrigated Mediterranean conditions. *Field Crops Research* 87(2-3):257-269.
- Acreche, M.M. y Slafer, G.A.** 2009. Variation of grain nitrogen content in relation with grain yield in old and modern Spanish wheats grown under a wide range of agronomic conditions in a Mediterranean region. *Journal of Agricultural Science* 147(06):657-667.
- Addiscott, T.** 2006. Is it nitrate that threatens life or the scare about nitrate? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13):2005-2009.
- AETC.** 2012. Encuesta de calidad de los trigos españoles. Cosecha 2012 XXIV Jornadas Técnicas de la AETC, Madrid.
- Ahmad, M.** 2000. Genetic evaluation of gliadin and glutenin subunits and their correlations to rheological properties in bread wheat. *Journal of Genetics and Breeding* 54(2):143.
- Aizpurua, A., Estavillo, J.M., Castellón, A., Alonso, A., Besga, G. y Ortuzar-Iragorri, M.A.** 2010. Estimation of Optimum Nitrogen Fertilizer Rates in Winter Wheat in Humid Mediterranean Conditions, II: Economically Optimal Dose of Nitrogen. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(3):301 - 307.
- Alvarez, M.L., Guelman, S., Halford, N.G., Lustig, S., Reggiardo, M.I., Ryabushkina, N., Schewry, P., Stein, J. y Vallejos, R.H.** 2000. Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theoretical and Applied Genetics* 100(2):319-327.
- Alzueta, I., Abeledo, L.G., Mignone, C.M. y Miralles, D.J.** 2012. Differences between wheat and barley in leaf and tillering coordination under contrasting nitrogen and sulfur conditions. *European Journal of Agronomy* 41:92-102.
- Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D. y Smith, M.** 2006. Crop evapotranspiration. Guidelines for computing crop water requirements. FAO irrigation and drainage paper 56, Rome, Italy.
- Anderson, O., Gu, Y., Kong, X., Lazo, G. y Wu, J.** 2009. The wheat ω -gliadin genes: structure and EST analysis. *Functional & Integrative Genomics* 9(3):397-410.

- Andersson, A. y Johansson, E.** 2006. Nitrogen Partitioning in Entire Plants of Different Spring Wheat Cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192(2):121-131.
- Anjum, F.M., Khan, M.R., Din, A., Saeed, M., Pasha, I. y Arshad, M.U.** 2007. Wheat Gluten: High Molecular Weight Glutenin Subunits; Structure, Genetics, and Relation to Dough Elasticity. *Journal of Food Science* 72(3):R56-R63.
- Arnall, D.B., Mallarino, A.P., Ruark, M.D., Varvel, G.E., Solie, J.B., Stone, M.L., Mullock, J.L., Taylor, R.K. y Raun, W.R.** 2013. Relationship between Grain Crop Yield Potential and Nitrogen Response. *Agronomy Journal* 105(5):1335-1344.
- Arregui, L. y Quemada, M.** 2006. Drainage and nitrate leaching in a crop rotation under different N-fertilizer strategies: application of capacitance probes. *Plant and Soil* 288:57-69.
- Arregui, L.M. y Quemada, M.** 2008. Strategies to Improve Nitrogen Use Efficiency in Winter Cereal Crops under Rainfed Conditions. *Agronomy Journal* 100(2):277-284.
- Arregui, L.M., Lasa, B., Lafarga, A., Irañeta, I., Baroja, E. y Quemada, M.** 2006. Evaluation of chlorophyll meters as tools for N fertilization in winter wheat under humid Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 24(2):140-148.
- ASAE.** 2009. D245.6: Moisture Relationships of Plant-based Agricultural Products. ASAE Standards, Vol. D245.6, St. Joseph, USA.
- Avery, A.A.** 1999. Infantile Methemoglobinemia: Reexamining the Role of Drinking Water Nitrates. *Environmental Health Perspectives* 107(7):583-586.
- Babcock, B.A.** 1992. The Effects of Uncertainty on Optimal Nitrogen Applications. *Review of Agricultural Economics* 14(2):271-280.
- Baker, D.A., Young, D.L., Huggins, D.R. y Pan, W.L.** 2004. Economically Optimal Nitrogen Fertilization for Yield and Protein in Hard Red Spring Wheat. *Agronomy Journal* 96(1):116-123.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L. y Döbereiner, J.** 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36(1):86-93.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. y Döbereiner, J.** 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8):924-929.
- Barak, S., Mudgil, D. y Khatkar, B.S.** 2013a. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology* 51(1):211-217.

- Barak, S., Mudgil, D. y Khatkar, B.S.** 2013b. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: DOI: 10.1080/10408398.2012.654863.
- Barraclough, P.B., Howarth, J.R., Jones, J., Lopez-Bellido, R., Parmar, S., Shepherd, C.E. y Hawkesford, M.J.** 2010. Nitrogen efficiency of wheat: Genotypic and environmental variation and prospects for improvement. *European Journal of Agronomy* 33(1):1-11.
- Barro, F., Rooke, L., Bekes, F., Gras, P., Tatham, A.S., Fido, R., Lazzeri, P.A., Shewry, P.R. y Barcelo, P.** 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology* 15(12):1295-1299.
- Baumhardt, R.L., Lascano, R.J. y Evett, S.R.** 2000. Soil Material, Temperature, and Salinity Effects on Calibration of Multisensor Capacitance Probes. *Soil Science Society of America Journal* 64(6):1940-1946.
- Beccari, J.B.** 1745. De Frumento. De Bononiensi Scientiarum et Artium. Instituto atque Academia Comentarum, II Part I, pp. 122-127, Bologna.
- Beevers, L. y Hageman, R.H.** 1969. Nitrate Reduction in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20(1):495-522.
- Békés, F.** 2012. New aspects in quality related wheat research: 1. Challenges and achievements. *Cereal Research Communications* 40(2):159-184.
- Békés, F., Gras, P.W. y Gupta, R.B.** 1994. Mixing properties as a measure of reversible reduction and oxidation of doughs. *Cereal Chemistry* 71(1):44-50.
- Belton, P.S.** 1999. Mini Review: On the Elasticity of Wheat Gluten. *Journal of Cereal Science* 29(2):103-107.
- Betchel, D.B., Abecassis, J., Shewry, P.R. y Evers, A.D.** 2009. Development, Structure, and Mechanical Properties of the Wheat Grain, p. 51-96, *En* Khan, K. y Shewry, P. R., eds. *Wheat: Chemistry and Technology*. AACC International, Inc., St. Paul, USA.
- Bhullar, S.S. y Jenner, C.F.** 1985. Differential Responses to High Temperatures of Starch and Nitrogen Accumulation in the Grain of Four Cultivars of Wheat. *Functional Plant Biology* 12(4):363-375.
- Bietz, J.A., Huebner, F.R., Sanderson, J.E. y Wall, J.S.** 1977. Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chemistry* 54(5):1070-1083.
- Blackmer, A.M., Voss, R.D. y Mallarino, A.P.** 1997. Nitrogen fertilizer recommendations for corn in Iowa. Iowa State Coop. Ext., Iowa. State Univ., Ames, EE. UU.
- Blom-Zandstra, M.** 1989. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology* 115(3):553-561.

- Blumenthal, C., Bekes, F., Gras, P., Barlow, E.W.R. y Wrigley, C.W.** 1995. Identification of Wheat Genotypes Tolerant to the Effects of Heat Stress on Grain Quality. *Cereal Chemistry* 72(6):539-544.
- Blumenthal, C.S., Barlow, E.W.R. y Wrigley, C.W.** 1993. Growth Environment and Wheat Quality: the Effect of Heat Stress on Dough Properties and Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* 18(1):3-21.
- Blumenthal, C.S., Batey, I.L., Bekes, F., Wrigley, C.W. y Barlow, E.W.R.** 1990. Gliadin genes contain heat-shock elements: Possible relevance to heat-induced changes in grain quality. *Journal of Cereal Science* 11(3):185-188.
- Blumenthal, C.S., Batey, I.L., Bekes, F., Wrigley, C.W. y Barlow, E.W.R.** 1991. Seasonal changes in wheat-grain quality associated with high temperatures during grain filling. *Australian Journal of Agricultural Research* 42(1):21-30.
- Bly, A.G. y Woodard, H.J.** 2003. Foliar Nitrogen Application Timing Influence on Grain Yield and Protein Concentration of Hard Red Winter and Spring Wheat. *Agronomy Journal* 95(2):335-338.
- Boddey, R., Baldani, V.D., Baldani, J. y Döbereiner, J.** 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant and Soil* 95(1):109-121.
- Booth, M.S., Stark, J.M. y Rastetter, E.** 2005. Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: a synthetic analysis of literature data *Ecological Monographs* 75(2):139-157.
- Borghi, B., Corbellini, M., Minoia, C., Palumbo, M., Di Fonzo, N. y Perenzin, M.** 1997. Effects of Mediterranean climate on wheat bread-making quality. *European Journal of Agronomy* 6(3-4):145-154.
- Bos, H.J. y Neuteboom, J.H.** 1998. Morphological Analysis of Leaf and Tiller Number Dynamics of Wheat (*Triticum aestivum* L.): Responses to Temperature and Light Intensity. *Annals of Botany* 81(1):131-139.
- Boxall, R.A.** 2001. Post-harvest losses to insects - a world overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 48(1-4):137-152.
- Brandolini, A., Hidalgo, A. y Plizzari, L.** 2010. Storage-induced changes in einkorn (*Triticum monococcum* L.) and breadwheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *Journal of Cereal Science* 51(2):205-212.
- Branlard, G., Dardevet, M., Saccomano, R., Lagoutte, F. y Gourdon, J.** 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119(1):59-67.

- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L.A., D'Amore, R., Allen, A.M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M.-C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W.R., Hall, A., Mayer, K.F.X., Edwards, K.J., Bevan, M.W. y Hall, N.** 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491(7426):705-710.
- Brisson, N., Mary, B., Ripoche, D., Jeuffroy, M.H., Ruget, F., Nicoullaud, B., Gate Philippe, Devienne-Barret, F., Antonioletti, R., Durr, C., Richard, G., Beaudoin, N., Recous, S., Tayot, X., Plenet, D., Cellier, P., Machet, J.-M., Meynard, J.M. y Delécolle, R.** 1998. STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie* 18(5-6):311-346.
- Britto, D.T. y Kronzucker, H.J.** 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159(6):567-584.
- Britto, D.T. y Kronzucker, H.J.** 2013. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of Botany* 112(6):957-963.
- Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L. y Boffetta, P.** 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology* 50(10):3646-3665.
- Bullock, D.G. y Bullock, D.S.** 1994. Quadratic and Quadratic-Plus-Plateau Models for Predicting Optimal Nitrogen Rate of Corn: A Comparison. *Agronomy Journal* 86(1):191-195.
- Bushuk, W. y Zillman, R.R.** 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Canadian Journal of Plant Science* 58(2):505-515.
- Campbell, J.B.** 2002. Introduction to Remote Sensing. The Guilford Press, Nueva York, EE. UU.
- Campbell, W.P., Wrigley, C.W., Cressey, P.J. y Slack, C.R.** 1987. Statistical Correlations Between Quality Attributes and Grain-Protein Composition for 71 Hexaploid Wheats Used as Breeding Parents. *Cereal Chemistry* 64(4):293-299.
- Cenkowski, S. y Zhang, Q.** 1995. Engineering Properties of Grains and Oilseeds., p. 411-464, En Jayas, D. S., White, N. D. G. y Muir, W. E., eds. *Stored-grain ecosystems* Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE. UU.
- Cerrato, M.E. y Blackmer, A.M.** 1990. Comparison of Models for Describing Corn Yield Response to Nitrogen Fertilizer. *Agronomy Journal* 82(1):138-143.
- Colman, B.P. y Schimel, J.P.** 2013. Drivers of microbial respiration and net N mineralization at the continental scale. *Soil Biology and Biochemistry* 60(0):65-76.

- Correa, P.** 1992. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research* 52(24):6735-6740.
- Crawford, D.M. y Chalk, P.M.** 1993. Sources of N uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) and N transformations in soil treated with a nitrification inhibitor (nitrapyrin). *Plant and Soil* 149(1):59-72.
- Cui, Z., Zhang, F., Chen, X., Dou, Z. y Li, J.** 2010. In-season nitrogen management strategy for winter wheat: Maximizing yields, minimizing environmental impact in an over-fertilization context. *Field Crops Research* 116(1-2):140-146.
- Chakraborty, K. y Khan, K.** 1988. Biochemical and Breadmaking Properties of Wheat Protein Components. II. Reconstitution Baking Studies of Protein Fractions from Various Isolation Procedures. *Cereal Chemistry* 65(4):340-344.
- Chen, C.-C. y Morey, R.V.** 1989. Comparison of Four EMC/ERH Equations. *Transactions of the ASAE* 32(3):983-990.
- D'Haene, K., Moreels, E., Neve, S., Chaves Daguilar, B., Boeckx, P., Hofman, G. y Cleemput, O.** 2003. Soil properties influencing the denitrification potential of Flemish agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils* 38(6):358-366.
- D'Ovidio, R. y Masci, S.** 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 39(3):321-339.
- Daniel, C. y Triboni, E.** 2000. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science* 32(1):45-56.
- Daughtry, C.S.T., Walthall, C.L., Kim, M.S., Brown de Colstoun, E. y McMurtrey, J.E.** 2000. Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration from Leaf and Canopy Reflectance. *Remote Sensing of Environment* 74(2):229-239.
- Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L. y Wrigley, C.W.** 2006. Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology* 17(2):82-90.
- Delogu, G., Cattivelli, L., Pecchioni, N., De Falcis, D., Maggiore, T. y Stanca, A.M.** 1998. Uptake and agronomic efficiency of nitrogen in winter barley and winter wheat. *European Journal of Agronomy* 9(1):11-20.
- Diekmann, F. y Fischbeck, G.** 2005. Differences in Wheat Cultivar Response to N Supply. I: Differences in Grain Yield Formation. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191(5):351-361.
- Diez, J.A., Roman, R., Caballero, R. y Caballero, A.** 1997. Nitrate leaching from soils under a maize-wheat-maize sequence, two irrigation schedules and three types of fertilisers. *Agriculture Ecosystems & Environment* 65(3):189-199.
- Directiva 91/676/CEE.** 1991. Directiva del Consejo 91/676/CEE, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias.

- Dobraszczyk, B.J.** 2004. The physics of baking: rheological and polymer molecular structure-function relationships in breadmaking. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* 124:61-69.
- Doekes, G.J. y Wennekes, L.M.J.** 1982. Effect of Nitrogen-Fertilization on Quantity and Composition of Wheat-Flour Protein. *Cereal Chemistry* 59:276-278.
- Don, C., Lichtendonk, W., Plijter, J.J. y Hamer, R.J.** 2003. Glutenin Macropolymer: a Gel Formed by Glutenin Particles. *Journal of Cereal Science* 37(1):1-7.
- Don, C., Mann, G., Bekes, F. y Hamer, R.J.** 2006. HMW-GS affect the properties of glutenin particles in GMP and thus flour quality. *Journal of Cereal Science* 44(2):127-136.
- Don, C., Lookhart, G., Naeem, H., MacRitchie, F. y Hamer, R.J.** 2005. Heat stress and genotype affect the glutenin particles of the glutenin macropolymer-gel fraction. *Journal of Cereal Science* 42(1):69-80.
- Dreccer, M.F., Chapman, S.C., Rattey, A.R., Neal, J., Song, Y., Christopher, J.T. y Reynolds, M.** 2013. Developmental and growth controls of tillering and water-soluble carbohydrate accumulation in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes: can we dissect them? *Journal of Experimental Botany* 64(1):143-160.
- Dupont, F.M. y Altenbach, S.B.** 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* 38(2):133-146.
- DuPont, F.M., Samoil, V. y Chan, R.** 2008. Extraction of up to 95% of Wheat (*Triticum aestivum*) Flour Protein Using Warm Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) without Reduction or Sonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16):7431-7438.
- Dupont, F.M., Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, C., Kothari, K.M., Chung, O.K. y Altenbach, S.B.** 2006. Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy* 25(2):96-107.
- Edwards, W.P.** 2007. *The Science of Bakery Products*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Evans, J.R.** 1983. Nitrogen and Photosynthesis in the Flag Leaf of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 72(2):297-302.
- Every, D., Simmons, L., Al-Hakkak, J., Hawkins, S. y Ross, M.** 2002. Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica* 126(1):135-142.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C. y Donald, L.S.** 2005. Enhancing Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants, p. 97-185 *Advances in Agronomy*, Vol. 88. Academic Press.
- Fan, M.X. y Mackenzie, A.F.** 1993. Urea and Phosphate Interactions in Fertilizer Microsites: Ammonia Volatilization and pH Changes. *Soil Science Society of America Journal* 57(3):839-845.

- FAO.** 2013. *FAO Statistical Yearbook 2013. World food and agriculture* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Fares, A. y Alva, A.K.** 2000. Evaluation of capacitance probes for optimal irrigation of citrus through soil moisture monitoring in an entisol profile. *Irrigation Science* 19(2):57-64.
- Farruggia, A., Gastal, F. y Scholefield, D.** 2004. Assessment of the nitrogen status of grassland. *Grass and Forage Science* 59(2):113-120.
- Feller, U., Anders, I. y Mae, T.** 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59(7):1615-1624.
- Fenn, M.E., Poth, M.A., Aber, J.D., Baron, J.S., Bormann, B.T., Johnson, D.W., Lemly, A.D., McNulty, S.G., Ryan, D.F. y Stottlemyer, R.** 1998. Nitrogen excess in north America ecosystems: predisposing factors, ecosystem responses, and management strategies. *Ecological Applications* 8(3):706-733.
- Fido, R.J., Békés, F., Gras, P.W. y Tatham, A.S.** 1997. Effects of [alpha]-, [beta]-, [gamma]- and [omega]-Gliadins on the Dough Mixing Properties of Wheat Flour. *Journal of Cereal Science* 26(3):271-277.
- Fourar-Belaifa, R., Fleurat-Lessard, F. y Bouznad, Z.** 2011. A systemic approach to qualitative changes in the stored-wheat ecosystem: Prediction of deterioration risks in unsafe storage conditions in relation to relative humidity level, infestation by *Sitophilus oryzae* (L.), and wheat variety. *Journal of Stored Products Research* 47(1):48-61.
- Fowler, D.B.** 2003. Crop Nitrogen Demand and Grain Protein Concentration of Spring and Winter Wheat. *Agronomy Journal* 95(2):260-265.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. y Perret, X.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387(6631):394-401.
- Fuertes-Mendizábal, T., Aizpurua, A., González-Moro, M.B. y Estavillo, J.M.** 2010. Improving wheat breadmaking quality by splitting the N fertilizer rate. *European Journal of Agronomy* 33(1):52-61.
- Fuertes-Mendizábal, T., González-Murua, C., González-Moro, M.B. y Estavillo, J.M.** 2012. Late nitrogen fertilization affects nitrogen remobilization in wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175(1):115-124.
- Gabriel, J.L., Lizaso, J.I. y Quemada, M.** 2010. Laboratory versus Field Calibration of Capacitance Probes. *Soil Science Society of America Journal* 74(2):593-601.
- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Snape, J.W., Heumez, E., LeGouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Griffiths, S., Orford, S., Hubbart, S. y Foulkes, M.J.** 2011. Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research* 123(2):139-152.

