

TRIGO

María Teresa Maya Caldeira

Doutora em Química Biológica, Gerente de
Tecnologia e Desenvolvimento
Moinhos Vera Cruz

Vitor Lopes de Abreu Lima

BSc Ciências Biológicas Depto. Bioquímica Médica
ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Homiko Abreu Seki

Escola Federal de Química CEFETEC

Franklin David Rumjanek

Ph.D., Professor Titular, Depto. Bioquímica Médica
ICB/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro
franklin@bioqmed.ufrj.br

Diversidade de trigos, tipificação de farinhas e genotipagem

Ilustrações: Caldeira *et al*

Uma das principais fontes de alimento do homem desde os tempos pré-históricos tem sido o trigo. O cultivo do trigo remonta à época dos primórdios da agricultura, há cerca de 10.000 anos, quando o homem troca sua característica nômade e extrativista por uma civilização sedentária e agrícola. O pão tem sido o alimento básico na história da civilização.

A farinha de trigo é o principal produto do trigo e é o ingrediente básico de vários produtos em diferentes culturas, tais como diversos tipos de pães específicos das diversas regiões do mundo, macarrão, biscoitos, bolos, cereais matinais, etc. Os produtos derivados do trigo estão altamente ligados à cultura dos povos, tendo assumido tanto um significado religioso como de importância econômica e nutricional (1).

Ainda que para o leigo ou observador casual todas as farinhas sejam iguais, a qualidade da farinha é bastante diferente entre uma que produzirá um pão daquela que produzirá um biscoito. A fonte dessa variabilidade está na matéria-prima básica - o trigo.

Os trigos de importância comercial - o trigo comum (*Triticum aestivum*), o tipo clube (*T. compactum*), e o trigo durum (*T. durum*) - são produtos da hibridização natural de seus ancestrais (2). Acredita-se que tenha havido pelo menos duas etapas na sua domesticação. Atribui-se à espécie *T. monococcum*, de genoma diplóide, a origem da espécie (3). Sua hibridização com *T. searsii* levou à origem da espécie *T. turgidum*, já com genoma tetraplóide, e precursor da espécie do

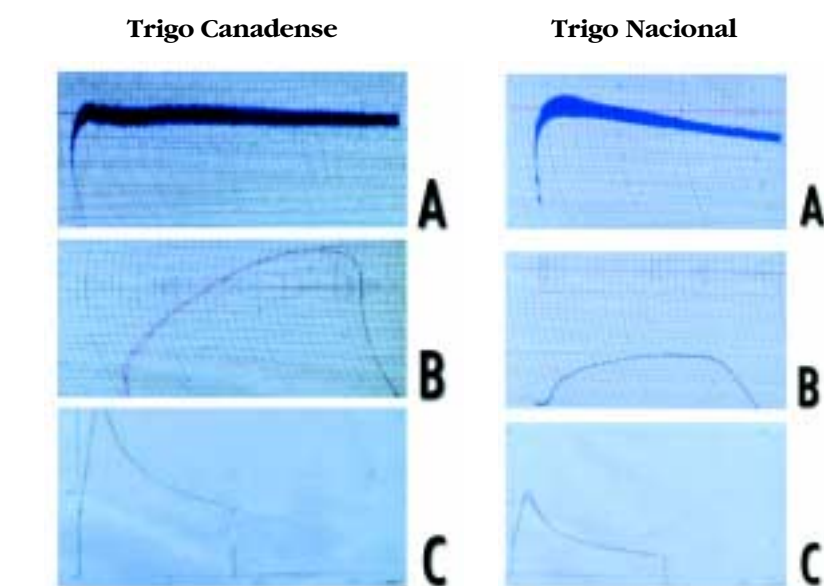


Figura 1 - Testes físicos realizados com as farinhas obtidas de trigos de cultivares diferentes.

A curva (a) mostra os resultados obtidos com o farinógrafo, a curva (b) com o extensógrafo e a curva (c) com o alveógrafo. Cada conjunto de 3 testes foi realizado com farinha de trigo canadense e de trigo nacional, respectivamente

trigo durum, cuja característica principal é a dureza do seu grão. É o trigo especialmente usado para produção de pastas, principalmente na Europa e nos EUA. A segunda hibridização da espécie *T. turgidum* com a espécie *T. tauschii*, gerou as espécies hexaplóides *T. aestivum*, espécie comercial mais cultivada e com características de qualidade bastante distintas entre seus diferentes cultivares, servindo à produção de uma ampla gama de produtos - pães, biscoitos, massas - e *T. compactum*, de características brandas, cuja farinha destina-se à produção de bolos e biscoitos (3).

