



*MASTER EN PRODUCCIÓN, PROTECCIÓN Y MEJORA VEGETAL  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA*

# **Efecto de la densidad de siembra y fertilización nitrogenada sobre parámetros agronómicos y de calidad en líneas avanzadas de Tritordeum**

**por**

**Alba Martínez Castilla**

Departamento de Mejora Genética Vegetal del Instituto de Agricultura  
Sostenible

Director/es del trabajo:

Francisco Barro Losada

VºB º del Director/es:

Firma del alumno:

## RESUMEN

En cereales, la densidad de siembra y la fertilización nitrogenada son dos factores cruciales que afectan a importantes parámetros agronómicos, como el rendimiento, la calidad, la cantidad y distribución de las distintas fracciones de proteínas, que a su vez afectan a las propiedades reológicas de la masa, que determinan la calidad final del pan y productos derivados. El tritordeum es un nuevo cereal desarrollado en Córdoba, y la investigación en este cereal sobre aspectos agronómicos importantes es escasa. En este trabajo hemos utilizado cinco líneas avanzadas de tritordeum junto a dos líneas de trigo duro y dos de trigo harinero para realizar un estudio comparativo del tritordeum junto con los trigos comerciales en respuesta a distintas densidades de siembra y diferentes dosis de fertilización nitrogenada. Se sembraron las nueve variedades en tres niveles de densidad de siembra y tres niveles de fertilización nitrogenada y se evaluó el efecto de ambas variables, y sus interacciones, sobre el rendimiento, el contenido total de proteína y almidón en el grano, sobre la cantidad y composición de las fracciones de proteínas pertenecientes al gluten, y sobre las proteínas no pertenecientes al gluten. Se observó efecto significativo de la fertilización nitrogenada sobre todos los parámetros. Sin embargo, el efecto de la densidad de siembra resulta significativo sólo para el contenido de almidón en el grano, el contenido de proteínas no pertenecientes al gluten y para la relación gli/glu. Además no hemos encontrado interacción significativa entre la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra en ninguno de los parámetros estudiados en el presente trabajo. Sobre la base de los resultados obtenidos en Tritordeum, se concluye que para alcanzar el máximo de rendimiento en las variedades de Tritordeum la densidad de siembra óptima sería 450 semillas/m<sup>2</sup> y aplicaremos una dosis media de 150 UN. Por el contrario, para aumentar el contenido de proteína sembraremos a 250 semillas/m<sup>2</sup> y fertilizaremos con dosis de 225 UN, lo que también nos proporciona Tritordeum de alta calidad y con bajo contenido en gluten.

**Palabras clave:** fertilización nitrogenada, densidad de siembra, tritordeum, RP-HPLC, calidad- harino panadera, rendimiento.

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	5
1.1. El trigo.....	5
1.2. Las proteínas de gluten.....	5
1.3. Trigos alopoloides.....	6
1.4. El tritordeum.....	7
1.5. Efecto de la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra en trigo.....	8
2. Objetivo.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Diseño del experimento.....	15
3.3. Extracción de las distintas fracciones del gluten: gliadinas y gluteninas.....	17
3.4. Cuantificación mediante RP-HPLC.....	18
3.5. Procesamiento de datos.....	19
3.6. Análisis estadístico.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Resultados del análisis de las distintas fracciones de gluten mediante RP-HPLC.....	21
4.2. Resultados del análisis MANOVA.....	24
4.3. Representación de los efectos significativos para el análisis MANOVA.....	25
4.4. Representación de las interacciones significativas para el análisis MANOVA.....	33
4.5. Análisis para el genotipo de Tritordeum.....	36
5. Discusión.....	39
6. Conclusiones.....	44
7. Bibliografía.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño del experimento.....	15
--------------------------------------	----

Tabla 2. Significaciones estadísticas para el análisis multivariante (MANOVA).....	25
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatogramas de la fracción de gliadinas.....	22
--	----

Figura 2. Cromatogramas de la fracción de gluteninas.....	23
---	----

Figura 3. Efectos significativos sobre el rendimiento.....	26
--	----

Figura 4. Efectos significativos sobre el contenido de proteína.....	27
--	----

Figura 5. Efectos significativos sobre el contenido de almidón.....	28
---	----

Figura 6. Efecto significativo sobre el contenido de gliadinas.....	29
---	----

Figura 7. Efectos significativos sobre el contenido de gluteninas.....	30
--	----

Figura 8. Efecto significativo sobre el contenido de prolaminas.....	31
--	----

Figura 9. Efectos significativos sobre el contenido de proteínas no pertenecientes al gluten.....	32
--	----

Figura 10. Efectos significativos sobre la relación gli/glu.....	33
--	----

Figura 11. Interacciones significativas para el rendimiento.....	35
--	----

Figura 12. Interacciones significativas para el contenido de almidón.....	36
---	----

Figura 13. Gráficos combinados para las variedades de tritordeum.....	37
---	----



# 1. Introducción

## 1.1. El trigo

El trigo es uno de los cultivos alimentarios más importantes a nivel mundial (Gyarmati, 2017); aproximadamente el 21% de los alimentos del mundo depende del cultivo de trigo, que crece en 220 millones de hectáreas en todo el mundo, lo que representa aproximadamente el 30% de la superficie mundial de cereales cosechados (FAO, 2018) (Kadar et al., 2019). Es un cereal con capacidad de adaptación a diversos climas y es usado tanto para alimentación humana como para alimentación ganadera, proporcionando energía y proteínas, tanto a seres humanos como a animales. Una de sus características más notables son sus propiedades harino-panaderas, lo que permite la producción de pan y otros alimentos como la repostería o la pasta, cuya base es la harina de trigo.

El principal componente del grano es almidón, representado el 60-75% del peso seco total seguido de proteína con un peso seco entre 9-15%, siendo este último muy importante para su funcionalidad, ya que gran parte de estas proteínas forman una red visco-elástica cohesiva, conocida como gluten; que permite la captura de dióxido de carbono durante la fermentación y expansión de la masa, contribuyendo al volumen final y a la textura del pan, y otros productos horneados (García-Molina y Barro, 2017).

## 1.2. Las proteínas del gluten

Las proteínas del grano de trigo se pueden clasificar según su funcionalidad o su solubilidad. Desde el punto de vista funcional encontramos dos grupos principales de proteínas. Las primeras son proteínas con funciones estructurales o metabólicas que representan entre un 15-20% del total de proteínas del trigo, podemos encontrarlas en las capas externas del grano y en bajas concentraciones en el endospermo. Las

segundas son proteínas de reserva, lo que conocemos como gluten, éstas aportan sustancias nutritivas y aminoácidos a la plántula en los primeros estadios del desarrollo, en trigo representan entre un 80-85% del total de las proteínas del grano y se encuentran principalmente en el endospermo (Shewry y Halford, 2001). Las proteínas del gluten también se llaman prolaminas debido a su alto contenido de los aminoácidos prolina y glutamina (Shewry y Halford, 2002).

Las proteínas del gluten están formadas por gliadinas y gluteninas (Shewry et al., 2009). Las gliadinas son monoméricas y proporcionan extensibilidad y viscosidad a la masa. Se clasifican en tres fracciones estructurales:  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  gliadinas. Las gluteninas son las responsables de proporcionar elasticidad y tenacidad a la masa y forman complejos poliméricos que se unen por enlaces disulfuro, constituyendo dos tipos de subunidades; gluteninas de alto peso molecular (High Molecular Weight; HMW) y gluteninas de bajo peso molecular (Low Molecular Weight; LMW) (Giménez y Barro, 2013; García-Molina y Barro, 2017).

### 1.3. Trigos alopoloides

En plantas la poliploidía ha tenido mucho que ver en la formación de nuevas especies. Además, han aparecido muchas especies cuyo complemento cromosómico está compuesto por la adición de juegos cromosómicos de especies ya existentes; son los alopoliploides o alopoloides. Cuando los poliploides surgen de forma espontánea en la naturaleza pueden mostrar superioridades como la de ser plantas mejor adaptadas a ambientes más amplios que las especies de las que provienen. Sin embargo, por lo general no tienen buena fertilidad, debido a fallos en el apareamiento meiótico. No obstante, con el tiempo los alopoloides pueden ver incrementada la fertilidad porque se diploidizan, es decir, se comportan meióticamente como verdaderos diploides. El trigo harinero es un caso de alopoloide natural diploidizado. También es posible obtener alopoloides de forma artificial (anfiploides) a través de la hibridación interespecífica e intergenérica y posterior duplicación cromosómica. A través de este mecanismo se han

sintetizado varios cereales, de los cuales, solo dos han sido cultivados para su uso directo en la producción de grano.

El primer anfiploide fue el triticales ( $\times$ *Triticosecale* Wittmack,  $2n=6x=42$ , AABBRR) obtenido a través del cruzamiento entre trigo duro (*T. turgidum* cv. durum,  $2n=4x=28$ , AABB) y centeno (*Secale cereale* L.,  $2n=2x=14$ , RR). Presenta una calidad nutricional superior a la del trigo, pero su mayor contenido en cenizas, menor rendimiento de molienda, inferior volumen de panificación y peor textura han limitado su uso en panificación comercial. En la actualidad se emplea principalmente para alimentación animal (McGoverin et al., 2011).

El tritordeum ( $\times$  *Tritordeum* Ascherson et Graebner) fue obtenido por Martín y Chapman en 1977 mediante el cruzamiento entre una cebada silvestre *Hordeum chilense* Roem. et Schultz ( $2n=2x=14$ ,  $H_{ch}H_{ch}$ ) y trigo harinero (*T. aestivum* cv. Chinese Spring) dando lugar a un anfiploide octoploide ( $2n=8x=56$ ,  $H_{ch}H_{ch}AABBDD$ ) que mostraba fertilidad baja, crecimiento inicial pobre y altas frecuencias de aneuploidía (Martin et al., 1999). Posteriormente se obtuvo el tritordeum hexaploide ( $2n=6x=42$ ,  $H_{ch}H_{ch}AABB$ ) cruce de *H. chilense* y trigo duro (*T. turgidum* cv. durum,  $2n=4x=28$ , AABB), cuyas características mejoraron, presentando mayor tasa de crecimiento, mejor fertilidad y menor frecuencia de aneuploidía (Martín et al., 1999).

#### 1.4. El tritordeum

El tritordeum es, morfológica y agronómicamente, similar al trigo, revelando una serie de características que sugieren un elevado potencial como nuevo cultivo (Cubero et al., 1986; Martín, 1988). Destacamos su elevado contenido en carotenoides, como la luteína, asociada a prevenir diferentes enfermedades relacionadas con la salud ocular (Atienza et al., 2007; Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). Este cereal destaca también por mostrar una alta variabilidad en el



contenido de compuestos fenólicos, compuestos antioxidantes que tienen un gran potencial para mejorar la salud humana (Navas-López et al., 2014). El tritordeum tiene menor proporción de proteínas de gluten (ciertas gliadinas) responsables de la intolerancia y sensibilidad al gluten que otros trigos harineros, por lo que el tritordeum puede ser una alternativa para personas con intolerancias alimentarias no celíacas (Vaquero et al., 2018). Todas estas cualidades confieren al Tritordeum el potencial de ser parte de una dieta saludable y recientemente se ha introducido en el mercado como un cereal alimenticio alternativo ([www.tritordeum.com](http://www.tritordeum.com)).

### 1.5. Efecto de la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra en trigo

En trigo, la calidad de las harinas, y por tanto del pan se ven afectadas por factores genéticos y ambientales. Dentro de los factores ambientales, la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra juegan un papel muy importante. Por lo tanto son dos factores de manejo del cultivo que debemos tener en cuenta en un sistema de producción no solo de trigo sino de cualquier cereal (Ellis et al., 1999; Otteson et al., 2008; Nakano et al., 2009). Otros factores ambientales que tienen un efecto significativo en la calidad de las harinas son la fuente de fertilizante nitrogenada (Jarecki et al., 2017), el momento de la aplicación de nitrógeno (Rawluk et al., 2000; Woolfolk et al., 2002; Karamanos et al., 2005), la rotación de cultivos (Kaerner, 1999; Halvorson et al., 2000) y la temperatura durante la temporada de crecimiento (Triboi et al., 2000; Dupont et al., 2006; Hurkman et al., 2013)

Hay numerosos estudios que evidencian el efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento, la calidad y la composición de las proteínas del grano; al igual que la calidad de la panificación y las características reológicas de la masa (Jia et al., 1996; Johansson et al., 2001; Fuertes-Mendizábal et al., 2010). La calidad de panificación de la harina depende de la calidad y cantidad de proteínas en el endospermo. La calidad de las proteínas está determinada genéticamente y está asociado a la composición de las subunidades HMW de las gluteninas. Éstas representan sólo el 1% del peso seco del endospermo maduro pero son las principales culpables de proporcionar elasticidad a la

masa, una de las características más importantes para la fabricación de pan (Payne, 1987). Por el contrario, la cantidad de proteínas es un parámetro que se ve afectado por los factores ambientales y sus interacciones, especialmente por la fertilización con nitrógeno (Graybosch et al., 1996; Huebner et al., 1997; Triboï et al., 2000; Zhu y Khan, 2001).