- Galili, G. y Feldman, M.** 1984. Mapping of glutenin and gliadin genes located on chromosome 1B of common wheat. *Molecular and General Genetics* 193(2):293-298.
- Gallejones, P., Castellón, A., del Prado, A., Unamunzaga, O. y Aizpurua, A.** 2012. Nitrogen and sulphur fertilization effect on leaching losses, nutrient balance and plant quality in a wheat–rapeseed rotation under a humid Mediterranean climate. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 93(3):337-355.
- Garabet, S., Wood, M. y Ryan, J.** 1998. Nitrogen and water effects on wheat yield in a Mediterranean-type climate: I. Growth, water-use and nitrogen accumulation. *Field Crops Research* 57(3):309-318.
- Garrido-Lestache, E., López-Bellido, R.J. y López-Bellido, L.** 2004. Effect of N rate, timing and splitting and N type on bread-making quality in hard red spring wheat under rainfed Mediterranean conditions. *Field Crops Research* 85(2-3):213-236.
- Gastal, F. y Lemaire, G.** 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53(370):789-799.
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Tollefsen, S., Sollid, L.M. y Barro, F.** 2010. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(39):17023-17028.
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Hernando, A., Alvarez, J.B., Shewry, P.R. y Barro, F.** 2008. Silencing of [gamma]-gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat. *Journal of Cereal Science* 48(3):565-568.
- Giraldo, P., Rodríguez-Quijano, M., Simon, c., Vazquez, J.F. y Carrillo, J.M.** 2010. Allelic variation in HMW glutenins in Spanish wheat landraces and their relationship with bread quality. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(4):1012-1023.
- Gobierno de Navarra.** 2013. Producciones Anuales de los Cultivos. Departamento de Desarrollo Rural Medio Ambiente y Administración Local, Pamplona-Iruña.
- Gobin, P., Duviau, M.-P., Wong, J.H., Buchanan, B.B. y Kobrehel, K.** 1996. Change in Sulfhydryl-Disulfide Status of Wheat Proteins During Conditioning and Milling. *Cereal Chemistry* 73(4):495-498.
- Godfrey, D., Hawkesford, M.J., Powers, S.J., Millar, S. y Shewry, P.R.** 2010. Effects of Crop Nutrition on Wheat Grain Composition and End Use Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(5).
- Godon, B.** 1988. Milling value and baking quality of soft wheats and their flours, p. 978-995, *En* Multon, J. L., Reimbert, A. M., Marsh, D. y Eydt, A. J., eds. *Preservation and storage of grains, seeds, and their by-products : cereals, oilseeds, pulses, and animal feed*. Lavoisier Pub, Nueva York, EE. UU.

- González-Torralba, J., Arazuri, S., Jarén, C. y Arregui, L.M.** 2011. Stable Quality Traits of Soft Winter Wheat under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Crop Science* 51(6):2820-2828.
- Gooding, M.J.** 2009. The wheat crop, p. 19-49, *En* Khan, K. y Shewry, P. R., eds. *Wheat: Chemistry and Technology*. AACC International, Inc., St. Paul, EE. UU.
- Gooding, M.J. y Davis, W.P.** 1997. Wheat production and utilization: Systems quality and the environment. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Gooding, M.J., Ellis, R.H., Shewry, P.R. y Schofield, J.D.** 2003. Effects of Restricted Water Availability and Increased Temperature on the Grain Filling, Drying and Quality of Winter Wheat. *Journal of Cereal Science* 37(3):295-309.
- Goulding, K.W.T., Poulton, P.R., Webster, C.P. y Howe, M.T.** 2000. Nitrate leaching from the Broadbalk Wheat Experiment, Rothamsted, UK, as influenced by fertilizer and manure inputs and the weather. *Soil Use and Management* 16(4):244-250.
- Gras, P.W. y O'Riordan, B.** 1998. Why wheat quality changes in storage, p. 259-262, *En* Banks, H. J., Wright, E. J. y Damcevski, K. A., eds. *Stored grain in Australia. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, 26-29 May 1998*. CSIRO Entomology, Canberra, Australia.
- Gras, P.W., Bason, M.L. y Tomlinson, J.D.** 1994. Effect of storage and thermal treatment on quality of rain-damaged wheat, p. 1235-1237, *En* Highley, E. W., E.J.; Banks, H.J.; Champ, B.R., ed. *6th International Working Conference on Stored-product Protection, Vol. 2*, Canberra, Australia.
- Gras, P.W., Kaur, S., Lewis, D.A. y O'Riordan, B.** 2001. How and why to keep grain quality constant, p. 526-530, *En* Wootton, M., I.L., B. y Wrigley, C. W., eds. *Cereals 2000, Proceedings 11th Cereal and Bread Congress and of the 50th Australian Cereal Chemistry, 11-14 September, 2000*. CSIRO, Gold Coast, Australia.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Marseille, J.P., Moonen, J.H.E. y Scheepstra, A.** 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *Journal of Cereal Science* 3(1):1-16.
- Greenspan, L.** 1977. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry* 81 A(1):89-96
- Greer, F.R., Shannon, M., the Committee on, N. y and the Committee on Environmental, H.** 2005. Infant Methemoglobinemia: The Role of Dietary Nitrate in Food and Water. *Pediatrics* 116(3):784-786.
- Gregersen, P.L., Holm, P.B. y Krupinska, K.** 2008. Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10:37-49.
- Grindlay, D.J.C.** 1997. Towards an explanation of crop nitrogen demand based on the optimization of leaf nitrogen per unit leaf area. *The Journal of Agricultural Science* 128(04):377-396.

- Groffman, P.M., Altabet, M.A., Böhlke, J.K., Butterbach-Bahl, K., David, M.B., Firestone, M.K., Giblin, A.E., Kana, T.M., Nielsen, L.P. y Voytek, M.A.** 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications* 16(6):2091-2122.
- Guarda, G., Padovan, S. y Delogu, G.** 2004. Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. *European Journal of Agronomy* 21(2):181-192.
- Gupta, R.B. y MacRitchie, F.** 1994. Allelic Variation at Glutenin Subunit and Gliadin Loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1 of Common Wheats. II. Biochemical Basis of the Allelic Effects on Dough Properties. *Journal of Cereal Science* 19(1):19-29.
- Gupta, R.B., Bekes, F. y Wrigley, C.W.** 1991. Prediction of Physical Dough Properties from Glutenin Subunit Composition in Bread Wheats: Correlation Studies. *Cereal Chemistry* 68(4):328-333.
- Gupta, R.B., Batey, I.L. y MacRitchie, F.** 1992. Relationships Between Protein Composition and Functional Properties of Wheat Flours. *Cereal Chemistry* 69(2):125-131.
- Guttieri, M.J., McLean, R., Stark, J.C. y Souza, E.** 2005. Managing Irrigation and Nitrogen Fertility of Hard Spring Wheats for Optimum Bread and Noodle Quality. *Crop Science* 45(5):2049-2059.
- Halverson, J. y Zeleny, C.** 1988. Criteria of wheat quality, p. 19, *En* Pomeranz, Y., ed. *Wheat: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, USA.
- Hawkesford, M.J.** 2011. An overview of nutrient use efficiency and strategies for crop improvement, p. 5-20, *En* Hawkesford, M. J. y Barraclough, P., eds. *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.
- He, S.-B., Yan, L., Kong, H.-N., Liu, Z.-M., Wu, D.-Y. y Hu, Z.-B.** 2007. Treatment efficiencies of constructed wetlands for eutrophic landscape river water. *Pedosphere* 17(4):522-528.
- Henke, J., Breustedt, G., Sieling, K. y Kage, H.** 2007. Impact of uncertainty on the optimum nitrogen fertilization rate and agronomic, ecological and economic factors in an oilseed rape based crop rotation. *Journal of Agricultural Science - London* 145(5):455-468.
- Herrmann, A. y Taube, F.** 2005. Nitrogen Concentration at Maturity - An Indicator of Nitrogen Status in Forage Maize. *Agronomy Journal* 97(1):201-210.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B. y Gallais, A.** 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58(9):2369-2387.