A qualidade do trigo depende de

uma série de fatores, os dois principais seriam as condições ambientais e as características genéticas presentes nas sementes (4). Em virtude dessa ampla variação presente nos cultivares, não podemos discutir qualidade de farinha de trigo sem saber para que propósito servirá tal farinha. Existem grandes diferenças entre farinhas para pães e biscoitos e também para as farinhas usadas nos diferentes tipos de pães e diferentes tipos de biscoito (5). Tomando o pão como exemplo, a qualidade de uma farinha para pão de forma, não necessariamente irá ter a qualidade apropriada para pão francês.

Uma série de fatores contribui para as características de uma massa. Contudo, os grandes responsáveis pelas propriedades funcionais da massa, como veremos, são as proteínas do glúten (1). O glúten é composto por várias proteínas que podem ser visualizadas em eletroforese e apresentam um amplo espectro de peso molecular. Cada proteína é produto de, pelo menos, um gene, sem nenhuma evidência de modificações pós-translacionais, exceto a formação de pontes dissulfeto (1). As proteínas do glúten foram classificadas em dois grupos: gliadinas, prolaminas de baixo peso molecular ~30.000, pobres em cisteína; e gluteninas, polímeros de alto peso molecular, > 10exp6, estabilizados pelas pontes dissulfeto, resultantes da ligação dos resíduos de cisteína (1). Devido a essas características, essas duas frações têm um significado funcional, aonde as gluteninas são responsáveis pela elasticidade do glúten, enquanto as gliadinas pelas características de viscosidade.

As propriedades reológicas dos materiais envolvem as características físicas de plasticidade, viscosidade, elasticidade. A massa de farinha é considerada um material viscoelástico do ponto de vista físico (6) devido às propriedades apresentadas pelo glúten. Dessa forma, a massa, ao ser esticada, sofre uma deformação, que ao ser suprimido o agente causal, permite à massa que retorne parcialmente a sua forma inicial: propriedade elástica da massa. Ao mesmo tempo, quando a tensão é aplicada por um longo período, a propriedade de viscosidade ocorrerá, o que reduzirá a tensão, e na massa é o que observamos como o fenômeno do seu relaxamento (6).

Essas propriedades, refletidas na massa de farinha e água, são cruciais para determinar a qualidade da farinha. A retenção do dióxido de carbono produzido pela fermentação das leveduras no processo de panificação é resultado direto da propriedade viscoelástica do glúten; a elasticidade excessiva limita a expansão do glúten e, conseqüentemente, o volume do pão, enquanto a elasticidade insuficiente não permite a retenção do dióxido de carbono pela rede de glúten. O balanço preciso nas propriedades viscoelásticas (propriedades reológicas)

da massa é o fator essencial para determinação de seu uso. A presença de um glúten elástico é necessário tanto em farinhas de panificação, como nas destinadas à produção de pasta, enquanto que um glúten menos elástico é requerido em farinhas para bolo e biscoitos (7). Portanto, a natureza da qualidade da farinha está contida fortemente na qualidade do seu glúten.

A elasticidade é uma característica pouco usual das proteínas e não há outros exemplos de proteínas elásticas encontradas em plantas (1). Todas as proteínas do glúten contribuem para sua característica final. Contudo, estudos recentes mostram que um grupo de proteínas está particularmente envolvido com as propriedades de elasticidade. Essas proteínas são as subunidades de alto peso molecular da classe das gluteninas, encontradas em diferentes genótipos de trigo (1, 7). A maior elasticidade encontrada nesses genótipos pode ser correlacionada ao maior número dessas subunidades presentes nos polímeros de glutenina (8). Outra variação observada em trigo com diferentes qualidades de panificação, foi variações no número e/ou na estrutura dos alelos das subunidades de alto peso molecular (9) desses genótipos.

Dada a grande diversidade da qualidade das farinhas, os métodos para detectar essas diferenças e permitir a sua adequada utilização são vários. Os mais utilizados são os métodos realçados com as características físicas da massa, a partir de sistemas simples de misturas de água e farinha. Hoje existe uma série de instrumentos desenhados para medir as propriedades reológicas da massa, tais como o farinógrafo, o extensógrafo e o alveógrafo, entre outros.