La fertilización nitrogenada aumenta la cantidad total de proteína del grano al final de la cosecha y está relacionado con un aumento en la cantidad de gliadinas y gluteninas para el trigo (Pechanek et al., 1997; Wieser y Seilmeier, 1998; Triboï et al., 2000) y de hordeínas para cebada (Shewry et al., 2001). En trigo, el aumento del suministro de nitrógeno generalmente ocasiona un aumento del porcentaje de gliadinas, mientras que el de las gluteninas no se ve afectado (Jia et al., 1996; Doekes y Wennekes, 1982; Gupta et al., 1992); aunque hay trabajos más recientes que han demostrado que este resultado depende del genotipo considerado (Pechanek et al., 1997; Wieser y Seilmeier, 1998). Por el contrario, las proteínas no pertenecientes al gluten, albúminas-globulinas, está muy poco influenciada por la nutrición con nitrógeno (Pechanek et al., 1997; Wieser y Seilmeier, 1998; Johansson et al., 2001).

Pechanek et al. (1997) estudiaron el efecto del nitrógeno en la calidad de diferentes componentes de las proteínas del gluten sobre tres variedades diferentes de trigo mediante HPLC de fase reversa, con el fin de distinguir si son las gliadinas o las gluteninas las responsables de las diferencias de calidad inducidas por la fertilización nitrogenada. Observó un aumento significativo del contenido total de proteína cuando se aplicaba una alta cantidad de nitrógeno. Este aumento fue obvio para las proteínas de gluten, no así para las albúminas y las globulinas, las cuales no se vieron casi afectadas. Sin embargo, el efecto del aumento del contenido en gliadinas respecto a la de gluteninas (relación gli/glu) fue inconsistente. No observó cambios constantes entre las subunidades de HMW (tipo x y tipo y) debido a la fertilización, esta proporción parece depender del genotipo y disminuye a medida que disminuye la calidad. En el estudio también se observa una clara correlación de la cantidad de subunidades del tipo x, con el valor de sedimentación (parámetro relacionado con la calidad por más

autores) y el volumen del pan, por lo que sugieren que la proporción de gluteninas HMW, especialmente las subunidades de tipo x, con respecto al contenido total de proteínas podría ser el mejor parámetro detectable temprano con un alto valor predictivo para la calidad de panificación, coincidiendo con lo descrito por Payne, 1987.

Fuertes-Mendizábal et al. (2010) determinaron mediante ensayos en la variedad de trigo *Soissons* un efecto beneficioso de la fertilización nitrogenada sobre la calidad del grano. Observaron que el contenido de proteínas metabólicas (no pertenecientes al gluten) se mantuvo constante, mientras que el contenido de las proteínas de reserva se incrementó a medida que aumentaba el contenido de nitrógeno. Se produjo un aumento en los parámetros de calidad como la extensibilidad, tenacidad y resistencia de la masa que se relacionaron con pequeños aumentos de la fracción de glutenina por encima de cierto valor umbral, por lo que sugirieron que un mayor grado de polimerización de las gluteninas fue la responsable del aumento de la calidad. Concluyeron que el incremento del contenido en las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) fue debido tanto al aumento de la cantidad de fertilizante nitrogenado como a la división del mismo, que permiten una mayor formación de enlaces disulfuro e induce un mayor grado de polimerización y, en consecuencia, una mejora de la calidad.

En trabajos anteriores (Levi et al., 1985; Doekes et al., 1982) observaron un aumento de gliadinas pero ningún cambio de las gluteninas después de la fertilización con nitrógeno. Como consecuencia, la relación gli/glu aumentó con el aumento de la fertilización nitrogenada. Estos resultados fueron confirmados por Gupta et al., (1992) donde encontraron una correlación positiva entre el aumento de la proporción gli/glu y el volumen del pan. Sin embargo, estos hallazgos contradicen los resultados obtenidos por Scheromm et al (1992) y Prieto et al (1992), ambos revelaron un efecto de la fertilización nitrogenada provocando un aumento tanto de las gluteninas como de las gliadinas dependiente de la variedad.

Muy recientemente, Kadar et al. (2019) estudiaron la correlación entre el rendimiento y el contenido de proteína del grano en diferentes fertilizaciones nitrogenadas, realizando un ensayo durante tres años con 19 genotipos de tres variedades de trigo de primavera. Los análisis de la varianza del rendimiento y del contenido de proteína de grano mostraron que hubo varianza para los mismos factores: genotipo, año, fertilización nitrogenada y la interacción genotipo\*año. Por el contrario, no obtuvieron variación para la interacción genotipo\*fertilización y la triple interacción genotipo\*año\*fertilización. Por lo tanto, los resultados de ANOVA indican que los años fueron más importantes en las interacciones con los genotipos que la fertilización con nitrógeno, por lo que el efecto de la fertilización nitrogenada fue poco relevante para la varianza en este estudio. Una dosis alta de nitrógeno aseguró un mayor rendimiento y una buena calidad para todos los cultivares. Aunque se encontraron correlaciones negativas entre la producción y el contenido de proteínas en algunos de ellos, también se encontraron algunos cultivares que mostraron regresiones positivas entre la producción y el contenido de proteína.

Barro y su grupo han realizado varios estudios para determinar el efecto del nitrógeno en la expresión de las proteínas de gluten, en combinación con azufre. Estudio realizado en líneas transgénicas de trigo con bajo contenido en gliadina. En estas líneas el aumento de la fertilización nitrogenada no incrementó el contenido de gluten (ppm), y algunas de estas líneas pueden ser útiles para reducir la incidencia de patologías relacionadas con el gluten, como la enfermedad celíaca (García-Molina y Barro, 2017).

La densidad de siembra también influye en el contenido proteico del grano y en la calidad, por lo que también puede considerarse un factor importante que contribuye al rendimiento y a la calidad del grano. Yan et al. (2008) realizaron estudios para ver los efectos de la fecha de siembra y la densidad de siembra sobre el componente proteico del grano y la calidad de dos cultivares de trigo de invierno, uno de gluten fuerte y otro de gluten medio. Los resultados mostraron que la fecha de siembra adecuada produjo el mayor contenido de proteína y rendimiento en el grano de trigo. El contenido de

proteína del grano se vio menos afectado por la densidad de siembra; por el contrario, la calidad del grano afectó en cierta medida al cultivar de gluten fuerte. Una baja densidad de siembra produjo mejor calidad de grano para el cultivar de gluten medio.

Zhang et al. (2016) estudiaron el efecto de la fertilización nitrogenada y densidad de siembra sobre el rendimiento de grano, la cantidad y la composición de las fracciones de proteína, tiempo de desarrollo de la masa, tiempo de estabilidad de la masa y volumen de pan; con el fin de evaluar el efecto de la interacción de los dos factores sobre un cultivar de trigo de invierno con dos niveles de fertilización nitrogenada (ausencia de fertilizante y aplicación normal 240 kg N / ha) y tres niveles de densidad de siembra (120, 180 y 240 plantas/m<sup>2</sup>). El efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento y la calidad del grano para el cultivar estudiado dependieron de los niveles de fertilización nitrogenada. Con respecto al rendimiento, observaron a fertilización normal como se produce un mayor rendimiento en este cultivar a medida que la densidad de siembra aumenta de 120 a 180 plantas/m<sup>2</sup>. Sin embargo de 180 a 240 plantas/m<sup>2</sup> no se logró ninguna mejora en el rendimiento. En ausencia de fertilizante observaron una disminución en el rendimiento a medida que aumentamos la densidad de 120 a 240 plantas/m<sup>2</sup>. A una fertilización normal (240 kg N/ha), a medida que la densidad de plantas aumenta de 120 a 240 plantas/m<sup>2</sup>, aprecian un aumento de la concentración de proteína en el grano, así como la concentración de gluteninas y gliadinas, gluteninas insolubles en SDS y gluteninas solubles en SDS, dando lugar a un mayor índice de polimerización. De la misma manera los parámetros de calidad también mejoraron al aumentar la densidad de siembra. En ausencia de fertilizante, la concentración de proteína en el grano, la concentración de gluteninas y gliadinas y los parámetros de calidad disminuyeron con el aumento de la densidad de siembra. Las gluteninas insolubles en SDS disminuyeron pero las gluteninas solubles no sufrieron alteración, lo que dio como resultado una disminución en el índice de polimerización al aumentar la densidad de la planta.

Aunque en determinados ensayos agronómicos el tritordeum se comporta igual que el trigo, poco se sabe sobre el efecto de la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra en este cultivo, por ello hemos llevado a cabo este estudio con líneas avanzadas de tritordeum y su comparación con trigo harinero y trigo duro. Los resultados de este trabajo proporcionarán importante información de este nuevo cereal y facilitará la optimización de su cultivo buscando alto rendimiento y buena calidad.

## **2. Objetivo**

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es estudiar el comportamiento de líneas comerciales y precomerciales de tritordeum junto con trigos comerciales en respuesta a distinta dosis de fertilización nitrogenada y distintas densidades de siembra, y sus interacciones, estudiando cómo afecta al rendimiento, a la cantidad de proteínas y almidón en el grano, y a la distribución de las distintas fracciones de proteína.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Material vegetal

Se han estudiado dos variedades comerciales de trigo harinero (Gazul y Arthur Nick), dos variedades comerciales de trigo duro (Amilcar y Avispa), y cinco variedades de tritordeum (Aucan, Bulel, HT444, HT460 y HT435). Aucan y Bulel son dos líneas comerciales de tritordeum. Las líneas HT444, HT435 y HT460 son líneas avanzadas de tritordeum.

#### 3.2. Diseño del experimento

Sembramos las nueve variedades en tres niveles (bloques) de fertilización nitrogenada, 75 Unidades de Nitrógeno UN (baja), 150 UN (fertilización estándar para la zona) y 225 UN (alta). A su vez se usaron tres niveles (sub-bloques) de densidad de siembra, 250 semillas/m<sup>2</sup> (baja), 350 semillas/m<sup>2</sup> (media) y 450 semillas/m<sup>2</sup> (alta). Dentro de cada sub-bloque hay tres repeticiones de cada una de las líneas (sub-sub-bloque) para evaluar el efecto de la interacción entre los niveles de fertilización nitrogenada y los niveles de densidad de siembra en las variables estudiadas. Para ello se ha diseñado un ensayo en Split-split-plot que se describe a continuación en la Tabla 1. La unidad experimental es la parcela de 7m<sup>2</sup>.



Tabla 1. Esquema con el diseño del experimento. El diseño consta de nueve variedades (Gazul, Arthur Nick, Amilcar, Avispa, Aucan, Bulel, HT444, HT460 y HT435); tres bloques con diferentes aplicaciones de abonado nitrogenado (75 UN, 150 UN, 225 UN); tres sub-bloques con distintas densidades de siembra 250 semillas/m<sup>2</sup>, 350 semillas/m<sup>2</sup>, 450 semillas/m<sup>2</sup> y tres repeticiones R1, R2 y R3.

450 (sem/m2)				350 (sem/m2)			250 (sem/m2)			75 (UN)
R1				R1			R1			
Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460				Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			
R2				R2			R2			
AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar				AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			
R3				R3			R3			
Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444				Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			
450 (sem/m2)				350 (sem/m2)			250 (sem/m2)			150 (UN)
R1				R1			R1			
Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460				Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			
R2				R2			R2			
AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar				AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			
R3				R3			R3			
Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444				Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			
450 (sem/m2)				350 (sem/m2)			250 (sem/m2)			225 (UN)
R1				R1			R1			
Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460				Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			Gazul      Avispa      Aucan HT444      HT435      AN Bulel      Amilcar      HT460			
R2				R2			R2			
AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar				AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			AN      Aucan      HT460 Avispa      Bulel      HT444 HT435      Gazul      Amilcar			
R3				R3			R3			
Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444				Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			Amilcar      Avispa      AN HT435      Aucan      Bulel HT460      Gazul      HT444			

El rendimiento o la producción de grano (kg/ha) fue obtenido cosechando y pesando el grano de cada parcela. Tanto el contenido de proteína del grano (%PS) como el contenido de almidón (%PS) se realizaron en un laboratorio externo (Laboratorio agroalimentario de Córdoba). El contenido de proteína se calculó a partir del contenido de nitrógeno de Kjeldahl (%N x 5.7) de acuerdo con el método estándar ICC nº 105/2 (ICC, 1994), y el contenido de almidón se determinó de acuerdo con el método estándar ICC nº 123/1 (ICC, 1994). Ambos parámetros se expresaron sobre

una base húmeda del 14%. Utilizamos un HPLC de fase reversa (RP-HPLC) para determinar el contenido de las diferentes fracciones de proteínas; gliadinas y gluteninas y contenido total de prolaminas. A partir de estos datos hemos calculado el contenido de gluten no proteico y la relación gli/glu.

### 3.3. Extracción gliadinas y gluteninas

La cuantificación de gliadinas y gluteninas se realizó en la segunda repetición (R2). En primer lugar se extrajo una pequeña muestra de grano de cada una de las parcelas de la segunda repetición. Las muestras se molieron en un molino de bolas de laboratorio. De la harina obtenida se extrajeron las gliadinas y las gluteninas siguiendo un método clásico modificado por Osborne basado en la solubilidad de las proteínas (Pistón et al., 2011).