- Hodges, R.J., Buzby, J.C. y Bennett, B.** 2011. Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. *The Journal of Agricultural Science* 149(SupplementS1):37-45.
- Hoel, B.O.** 1999. Determination of Nitrogen Status in Winter Wheat by Measuring Basal Stem Tissue Sap Nitrate Concentration. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 49(2):82-91.
- Horwitz, W.** 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
- Hou, G., Yamamoto, H. y Ng, P.K.W.** 1996. Relationship of quantity of glutenin subunits of selected U.S. soft wheat flours to rheological and baking properties. *Cereal Chemistry* 73(3):358-363.
- Houlès, V., Mary, B., Guérif, M., Makowski, D. y Justes, E.** 2004. Evaluation of the ability of the crop model STICS to recommend nitrogen fertilisation rates according to agro-environmental criteria. *Agronomie* 24(6-7):339-349.
- Huebner, F.R.** 1989. Assessment of Potential Breadmaking Quality of Hard Spring Wheats by High-Performance Liquid Chromatography of Gliadins - Year Two. *Cereal Chemistry* 66(4):333-337.
- Huebner, F.R. y Bietz, J.A.** 1986. Assessment of the potential breadmaking quality of hard wheats by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadins. *Journal of Cereal Science* 4(4):379-388.
- Huebner, F.R. y Bietz, J.A.** 1993. Improved Chromatographic Separation and Characterization of Ethanol-Soluble Wheat Proteins. *Cereal Chemistry* 70(5):506-511.
- Huggins, D.R. y Pan, W.L.** 1993. Nitrogen Efficiency Component Analysis: An Evaluation of Cropping System Differences in Productivity. *Agronomy Journal* 85(4):898-905.
- Hurkman, W., Tanaka, C., Vensel, W., Thilmony, R. y Altenbach, S.** 2013. Comparative proteomic analysis of the effect of temperature and fertilizer on gliadin and glutenin accumulation in the developing endosperm and flour from *Triticum aestivum* L. cv. Butte 86. *Proteome Science* 11(1):1-15.
- Jackson, E.A., Holt, L.M. y Payne, P.I.** 1985. Glu-B2, a storage protein locus controlling the D group of LMW glutenin subunits in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Genetics Research* 46(01):11-17.
- Jamieson, P.D. y Semenov, M.A.** 2000. Modelling nitrogen uptake and redistribution in wheat. *Field Crops Research* 68(1):21-29.
- Jayas, D.S. y White, N.D.G.** 2003. Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. *Food Control* 14(4):255-261.
- Jaynes, D.B., Dinnes, D.L., Meek, D.W., Karlen, D.L., Cambardella, C.A. y Colvin, T.S.** 2004. Using the Late Spring Nitrate Test to Reduce Nitrate Loss within a Watershed. *Journal of Environmental Quality* 33(2):669-677.

- Jenner, C.F. 1994. Starch Synthesis in the Kernel of Wheat Under High Temperature Conditions. *Functional Plant Biology* 21(6):791-806.
- Jeuffroy, M.H. y Recous, S. 1999. Azodyn: a simple model simulating the date of nitrogen deficiency for decision support in wheat fertilization. *European Journal of Agronomy* 10(2):129-144.
- Jia, Y.-Q., Masbou, V., Aussenac, T., Fabre, J.-L. y Debaeke, P. 1996. Effects of Nitrogen Fertilization and Maturation Conditions on Protein Aggregates and on the Breadmaking Quality of Soissons, a Common Wheat Cultivar. *Cereal Chemistry* 73(1):123-130.
- Jin, H., Zhang, Y., Li, G., Mu, P., Fan, Z., Xia, X. y He, Z. 2013. Effects of allelic variation of HMW-GS and LMW-GS on mixograph properties and Chinese noodle and steamed bread qualities in a set of Aroona near-isogenic wheat lines. *Journal of Cereal Science* 57(1):146-152.
- Johansson, E. y Svensson, G. 1999. Influences of yearly weather variation and fertilizer rate on bread-making quality in Swedish grown wheats containing HMW glutenin subunits 2+12 or 5+10 cultivated during the period 1990-1996. *The Journal of Agricultural Science* 132(01):13-22.
- Johansson, E., Prieto-Linde, M.L. y Jönsson, J.Ö. 2001. Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chemistry* 78(1):19-25.
- Johansson, E., Prieto-Linde, M.L., Svensson, G., Ouml, Nsson, J. y Ouml. 2003. Influences of cultivar, cultivation year and fertilizer rate on amount of protein groups and amount and size distribution of mono- and polymeric proteins in wheat. *The Journal of Agricultural Science* 140(03):275-284.
- Jones, D.L., Hodge, A. y Kuzyakov, Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163(3):459-480.
- Juang, T.C., Wang, M.K., Chen, H.J. y Tan, C.C. 2001. Ammonium fixation by surface soils and clays. *Soil Science* 166(5):345-352.
- Justes, E., Meynard, J.M., Mary, B. y Plénet, D. 1997. Diagnosis using stem base extract: JUBIL method, p. 163-187, En Lemaire, G., ed. *Diagnosis of the nitrogen status in crop*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Justes, E., Mary, B., Meynard, J.M., Machet, J.M. y Thelier-Huche, L. 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Annals of Botany* 74(4):397-407.
- Kaleta, A. y Górnicki, K. 2013. Criteria of Determination of Safe Grain Storage Time - A Review.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A. y Cohen, J.M. 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research* 1(3):205-216.
- Karunakaran, C., Muir, W.E., Jayas, D.S., White, N.D.G. y Abramson, D. 2001. Safe storage time of high moisture wheat. *Journal of Stored Products Research* 37(3):303-312.

- Kasarda, D.D.** 1999. Glutenin Polymers: The In Vitro to In Vivo Transition. *Cereal Foods World* 44(8):566-571.
- Kasarda, D.D., Autran, J.-C., Lew, E.J.L., Nimmo, C.C. y Shewry, P.R.** 1983. N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins: Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 747(1-2):138-150.
- Keeney, D.R. y Nelson, D.W.** 1982. Nitrogen-inorganic forms, p. 643-698, *En Page*, A. L., ed. *Methods of analysis, part 2. Chemical methods*. ASA and SSSA, Madison.
- Khatkar, B.S., Bell, A.E. y Schofield, J.D.** 1995. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science* 22(1):29-44.
- Khatkar, B.S., Barak, S. y Mudgil, D.** 2013. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *International Journal of Biological Macromolecules* 53(0):38-41.
- Khatkar, B.S., Fido, R.J., Tatham, A.S. y Schofield, J.D.** 2002. Functional Properties of Wheat Gliadins. I. Effects on Mixing Characteristics and Bread Making Quality. *Journal of Cereal Science* 35(3):299-306.
- Kieffer, R.** 2007. The Role of Gluten Elasticity in the Baking Quality of Wheat, p. 480, *En Popper, L., Schäfer, W. y Freund, W., eds. Future of Flour: A compendium of Flour Improvement*. Verlag Agrimedia, Clenze, Germany.
- Kindred, D.R., Verhoeven, T.M.O., Weightman, R.M., Swanston, J.S., Agu, R.C., Brosnan, J.M. y Sylvester-Bradley, R.** 2008. Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *Journal of Cereal Science* 48(1):46-57.
- Labuschagne, M.T., Meintjes, G. y Groenewald, F.P.C.** 2006. The influence of different nitrogen treatments on the size distribution of protein fractions in hard and soft wheat. *Journal of Cereal Science* 43(3):315-321.
- Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C. y Pandiella, S.S.** 2006. Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering* 72(4):332-338.
- Larroque, O., Gianibelli, M.C. y MacRitchie, F.** 1999. Protein Composition for Pairs of Wheat Lines with Contrasting Dough Extensibility. *Journal of Cereal Science* 29(1):27-31.
- Lasa, B., Frechilla, S., Lamsfus, C. y Aparicio-Tejo, P.M.** 2001. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. *Scientia Horticulturae* 91(1-2):143-152.
- Le Gouis, J., Béghin, D., Heumez, E. y Pluchard, P.** 2000. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* 12(3-4):163-173.

- Lea, P.J. y Mifflin, B.J.** 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251(5476):614-616.
- Lefebvre, J., Pruska-Kedzior, A., Kedzior, Z. y Lavenant, L.** 2003. A phenomenological analysis of wheat gluten viscoelastic response in retardation and in dynamic experiments over a large time scale. *Journal of Cereal Science* 38(3):257-267.
- Legg, J.O. y Meisinger, J.J.** 1982. Soil nitrogen budgets, p. 1-42, *En* Stevenson, F. J., ed. *Nitrogen in agricultural soils*. American Society of Agronomy, Madison, EE. UU.
- Lemaire, G., Plénet, D. y Grindlay, D.** 1997. Leaf N content as an indicator of crop N nutrition status, p. 189-199, *En* Lemaire, G., ed. *Diagnosis on the Nitrogen Status in Crops*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.-H. y Gastal, F.** 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage: Theory and practices for crop N management. *European Journal of Agronomy* 28(4):614-624.
- León, E., Marín, S., Giménez, M.J., Piston, F., Rodríguez-Quijano, M., Shewry, P.R. y Barro, F.** 2009. Mixing properties and dough functionality of transgenic lines of a commercial wheat cultivar expressing the 1Ax1, 1Dx5 and 1Dy10 HMW glutenin subunit genes. *Journal of Cereal Science* 49(1):148-156.
- Li, X., Cao, Z., Wei, Z., Feng, Q. y Wang, J.** 2011. Equilibrium moisture content and sorption isosteric heats of five wheat varieties in China. *Journal of Stored Products Research* 47(1):39-47.
- Lindsay, M.P. y Skerritt, J.H.** 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 10(8):247-253.
- Liu, W., Zhang, Y., Gao, X., Wang, K., Wang, S., Zhang, Y., He, Z., Ma, W. y Yan, Y.** 2012. Comparative proteome analysis of glutenin synthesis and accumulation in developing grains between superior and poor quality bread wheat cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(1):106-115.
- López-Bellido, L., López-Bellido, R.J. y Redondo, R.** 2005. Nitrogen efficiency in wheat under rainfed Mediterranean conditions as affected by split nitrogen application. *Field Crops Research* 94(1):86-97.
- López-Bellido, L., Muñoz-Romero, V., Benítez-Vega, J., Fernández-García, P., Redondo, R. y López-Bellido, R.J.** 2012. Wheat response to nitrogen splitting applied to a Vertisols in different tillage systems and cropping rotations under typical Mediterranean climatic conditions. *European Journal of Agronomy* 43(0):24-32.
- López-Bellido, R.J. y López-Bellido, L.** 2001. Efficiency of nitrogen in wheat under Mediterranean conditions: effect of tillage, crop rotation and N fertilization. *Field Crops Research* 71(1):31-46.