O farinógrafo tem sido o mais frequente instrumento utilizado para a avaliação da qualidade e força da farinha, e, conseqüentemente, para a indicação de seu uso. O farinógrafo é um instrumento que mede a força da massa durante um trabalho prolongado, uma vez que esta tem um comportamento, do ponto de vista da física, de características viscoelásticas (6). Essencialmente, a massa oferece resistência ao trabalho das pás de uma masseira, o torque é transmitido a um dinamômetro, o qual está conectado a um sistema de escala, a uma pena

registradora, gerando finalmente, um gráfico (10). A curva farinográfica reflete basicamente três processos: absorção de água, desenvolvimento da massa e quebra da massa, intrinsecamente relacionados à qualidade da farinha (6). A absorção é obtida diretamente, pela quantidade de água adicionada a farinha. O desenvolvimento da massa é obtido ao se encontrar o ponto máximo alcançado pela curva ao ser atingida a linha arbitrária da 500 unidades, determinado pelo fabricante do equipamento. A quebra da massa é intrínseca a cada massa, mas o tempo que a curva da farinha permanece dentro da linha arbitrária das 500 unidades representa a estabilidade da farinha ao trabalho mecânico das pás da masseira e é um indicativo de sua força (10).

As características de elasticidade e extensibilidade (viscosidade) podem ser determinadas tanto pelo extensógrafo como pelo alveógrafo (11). O extensógrafo consiste de câmaras com temperatura controlada, onde a massa, previamente preparada sob condições próprias, é colocada para descansar por períodos de 45, 90 e 135 minutos, simulando o período de fermentação da massa. Ao final de cada intervalo de fermentação, a massa é submetida a um trabalho de extensão, realizada por um gancho que puxa a massa unidirecionalmente a partir de seu centro, a velocidade constante, e cujo sinal é transmitido a um registrador que desenha o gráfico. A partir desse gráfico é feita a avaliação, no qual são obtidos: 1) resistência da massa à sua extensão, 2) extensibilidade da massa e 3) força da massa (11).

Parâmetros similares são obtidos também pelo alveógrafo. Contudo, a resistência à expansão e a extensibilidade são obtidos ao se insuflar ar em um disco de massa, propriamente preparado, e observar o comportamento da bolha resultante até o seu rompimento. Neste caso, a deformação da massa é realizada de forma tridimensional. Todo o processo é registrado e a leitura do alveograma resultante revela os seguintes índices: 1) "P", ou a altura máxima alcançada pela curva, que representa a tenacidade da massa, ou seja, a resistência da massa a deformação, 2) A extensão da curva, "L", do início até seu rompimento, 3) a força da massa, obtida pela área da curva,

que representa a energia necessária à sua deformação (11).

É importante observar que a definição de uma farinha deve ser feita após a avaliação do conjunto desses testes. A fig.1 apresenta 3 tipos de curvas de 2 farinhas obtidas de trigos com características reológicas diferentes, isto é, com qualidades diferentes. Comparando os valores obtidos para os diferentes testes, podemos classificar o trigo como fraco e próprio para produção de biscoitos, ou como sendo forte e com uso indicado para produtos de panificação e pastificio.

Como podemos observar, a escolha apropriada de uma farinha para determinado produto não é muito simples e deve seguir controles rigorosos. Existem diversas etapas a serem alcançadas para que se possa conseguir a qualidade desejada para os diferentes produtos, desde a seleção dos grãos, que estão submetidos às variações de safras, ao processo intrínseco de moagem e as especificações próprias de cada produto que se deseja obter. Os testes devem ser realizados antes da moagem definitiva e, para tal, os laboratórios devem receber uma quantidade suficiente de amostras, 3 kg de amostra pelo menos. Outra questão importante é a calibração adequada dos equipamentos. Como são métodos empíricos, os testes devem ser realizados em condições extremamente adequadas para que se consigam resultados reprodutíveis em diferentes laboratórios.

