Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Identification of quantitative trait loci (QTL) associated with enzymatic digestibility of wheat straw using DArT markers

Fatemeh Shafaei
Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic engineering, Agriculture Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: Shafaei_f95@yahoo.com

Shohreh Ariaee-Nejad
Assistant professor, department of systems biology research, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran. E-mail: Sh.ariaee@abrii.ac.ir

Ghasem Mohammadi-Nejad
Professor, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: Mohammadinejad@uk.ac.ir

Somayeh Sardouei-Nasab
Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: Sardoueinasabs@gmail.com

Ali Kazemipour
*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic engineering, Agriculture Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, Iran. E-mail: Ali.kazemi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Agricultural wastes are a serious challenge in developing countries. Lignocellulosic wastes, as the most abundant biomass on Earth, can be used as a source for the production of biofuels and other valuable products. These wastes are particularly important in terms of the production of fermentable sugars for biofuels and other commercial materials. The aim of this study is to identify gene loci, candidate genes, and molecular markers associated with the enzymatic digestibility of wheat straw for use in wheat breeding projects to increase the production of reducing sugars. In addition, identifying sources of lignocellulosic wastes with the highest potential for conversion to reducing sugars among wheat lines is another goal of this research.

Materials and methods

In this study, 167 inbred lines (F9) obtained from the crossing of Roshan and Superhead cultivars were used. These lines were cultivated in a research farm located in the Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, and after harvesting, the straw obtained was prepared for enzymatic digestion experiments. For enzymatic digestion of the resulting biomass, recombinant xylanase and cellulase enzymes were used and the amount of sugar released by these enzymes was measured. Genotyping of the lines was constructed using DArT markers. Then, a genetic

map was drawn using 167 lines and 662 DArT markers in the QTL IciMapping software. Identification of candidate genes within the confidence interval of the identified QTLs was performed using the sequences related to the DArT marker and the physical distance of adjacent markers in the databases related to the wheat genome.

Results

A genetic linkage map of 4315.35 CM was drawn and three QTLs were identified for traits related to the amount of sugar released from biomass. Of these three QTLs, two QTLs were located on chromosomes 7A and 6D for the trait of sugar released by cellulase digestion (CEL) and one QTL for the trait of sugar released by xylanase digestion (XYL) on chromosome 7A. Using the physical distance of the markers adjacent to the identified QTLs, two candidate genes *TraesCS7A03G0782000LC* and *TraesCS7A03G0781900LC* were identified within a confidence interval on chromosome 7A. Based on information obtained from wheat databases, it was determined that these genes are involved in specific biochemical processes that are related to the production of kinase proteins and hypothetical proteins. These proteins can play a key role in regulating metabolic pathways related to enzymatic digestion and the conversion of biomass to reducing sugars. Thus, these genes are recognized as important candidates for genetic modification to improve sugar production processes in wheat. Also, the identification of promising lines identified in this study can be used in wheat breeding projects to produce varieties with higher sugar production capabilities.

Conclusions

The results of this study indicate the importance of chromosomes 6D and 7A in controlling the amount of sugars released from biomass by enzymatic digestion. Also, the genes identified for the QTL regions and the identified markers can be used in breeding projects to improve biomass digestibility in wheat. The identified superior genotypes with high sugar production capacity from biomass can be used for the production of biofuels and other commercial materials, as well as in breeding projects to improve sugar production in wheat.

Keywords: Cellulase, Enzymatic Digestion, Lignocellulosic Wastes, Xylanase.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Shafaei, F., Ariaee-Nejad, Sh., Mohammadi-Nejad, Gh., Sardouei-Nasab, S., & Kazemipour, A. (2025). Identification of quantitative trait loci (QTL) associated with enzymatic digestibility of wheat straw using DArT markers. *Agricultural Biotechnology Journal,* 17(3), 219-234.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(3), 219-234. DOI: 10.22103/jab.2025.24915.1671

Received: May 20, 2025. Received in revised form: July 10, 2025.