- Lopez-Bustins, J.-A., Martin-Vide, J. y Sanchez-Lorenzo, A.** 2008. Iberia winter rainfall trends based upon changes in teleconnection and circulation patterns. *Global and Planetary Change* 63(2-3):171-176.
- Lord, E.I. y Shepherd, M.A.** 1993. Developments in the use of porous ceramic cups for measuring nitrate leaching. *Journal of Soil Science* 44(3):435-449.
- Ludwig, J., Meixner, F., Vogel, B. y Förstner, J.** 2001. Soil-air exchange of nitric oxide: An overview of processes, environmental factors, and modeling studies. *Biogeochemistry* 52(3):225-257.
- Lukow, O.M., White, N.D.G. y Sinha, R.N.** 1995. Influence of ambient storage conditions on the breadmaking quality of two hard red spring wheats. *Journal of Stored Products Research* 31(4):279-289.
- Luo, J., Tillman, R.W., White, R.E. y Ball, P.R.** 1998. Variation in denitrification activity with soil depth under pasture. *Soil Biology and Biochemistry* 30(7):897-903.
- Lloveras, J., Lopez, A., Ferran, J., Espachs, S. y Solsona, J.** 2001. Bread-Making Wheat and Soil Nitrate as Affected by Nitrogen Fertilization in Irrigated Mediterranean Conditions. *Agronomy Journal* 93(6):1183-1190.
- MacRitchie, F. y Gupta, R.B.** 1993. Functionality-Composition relationships of wheat flour as a result of variation in sulfur availability. *Australian Journal of Agricultural Research* 44(8):1767-1774.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V. y Aldred, D.** 2003. Post-Harvest Fungal Ecology: Impact of Fungal Growth and Mycotoxin Accumulation in Stored Grain. *European Journal of Plant Pathology* 109(7):723-730.
- Magdoff, F.R., Ross, D. y Amadon, J.** 1984. A Soil Test for Nitrogen Availability to Corn. *Soil Science Society of America Journal* 48(6):1301-1304.
- Magrama.** 2013. Avances de producciones y superficies agrícolas. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, Madrid.
- Marino, S., Tognetti, R. y Alvino, A.** 2011. Effects of varying nitrogen fertilization on crop yield and grain quality of emmer grown in a typical Mediterranean environment in central Italy. *European Journal of Agronomy* 34(3):172-180.
- Martre, P., Porter, J.R., Jamieson, P.D. y Triboui, E.** 2003. Modeling Grain Nitrogen Accumulation and Protein Composition to Understand the Sink/Source Regulations of Nitrogen Remobilization for Wheat. *Plant Physiol.* 133(4):1959-1967.
- Masci, S., Rovelli, L., Kasarda, D.D., Vensel, W.H. y Lafiandra, D.** 2002. Characterisation and chromosomal localisation of C-type low-molecular-weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring. *Theoretical and Applied Genetics* 104(2-3):422-428.

- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. y Suzuki, A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105(7):1141-1157.
- Mason, L.J., Rulon, R.A. y Maier, D.E.** 1997. Chilled versus ambient aeration and fumigation of stored popcorn part 2: Pest management. *Journal of Stored Products Research* 33(1):51-58.
- Matus-Cádiz, M.A., Hucl, P., Horak, M.J. y Blomquist, L.K.** 2004. Gene Flow in Wheat at the Field Scale. *Crop Science* 44(3):718-727.
- McCleary, B.V., McNally, M., Monaghan, D. y Mugford, D.C.** 2002. Measurement of α -Amylase Activity in White Wheat Flour, Milled Malt, and Microbial Enzyme Preparations, Using the Ceralpha Assay: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 85(5):1096-1102.
- McKnight, G.M., Duncan, C.W., Leifert, C. y Golden, M.H.** 1999. Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition* 81(05):349-358.
- Meisinger, J.J. y Randall, P.J.** 1991. Estimating nitrogen budgets for soil-crop systems, p. 85-124, *En Follett, R. F., Keeney, D. R. y Cruse, R. M., eds. Managing nitrogen for groundwater quality and farm profitability.* Soil Science Society of America, Inc., Madison, EE. UU.
- Menéndez, S., Merino, P., Pinto, M., González-Murua, C. y Estavillo, J.M.** 2006. 3,4-Dimethylpyrazol Phosphate Effect on Nitrous Oxide, Nitric Oxide, Ammonia, and Carbon Dioxide Emissions from Grasslands. *Journal of Environmental Quality* 35(4):973-981.
- Mengel, K., Schneider, B. y Kosegarten, H.** 1999. Nitrogen compounds extracted by electroultrafiltration (EUF) or CaCl₂ solution and their relationships to nitrogen mineralization in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 162(2):139-148.
- Mengel, K., Hütsch, B. y Kane, Y.** 2006. Nitrogen fertilizer application rates on cereal crops according to available mineral and organic soil nitrogen. *European Journal of Agronomy* 24(4):343-348.
- Metakovsky, E.V., Akhmedov, M.G. y Sozinov, A.A.** 1986. Genetic analysis of gliadin-encoding genes reveals gene clusters as well as single remote genes. *Theoretical and Applied Genetics* 73(2):278-285.
- Metakovsky, E.V., Dardevet, M. y Brandlard, G.** 1996. Recombination mapping of minor omega-gliadin-coding loci on chromosome 1A of common wheat. A revision. *Journal of Genetics & Breeding* 50(3):277-286.
- Metakovsky, E.V., Wrigley, C.W., Bekes, F., Gupta, R.B. y Metakovskii, E.V.** 1990. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research* 41(2):289-306.
- Mi, G., Tang, L., Zhang, F. y Zhang, J.** 2000. Is nitrogen uptake after anthesis in wheat regulated by sink size? *Field Crops Research* 68(3):183-190.

- Miransari, M. y Mackenzie, A.F.** 2010. Wheat Grain Nitrogen Uptake, as Affected by Soil Total and Mineral Nitrogen, for the Determination of Optimum Nitrogen Fertilizer Rates for Wheat Production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(13):1644 - 1653.
- Miransari, M. y Mackenzie, A.F.** 2011. Development of a soil N test for fertilizer requirements for wheat. *Journal of Plant Nutrition* 34(5):762-777.
- Misselbrook, T.H., Sutton, M.A. y Scholefield, D.** 2004. A simple process-based model for estimating ammonia emissions from agricultural land after fertilizer applications. *Soil Use and Management* 20(4):365-372.
- Mitchell, J.H., Rebetzke, G.J., Chapman, S.C. y Fukai, S.** 2013. Evaluation of reduced-tillering (tin) wheat lines in managed, terminal water deficit environments. *Journal of Experimental Botany* 64(11):3439-3451.
- Mohammed, Y.A., Kelly, J., Chim, B.K., Rutto, E., Waldschmidt, K., Mullock, J., Torres, G., Desta, K.G. y Raun, W.** 2013. Nitrogen fertilizer management for improved grain quality and yield in winter wheat in Oklahoma. *Journal of Plant Nutrition* 36(5):749-761.
- Moll, R.H., Kamprath, E.J. y Jackson, W.A.** 1982. Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. *Agronomy Journal* 74(3):562-564.
- Mondal, S., Tilley, M., Alviola, J.N., Waniska, R.D., Bean, S.R., Glover, K.D. y Hays, D.B.** 2007. Use of Near-Isogenic Wheat Lines to Determine the Glutenin Composition and Functionality Requirements for Flour Tortillas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(1):179-184.
- Muir, W.E. y Sinha, R.N.** 1988. Physical properties of cereal and oilseed cultivars grown in western Canada. *Canadian Agricultural Engineering* 30:51-55.
- Multon, J.L.** 1988. Preservation and Storage of Grains, Seeds and their byproducts: cereals, oilseeds, pulses and animal feed. Lavoisier, Nueva York, EE. UU.
- Nemeth, K.** 1979. The availability of nutrients in the soil as determined by electro-ultrafiltration (EUF), p. 155-187 *Advances in Agronomy*, Vol. 31. Academic Press, Inc., Nueva York, EE. UU.
- Newton, W.E.** 2000. Nitrogen Fixation in Perspective, p. 3-8, *En Pedrosa, F. O., Hungria, M., Yates, G. y Newton, W. E., eds. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, Vol. 38. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos.
- Ng, P.K.W. y Bushuk, W.** 1988. Statistical Relationship Between High Molecular Weight Subunits of Glutenin and Breadmaking Quality of Canadian-Grown Wheats. *Cereal Chemistry* 65(5):408-413.
- Nicolardot, B., Recous, S. y Mary, B.** 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant and Soil* 228(1):83-103.