La fracción de gliadinas se obtuvo a partir de 100 mg de harina a los que se añadió 670  $\mu$ l de etanol al 60% (v/v), se agitó en molinos de bolas a baja amplitud durante 10 minutos con la intención de mezclar bien la harina con el tampón. Posteriormente se centrifuga a 6000 x g a temperatura ambiente durante 15 minutos y recuperamos el sobrenadante en un tubo nuevo. El proceso se repitió dos veces más y al final se juntaron los tres sobrenadantes en el mismo tubo. El precipitado se conservó a -20°C para la posterior extracción de las gluteninas. La fracción de gluteninas se extrajo del precipitado insoluble (del pellet de la etapa anterior) con 500  $\mu$ l de 1-propanol al 50% (v/v), urea 2 M, Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) y DTT al 2% (p/v). Seguidamente se agitaron las muestras en un molino de bolas durante dos minutos a amplitud intermedia y se incubaron durante 30 min a 60 °C en un agitador orbital. Tras la incubación, se centrifugaron a 6000 x g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Esta operación se repitió dos veces más y al final se juntaron los tres sobrenadantes en el mismo tubo.

Tanto el extracto de gliadinas como el de gluteninas se filtraron antes de ser inyectadas en el HPLC, ya que no deben de contener ninguna partícula que pueda obstruir la columna del HPLC. Para ello, los extractos proteicos se centrifugaron con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Corning® Costar® Spin-X®). Finalmente, los extractos filtrados se pasaron a un vial de cromatografía.

### 3.4. Cuantificación gliadinas y gluteninas mediante RP-HPLC

La cuantificación de las gliadinas y gluteninas (proteínas de gluten) extraídas, se realiza mediante cromatografía líquida de fase reversa RP-HPLC (1200 Series Quaternary LC System liquid chromatograph de Agilent Technologies). La separación de la fracción proteica está basada en la hidrofobicidad de estos compuestos, por lo tanto el orden de la elución será de  $\omega$ -,  $\alpha$ -, y  $\gamma$ - para las gliadinas; y HMW y LMW para las gluteninas (de menos a más hidrofobicidad).

Los extractos de gliadinas (60  $\mu\text{l}$ ) y gluteninas (60  $\mu\text{l}$ ) se inyectaron y analizaron en una columna analítica de fase reversa LiChrospher® 100RP-8 (4,6 x 250 nm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro de 100 Å, SIGMA-ALDRICH) utilizando un sistema cuaternario de cromatografía líquida de alta resolución serie 1200 (Agilent Technologies) con un detector DAD UV-V, como se describe en (Wieser et al., 1998; Gil-Humanes et al., 2010). Los solventes son agua desionizada (A) y acetonitrilo (B), que contienen ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v), se utilizaron como fase móvil. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 26 % B a 54 % B en 60 min tanto para gliadinas como para gluteninas, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min a 50°C. Se detectaron con el módulo DAD UV-V a 210 nm. El software del equipo realizó de forma automática la integración con algunos ajustes manuales. Se determinaron las cantidades absolutas de la fracción de gliadinas y gluteninas usando albúmina de suero bovino (BSA, BSA  $\geq 98\%$ , fracción V, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, cat. No. A3294) como patrón de proteínas. Se llevaron a cabo dos repeticiones de cada parcela

experimental, utilizándose la media aritmética de las dos repeticiones para el análisis de los datos.

### 3.5. Procesamiento de los datos

La salida del tiempo de retención (min) y el área (mAU) del software del HPLC se importó a Excel y se realizaron los cortes a mano de las distintas fracciones de gliadinas y gluteninas. A partir de las áreas obtenidas de cada pico calculamos todas las fracciones de gluten de cada una de las muestras, mediante la fórmula:

$$Proteína \left( \frac{\mu g}{mg \text{ de harina}} \right) = 0,0005 \text{ Área (mAU)} \frac{(V \text{ extracción } (\mu l))}{(V \text{ inyección } (\mu l) \text{ Peso harina (mg)})}$$

$$Gliadinas \left( \frac{\mu g}{mg \text{ de harina}} \right) = 0,0005 \text{ Área (mAU)} \frac{(2000(\mu l))}{(60 (\mu l) 100 (mg))}$$

$$Gluteninas \left( \frac{\mu g}{mg \text{ de harina}} \right) = 0,0005 \text{ Área (mAU)} \frac{(1500 (\mu l))}{(60 (\mu l) 100 (mg))}$$

La cantidad total de gliadinas fue calculada sumando el total de  $\omega$ -gliadinas,  $\alpha$ -gliadinas y  $\gamma$ -gliadinas. La cantidad total de gluteninas fue calculada sumando las dos fracciones HMW y LMW. El total de prolaminas se obtuvo sumando la cantidad de gliadinas y gluteninas. Y la cantidad de gluten no proteico se calculó mediante la fórmula:

$$Gluten \text{ no proteico } (\mu g/mg) = Proteína (PS\%) \frac{(Prolaminas (\mu g/mg))}{(100 - Humedad (PS\%))}$$

### 3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos descrito a continuación, se realizó con el programa estadístico R versión 3.5.1 (Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing, Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64 (64-bit) (Ihaka y Gentleman, 1996) utilizando la interfaz gráfica de R Studio.

Para determinar el efecto de las distintas aplicaciones de abonado nitrogenado y las distintas densidades de siembra sobre las nueve variedades objeto de estudio se realizó un análisis multivariante de la varianza MANOVA, puesto que tenemos más de una variable dependiente y queremos ver si existe interacción entre ellas e identificar las variables dependientes específicas que contribuyen al efecto global significativo de cada uno de los factores. Los factores objeto de estudio son rendimiento (kg/ha), contenido de proteína en el grano (PS%), contenido de almidón en el grano (PS%), gliadinas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), gluteninas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), total prolaminas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), proteínas no pertenecientes al gluten ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) y la relación gli/glu. El análisis multivariante se realizó con la función “manova” del paquete stats v3.5.1. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias entre muestras comparadas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $p < 0,05$ ).

Una vez obtenidas las diferencias entre las muestras. Representamos gráficamente aquellos factores que resultaron ser significativos mediante box-plot con la función “boxplot” del paquete estadístico ggplot2. Para representar las interacciones significativas hemos usado la función “interaction.plot” del paquete stats v3.5.1. La representación de los gráficos combinados se realizó con la función “plot.all.d” del paquete estadístico ggpubr.

## 4. Resultados

### 4.1. Análisis de las fracciones de gliadinas y gluteninas mediante RP-HPLC

Las gliadinas están formadas por tres grupos estructurales:  $\alpha$ - ,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas. Por su parte, las gluteninas están formadas por gluteninas de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW).

En RP-HPLC las proteínas se separan según su hidrofobicidad. Por tanto, el orden de elución es  $\omega$ -,  $\alpha$ - y  $\gamma$ - para la fracción de gliadinas y HMW y LMW para la fracción de gluteninas. En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de perfiles cromatográficos que se obtuvieron la para la fracción de gliadinas y gluteninas, respectivamente en las tres densidades de siembra y tres dosis de abonado nitrogenado.

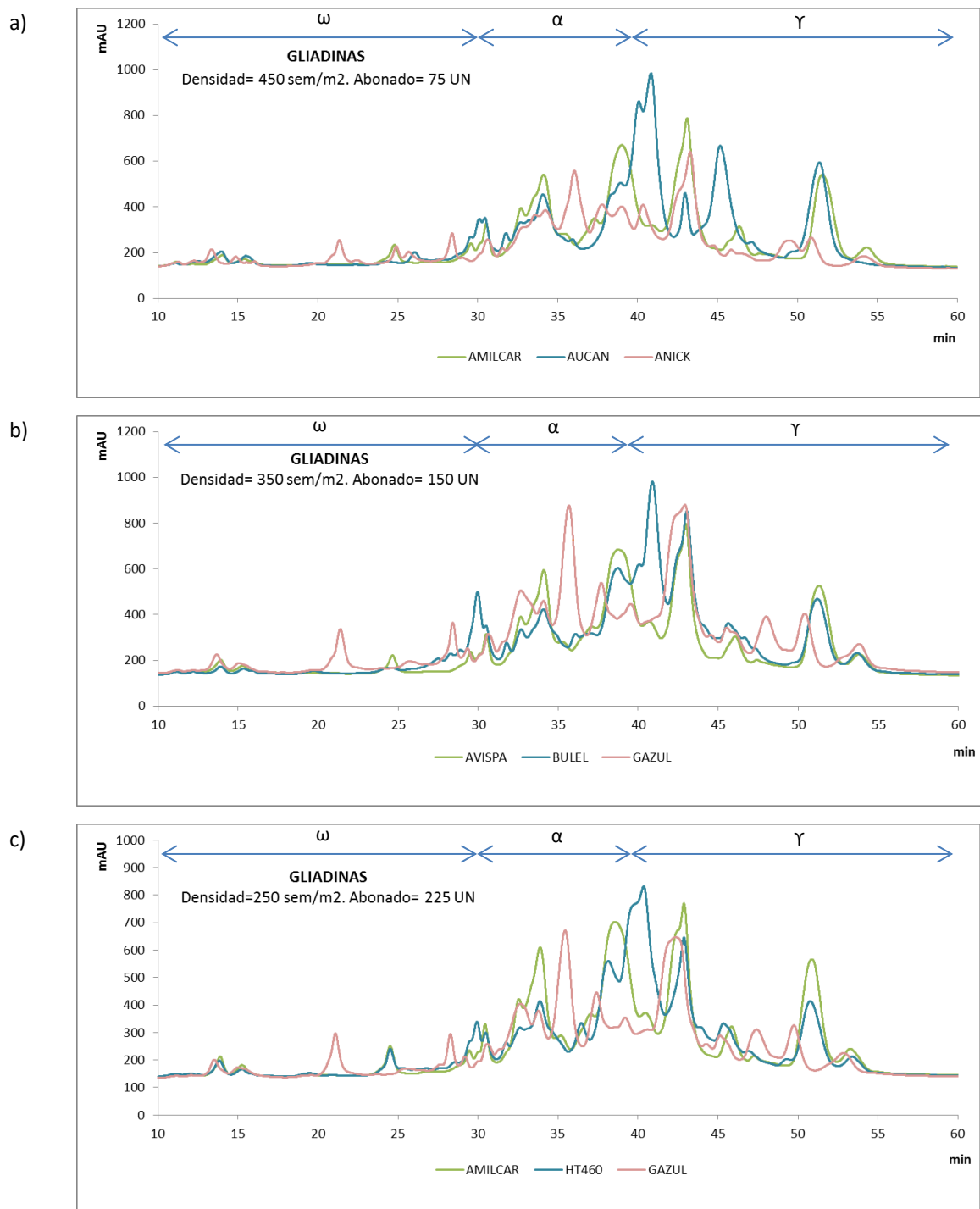


Figura 1. Cromatogramas de la fracción de gliadinas analizadas por RP-HPLC. En el eje de abscisas se representa el tiempo de retención (minutos) y en el eje de ordenadas se representan las unidades de absorbancia (mili unidades de absorbancia). Se observa en verde un trigo duro (Amilcar), en azul un tritordeum (HT460) y en rosa un trigo harinero (Gazul). a) muestras sembradas a 450 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 75 UN, b) muestras sembradas a 350 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 150 UN y c) muestras sembradas a 250 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 225 UN.

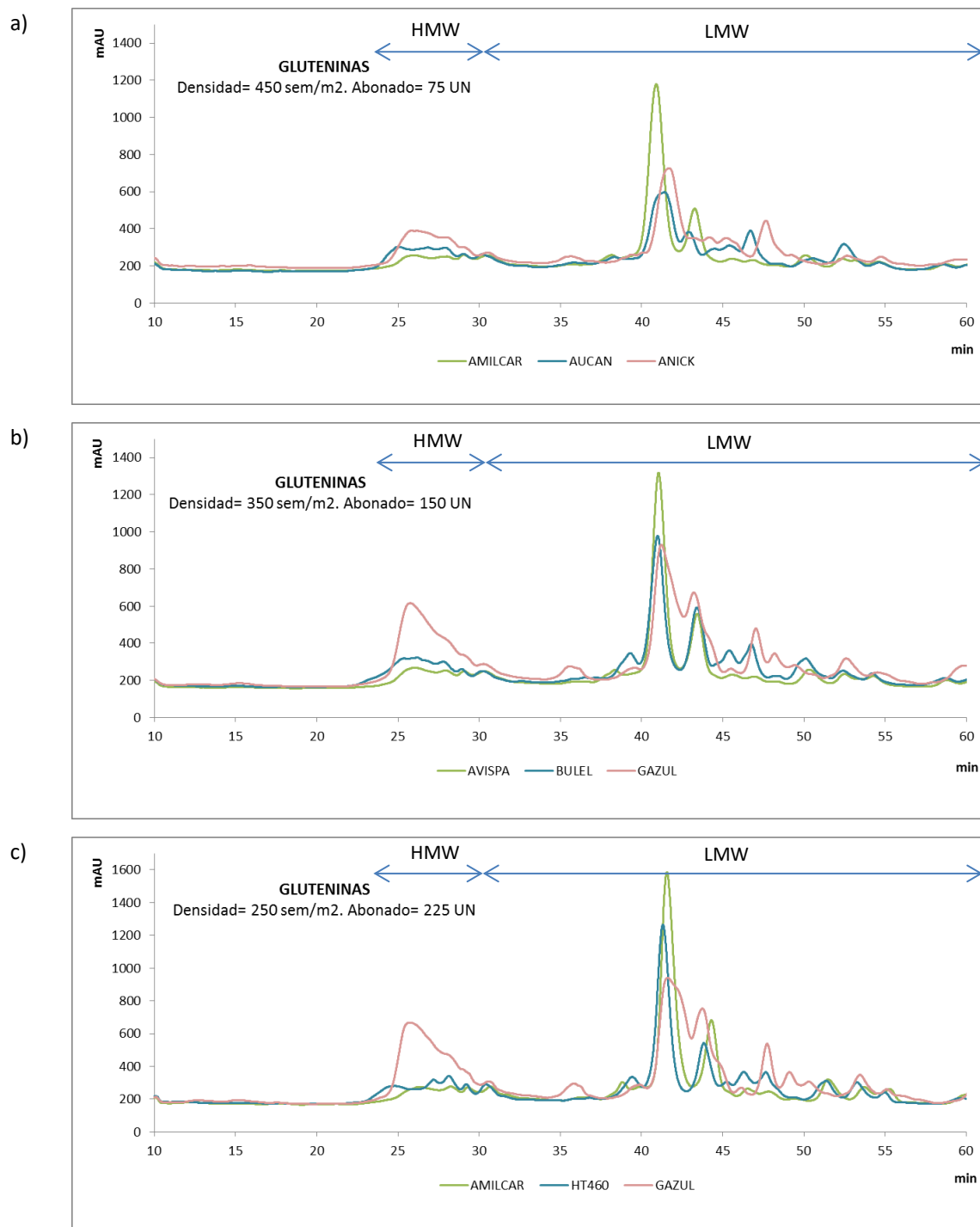


Figura 2. Cromatogramas de la fracción de gluteninas analizadas por RP-HPLC. En el eje de abscisas se representa el tiempo de retención (minutos) y en el eje de ordenadas se representan las unidades de absorbancia (mili unidades de absorbancia). Se observa en verde un trigo duro (Amilcar), en azul un tritordeum (HT460) y en rosa se observa un trigo harinero (Gazul). a) muestras sembradas a 450 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 75 UN, b) muestras sembradas a 350 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 150 UN y c) muestras sembradas a 250 semillas/m<sup>2</sup> de densidad y con un abonado nitrogenado de 225 UN.