Accepted: July 11, 2025. Published online: August 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Agricultural waste is considered one of the significant challenges in developing countries. Agricultural waste and residues have severe negative impacts on natural resources such as water, soil, and air. In addition to the environmental and health problems resulting from the burial, burning, and disposal of agricultural waste, the increase in these residues leads to considerable economic damage. These damages include the wastage of limited water and soil resources, reduced quality and value of products, loss of subsidized inputs, increased import needs, reduced income for farmers, and the threat to the job positions of producers. Lignocellulosic residues, recognized as the most abundant biomass on Earth, are primarily composed of polymeric sugars such as cellulose, hemicellulose, and lignin. These polymeric sugars can be hydrolyzed enzymatically into simple sugars. Lignocellulosic materials, such as rice, corn, and wheat residues, can be highly suitable for producing reducible sugars. Specifically, wheat straw is a potential biomass for producing monomeric sugars. The degradability of biomass not only increases biofuel production efficiency but can also directly play a crucial role in reducing agricultural waste and minimizing environmental pollution. This approach makes a sustainable agricultural and industrial cycle possible with minimal environmental impact. One of the main challenges in biorefineries is converting carbohydrates in lignocellulosic feedstocks into fermentable sugars. Efficient and cost-effective hydrolysis of cellulose and hemicellulose carbohydrates into monosaccharides remains a significant challenge for their utilization, and future research should focus on this stage. Therefore, identifying lignocellulosic waste sources with the highest potential for conversion to reducible sugars and examining and identifying genes controlling the production of polymeric sugars that can be converted into reducible sugars are essential research priorities. Since sugar production through enzymatic digestion of lignocellulose is a quantitative trait, identifying QTLs related to the amount of released sugars will have wide applications in plant breeding and industrial production. The goal of this study is to identify genes, genetic loci, and molecular markers associated with the enzymatic digestibility of wheat straw for use in wheat breeding projects aimed at improving reducible sugar production. Additionally, identifying lignocellulosic waste sources with the highest potential for reducible sugar conversion among wheat lines is another objective of this research.

Materials and methods

In this study, 167 (F9) inbred lines derived from the cross between the Roshan and Superhead wheat varieties were used. The lines were planted in a simple lattice design at the Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman. After harvesting, the straw was air-dried and prepared for enzymatic digestion. To hydrolyze the cellulose and xylan in the cell wall,

recombinant cellulase and xylanase enzymes produced at the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran were used. For enzymatic digestion, cellulase and xylanase enzymes were applied at a concentration of 2 units per milliliter. The wheat straw powder was prepared by grinding the dried stems of each genotype and passing it through a 1-mm sieve. Enzymatic digestion to measure the sugar content in lignocellulosic biomass was based on Miller's method (1959), using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent and measuring the reducing sugars released from cellulose and xylan soluble in the solution. The amount of released sugar was quantified using a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm by comparison with a glucose standard curve. The trait of released sugar through cellulase (CEL) and xylanase (XYL) digestion was measured. Genotyping of the lines was conducted using DArT markers. A genetic map was constructed using 167 lines and 662 DArT markers in the QTL IciMapping software. Candidate genes in the confidence intervals of the identified QTLs were identified using sequences related to DArT markers and the physical distance of adjacent markers in relevant wheat genome databases.

Results

A genetic linkage map of 4315.35 CM in length was constructed, and three QTLs related to the amount of released sugar from biomass were identified. Two QTLs on chromosomes 7A and 6D were identified for the trait of sugar released by cellulase digestion (CEL), and one QTL for the trait of sugar released by xylanase digestion (XYL) was located on chromosome 7A. Two loci controlling the identified quantitative traits, *qCEL7A* and *qCEL6D*, for the amount of sugar released by cellulase digestion, were located at positions 82 and 334 CM on chromosomes 7A and 6D, respectively. These QTLs explained 1.12% and 1.44% of the phenotypic variance for enzymatic lignocellulose digestion. The additive effects of the QTLs showed that *qCEL6D*, with a positive additive effect, inherited favorable alleles from the Roshan parent and increased the released sugar by 4.40 mg. Conversely, the negative additive effect of *qCEL7A* indicates that it inherited reducing alleles from the Superhead parent, decreasing the released sugar by 5.92 mg. Additionally, the locus *qXYL7A*, which is related to the amount of sugar released by xylanase digestion, was identified on chromosome 7A at position 81 CM, explaining 1.48% of the phenotypic variance. The negative additive effect of this QTL suggests that alleles related to this trait were inherited from the Superhead parent, reducing the released sugar by 7.66 mg. Using the physical distance of adjacent markers to the identified QTLs, two candidate genes, *TraesCS7A03G0782000LC* and *TraesCS7A03G0781900LC*, were identified in the confidence interval on chromosome 7A. These genes are involved in protein kinase production and

hypothetical protein functions. These genes could serve as targets for breeding to enhance sugar release in the enzymatic digestion process.