- Nieto-Taladriz, M.T., Rodríguez-Quijano, M. y Carrillo, J.M.** 1998. Biochemical and genetic characterisation of a D glutenin subunit encoded at the Glu-B3 locus. *Genome* 41(2):215-220.
- Nithya, U., Chelladurai, V., Jayas, D.S. y White, N.D.G.** 2011. Safe storage guidelines for durum wheat. *Journal of Stored Products Research* 47(4):328-333.
- Olfs, H.-W., Blankenau, K., Brentrup, F., Jasper, J., Link, A. y Lammel, J.** 2005. Soil- and plant-based nitrogen-fertilizer recommendations in arable farming. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168(4):414-431.
- Orden Foral 128/2009.** de 20 de marzo, de la Consejera de Desarrollo Rural y Medio Ambiente, por la que se revisan las zonas vulnerables a la contaminación de las aguas por nitratos de fuentes agrarias., Boletín Oficial de Navarra Nº 43 - 10 de abril de 2009. Pamplona-Iruña.
- Orden Foral 518/2009.** de 30 de octubre, de la Consejera de Desarrollo Rural y Medio Ambiente, por la que se aprueba el Programa de Actuaciones 2010 - 2013 para las zonas vulnerables a la contaminación de las aguas por nitratos procedentes de actividades agrarias., Boletín Oficial de Navarra Nº 146 - 27 de noviembre de 2009. Pamplona-Iruña.
- Ortuzar-Iragorri, M.A., Castellón, A., Alonso, A., Besga, G., Estavillo, J.M. y Aizpurua, A.** 2010. Estimation of Optimum Nitrogen Fertilizer Rates in Winter Wheat in Humid Mediterranean Conditions, I: Selection of Yield and Protein Response Models. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(19):2293 - 2300.
- Osborne, T.B.** 1907. The protein of the wheat kernel. Publication no. 84. Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C., EE. UU.
- Oszvald, M., Tömösközi, S., Tamás, L. y Békés, F.** 2009. Effects of Wheat Storage Proteins on the Functional Properties of Rice Dough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21):10442-10449.
- Oszvald, M., Tömösközi, S., Jenes, B., Tamás, L. y Békés, F.** 2008. In vitro and in vivo studies of wheat storage proteins on dough quality in model system, *En Appels, R., Astwood, R., Lagudah, E., Angridge, P., Mackay, M., McIntyre, L. y Sharp, P., eds. 11th International Wheat Genetics Symposium, Brisbane, Australia.*
- Oury, F.-X., Chiron, H., Faye, A., Gardet, O., Giraud, A., Heumez, E., Rolland, B., Rousset, M., Trottet, M., Charmet, G. y Branlard, G.** 2010. The prediction of bread wheat quality: joint use of the phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits. *Euphytica* 171(1):87-109.
- Pagola, M., Ortiz, R., Irigoyen, I., Bustince, H., Barrenechea, E., Aparicio-Tejo, P., Lamsfus, C. y Lasa, B.** 2009. New method to assess barley nitrogen nutrition status based on image colour analysis: Comparison with SPAD-502. *Computers and Electronics in Agriculture* 65(2):213-218.

- Papastylianou, I., Graham, R.D. y Puckridge, D.W.** 1982. The diagnosis of nitrogen deficiency in wheat by means of a critical nitrate concentration in stem bases. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 13(6):473-485.
- Pareyt, B., Van Steertegem, B., Brijs, K., Lagrain, B. y Delcour, J.A.** 2010. The impact of redox agents on sugar-snap cookie making. *Journal of Cereal Science* 52(2):192-199.
- Payne, P.I. y Lawrence, G.J.** 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1 , Glu-B1 , and Glu-D1 , which code for the high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat *Cereal Research Communications* 11:29-35.
- Payne, P.I., Nightingale, M.A., Krattiger, A.F. y Holt, L.M.** 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40(1):51-65.
- Pechanek, U., Karger, A., Gröger, S., Charvart, B., Schöggel, G. y Lelley, T.** 1997. Effect of Nitrogen Fertilization on Quantity of Flour Protein Components, Dough Properties, and Breadmaking Quality of Wheat. *Cereal Chemistry* 74(6):800-805.
- Pedersen, L. y Jørgensen, J.R.** 2007. Variation in rheological properties of gluten from three biscuit wheat cultivars in relation to nitrogen fertilisation. *Journal of Cereal Science* 46(2):132-138.
- Peña, E., Bernardo, A., Soler, C. y Jouve, N.** 2005. Relationship between common wheat (*Triticum aestivum* L.) gluten proteins and dough rheological properties. *Euphytica* 143:169-177.
- Pepler, S., Gooding, M.J. y Ellis, R.H.** 2006. Modelling simultaneously water content and dry matter dynamics of wheat grains. *Field Crops Research* 95(1):49-63.
- Pfost, H.B., Maucher, S.G., Chung, D.S. y Milliken, G.A.** 1976. Summarizing and reporting equilibrium moisture data for grains ASAE paper No. 76-3520. ASAE, St. Joseph, USA.
- Pierucci, V.R.M., Tilley, M., Graybosch, R.A., Blechl, A.E., Bean, S.R. y Tilley, K.A.** 2009. Effects of Overexpression of High Molecular Weight Glutenin Subunit 1Dy10 on Wheat Tortilla Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14):6318-6326.
- Pirozi, M.R., Margiotta, B., Lafiandra, D. y MacRitchie, F.** 2008. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. *Journal of Cereal Science* 48(1):117-122.
- Pistón, F., Gil-Humanes, J., Rodríguez-Quijano, M. y Barro, F.** 2011. Down-Regulating γ -Gliadins in Bread Wheat Leads to Non-Specific Increases in Other Gluten Proteins and Has No Major Effect on Dough Gluten Strength. *PLOS ONE* 6(9):e24754.

- Pixton, S.W. y Warburton, S.** 1968. The time required for conditioning grain to equilibrium with specific relative humidities. *Journal of Stored Products Research* 4(3):261-265.
- Pixton, S.W. y Warburton, S.** 1971. Moisture content/relative humidity equilibrium of some cereal grains at different temperatures. *Journal of Stored Products Research* 6(4):283-293.
- Pixton, S.W., Warburton, S. y Hill, S.T.** 1975. Long-term storage of wheat-III: Some changes in the quality of wheat observed during 16 years of storage. *Journal of Stored Products Research* 11(3-4):177-185.
- Pogna, N.E., Metakovsky, E.V., Redaelli, R., Raineri, F. y Dachkevitch, T.** 1993. Recombination mapping of Gli-5, a new gliadin-coding locus on chromosomes 1A and 1B in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 87(1-2):113-121.
- Pogna, N.E., Redaelli, R., Vaccino, P., Biancardi, A.M., Peruffo, A.D.B., Curioni, A., Metakovsky, E.V. y Pagliaricci, S.** 1995. Production and genetic characterization of near-isogenic lines in the bread-wheat cultivar Alpe. *Theoretical and Applied Genetics* 90(5):650-658.
- Porter, J.R. y Gawith, M.** 1999. Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European Journal of Agronomy* 10(1):23-36.
- Posner, E.S. y Deyoe, C.W.** 1986. Changes in Milling Properties of Newly Harvested Hard Wheat During Storage. *Cereal Chemistry* 63(5):451-456.
- Qi, P.F., Wei, Y.M., Yue, Y.W., Yan, Z.H. y Zheng, Y.L.** 2006. Biochemical and Molecular Characterization of Gliadins. *Molecular Biology* 40(5):713-723.
- Quemada, M.** 2006. Introducción, p. 11-16, *En Quemada, M., ed. Balance de nitrógeno en sistemas de cultivo de cereal de invierno y de maíz en varias regiones españolas.* Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, España.
- Rao, V.S., Vakil, U.K. y Sreenivasan, A.** 1978. Comparative studies on physicochemical and baking properties of newly harvested and stored indian varieties of wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29(2):155-164.
- Raun, W.R., Solie, J.B., Stone, M.L., Zavodny, D.L., Martin, K.L. y Freeman, K.W.** 2005. Automated calibration stamp technology for improved in-season nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 97(1):338-342.
- Raun, W.R., Solie, J.B., Taylor, R.K., Arnall, D.B., Mack, C.J. y Edmonds, D.E.** 2008. Ramp Calibration Strip Technology for Determining Midseason Nitrogen Rates in Corn and Wheat. *Agronomy Journal* 100(4):1088-1093.
- Real Decreto 1615/2010.** por el que se aprueba la norma de calidad del trigo. Boletín Oficial del Estado núm. 301, Madrid.