## 4.2. Resultados del análisis MANOVA

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para el análisis multivariante (MANOVA). En ella podemos observar la significación de cada uno de los factores estudiados en todos los efectos, en la interacción dos a dos de dichos efectos y en las triples interacciones. Cabe destacar que el efecto del nitrógeno fue significativo para todos los factores. La densidad de siembra, sin embargo, afecta significativamente al contenido de almidón, a la relación gli/glu y en menor medida al contenido de proteínas no pertenecientes al gluten, pero el efecto en el resto de factores no resulta significativo. En cuanto al efecto del genotipo (trigo duro, trigo harinero y tritordeum), es significativo para todos los factores, excepto para el contenido total de gliadinas y el contenido de prolaminas. En el efecto de la variedad vemos efecto significativo en el rendimiento, el contenido de proteína, contenido de almidón, la cantidad de gluteninas y a la relación gli/glu.

Con respecto a las interacciones vemos significación en el factor rendimiento, en el factor almidón y en el factor relación gli/glu. Para el factor rendimiento es significativa la interacción densidad\*genotipo ( $D \times G$ ), la interacción nitrógeno\*genotipo ( $N \times G$ ) y la interacción nitrógeno\*variedad ( $N \times V$ ). Para el factor almidón sólo es significativa la interacción densidad\*variedad ( $D \times V$ ). Para el factor relación gli/glu se observa efecto significativo de la triple interacción densidad\*nitrógeno\*variedad ( $D \times N \times V$ ).

Tabla 2. Significaciones estadísticas para el análisis multivariante (MANOVA) de los efectos nitrógeno, densidad, genotipo, variedad e interacciones para cada uno de los factores estudiados. . , ( $P < 0,01$ ); \* , ( $P < 0,05$ ); \*\*, ( $P < 0,01$ ); \*\*\*, ( $P < 0,001$ ).

	kg/ha	Proteína	Almidón	Gliadinas	Gluteninas	Prolaminas	Proteínas no gluten	Relación gli/glu
<b>Nitrógeno</b>	0.0002 ***	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0148 *	0.0000 ***	0.0000 ***	0.0001 ***	0.0325 *
<b>Densidad</b>	0.1584	0.1341	0.0005 ***	0.1734	0.1256	0.4077	0.0328 *	0.0011 **
<b>Genotipo</b>	0.0000 ***	0.0004 ***	0.0000 ***	0.1090	0.0000 ***	0.0933 .	0.0137 *	0.0000 ***
<b>Variedad</b>	0.0017 **	0.0142 *	0.0004 ***	0.1303	0.0000 ***	0.3706	0.7852	0.0000 ***
<b>D*N</b>	0.2569	0.9805	0.0601 .	0.8802	0.7059	0.8259	0.7463	0.1878
<b>D*G</b>	0.0439 *	0.6710	0.9782	0.3393	0.3607	0.3101	0.3983	0.6081
<b>N*G</b>	0.0030 **	0.9987	0.0713.	0.7846	0.1887	0.5914	0.4570	0.6196
<b>D*V</b>	0.1208	0.8873	0.0417*	0.5685	0.8303	0.6760	0.3564	0.9584
<b>N*V</b>	0.0433 *	0.3229	0.5010	0.5491	0.2468	0.4504	0.8774	0.9395
<b>D*N*G</b>	0.6428	0.9070	0.6423	0.2804	0.8344	0.3452	0.2889	0.1802
<b>D*N*V</b>	0.8382	0.8615	0.4352	0.0786 .	0.8677	0.1815	0.0661 .	0.0139 *

#### 4.3. Representación de los efectos significativos.

Para el factor rendimiento (kg/ha) ha resultado significativo el efecto del nitrógeno, del genotipo y de la variedad (Figura 3), y no tiene efecto significativo de la densidad de siembra. Hay diferencias significativas en las distintas aplicaciones de nitrógeno obteniendo el mayor rendimiento cuando aplicamos un tratamiento medio de 150 UN. Los mayores rendimientos se tienen en trigo duro, rendimientos intermedios para trigo harinero y menores rendimientos en tritordeum. Dentro de las líneas de tritordeum los peores resultados obtenidos son de la línea Bulel, mientras que no se observaron diferencias significativas entre las otras cuatro variedades de tritordeum, con rendimientos similares.

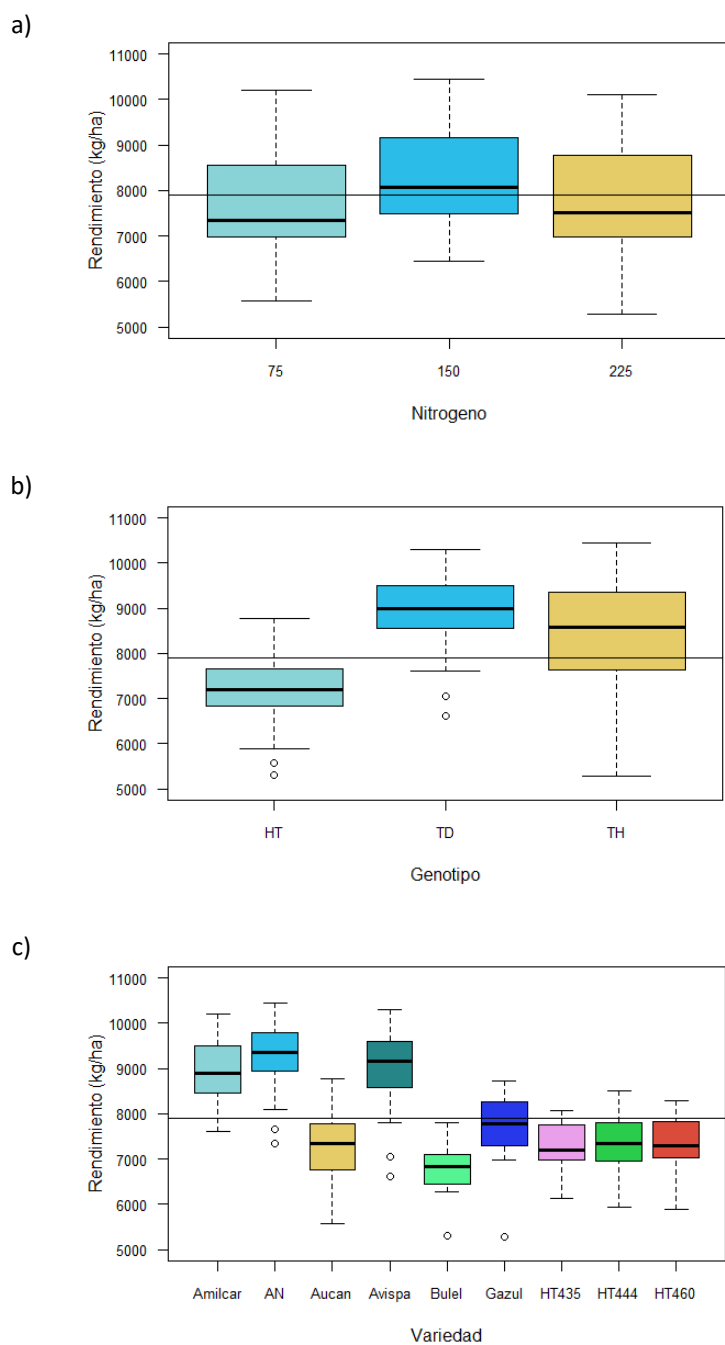


Figura 3. Efecto del a) nitrógeno, b) genotipo, y c) variedad sobre el rendimiento (kg/ha). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

Para el contenido de proteína (PS%) se observan efectos significativos del nitrógeno, genotipo y variedad (Figura 4). No existe efecto significativo de la densidad de siembra. Con respecto al efecto de la dosis de nitrógeno, se obtienen mayores

valores de proteína a dosis altas y disminuye a medida que bajamos la dosis de fertilización. En cuanto al genotipo, los mayores contenidos en proteína obtienen en tritordeum, de los cuales la línea HT435 presenta los valores más elevados de proteína, seguidos de Aucan y Bulel. En todas las variedades se observa una gran variabilidad para el contenido en proteína.

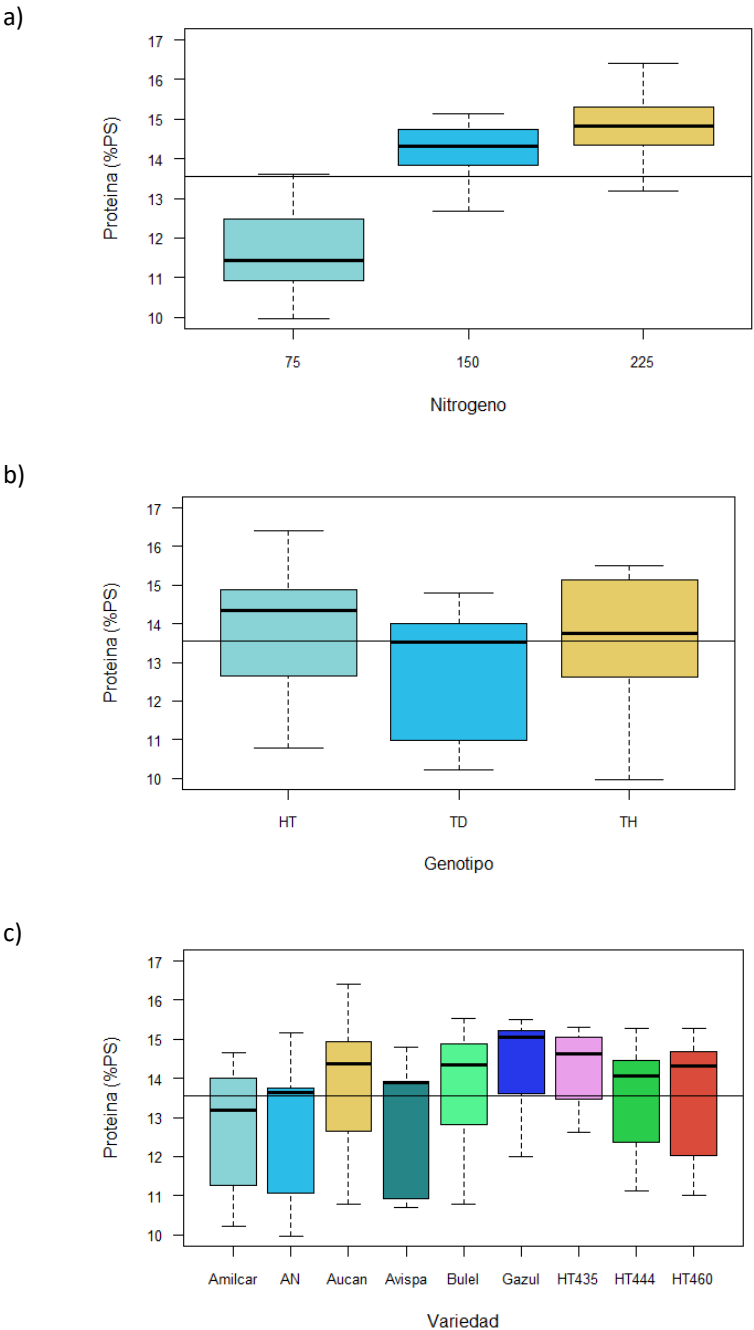


Figura 4. Efecto del a) nitrógeno, b) genotipo, y c) variedad sobre el contenido en Proteína (PS%). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

En la Figura 5 se observa que el contenido de almidón (PS%) se ve afectado significativamente por todos los factores objeto de estudio. El mayor contenido de almidón se obtiene a baja densidad de siembra (250 semillas/m<sup>2</sup> y con dosis baja de nitrógeno (75 UN); a medida que aumentamos tanto la densidad como la dosis de nitrógeno descende el contenido de almidón. Con respecto al efecto del genotipo, observamos que los valores más elevados de almidón en grano corresponden a trigo duro; en tritordeum se dan los valores más bajos, siendo la variedad HT444 el que muestra los valores más elevados, mientras que la variedad HT435 los menores contenidos en almidón.