Uma vez que as propriedades reológicas parecem estar associadas às características físico-químicas das proteínas majoritárias do trigo, as gliadinas e as gluteninas, deveria ser possível, então, investigar se existem variações nos genes que codificam essas proteínas e que justifiquem tais propriedades, ou fenótipo. Por variações, estamos nos referindo às diferenças entre as seqüências de nucleotídeos dos genes. É preciso lembrar também que as variações que permitem uma identificação genômica dos vários cultivares de trigo não estão restritas aos genes propriamente ditos. Existe uma grande região não codificadora do genoma que também está passível de apresentar as variações.

As variações aludidas poderiam ser investigadas de várias maneiras, uma das quais veremos adiante. Esse



Figura 2 - Amostras de sementes de trigo de cultivares diferentes. De cada amostra 10 sementes foram utilizadas para extração do DNA

tipo de abordagem procura determinar a “assinatura genômica” do trigo de interesse. Tal análise seria ainda mais informativa se os genes dessas proteínas e de outras regiões não codificadoras do genoma sofressem o que se denomina de “polimorfismo”. O polimorfismo significa simplesmente que, se num indivíduo compararmos a seqüência de um determinado gene, ou de um alelo, para usarmos um termo mais genérico, esta pode apresentar algumas diferenças quan-

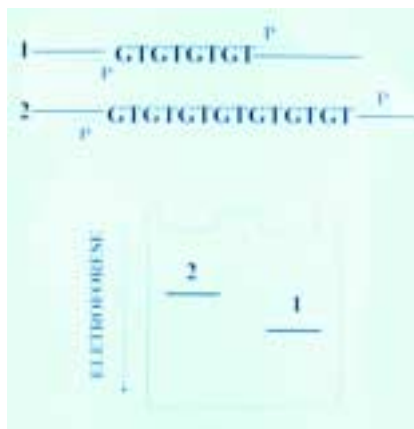


Figura 3 - Diagrama mostrando o princípio da determinação de polimorfismos através da amplificação de regiões repetitivas. Após a amplificação por PCR, os fragmentos de DNA são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e corados pelo método da prata. Por ser maior, o fragmento 2 migra mais lentamente. Na figura, **p** representa os “primers” utilizados na amplificação

do comparada com a seqüência do mesmo alelo de um outro indivíduo. Este é um fenômeno comum na natureza e decorre do fato que o DNA está constantemente sofrendo insultos variados, como por exemplo, radiações ionizantes, a ligação de metais como o cobre, radicais livres e alguns compostos orgânicos. No entanto, uma das principais fontes de modificações deve-se à própria enzima DNA polimerase, que, ao replicar a molécula de DNA, sofre ‘derrapagens’, o que produz, na cadeia nova, uma seqüência diversa da original. Se esses erros não forem reparados prontamente, as alterações ou mutações tornam-se permanentes na seqüência do DNA, ou seja, estáveis. Desde que a mutação não comprometa a função do gene em questão e, por conseguinte, a viabilidade do organismo, ela é então transmitida aos descendentes de acordo com as leis de herança de Mendel. É claro que se mutações ocorrerem na parte não codificadora do DNA, também chamado de DNA ‘lixo’, ou DNA ‘tralha’, elas terão uma probabilidade maior de tornarem-se estáveis e de serem propagadas para as gerações seguintes. Nos organismos que apresentam reprodução sexuada, podemos inclusive distinguir qual é a contribuição do DNA materno e qual a do DNA paterno. Foi justamente esse tipo de observação que tornou possível o teste de paternidade por tipagem de DNA.

Uma das formas mais aparentes de detectar o polimorfismo genômico é a análise do microsatélite. O microsatélite nada mais é do que uma série de repetições de seqüências simples, tais como (GT)_n, (CA)_n, ou (CT)_n, onde n corresponde ao número das repetições. Assim, por exemplo, um microsatélite pode apresentar n= 8 repetições de GT, ao passo que outro pode consistir de n= 12. Essas regiões podem repetir-se centenas de vezes ao longo de um mesmo genoma.