- Redaelli, R., Pogna, N.E., Dachkevitch, T., Cacciatori, P., Biancard, A.M. y Metakovsky, E.V.** 1992. Inheritance studies of the 1AS/1DS chromosome translocation in the bread wheat variety 'Perzivan-1'. *Journal of Genetics and Breeding* 46:253-262.
- Reeves, D.W., Mask, P.L., Wood, C.W. y Delaney, D.P.** 1993. Determination of wheat nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter: Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition* 16(5):781-796.
- Rehman, Z.U. y Shah, W.H.** 1999. Biochemical changes in wheat during storage at three temperatures. *Plant Foods for Human Nutrition* 54(2):109-117.
- Rémy, J.C. y Hébert, J.** 1977. Le devenir des engrais azotés dans le sol. *Comptes-rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France* 63(11):700-714.
- Rharrabti, Y., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., Aparicio, N., Elhani, S. y Royo, C.** 2001. Environmental and genetic determination of protein content and grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Plant Breeding* 120(5):381-388.
- Rodríguez-Quijano, M. y Carrillo, J.M.** 1996. Linkage map of prolamin loci Gli-D4 and Gli-D5 in hexaploid wheat. *Plant Breeding* 115(3):189-191.
- Ross, A.S. y Bettge, A.D.** 2009. Passing the Test on Wheat End-Use Quality, p. 455-494, *En Carver, B. F., ed. Wheat: science and trade*. Wiley-Blackwell, Ames, EE. UU.
- Rouse, J.W., Haas, R.H., Schell, J.A. y Deering, D.W.** 1973. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS, p. 309-317 *NASA Goddard Space Flight Center 3d ERTS-1 Symposium*, Vol. 1, Washington, EE. UU.
- Rumbo, M., Chirido, F.G., Giorgieri, S.A., Fossati, C.A. y Añón, M.C.** 1999. Preparative Fractionation of Gliadins by Electrophoresis at pH 3.1 (A-PAGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(8):3243-3248.
- Sahrawat, K.L.** 2008. Factors Affecting Nitrification in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39(9-10):1436-1446.
- Saint Pierre, C., Peterson, C.J., Ross, A.S., Ohm, J.B., Verhoeven, M.C., Larson, M. y Hofer, B.** 2008. Winter wheat genotypes under different levels of nitrogen and water stress: Changes in grain protein composition. *Journal of Cereal Science* 47(3):407-416.
- Salman, H. y Copeland, L.** 2007. Effect of Storage on Fat Acidity and Pasting Characteristics of Wheat Flour. *Cereal Chemistry* 84(6):600-606.
- Salvagiotti, F., Castellarín, J.M., Miralles, D.J. y Pedrol, H.M.** 2009. Sulfur fertilization improves nitrogen use efficiency in wheat by increasing nitrogen uptake. *Field Crops Research* 113(2):170-177.
- Santamaria, P.** 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(1):10-17.
- Santi, C., Bogusz, D. y Franche, C.** 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany* 111(5):743-767.

- Schindler, D.W.** 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and Oceanography* 51(1):356-363
- Schropp, P. y Wieser, H.** 1996. Effects of High Molecular Weight Subunits of Glutenin on the Rheological Properties of Wheat Gluten. *Cereal Chemistry* 73(3):410-413.
- Shanahan, J.F., Kitchen, N.R., Raun, W.R. y Schepers, J.S.** 2008. Responsive in-season nitrogen management for cereals. *Computers and Electronics in Agriculture* 61(1):51-62.
- Shewry, P.R.** 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science* 46(3):239-250.
- Shewry, P.R.** 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60:1537-1553.
- Shewry, P.R. y Tatham, A.S.** 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical Journal* 267:1-12.
- Shewry, P.R. y Tatham, A.S.** 1997. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* 25(3):207-227.
- Shewry, P.R. y Halford, N.G.** 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53(370):947-958.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S. y Halford, N.G.** 2001a. Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation* 34(1):105-111.
- Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D. y Belton, P.** 2001b. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology* 11(12):433-441.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S. y Belton, P.S.** 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357(1418):133-143.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M. y Mifflin, B.J.** 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science* 4(2):97-106.
- Shewry, P.R., Hawkesford, M.J., Piironen, V., Lampi, A.-M., Gebruers, K., Boros, D., Andersson, A.A.M., Aman, P., Rakszegi, M., Bedo, Z. y Ward, J.L.** 2013. Natural Variation in Grain Composition of Wheat and Related Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(35):8295-8303.
- Singh, S., Singh, G., Singh, P. y Singh, N.** 2008. Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat varieties. *Food Chemistry* 108(1):130-139.
- Sinha, R.N.** 1973. Interrelations of physical, chemical, and biological variables in the deterioration of stored grain, p. 15-47, *En Sinha, R. N. y Muir, W. E.*, eds. *Grain storage: part of a system*. The AVI Publishing Co., Westport, EE. UU.

- Skerritt, J.H., Bekes, F. y Murray, D.** 1996. Isolation treatments and effects of gliadin and glutenin fractions on dough mixing properties. *Cereal Chemistry* 73(5):644-649.
- Slafer, G.A., Connor, D.J. y Halloran, G.M.** 1994. Rate of Leaf Appearance and Final Number of Leaves in Wheat: Effects of Duration and Rate of Change of Photoperiod. *Annals of Botany* 74(5):427-436.
- Smart, D.R. y Bloom, A.J.** 2001. Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(14):7875-7878.
- Snape, J. y Pánková, K.** 2006. *Triticum aestivum* (wheat), En Marquat, L., Jacobs, D. R. J., McIntosh, G., Poutanen, K. y Reicks, M., eds. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, EE. UU.
- Solorzano, L.** 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*:799-801.
- Stapper, M.** 2010. Crop Monitoring and Zadoks Growth Stages for Wheat. CSIRO Plant Industry, Canberra, Australia.
- Stevenson, F.J.** 1982. Origin and distribution of nitrogen in soil, p. 1-42, En Stevenson, F. J., ed. *Nitrogen in agricultural soils*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wi, EEUU.
- Stickel, E., Mädl, F.X., Retzer, F., Dennert, J. y Fischbeck, G.** 2000. Efficiency of grain production of winter wheat as affected by N fertilisation under particular consideration of single culm sink size. *European Journal of Agronomy* 13(4):287-294.
- Strelec, I., Kočeva Komlenic, D., Jurkovic, V., Jurkovic, Z. y Ugarcic-Hardi, Ž.** 2010. Quality Parameter Changes in Wheat Varieties During Storage at Four Different Storage Conditions. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75(3):105-111.
- Suchy, J., Lukow, O.M. y Fu, B.X.** 2003. Quantification of monomeric and polymeric wheat proteins and the relationship of protein fractions to wheat quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(10):1083-1090.
- Sun, D.W. y Woods, J.L.** 1993. The Moisture Content/Relative Humidity Equilibrium Relationship Of Wheat - A Review. *Drying Technology* 11(7):1523-1551.
- Sun, D.W. y Woods, J.L.** 1994. The selection of sorption isotherm equations for wheat based on the fitting of available data. *Journal of Stored Products Research* 30(1):27-43.
- Thompson, T.L., Peart, R.M. y Foster, G.H.** 1968. Mathematical simulation of corn drying - a new model. *Transactions of the ASAE* 24(3):582-586.
- Tipples, K.H.** 1995. Quality and Nutritional Changes in Stored Grain, p. 325-352, En Jayas, D. S., White, N. D. G. y Muir, W. E., eds. *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE. UU.

- Torres, P.I., Vazquez-Moreno, L., Ledesma-Osuna, A.I. y Medina-Rodriguez, C.** 2000. Contribution of Hydrophobic Soluble Gluten Proteins, Fractionated by Hydrophobic Interaction Chromatography in Highly Acetylated Agarose, to Dough Rheological Properties. *Cereal Chemistry* 77(6):702-707.
- Triboi, E. y Triboi-Blondel, A.-M.** 2002. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem--invited paper. *European Journal of Agronomy* 16(3):163-186.
- Triboi, E., Martre, P. y Triboi-Blondel, A.-M.** 2003. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *Journal of Experimental Botany* 54(388):1731-1742.
- Triboi, E., Martre, P., Girousse, C., Ravel, C. y Triboi-Blondel, A.-M.** 2006. Unravelling environmental and genetic relationships between grain yield and nitrogen concentration for wheat. *European Journal of Agronomy* 25(2):108-118.
- Triboi, E., Abad, A., Michelena, A., Lloveras, J., Ollier, J.L. y Daniel, C.** 2000. Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: 1. quantitative and qualitative variation of storage proteins. *European Journal of Agronomy* 13(1):47-64.
- Tripathi, S.C., Sayre, K.D., Kaul, J.N. y Narang, R.S.** 2003. Growth and morphology of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) culms and their association with lodging: effects of genotypes, N levels and ethephon. *Field Crops Research* 84(3):271-290.
- Tsen, C.C.** 1969. Effects of Oxidizing and Reducing Agents on Changes of Flour Proteins during Dough Mixing. *Cereal Chemistry* 46:435-442.
- USDA Soil Conservation Service.** 1972. National Engineering Handbook. US Government Printing Office, Washington.
- Uthayakumaran, S., Gras, P.W., Stoddard, F.L. y Bekes, F.** 1999. Effect of Varying Protein Content and Glutenin-to-Gliadin Ratio on the Functional Properties of Wheat Dough. *Cereal Chemistry* 76(3):389-394.
- Uthayakumaran, S., Tömösközi, S., Tatham, A.S., Savage, A.W.J., Gianibelli, M.C., Stoddard, F.L. y Bekes, F.** 2001. Effects of Gliadin Fractions on Functional Properties of Wheat Dough Depending on Molecular Size and Hydrophobicity. *Cereal Chemistry* 78(2):138-141.
- Vallejo, A., García-Torres, L., Díez, J.A., Arce, A. y López-Fernández, S.** 2005. Comparison of N losses (NO_3^- , N_2O , NO) from surface applied, injected or amended (DCD) pig slurry of an irrigated soil in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 272(1-2):313-325.
- Van der Burgt, G.J.H.M., Oomen, G.J.M., Habets, A.S.J. y Rossing, W.A.H.** 2006. The NDICEA model, a tool to improve nitrogen use efficiency in cropping systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 74(3):275-294.