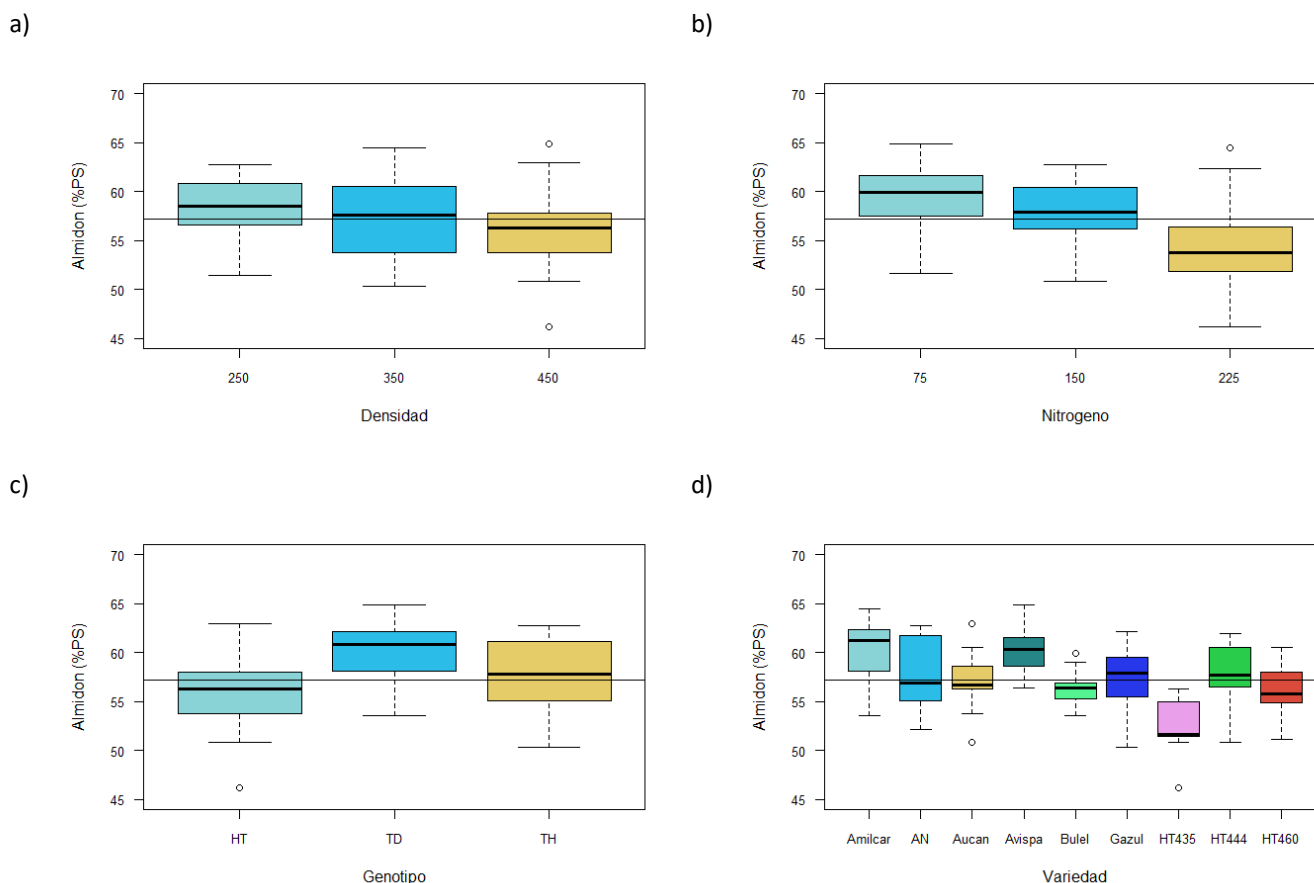


Figura 5. Efecto de la a) densidad de siembra, b) la dosis de nitrógeno, c) el genotipo y d) la variedad sobre el contenido en almidón (PS%). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

En el caso del contenido total de gliadinas sólo se ha encontrado un efecto significativo para el nitrógeno, obteniendo los valores más elevados para una dosis

media de 150 UN, seguido de dosis alta y los valores más bajos para una dosis baja de nitrógeno (Figura 6).

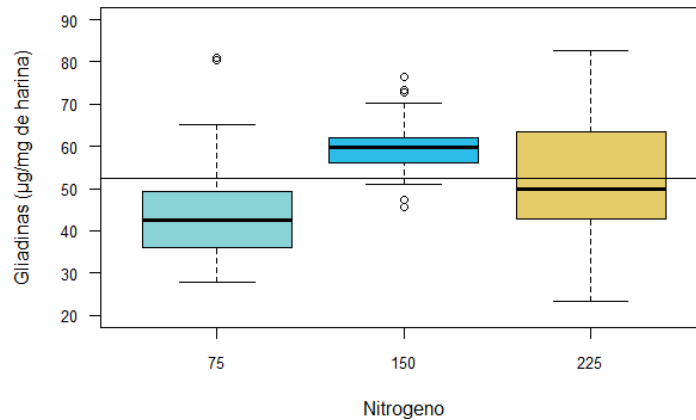
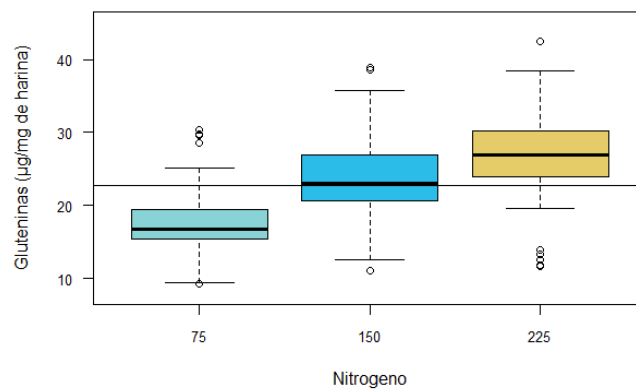


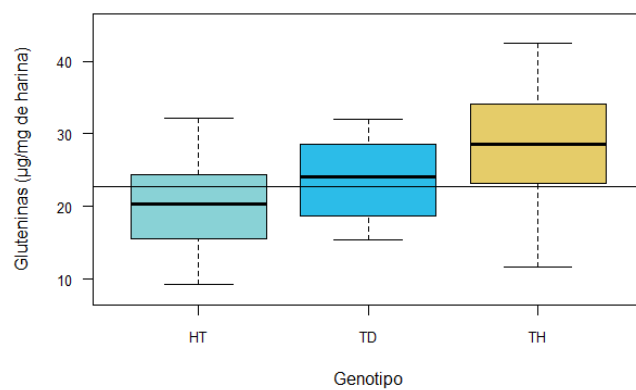
Figura 6. Efecto de la dosis de abonado con nitrógeno sobre el contenido de gliadinas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de harina). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos

Por el contrario, para el contenido de gluteninas se observa un efecto significativo de la dosis de nitrógeno, del genotipo y de la variedad. El mayor contenido de gluteninas se obtiene a alta dosis de nitrógeno (225 UN), y disminuye a medida que disminuye la dosis. Con respecto al efecto del genotipo, observamos que los valores más altos de gluteninas se obtienen en trigo harinero, seguido de trigo duro y tritordeum en último lugar, con los valores más bajos. La variedad de tritordeum con valor más bajo para las gluteninas fue HT435. Por su parte, Gazul es la variedad con los valores significativamente más elevados de gluteninas.

a)



b)



c)

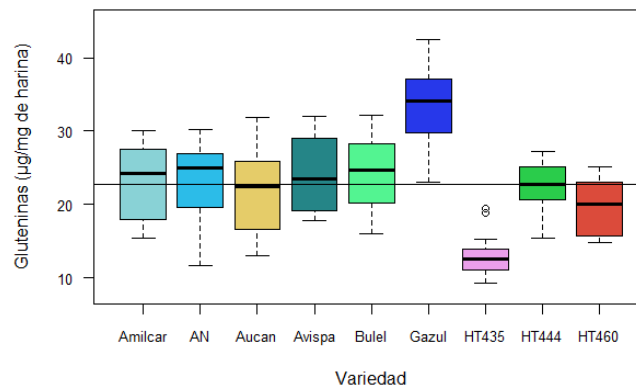


Figura 7. Efecto de la a) dosis de nitrógeno, b) el genotipo y c) la variedad sobre el contenido de gluteninas ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de harina). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

Para el contenido total de prolaminas o contenido de gluten sólo hay un efecto significativo para la dosis de nitrógeno (Figura 8). Los mayores valores se consiguen para dosis medias y dosis altas casi en igual medida y los valores más bajos de prolaminas se obtienen a dosis bajas de nitrógeno (75 UN).

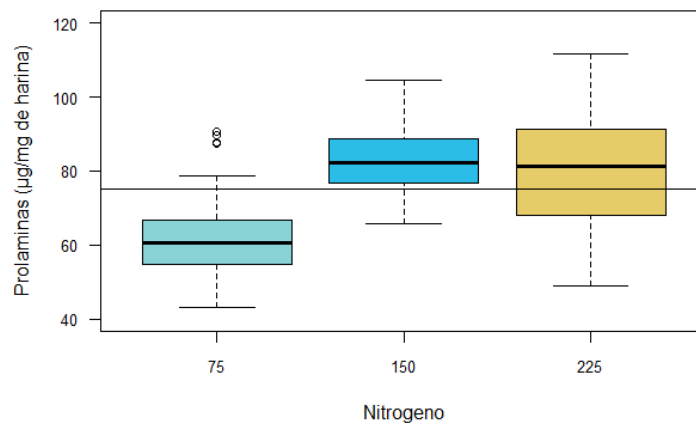


Figura 8. Efecto de la dosis de nitrógeno sobre el contenido de prolaminas ( $\mu\text{l}/\text{mg}$  de harina). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos.

En la Figura 9 se muestran los resultados para las proteínas no pertenecientes al gluten. Como se muestra, hay efectos significativos para la densidad de siembra, la dosis de fertilización nitrogenada y el genotipo. A baja densidad de siembra mayor contenido de proteínas no pertenecientes al gluten, que disminuye a medida que incrementamos la densidad de siembra. Para la dosis de nitrógeno se consiguen mayores valores a dosis altas (225 UN). Con respecto al genotipo se obtienen valores más altos en tritordeum, seguido de trigo duro y trigo harinero en último lugar.



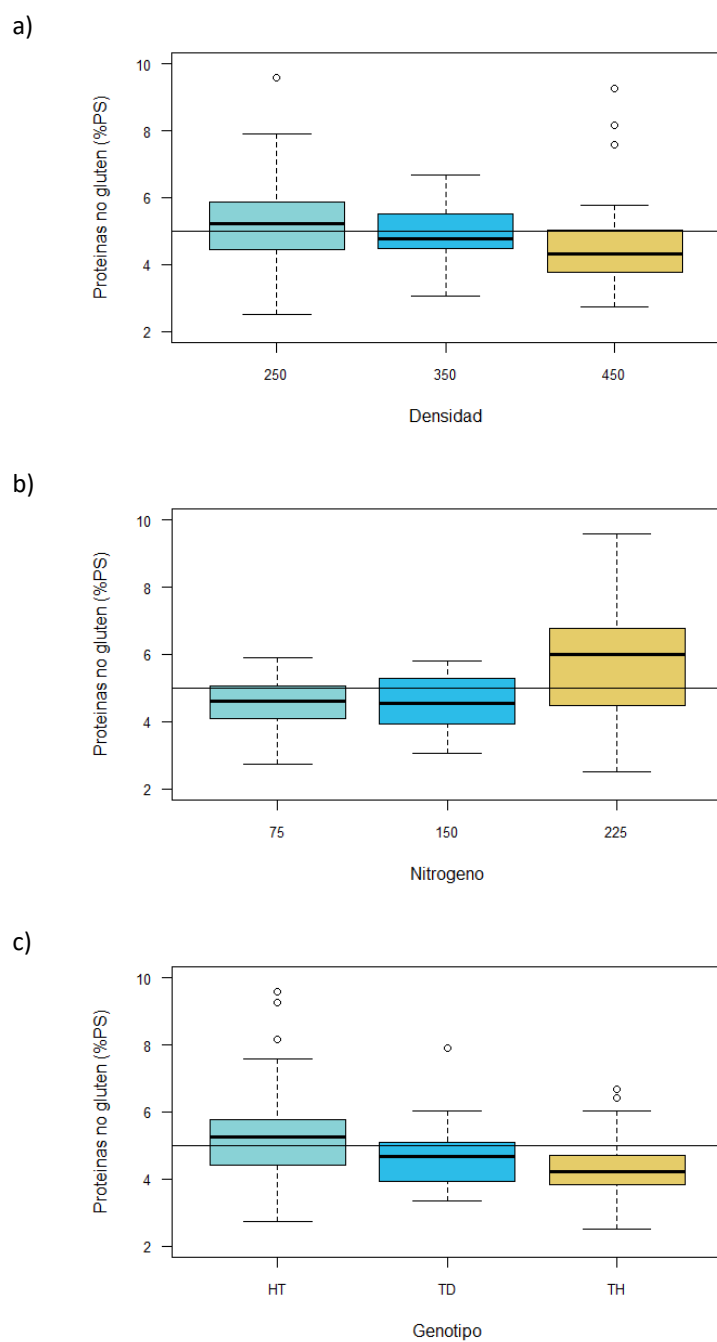


Figura 9. Efecto de a) la densidad de siembra, b) la dosis de nitrógeno y c) genotipo sobre el contenido de proteínas no pertenecientes al gluten ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de harina). La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero.