Conclusions

The results of this study led to the identification of three important QTLs related to the amount of sugar released from lignocellulosic biomass. These QTLs highlight the importance of chromosomes 6D and 7A in controlling sugar release from biomass through enzymatic digestion, demonstrating the significant genetic role of these regions in controlling enzymatic digestibility traits of wheat biomass. Furthermore, the identified genes for the QTL regions and the detected markers can be used in breeding programs aimed at improving lignocellulose digestibility in wheat. The superior genotypes identified, which have high potential for sugar production from biomass, could be utilized in biofuel production, commercial materials, and breeding projects.

Author Contributions

G. M. N. Made the concept and Project administration. F. S., A. K., S. A. N., S. S. N. Provided the Data curation, Methodology, made the investigation and formal analysis. G. M. N. and A. K. Supervised the manuscript. S. S. N. Wrote the original draft of the manuscript. A. K. and F. S. Reviewed and edited the manuscript. F. S. Prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors thank all participants in this study.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the RTIPP Institute of Shahid Bahanar University of Kerman, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

شناسایی مکان‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) مرتبط با قابلیت هضم آنزیمی کاه گندم با استفاده از نشانگرهای DArT

فاطمه شفائی

دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: shafaei_f95@yahoo.com

شهره آریایی‌نژاد

استادیار، گروه سیستم‌ها و زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران. رایانامه: Sh.ariaee@abrii.ac.ir

قاسم محمدی‌نژاد

استاد، پژوهشکده فناوری و تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران. رایانامه: mohammadinejad@uk.ac.ir

سمیه ساردویی‌نسب

استادیار، پژوهشکده فناوری و تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران. رایانامه: sardoueinasabs@gmail.com

علی کاظمی‌پور

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، کرمان، ایران. رایانامه: ali.kazemi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰

چکیده

هدف: ضایعات کشاورزی یکی از چالش‌های جهان امروزی محسوب می‌شوند. ضایعات لیگنوسلولزی، می‌توانند به‌عنوان منبعی برای تولید قندهای قابل تخمیر جهت سوخت‌های زیستی و دیگر محصولات با ارزش استفاده شوند. هدف این مطالعه شناسایی مکان‌های ژنی، ژن‌های کاندید و نشانگرهای مولکولی مرتبط با قابلیت هضم آنزیمی کاه گندم به منظور بهره‌برداری در پروژه‌های به‌نژادی گندم جهت افزایش تولید قندهای احیاءشونده است. همچنین شناسایی لاین‌های گندم با بیشترین پتانسیل تبدیل به قندهای احیاءشونده از دیگر اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از ۱۶۷ لاین خویش‌آمیخته (F9) حاصل از تلاقی ارقام روشن و سوپرهد استفاده شد. لاین‌ها در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان کشت گردیدند و کاه بدست آمده برای انجام آزمایش‌های هضم آنزیمی آماده‌سازی شد. برای هضم آنزیمی، از آنزیم‌های نوترکیب زایلاناز و سلولاز استفاده شد و میزان قند آزاد شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ژنوتیپ‌یابی لاین‌ها با استفاده از نشانگرهای DArT انجام شد و نقشه ژنتیکی با استفاده از ۱۶۷ لاین و ۶۶۲ نشانگر DArT، ترسیم گردید. شناسایی ژن‌های کاندید در فاصله اطمینانQTL های شناسایی‌شده در پایگاه‌داده های مرتبط با ژنوم گندم انجام شد.