Embora os polimorfismos estejam presentes em todos os cromossomas, análogos ou não, para fins de identificação seria mais fácil interpretar um resultado em que somente as regiões polimórficas dos cromossomas análogos fossem consideradas. Quando tais polimorfismos existem, diz-se que é um polimorfismo de loco único, isto é, está presente em somente um loco em todo o genoma. Nesse caso, um indi-

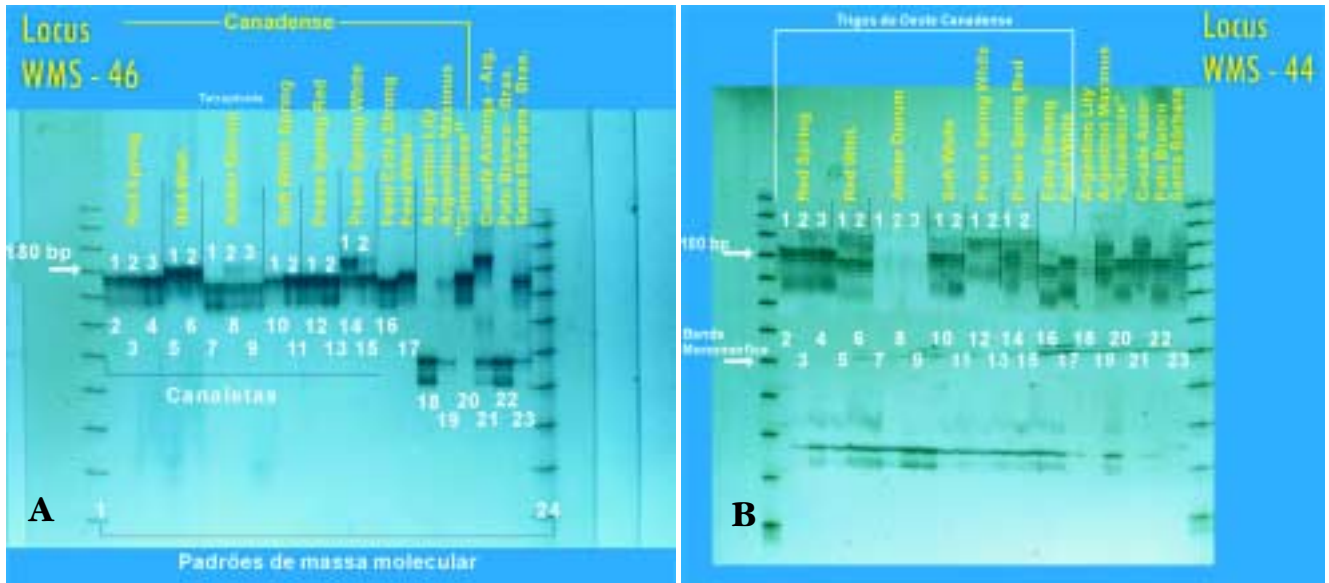


Figura 4

A- Polimorfismo obtido com sementes de trigos canadenses, argentinos e nacionais com o loco WMS-46. As canaletas 1 e 24 contêm os marcadores de massa molecular. A seta indica a posição da banda de 180 pares de bases (pb). Canaletas 2-4, cultivares do trigo Red Spring; 5,6, Red Winter; 7-9, Amber durum; 10,11, Soft White Spring; 12,13, Prairie Spring Red; 14,15, Prairie Spring White; 16,17, Feed Extra Strong & Feed Wheat, respectivamente; 18, Argentino 1; 19, Argentino 2; 20, Canadense 1; 21, Argentino 3; 22, Brasileiro 1; 23, Brasileiro 2.

B- Polimorfismo obtido com sementes de trigos canadenses, argentinos e nacionais com o loco WMS-44. A ordem das amostras é idêntica àquela descrita para a A. A seta indica a posição das bandas monomórficas

víduo diplóide, isto é, que possui duas cópias de cada cromossoma, exibiria somente dois alelos correspondendo àquele loco. Um alelo estaria localizado num cromossoma e o outro no cromossoma análogo. Os polimorfismos de locos múltiplos ocorrem em vários cromossomas e por conseguinte, geram vários alelos.

Para detectar esse tipo de polimorfismo nos microsátélites, recorre-se à técnica da PCR, (reação em cadeia da polimerase) que, através de iniciadores, ou 'primers' específicos, amplifica somente a região do genoma delimitada por estes. Dessa forma, se conhecemos a seqüência do DNA na região que apresenta polimorfismo, é possível sintetizar-se oligonucleotídeos com seqüências complementares a estes sítios. Esses oligonucleotídeos passam a atuar como primers para a reação da polimerase. Ao hibridar-se especificamente no sítio que flanqueia o trecho com as repetições, os primers promovem a amplificação de fragmentos de DNA, cujos tamanhos são diretamente proporcionais ao número de repetições. Ao analisarmos o tama-

nho do produto amplificado teremos, então, uma medida da extensão da região repetitiva. Esse princípio está ilustrado na Fig. 2. Como pode ser visto, o alelo 1, que apresenta 4 repetições GT, gera um fragmento que, em eletroforese, migra mais rapidamente do que o alelo 2, que possui 8 repetições GT e que, portanto, migra mais lentamente.