Para la relación gli/glu (Figura 10) se observa efecto significativo de la densidad de siembra, de la fertilización con nitrógeno, del genotipo y de la variedad. Nos interesan valores bajos, éstos se consiguen a densidad de siembra baja (250 semillas/m<sup>2</sup>) y van aumentando a medida que se incrementa la densidad de siembra. Para la fertilización con nitrógeno se consiguen menores valores a dosis alta (225 UN). Con respecto al genotipo, los trigos harineros muestra los valores mas bajos, siendo Gazul la variedad de harinero que muestra el valor más bajo. Le sigue trigo duro con valores intermedios y con los valores más altos tenemos el genotipo de tritordeum. Dentro de las variedades de tritordeum; Aucan, Bulel, HT444 y HT460 muestran valores muy parecidos a los controles, pero la variedad HT435 tiene valores muy por encima del valor medio.

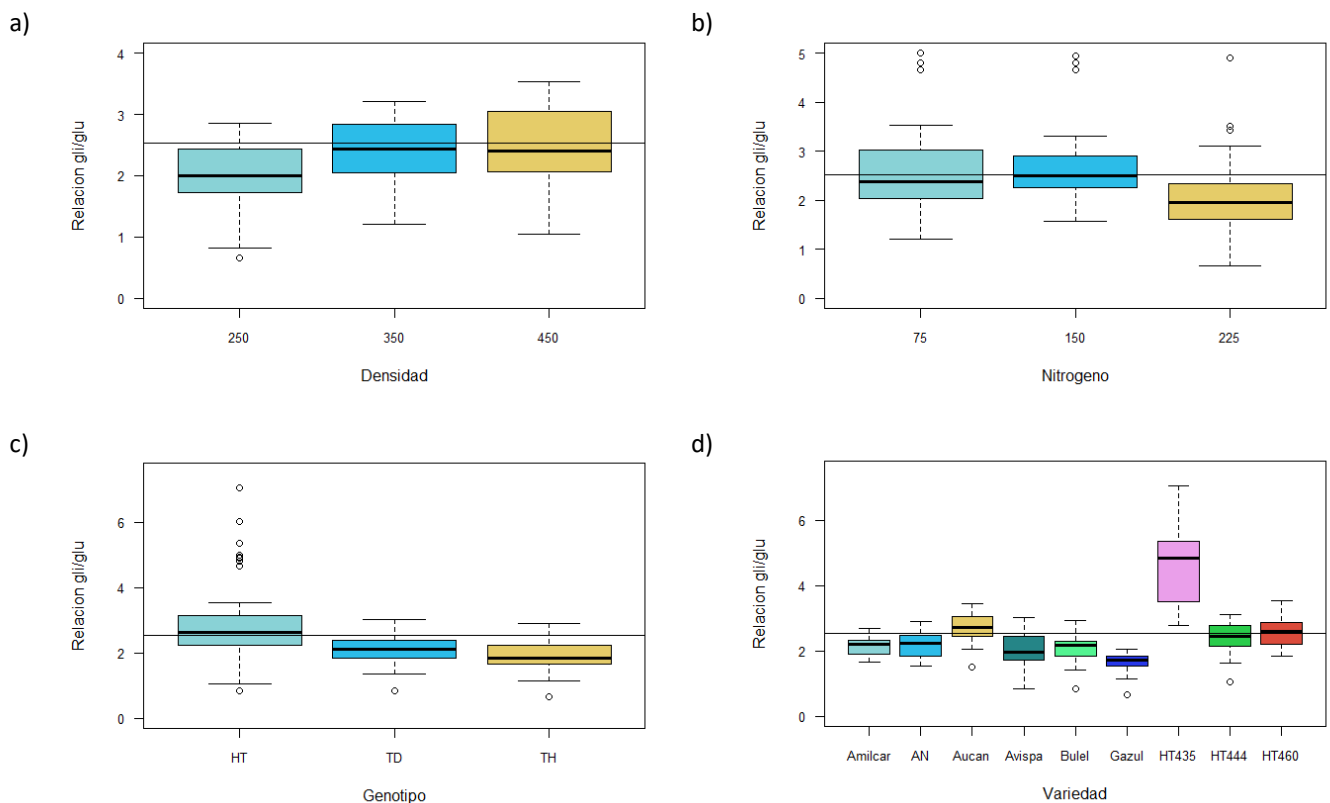


Figura 10. Efecto de a) la densidad de siembra, b) la dosis de nitrógeno, c) el genotipo y d) la variedad sobre la relación gli/glu. La línea horizontal representa el valor medio del conjunto de datos. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

#### 4.4. Representación de interacciones significativas

Según el análisis multivariante MANOVA no existe interacción significativa entre la densidad de siembra y la fertilización nitrogenada para ninguna de las variables objeto de estudio. Sin embargo, otras interacciones si tienen efectos significativos según el análisis multivariante MANOVA, a continuación se representan dichas interacciones.

El efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento del grano depende del genotipo estudiado. De esta manera los mejores rendimientos fueron para trigo duro (TD), obteniendo el mayor rendimiento para una densidad de siembra media (350 semillas/m<sup>2</sup>) seguido de densidad baja (250 semillas/m<sup>2</sup>) y los rendimientos más bajos los encontramos a densidad de siembra alta (450 semillas/m<sup>2</sup>). Por su parte, el trigo harinero (TH) incrementa el rendimiento a medida que aumenta la densidad de siembra. Por ultimo, el tritordeum (HT) obtiene los valores de rendimiento más bajos, obteniendo valores similares a densidades de siembra medias y altas, y mostrando los valores mas bajos de rendimiento a densidad de siembra baja (Figura 11.a).

Con respecto al efecto del nitrógeno sobre el rendimiento, hemos encontrado efectos significativos tanto del genotipo como de la variedad. En dosis bajas de nitrógeno, es el trigo harinero (TH) el que ofrece los rendimientos más elevados, seguido muy de cerca por el trigo duro (TD) y, finalmente el tritordeum (HT) con los valores mas bajos. La misma tendencia se observa tanto para dosis de nitrógeno intermedias como altas, siendo el trigo duro el que ofrece mayores rendimientos, seguido de trigo harinero y en ultimo lugar el tritordeum (Figura 11.b). Con respecto a las variedades, hay que destacar Arthur Nick (TH) como la variedad más productiva y Bulel (HT) como la menos productiva, a fertilizaciones bajas e intermedias. En fertilizaciones altas, destaca Amilcar (TD) ofreciendo rendimientos más elevados y Bulel (HT) obtiene los rendimientos mas bajos. La tendencia general es que la mayoría de las líneas ofrecen los mayores rendimientos en aplicaciones intermedias de nitrógeno (150 UN), excepto Gazul, que tiene mayores rendimientos a una fertilización

baja (75 UN), y Avispa (TD) que obtiene los mayores rendimientos a una fertilización alta (225 UN) (Figura 11.c)

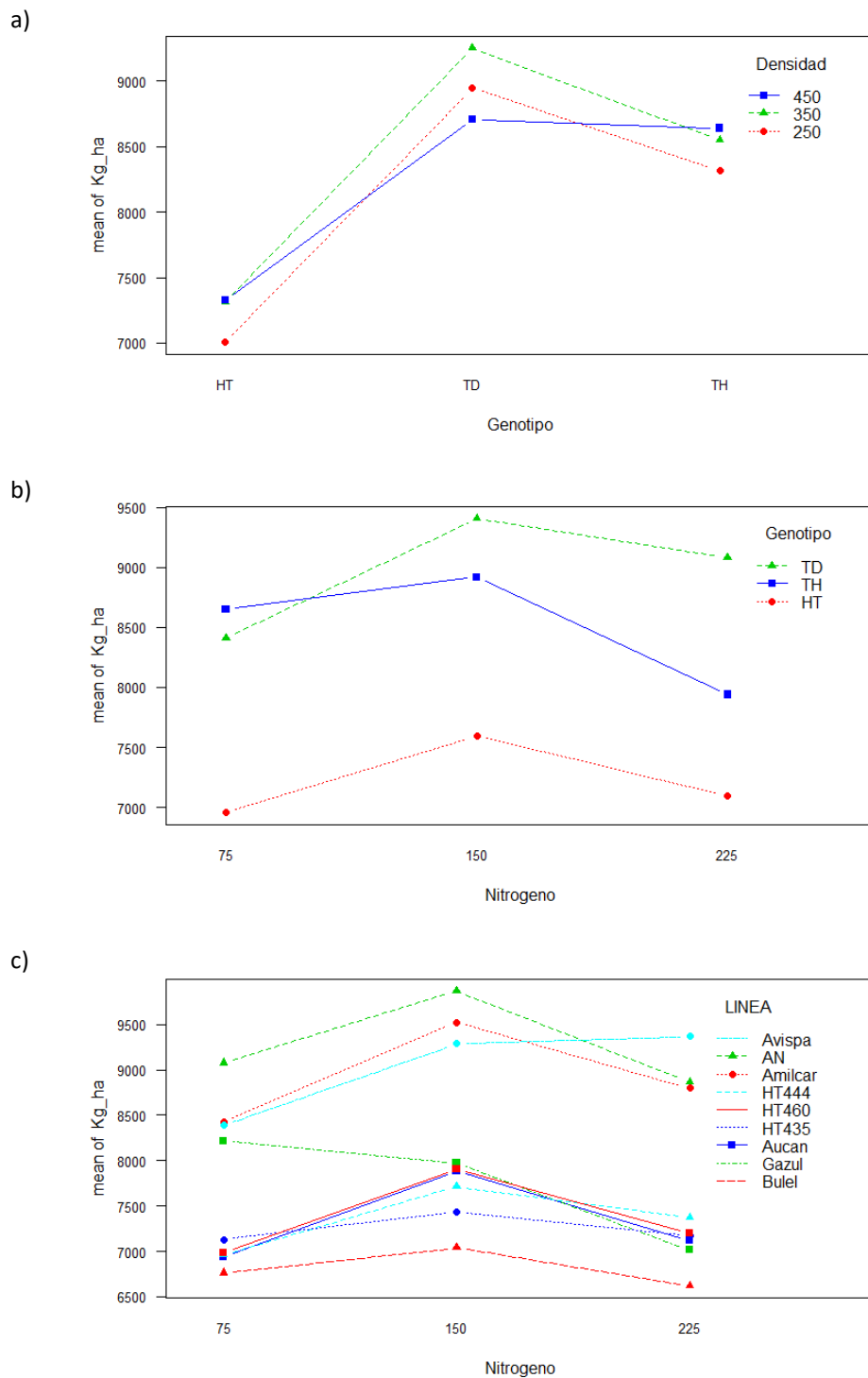


Figura 11. Interacciones significativas para el rendimiento (kg/ha) a) Interacción Densidad de siembra\* Genotipo. b) Interacción Nitrógeno\* Genotipo. c) Interacción Nitrógeno\* Variedad. HT, tritordeum; TD, trigo duro; TH, trigo harinero; AN, Arthur Nick.

El efecto de la densidad de siembra sobre el contenido de almidón del grano (%PS) depende significativamente de la variedad. A densidades bajas la tendencia que se observa es que los trigos harineros tienen mayor contenido en almidón, seguido de los trigos duros y el último lugar para las variedades de tritordeum. A densidades medias algunas variedades tienden a bajar el valor de uno a dos puntos, excepto Amilcar, HT444, Aucan y Bulel que lo aumentan. Se producen cambios más destacables a densidades altas, en este caso Amilcar, la variedad con los valores más altos a densidades de siembra media y baja, baja su valor seis puntos, y por el contrario Avispa aumenta su valor tres puntos respecto a la densidad de siembra media. Es de destacar HT435, que obtiene valores muy bajos para el contenido en almidón a densidades de siembra altas. Finalmente, el resto de variedades mantienen los valores de almidón, en cierta medida, respecto a la densidad de siembra media (Figura 12).