نتایج و بحث: نقشه پیوستگی ژنتیکی به طول ۴۳۱۵/۳۵ سانتی‌مورگان ترسیم شد و سه QTL برای میزان قند آزاد شده از زیست‌توده شناسایی گردید. دو QTL بر روی کروموزوم‌های 7A و 6D برای میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم سلولاز (CEL) و یک QTL برای صفت هضم با آنزیم زایلاناز (XYL) بر روی کروموزوم 7A قرار داشتند. با استفاده از فاصله فیزیکی نشانگرهای مجاورQTL های شناسایی‌شده، ۲ ژن *TraesCS7A03G0782000LC* و *TraesCS7A03G0781900LC* شناسایی شدند که این ژن‌ها در فرایندهای بیوشیمیایی مربوط به تولید پروتئین‌های کیناز و پروتئین‌های هایپوتتیکال مرتبط می‌باشند. این پروتئین‌ها نقش کلیدی در تنظیم مسیرهای متابولیکی مرتبط با هضم آنزیمی و تبدیل زیست‌توده به قندهای احیاءشونده ایفا می‌کنند. این ژن‌ها کاندیدای مناسبی برای اصلاح ژنتیکی بهبود فرآیندهای تولید قند در گندم محسوب می‌شوند. همچنین لاین‌های امید بخش شناسایی شده در این تحقیق می‌توانند در پروژه‌های به‌نژادی گندم جهت تولید ارقام با قابلیت تولید قند بیشتر مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اهمیت کروموزوم‌های 7A و 6D در کنترل میزان قندهای آزاد شده توسط هضم آنزیمی است. ژن‌ها و نشانگرهای شناسایی شده می‌توانند در پروژه‌های اصلاحی بهبود قابلیت هضم زیست‌توده گندم بکار روند. همچنین ژنوتیپ‌های برتر شناسایی شده می‌توانند برای تولید سوخت‌های زیستی و دیگر مواد تجاری و در پروژه‌های به‌نژادی برای بهبود تولید قند از کاه گندم مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: زایلاناز، سلولاز، ضایعات لیگنوسلولزی، هضم‌آنزیمی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: شفائی فاطمه، آریایی‌نژاد شهره، محمدی‌نژاد قاسم، ساردویی‌نسب سمیه، کاظمی‌پور علی (۱۴۰۴) شناسایی مکان‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) مرتبط با قابلیت هضم آنزیمی کاه گندم با استفاده از نشانگرهای DArT. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۳)، ۲۱۹-۲۳۴.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سالانه حجم زیادی از تولیدات بخش کشاورزی به صورت ضایعات از چرخه مصرف خارج می‌شود. روند افزایشی ضایعات کشاورزی یکی از چالش‌های جدی در اکثر کشورهای جهان، به‌ویژه کشورهای در حال توسعه، محسوب می‌شود. ضایعات و پسماندهای کشاورزی می‌تواند تاثیرات منفی زیادی بر منابع طبیعی مانند آب، خاک و هوا داشته باشد. تجزیه ضایعات کشاورزی گازهای گلخانه‌ای تولید می‌کند که موجب آلودگی هوا می‌شود و ضایعات کشاورزی، به‌ویژه شیرابه‌های حاصل از آن‌ها، می‌تواند آلودگی خاک و منابع آبی سطحی و زیرزمینی را به همراه داشته باشد (Nagendran, 2011). علاوه بر مشکلات زیست محیطی و بهداشتی که به دنبال دفن، سوزاندن و رهاسازی ضایعات کشاورزی به‌وجود می‌آید، افزایش این ضایعات خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی ایجاد می‌کند. این خسارت‌ها شامل هدر رفت منابع محدود آب و خاک، کاهش کیفیت و ارزش محصولات، از دست دادن نهاده‌های یارانه‌ای، افزایش نیاز به واردات، کاهش درآمد کشاورزان و تهدید موقعیت شغلی تولیدکنندگان می‌باشد (Gomiero, 2016). ضایعات لیگنوسلولزی به عنوان فراوان‌ترین زیست‌توده روی زمین شناخته می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان منبعی مناسب برای تولید محصولات با ارزش، از جمله سوخت‌های زیستی، مورد استفاده قرار گیرند (Taha et al., 2016). همچنین، محصولات فرعی کشاورزی می‌توانند در تغذیه حیوانات به‌کار روند که این امر از سه جنبه حائز اهمیت است: اول، کاهش وابستگی دام به غلاتی که برای مصرف انسان تولید می‌شوند. دوم، کاهش هزینه تأمین مواد مغذی مورد نیاز دام و سوم، جلوگیری از آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از انباشت این پسماندها (Grasser et al., 1995). یکی از روش‌های پالایش زیستی ضایعات لیگنوسلولزی، تولید محصولات با ارزش افزوده از سلولز است. به‌طور مثال، بیواتانول را می‌توان از طریق تخمیر گلوکز تولید کرد (Silveira et al., 2015; Tuck et al., 2012). حدود ۷۵٪ لیگنوسلولز از کربوهیدرات‌ها تشکیل شده است که در آینده نزدیک به منبعی مهم برای تولید کربوهیدرات‌های قابل تخمیر تبدیل خواهد شد. این ماده می‌تواند به‌عنوان منبعی برای تولید سوخت‌های زیستی مایع در بخش حمل و نقل و انواع مختلفی از مواد شیمیایی تجاری و مواد زیست‌تخریب‌پذیر مورد استفاده قرار گیرد. پیش‌بینی می‌شود که صنعت پتروشیمی مبتنی بر سوخت‌های فسیلی به تدریج با پالایشگاه‌های زیستی جایگزین شوند که محصولات با ارزش از جمله سوخت، گرما و برق را از مواد لیگنوسلولزی تولید می‌کنند (Vogt & Weckhuysen, 2024). تبدیل زیستی لیگنوسلولز به محصولات زیستی مانند اتانول زیستی، بیوهیدروژن و کامپوزیت‌های زیستی می‌تواند دستاوردهای قابل توجهی داشته باشد (Tian et al., 2018). قسمت عمده زیست‌توده لیگنوسلولزی از قندهای پلیمری سلولزی، همی‌سلولزی و لیگنین تشکیل شده است. این قندهای پلیمری می‌توانند از طریق هیدرولیز آنزیمی به قندهای ساده تجزیه شوند (Vasić et al., 2021). مواد لیگنوسلولزی مانند بقایای محصولات برنج، ذرت و گندم می‌توانند برای تولید قندهای احیاءشونده بسیار مناسب باشند (Gupta & Verma, 2015). به‌طور خاص، کاه گندم یک زیست‌توده بالقوه برای تولید قندهای مونومری است (Zheng et al., 2018). یکی از چالش‌های اصلی در کارخانه‌های زیستی، تبدیل کربوهیدرات‌های مواد اولیه لیگنوسلولزی به قندهای قابل تخمیر است. هیدرولیز کارآمد و مقرون به صرفه کربوهیدرات‌های سلولز و همی‌سلولز به مونوساکاریدها، یک چالش مهم برای استفاده از آن‌ها محسوب می‌شود و تحقیقات آتی باید