Essa é uma técnica simples, muito conveniente, sensível e bastante informativa. Para usá-la no caso do trigo, antes de mais nada teríamos que responder a várias perguntas. Por exemplo: 'os genes do trigo sofrem polimorfismo?' 'Existem polimorfismos também nas regiões não codificadoras?' 'Podemos analisar diversos cultivares de trigo e identificá-los através de sua "marca genômica"? Ou ainda, 'É possível associar os polimorfismos observados com as características reológicas das variedades de interesse industrial?' A resposta para as três primeiras perguntas é "sim" e a resposta para a última é "*provavelmente sim*".

Para investigar o polimorfismo dos vários cultivares de trigo no presente

trabalho, foi necessário antes extrair o DNA das sementes de cada população. A Fig.3 mostra os espécimens disponíveis dos cultivares. Dessas amostras, 10 sementes de cada cultivar foram trituradas na presença de um pequeno volume de uma solução tampão contendo EDTA, um detergente (SDS) e bisulfito de sódio. Após 45 minutos de extração a 65 °C, o DNA foi extraído com uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico. O DNA que se encontra na fase aquosa desta mistura é finalmente purificado por precipitação com etanol.

Os locos investigados WMS 46 e WMS 44 foram descritos por Roder et al. para o cultivar Chinese Spring (12). Esses locos compreendem, respectivamente, repetições do tipo $(GA)_2GC(GA)_{33}$ e $(GA)_{28}$. Os pares de primers com seqüências complementares às regiões flanqueadoras das repetições foram obtidos comercialmente e usados nas reações de PCR. Após a reação da PCR com os primers dos locos WMS 44 e 46, fragmentos de, aproximadamente, 180 pares de bases (pb) foram amplificados. Estes frag-

mentos foram então fracionados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uréia, o que fornece uma resolução idêntica àquela obtida em protocolos de seqüenciamento de ácidos nucléicos. Com este sistema é possível separar fragmentos, mesmo que eles difiram de somente 1 nucleotídeo. Para visualizar-se os produtos de amplificação, o gel é então corado pelo método da prata, usando-se o kit da PROMEGA.

Os resultados descritos abaixo mostram os resultados de genotipagem de, aproximadamente, 22 cultivares distintos usando as técnicas resumidas acima.

A Fig.4 **A** mostra os resultados das amplificações do locus WMS 46. As canaletas 1 e 24 correspondem a padrões de massa molecular. Podemos observar que a amplificação por PCR gera grupos de 4-5 alelos majoritários por variedade, o que corresponde à poliploidia destes híbridos. A variedade *Amber durum* é tetraplóide e as demais são hexaplóides. De uma forma geral, o padrão obtido mostra que os cultivares de trigo canadense apresentam um perfil bem semelhante entre si, embora seja ainda possível distinguir as variedades Red Winter e Prairie Spring White (canaletas 5,6 e 14 e 15, respectivamente) das demais canadenses. Em contraste, os cultivares de trigo argentino e brasileiro apresentam padrões alélicos bem diferentes dos canadenses. Por exemplo, compare as canaletas 2-17 e 20 (canadenses) com as canaletas 18,19 (argentinos) e canaletas 21 e 22 (brasileiros). Por si só, esses resultados já permitem que seja feita uma triagem dos cultivares exclusivamente com base na amplificação por PCR. Por outro lado, o loco WMS 44, foi menos informativo. A Fig.4 **B**, mostra que, ou não ocorre a amplificação nesse loco (*Amber durum*, canaletas 7-9), ou que as variações são mais discretas, mesmo se considerando somente os cultivares argentinos e brasileiros. Nota-se também nesses resultados a ocorrência de bandas monomórficas (invariáveis), indicadas pela seta na Fig. 4**B**. De qualquer modo, a própria ausência de amplificação do loco WMS 44 também constitui um parâmetro de identificação para um determinado cultivar. Se, por exemplo, deseja-se classificar uma população de sementes, a falta de

amplificação específica do loco WMS 44 sugere que se trata da variedade *Amber durum*.