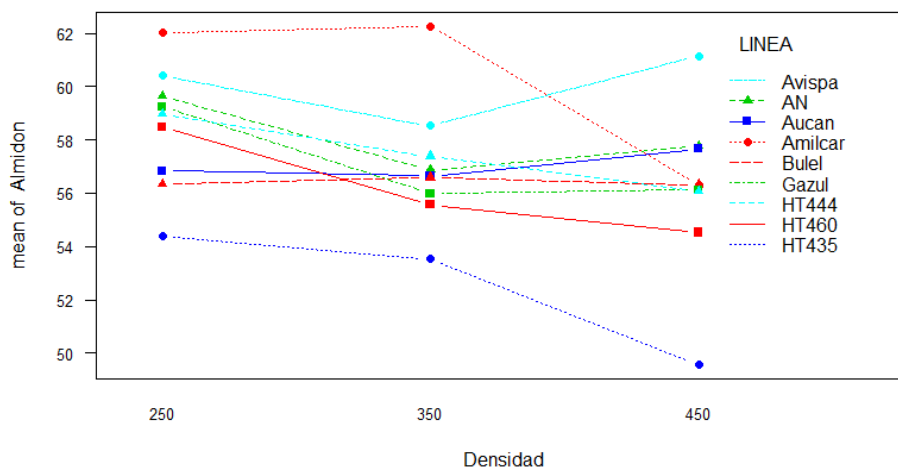


Figura 12. Interacción Densidad de siembra\* Variedad para el contenido en Almidón (PS%)

#### 4.5. Análisis para el genotipo de tritordeum

Hemos realizado una representación gráfica en la que combinamos los niveles de densidad de siembra y los niveles de fertilización nitrógenada con las variedades del genotipo de tritordeum (HT) de los parámetros rendimiento, contenido de proteína y relación gli/glu. Consideramos que estos parámetros son los más importantes para

llevar a cabo una optimización de este cultivo para buscar un buen rendimiento y una buena calidad.

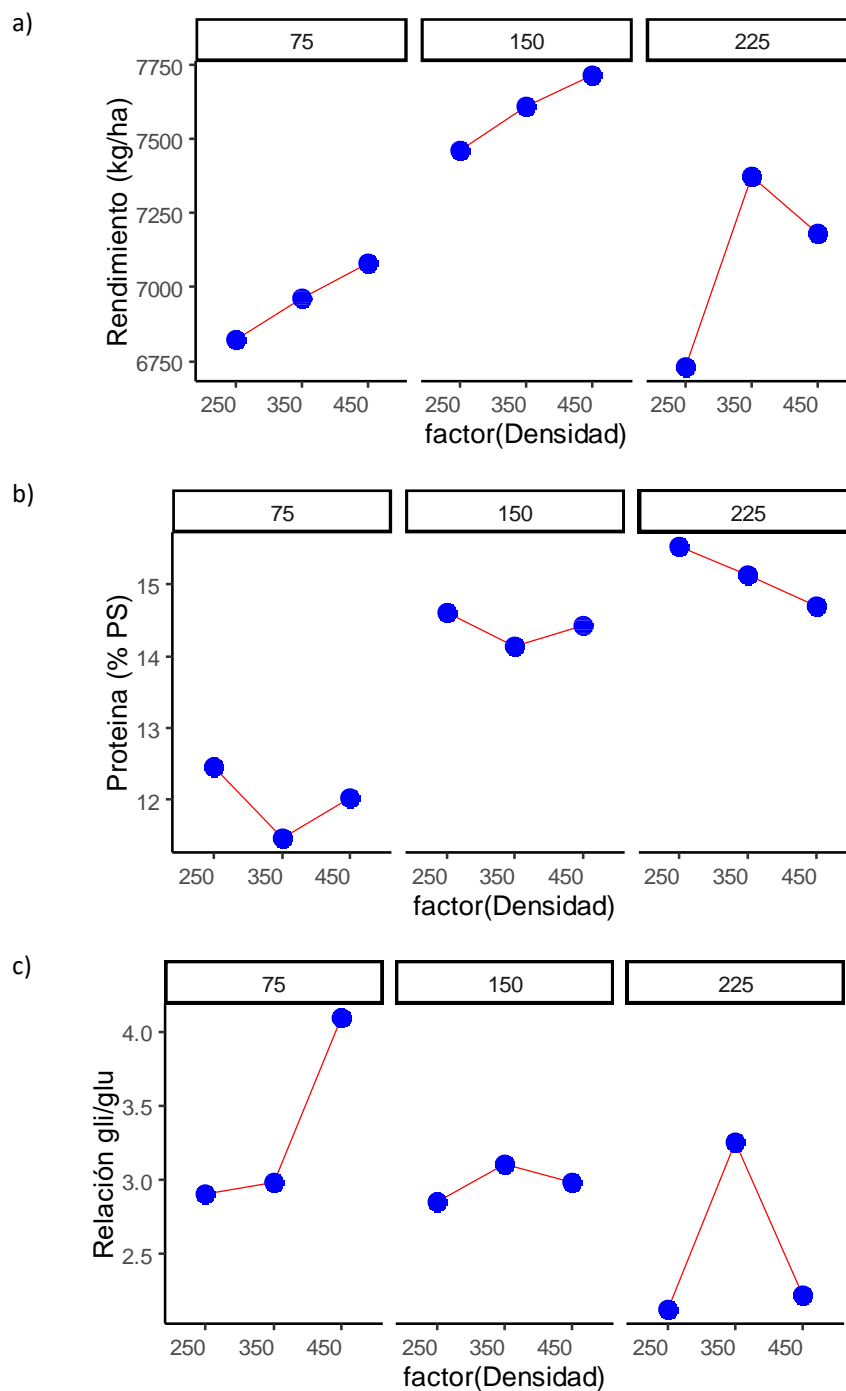


Figura 13. Gráfico que combina los niveles de densidad de siembra (250, 350 y 450 semillas/m² y los niveles de fertilización nitrogenada (75, 150 y 225 UN) para las variedades de tritordeum. Usamos como factor principal la densidad de siembra. a) Gráfico combinado para el parámetro rendimiento (kg/ha). b) Gráfico combinado para el parámetro cantidad de proteína (%PS). c) Gráfico combinado para el parámetro relación gli/glu.

Los valores máximos de rendimiento para las variedades de Tritordeum (Figura 13.a) se obtienen cuando aplicamos dosis medias de fertilizante (150 UN) y más concretamente si sembramos a densidad alta (450 semillas/m<sup>2</sup>), obteniendo valor muy por encima del resto. El menor rendimiento se obtiene a dosis altas de fertilizante (225 UN) y cuando sembramos a baja densidad (250 semillas/m<sup>2</sup>).

Con respecto al contenido de proteína en tritordeum (Figura 13.b), obtenemos los mejores resultados en la mayor dosis de nitrógeno (225 UN) y a densidad de siembra baja (250 semillas/m<sup>2</sup>). Los menores valores de proteína, se sitúan 3-4 puntos por debajo y se obtienen a dosis baja de nitrógeno (75 UN). Esto ocurre en todos los cereales. Con una fertilización intermedia (350 semillas /m<sup>2</sup>) los valores de proteína se mantienen estables en las densidades de siembra, situándose entre valores del 14-15%.

En cuanto a la relación gli/glu nos interesa tener valores bajos de este parámetro, lo más cercanos a uno. De esta manera estaremos consiguiendo bajo contenido en gliadinas (responsables de la enfermedad celiaca) y alto contenido en gluteninas (responsable de la calidad harino-panadera). Si miramos la relación gli/glu en las líneas de tritordeum (Figura 13.c) obtenemos los mejores valores a una fertilización alta (225 UN) y a densidad baja (250 semillas/m<sup>2</sup>) o alta (450 semillas/m<sup>2</sup>), a densidad media (350 semillas/m<sup>2</sup>) esta relación sube un punto. Los peores resultados de la relación gli/glu se consiguen a una fertilización baja (75 UN) y a densidad alta (450 semillas/m<sup>2</sup>). Con una fertilización intermedia (350 semillas /m<sup>2</sup>) los valores de gli/glu se mantienen en todas las densidades de siembra.

## 5. Discusión

En trigo, la calidad de panificación de una harina depende tanto de calidad como de la cantidad de las proteínas que se encuentren en su endospermo. La calidad de esas proteínas es un parámetro que está determinado genéticamente, no tanto así la cantidad de proteína, la cual se ve muy influenciada por factores ambientales. Algunos de los factores ambientales que tienen un impacto significativo en la cantidad de proteína son la dosis de fertilización con nitrógeno, la fuente de fertilizante nitrogenado, el momento de aplicación, la rotación de cultivos, la densidad de siembra, la frecuencia de precipitación y la temperatura durante la temporada de crecimiento.

En este trabajo se estudiaron los efectos de los factores dosis de fertilización nitrogenada y densidad de siembra sobre componentes del rendimiento y calidad harino panadera en tritordeum. Si hablamos de la dosis de fertilización nitrogenada, sabemos que un aumento de la cantidad de nitrógeno aumenta la cantidad total de proteína del grano, generando un aumento de la cantidad de gliadinas y gluteninas aunque la ratio va a depender mucho del genotipo considerado (Pechanek et al., 1997; Wieser y Seilmeier, 1998). Los resultados de nuestro estudio apoyan lo descrito anteriormente, ya que si miramos el factor contenido de proteína en el grano (Figura 4), se obtienen valores más elevados de proteína a dosis altas de nitrógeno y disminuye a medida que bajamos la dosis de fertilización nitrogenada para todos los genotipos, siendo el genotipo de tritordeum el que obtiene los valores de proteína más altos. En este sentido podemos confirmar que en tritordeum también se cumple esta hipótesis y que se comporta como los trigos comerciales. Hay que destacar que esta elevada cantidad de proteína en grano, ha sido desde su creación, una de las características distintivas del tritordeum (Martín et al., 1996). En concreto para las variedades de Tritordeum (Figura 13.b), si queremos conseguir el mayor contenido de proteína, deberemos abonar con dosis altas de fertilizante (225 UN), para alcanzar el máximo además sembraremos a baja densidad de siembra (250 semillas/m<sup>2</sup>).



Mantener un buen balance entre las distintas fracciones proteicas, gliadinas y gluteninas es fundamental, no solo para tener unas buenas propiedades harino-panaderas, sino también para reducir la incidencia de enfermedades relacionadas con el gluten. Las gliadinas, son la fracción proteica del gluten responsable, mayoritariamente, de la inmunogenicidad del gluten, ya que en dicho grupo de proteínas se localizan los epítomos responsables de la celiaquía en humanos (Arentz-Hansen et al., 2002). Por el contrario, la fracción de gluteninas han sido descritas como las principales responsables de la calidad harino-panadera de trigo (Payne, 1987; Fuertes-Mendizábal et al., 2010; Pechanek et al. (1997). Por tanto, un excelente balance entre gliadinas y gluteninas sería aquel donde reducimos el contenido en gliadinas e incrementamos el contenido en gluteninas.

Con respecto al contenido de gliadinas, observamos que los mayores incrementos en contenido de gliadinas se dan a dosis de nitrógeno medias (150 UN), seguido de dosis alta (225 UN) y obteniendo el valor más bajo a dosis bajas (75 UN) (Figura 6). Podemos afirmar que el contenido de gliadinas no está asociado a la dosis aplicada de fertilizante nitrogenado, aunque salga significativo. Estos resultados dan sentido a los resultados obtenidos por García-Molina y Barro (2017), en los que el contenido de gliadinas silenciadas no se ve afectadas por el contenido de nitrógeno. En contraposición tenemos los estudios de (Jia et al., 1996; Doekes y Wennekes, 1982; Gupta et al., 1992) en los que afirman que el aumento de la dosis de nitrógeno generalmente ocasiona un aumento del porcentaje de gliadinas, mientras que el contenido de gluteninas no se ve afectado. En nuestros resultados, el contenido de gluteninas (Figura 7) aumenta a medida que aumenta la dosis de nitrógeno (igual ocurre con las fracciones por separado: LMW y HMW), por lo tanto, tampoco coinciden con los resultados obtenidos por estos autores. Conseguiremos por tanto, la mejor calidad a dosis alta de fertilizante (225 UN) porque es cuando obtendremos más cantidad del contenido de gluteninas.

Para saber si tenemos un buen balance entre gliadinas y gluteninas, disponemos del parámetro relación gli/glu (Figura 10). En nuestros resultados existe efecto significativo de este parámetro con la fertilización nitrogenada a diferencia de los datos obtenidos en el estudio que realizaron Johansson et al. (2001) con variedades de trigo de primavera donde este ratio no se vio afectado por el aumento de la dosis de nitrógeno. También vemos efecto significativo del genotipo, esto coincide con los resultados obtenidos por Scheromm et al. (1992) que mostraron un aumento dependiente de la variedad tanto de las gluteninas como de las gliadinas. Prieto et al. (1992) también observaron un efecto de la fertilización nitrogenada dependiente de la variedad en relación con este parámetro. A su vez, encontramos en nuestros resultados efecto significativo con la densidad de siembra y un efecto de la triple interacción densidad\*nitrógeno\*variedad, lo que indicaría que cada variedad se comporta de una manera diferente dependiendo de la densidad de siembra y de la fertilización nitrogenada. En concreto, para las variedades de Tritordeum (Figura 13.c), si queremos obtener valores bajos de este parámetro deberíamos abonar con dosis altas de fertilizante nitrogenado (225 UN) y con densidades de siembra de 250 o de 450 semillas/m<sup>2</sup>. La línea HT435, da valores muy altos de la relación gli/glu, por lo que no es una línea a seguir cuando pretendemos reducir el contenido en gliadinas.

Si miramos el contenido total de prolaminas en nuestro estudio (Figura 8), vemos que sus valores están relacionados con el contenido de gliadinas, mostrando a dosis media de nitrógeno (150 UN) sus valores más elevados, seguidos muy cerca por dosis alta y adquiriendo los menores valores de prolaminas a dosis bajas de nitrógeno. Podemos decir que para las variedades estudiadas en este trabajo existe una alta relación entre el contenido de prolaminas y el contenido total de gliadinas.