- Varga, B. y Svecnjak, Z.** 2006. The effect of late-season urea spraying on grain yield and quality of winter wheat cultivars under low and high basal nitrogen fertilization. *Field Crops Research* 96(1):125-132.
- Vázquez, N., Pardo, A., Suso, M. y Quemada, M.** 2005. A methodology for measuring drainage and nitrate leaching in unevenly irrigated vegetable crops. *Plant and Soil* 269(1):297-308.
- Verbruggen, I.M. y Delcour, J.A.** 2003. Extension Properties of Wheat Flour Dough Fortified with Characterised Wheat Gluten Fractions. *Journal of Cereal Science* 37(2):151-156.
- Verhoeven, J.T.A., Arheimer, B., Yin, C. y Hefting, M.M.** 2006. Regional and global concerns over wetlands and water quality. *Trends in Ecology & Evolution* 21(2):96-103.
- Wallace, H.A.H., Sholberg, P.L., Sinha, R.N. y Muir, W.E.** 1983. Biological, physical and chemical changes in stored wheat. *Mycopathologia* 82(2):65-76.
- Wang, A., Gao, L., Li, X., Zhang, Y., He, Z., Xia, X., Zhang, Y. y Yan, Y.** 2008. Characterization of two 1D-encoded [omega]-gliadin subunits closely related to dough strength and pan bread-making quality in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science* 47(3):528-535.
- Wang, C., Wan, S., Xing, X., Zhang, L. y Han, X.** 2006. Temperature and soil moisture interactively affected soil net N mineralization in temperate grassland in Northern China. *Soil Biology & Biochemistry* 38(5):1101-1110.
- Wang, L. y Flores, R.A.** 1999. The effects of storage on flour quality and baking performance. *Food Reviews International* 15(2):215 - 234.
- Wang, Q., Li, F., Zhao, L., Zhang, E., Shi, S., Zhao, W., Song, W. y Vance, M.** 2010. Effects of irrigation and nitrogen application rates on nitrate nitrogen distribution and fertilizer nitrogen loss, wheat yield and nitrogen uptake on a recently reclaimed sandy farmland. *Plant and Soil* 337(1-2):325-339.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J. y Schofield, J.D.** 1996. Functional Properties of Wheat Glutenin. *Journal of Cereal Science* 23(1):1-17.
- Weegels, P.L., de Groot, A.M.G., Verhoek, J.A. y Hamer, R.J.** 1994a. Effects on Gluten of Heating at Different Moisture Contents. II. Changes in Physico-Chemical Properties and Secondary Structure. *Journal of Cereal Science* 19(1):39-47.
- Weegels, P.L., Verhoek, J.A., de Groot, A.M.G. y Hamer, R.J.** 1994b. Effects on Gluten of Heating at Different Moisture Contents. I. Changes in Functional Properties. *Journal of Cereal Science* 19(1):31-38.
- Wehrmann, J. y Scharpf, H.C.** 1979. Der Mineralstickstoffgehalt des Bodens als Maßstab für den Stickstoffdüngerbedarf (Nmin-Methode). *Plant and Soil* 52(1):109-126.
- Wehrmann, J. y Scharpf, H.C.** 1986. The Nmin-method - an aid to integrating various objectives of nitrogen fertilization. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149(4):428-440.

- Wieser, H.** 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24(2):115-119.
- Wieser, H. y Seilmeier, W.** 1998. The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76(1):49-55.
- Wieser, H. y Kieffer, R.** 2001. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science* 34(1):19-27.
- Wieser, H., Seilmeier, W. y Belitz, H.D.** 1994. Quantitative Determination of Gliadin Subgroups from Different Wheat Cultivars. *Journal of Cereal Science* 19(2):149-155.
- Wieser, H., Antes, S. y Seilmeier, W.** 1998. Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry* 75(5):644-650.
- Wieser, H., Gutser, R. y von Tucher, S.** 2004. Influence of sulphur fertilisation on quantities and proportions of gluten protein types in wheat flour. *Journal of Cereal Science* 40(3):239-244.
- Wilkes, M. y Copeland, L.** 2008. Storage of Wheat Grains at Elevated Temperatures Increases Solubilization of Glutenin Subunits. *Cereal Chemistry* 85(3):335-338.
- Windham, W.R., Gaines, C.S. y Leffler, R.G.** 1993. Effect of Wheat Moisture Content on Hardness Scores Determined by Near-Infrared Reflectance and on Hardness Score Standardization. *Cereal Chemistry* 70(6):662-666.
- Wooding, A.R., Kavale, S., MacRitchie, F., Stoddard, F.L. y Wallace, A.** 2000. Effects of Nitrogen and Sulfur Fertilizer on Protein Composition, Mixing Requirements, and Dough Strength of Four Wheat Cultivars. *Cereal Chemistry* 77(6):798-807.
- Woolfolk, C.W., Raun, W.R., Johnson, G.V., Thomason, W.E., Mullen, R.W., Wynn, K.J. y Freeman, K.W.** 2002. Influence of Late-Season Foliar Nitrogen Applications on Yield and Grain Nitrogen in Winter Wheat. *Agronomy Journal* 94(3):429-434.
- Woychik, J.H., Boundy, J.A. y Dimler, R.J.** 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 94(3):477-482.
- Wrigley, C.W.** 1996. Giant proteins with flour power. *Nature* 381(6585):738-739.
- Wrigley, C.W.** 2007. Mitigating the Damaging Effects of Growth and Storage Conditions on Grain Quality, p. 425-439, *En* Buck, H. T., Nisi, J. E., Salomón, N. y Wrigley, C. W., eds. *Wheat Production in Stressed Environments*, Vol. 12. Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Wrigley, C.W.** 2009. Wheat: a unique grain for the world, p. 1-18, *En* Khan, K. y Shewry, P. R., eds. *Wheat: Chemistry and Technology*, 4 ed. AACC International, Inc., St. Paul, USA.

- Wrigley, C.W., Gras, P.W. y Bason, M.L.** 1994. Maintenance of grain quality during storage-prediction of the conditions and period of 'safe' storage, p. 666-670, *En* Highley, E., Wright, E. J., Banks, H. J. y Champ, B. R., eds. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection*, Vol. 2. CAB International, Wallingford, United Kingdom, Canberra (Australia).
- Wu, C.H., Nakai, S. y Powrie, W.D.** 1976. Preparation and properties of acid-solubilized gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(3):504-510.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V. y Dubcovsky, J.** 2004. The Wheat VRN2 Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science* 303(5664):1640-1644.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S. y Dubcovsky, J.** 2006. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(51):19581-19586.
- Yue, S.J., Li, H., Li, Y.W., Zhu, Y.F., Guo, J.K., Liu, Y.J., Chen, Y. y Jia, X.** 2008. Generation of transgenic wheat lines with altered expression levels of 1Dx5 high-molecular weight glutenin subunit by RNA interference. *Journal of Cereal Science* 47(2):153-161.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. y Konzak, C.F.** 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14(6):415-421.
- Zambre, M.A., Konde, B.K. y Sonar, K.R.** 1984. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. *Plant and Soil* 79(1):61-67.
- Zhang, Y., Luan, S., Chen, L. y Shao, M.** 2011. Estimating the volatilization of ammonia from synthetic nitrogenous fertilizers used in China. *Journal of Environmental Management* 92(3):480-493.
- Zörb, C., Grover, C., Steinfurth, D. y Hermann Mühlhling, K.** 2010. Quantitative proteome analysis of wheat gluten as influenced by N and S nutrition. *Plant and Soil* 327(1):225-234.

LISTA DE PUBLICACIONES

- González-Torralba, J.**, Arazuri, S., Jarén, C. y Arregui, L.M. 2013. Influence of temperature and r.h. during storage on wheat bread making quality. *Journal of Stored Products Research* 55:134-144.
- Fuertes-Mendizábal, T., **González-Torralba, J.**, Arregui, L.M., González-Murua, C., González-Moro, M.B. y Estavillo, J.M. 2013. Ammonium as sole N source improves grain quality in wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2162-2171.
- Arazuri, S., Ignacio Arana, J., Arias, N., Arregui, L.M., **Gonzalez-Torralba, J.** y Jaren, C. 2012. Rheological parameters determination using Near Infrared technology in whole wheat grain. *Journal of Food Engineering* 111(1):115-121.
- González-Torralba, J.**, Arazuri, S., Jarén, C. y Arregui, L.M. 2011. Stable Quality Traits of Soft Winter Wheat under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Crop Science* 51(6):2820-2828.



upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Profesora Ina Etxepare Jauregui

ION KONZÁLEZTORRALRA TESIS DOCTORAL