Os resultados obtidos com a PCR podem ser correlacionados com as análises reológicas das farinhas. Por exemplo, os resultados mostrados na Fig.1 incluem o trigo canadense, argentino e nacional, cada um apresentando curvas bem características. O perfil de amplificação por PCR também é característico. Esse resultado permite, assim, a correlação das propriedades reológicas das farinhas com a genotipagem dos cultivares testados. Naturalmente, seria muito interessante do ponto de vista prático, se pudéssemos dissecar cada um dos parâmetros físicos das massas, a saber: a resistência, a extensibilidade e a força, e associá-los a padrões individuais de amplificação por PCR. Nesse caso, simplesmente examinando o resultado da genotipagem, o analista poderia classificar o cultivar não só com relação à sua origem geográfica, mas também determinar se aquela variedade possui as propriedades desejáveis para a produção de pães, ou de bolos e biscoitos. As vantagens de tal análise são muitas, mas as principais talvez sejam a sensibilidade e a rapidez. Uma análise completa de PCR, incluindo a eletroforese e a coloração por prata, pode ser facilmente realizada em um dia. Com relação ao material inicial, a amplificação por PCR descrita neste trabalho foi rotineiramente feita em 10 sementes de trigo, mas já conseguimos amplificar alguns locos com DNA obtido de apenas meia semente. Como os testes das propriedades viscoelásticas da farinha necessitam de, pelo menos, 3 kg de sementes e consomem cerca de 3 dias, a economia de tempo e de material seria considerável.

Para que a análise por PCR venha a substituir o farinógrafo, o extensógrafo e o alveógrafo, existe a necessidade de expandir o conjunto de locos investigados, de modo que a genotipagem dos cultivares seja suficientemente detalhada. De posse de um mapa mais completo, uma análise combinatorial certamente revelará instantaneamente o perfil de dureza, conteúdo de glúten, absorção de água e outras características que definirão a qualidade panificia. Como já existem dezenas de primers para locos poli-

mórficos de trigo descritos na literatura (12), essa perspectiva não está distante.

Referências Bibliográficas

1. Shewry, P.R., Tatham, A.S., Barro, F., Barcelo, P & Lazzeri, P. 1995. *Biotechnology*. 13: 1185-1190.
2. Schmidt, J.W. 1974. Wheat in Perspective. In: Inglett, G.E. (ed.), *Wheat: Production and Utilization*. The Avi Publishing Company, Inc. Connecticut. pp.1-7.
3. Feldman, M. 1976. Taxonomic Classification and Names of Wild, Primitive, Cultivated, and Modern Cultivated Wheats. In: Simmonds, N.M. (ed.), *Evolution of Crop Plants*. Longman, London. pp. 120-128.
4. Gilles, K.A., Sibbitt, L.D. 1974. Quality. In: Inglett, G.E. (ed.), *Wheat: Production and Utilization*. The Avi Publishing Company, Inc. Connecticut. pp. 93-107.
5. Hosney, R.C. 1997. Functionality of Flour. In: *Proceedings of the 73 Annual Technical Conference*. American Society of Bakery Engineers. Chicago. Illinois. pp. 85-90.
6. Preston, K.R. & Kilborn. R.H. 1984. Dough Rheology and the Farinograph. In: D'Appolonia, B.L. & Kunerth, W.H. (ed.), *The Farinograph Handbook, Third Edition, Revised and Expanded*. AACC. USA. pp. 38-42.
7. Shewry, P.R. & Lazzeri, P. 1997. *Chemistry and Industry*. : 559-561.
8. Field, J.M., Shwery, P.R. & Milflin, B.J. 1983. *J.Sci.Food Agric.* 34: 370-377.
9. Shwery, P.R. & Halford, N.G. 1992. *J.Cereal Sci.* 15: 105-120.
10. Shuey, W.C. 1984. Physical Factors Influencing Farinograms. In: D'Appolonia, B.L. & Kunerth, W.H. (ed.), *The Farinograph Handbook, Third Edition, Revised and Expanded*. AACC. USA. pp. 24-30.
11. Pyler, E.J. 1988. Chapter 21. Physical and Chemical Test Methods. In: *Baking Science & Technology*. 3rd Edition. Sosland Publishing Company. Kansas City. Missouri. pp. 850-910.
12. Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tansley, S.D. and Ganai, M.W. (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.