En el estudio que realizó Kadar et al. (2019) vieron que para el rendimiento fue más importante el genotipo que la fertilización con nitrógeno para cada uno de los años. No ocurre así en nuestro caso, donde el rendimiento si es significativo para la fertilización con nitrógeno, obteniendo los mayores rendimientos a dosis media de

aplicación de nitrógeno (150 UN) y bajando a dosis altas de fertilización (Figura 3), aunque nuestros datos son de una campaña. Con respecto al efecto del genotipo nuestros resultados si coinciden con los de Kadar et al. (2019), al igual que ellos, encontramos significación del genotipo con la fertilización nitrogenada, siendo el genotipo de trigo duro el que muestra mayor rendimiento, le sigue trigo harinero y con los rendimientos más bajos los tenemos en el genotipo de Tritordeum. Dentro de las variedades de Tritordeum (Figura 13.a), si queremos obtener los mejores rendimientos de nuestras variedades, debemos abonar con dosis medias de fertilizante (150 UN). Para conseguir máximos valores de rendimiento además sembraremos con una dosis alta de siembra (450 semillas/m<sup>2</sup>).

Estudios anteriores demuestran que la cantidad de proteínas no pertenecientes al gluten está muy poco influenciada con la aplicación de nitrógeno (Pechanek et al., 1997; Wieser y Seilmeier, 1998; Johansson et al, 2001). Estos resultados no coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo. En nuestros datos no apreciamos cambios entre dosis baja y media de fertilización, pero si hay un incremento significativo de este parámetro cuando aplicamos la dosis más alta (225 UN), por lo que el parámetro si está influenciado con la fertilización con nitrógeno. Para el caso de la densidad de siembra, no hay resultados anteriores concluyentes, y en nuestros resultados vemos que existe una correlación negativa del contenido de proteínas no pertenecientes al gluten a medida que aumenta la densidad de siembra (Figura 5).

En cuanto al factor densidad de siembra, Geleta et al. (2002) publicaron que la concentración de proteína en el grano disminuyó al aumentar la densidad de siembra. Sin embargo, en un trabajo posterior se ha visto que el contenido de proteína del grano está muy poco afectado por la densidad de siembra (Yan et al., 2008). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo, ya que nosotros observamos que no existe efecto significativo de la densidad de siembra sobre el contenido de proteína.

En nuestro estudio los únicos factores que se ven influenciados por la densidad de siembra son el contenido de almidón (Figura 3), el contenido de proteínas no pertenecientes al gluten (Figura 9) y la relación gli/glu (Figura 10). Almidón y proteínas no pertenecientes al gluten obtienen valores más elevados a densidades de siembra bajas y disminuyen a medida que aumentamos la densidad de siembra, mostrando por tanto una relación inversa con la densidad de siembra. El efecto inverso ocurre para la relación gli/glu.

Aunque en este trabajo no hemos encontrado interacción significativa entre los factores estudiados, no quiere decir que no la haya. A pesar de que la información disponible sobre el efecto de la interacción entre el nivel de fertilización nitrógeno y la densidad de siembra sobre la distribución de las fracciones de proteína y su relación con la calidad es escasa, encontramos el estudio realizado por Zhang et al. (2016) donde observaron una interacción entre ambos factores. Mostrando que el efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento y la calidad del grano dependieron de los niveles de fertilización nitrogenada. El estudio es realizado sobre un cultivar de trigo de invierno. Los niveles de densidad se asemejan a los utilizados en nuestro trabajo, sin embargo los niveles de fertilización difieren de los nuestros, ellos usan ausencia de fertilización y fertilización a 240 Kg N/ha (como dosis normal). En nuestro caso fijamos fertilización normal a 150 UN (lo que para ellos es fertilización normal para nosotros es alta). Las diferencias obtenidas en los resultados pueden deberse a diferencias del genotipo estudiado y a las diferencias de la fertilización nitrogenada.

## 6. Conclusiones

El presente trabajo ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El tritordeum, en relación a la densidad de siembra y la fertilización nitrogenada se comporta agrónomicamente como los trigos duros y los trigos harineros.
2. Las gluteninas, principales determinantes de la calidad harino-panadera, se incrementan con la fertilización nitrogenada y no se ven afectadas por la densidad de siembra. Concluimos que en tritordeum, conseguiremos mayores incrementos de calidad incrementando la dosis nitrogenada. Sin embargo, análisis adicionales de calidad, como análisis de extensibilidad, tenacidad y resistencia a la masa, serán necesarios para confirmar esta observación.
3. En este trabajo no se ha detectado una interacción significativa entre la fertilización nitrogenada y la densidad de siembra.
4. A la vista de nuestros resultados, para alcanzar el máximo de rendimiento en las variedades de tritordeum es necesario sembrar a una densidad de 450 semillas/m<sup>2</sup> y aplicar una dosis media de 150 UN.
5. Por el contrario, para aumentar el contenido de proteína en las variedades de tritordeum es necesario sembrar a una densidad de 250 semillas/m<sup>2</sup> y fertilizar con dosis alta de 225 UN.

## 7. Bibliografía

Alvarez, J. B., Ballesteros, J., Sillero, J. A., and Martin, L. M. (1992). Tritordeum- A new crop of potential importance in the food-industry. *Hereditas*, 116(1-2), 193-197.

Arentz-Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, O., Fleckenstein, B., Lundin, K. E. A., Jorgensen, T. J. D., et al. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803-809.

Atienza, S. G., Ballesteros, J., Martin, A., and Hornero-Mendez, D. (2007). Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (xTritordeum Ascherson et Graebner) and durum wheat accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4244-4251.

Cubero, J. I., Martin, A., Millan, T., Gomezcabrera, A., and Deharo, A. (1986). Tritordeum- A new allopolyploid of potential importance as a protein-source crop. *Crop Science*, 26(6), 1186-1190.

Daniel, C., and Triboi, 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.

Doekes, G. J., and Wennekes, L. M. J. (1982). Effect of nitrogen-fertilization on quantity and composition of wheat-flour protein. *Cereal Chemistry*, 59(4), 276-278.

Dolores Garcia-Molina, M., and Barro, F. (2017). Characterization of Changes in Gluten Proteins in Low-Gliadin Transgenic Wheat Lines in Response to Application of Different Nitrogen Regimes. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Dupont, F. M., Hurkman, W. J., Vensel, W. H., Tanaka, C., Kothari, K. M., Chung, O. K., et al. (2006). Protein accumulation and composition in wheat grains: Effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy*, 25(2), 96-107.

Ellis, R. H., Salahi, M., and Jones, S. A. (1999). Yield-density equations can be extended to quantify the effect of applied nitrogen and cultivar on wheat grain yield. *Annals of Applied Biology*, 134(3), 347-352.

Fuertes-Mendizabal, T., Aizpurua, A., Gonzalez-Moro, M. B., and Estavillo, J. M. (2010). Improving wheat breadmaking quality by splitting the N fertilizer rate. *European Journal of Agronomy*, 33(1), 52-61.

Geleta, B., Atak, M., Baenziger, P. S., Nelson, L. A., Baltenesperger, D. D., Eskridge, K. M., et al. (2002). Seeding rate and genotype effect on agronomic performance and end-use quality of winter wheat. *Crop Science*, 42(3), 827-832.

Gil-Humanes, J., Piston, F., Tollefsen, S., Sollid, L. M., and 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 of the United States of America*, 107(39), 17023-17028.

Giménez, M.J., and Barro F. (2013). Variedades de trigo aptas para celíacos. En Peña AS, Rodrigo L. editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience. p. 463-477.

Graybosch, R. A., Peterson, C. J., Shelton, D. R., and Baenziger, P. S. (1996). Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end-use quality. *Crop Science*, 36(2), 296-300.

Gupta, R. B., Batey, I. L., and Macritchie, F. (1992). Relationships between protein-properties of wheat flours. *Cereal Chemistry*, 69(2), 125-131.

Gyarmati G., 2017. On what factors the wheat production and price depends. *Management, Enterprise and Benchmarking in the 21st Century IV*:78-96.

Halvorson, A. D., Black, A. L., Krupinsky, J. M., Merrill, S. D., Wienhold, B. J., and Tanaka, D. L. (2000). Spring wheat response to tillage and nitrogen fertilization in rotation with sunflower and winter wheat. *Agronomy Journal*, 92(1), 136-144.

Huebner, F. R., Nelsen, T. C., Chung, O. K., and Bietz, J. A. (1997). Protein distributions among hard red winter wheat varieties as related to environment and baking quality. *Cereal Chemistry*, 74(2), 123-128.

Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Vensel, W. H., Thilmony, R., and Altenbach, S. B. (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.

Ihaka R., and Gentleman R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.* 5, 299-314.

Jarecki, W., Buczek, J., and Bobrecka-Jamro, D. (2017). Response of spring wheat to different soil and foliar fertilization. *Journal of Central European Agriculture*, 18(2), 460-476.

Jia, Y. Q., Masbou, V., Aussenac, T., Fabre, J. L., and 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.

Johansson, E., Prieto-Linde, M. L., and Jonsson, J. O. (2001). Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chemistry*, 78(1), 19-25.

Kadar, R., Muntean, L., Racz, I., Ona, A. D., Ceclan, A., and Hiriscau, D. (2019). The Effect of Genotype, Climatic Conditions and Nitrogen Fertilization on Yield and Grain Protein Content of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 515-521.

Kaerner E., and Kaerner M. (1999). The influence of nitrogen fertilizer and preceding crop on the gluten content of spring wheat. *Agris* 6, 59-62.

Karamanos, R. E., Flore, N. A., and Harapiak, J. T. (2005). Effect of post-emergence nitrogen application on the yield and protein content of wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(2), 327-342.

Levy, A. A., Galili, G., and Feldman, M. (1985). The effect of additions of *Aegilops longissima* chromosomes on grain protein common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 69(4), 429-435.



Martin, A., Alvarez, J. B., Martin, L. M., Barro, F., and Ballesteros, J. (1999). The development of tritordeum: A novel cereal for food processing. *Journal of Cereal Science*, 30(2), 85-95.

Martin, A., MartinezAraque, C., Rubiales, D., and Ballesteros, J. (1996). Tritordeum: Triticale's new brother cereal (Vol. 5).

McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W., Fox, G., and Manley, M. (2011). A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1155-1165.

Mellado-Ortega, E., and Hornero-Mendez, D. (2012). Isolation and identification of lutein esters, including their regioisomers, in tritordeum (x Tritordeum Ascherson et Graebner) grains: Evidence for a preferential xanthophyll acyltransferase activity. *Food Chemistry*, 135(3), 1344-1352.

Nakano, H., and Morita, S. (2009). Effects of Seeding Rate and Nitrogen Application Rate on Grain Yield and Protein Content of the Bread Wheat Cultivar 'Minaminokaori' in Southwestern Japan. *Plant Production Science*, 12(1), 109-115.

Navas-Lopez, J. F., Ostos-Garrido, F. J., Castillo, A., Martin, A., Gimenez, M. J., and Piston, F. (2014). Phenolic content variability and its chromosome location in tritordeum. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Payne, P. I., Nightingale, M. A., Krattiger, A. F., and 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., Groger, S., Charvat, B., Schoggl, G., and 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.

Piston, F., Gil-Humanes, J., Rodriguez-Quijano, M., and Barro, F. (2011). Down-Regulating gamma-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).

Prieto, J. A., Kelfkens, M., Weegels, P. L., and Hamer, R. J. (1992). Variations in the gliadin pattern of flour and isolated gluten on nitrogen application- implications for baking potential and rheological properties. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 194(4), 337-343.

Rawluk, C. D. L., Racz, G. J., and Grant, C. A. (2000). Uptake of foliar or soil application of N-15-labelled urea solution at anthesis and its affect on wheat grain yield and protein. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(2), 331-334.

Shewry, P. R., D'ovidio, R., Lafiandra, D., Jenkins, J. A., Clare Mills, E. N., and Békés, F. (2009). "Wheat grain proteins," in *WHEAT: Chemistry and Technology*, eds K. Khan and P. R. Shewry (St Paul, MN: American Association of Cereal Chemist), 223–298.

Shewry, P. R., and 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., and Halford, N. G. (2001). Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 105-111.

Triboi, E., Abad, A., Michelena, A., Lloveras, J., Ollier, J. L., and 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.

Triboi, E., Martre, P., and 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.

Vaquero, L., Comino, I., Vivas, S., Rodriguez-Martin, L., Gimenez, M. J., Pastor, J., et al. (2018). Tritordeum: a novel cereal for food processing with good acceptability and significant reduction in gluten immunogenic peptides in comparison with wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2201-2209.

Wieser, H., and 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.

Woolfolk, C. W., Raun, W. R., Johnson, G. V., Thomason, W. E., Mullen, R. W., Wynn, K. J., et al. (2002). Influence of late-season foliar nitrogen applications on yield and grain nitrogen in winter wheat. *Agronomy Journal*, 94(3), 429-434.

Yan, C., Zhang, Y., Zhang, D., and Dang, J. (2008). Effects of sowing date and planting density on the grain's protein component and quality of strong and medium gluten winter wheat cultivars. *Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology*, 19(8), 1733-1740.

Zhang, Y., Dai, X., Jia, D., Li, H., Wang, Y., Li, C., et al. (2016). Effects of plant density on grain yield, protein size distribution, and breadmaking quality of winter wheat grown under two nitrogen fertilisation rates. *European Journal of Agronomy*, 73, 1-10.

Zhu, J., and Khan, K. (2001). Effects of genotype and environment on glutenin polymers and breadmaking quality. *Cereal Chemistry*, 78(2), 125-130.