بر این مرحله تمرکز کند (Kamm & Kamm, 2004; Ragauskas et al., 2006). بنابراین، استفاده از آنزیم‌هایی که قادر به تبدیل ضایعات لیگنوسلولزی به قندهای قابل تخمیر هستند از نظر اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند. همچنین، شناسایی منابع ضایعات لیگنوسلولزی با بیشترین پتانسیل تبدیل به قندهای احیاءشونده و بررسی و شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده تولید قندهای پلیمری که قابلیت تبدیل به قندهای احیاءشونده دارند، از اولویت‌های تحقیقاتی می‌باشند. از آنجا که صفت تولید قند از طریق هضم آنزیمی لیگنوسلولز یک صفت کمی می‌باشد (Nguyen et al., 2020). شناسایی QTLهای مرتبط با میزان قند آزاد شده، کاربردهای گسترده‌ای در به‌نژادی گیاهی و تولید صنعتی خواهد داشت. قابلیت تجزیه زیست‌توده بازده تولید سوخت‌های زیستی را افزایش می‌دهد، و می‌تواند به طور مستقیم در کاهش ضایعات کشاورزی و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی نقشی اساسی ایفا کند. از این طریق، چرخه پایدار کشاورزی و صنعتی با حداقل اثرات مخرب زیست‌محیطی امکان‌پذیر خواهد شد. سلولز فراوان‌ترین عنصر فیبری در زیست‌توده گیاهی است. این جزء پلیمری، پتانسیل بالایی برای تولید بیوگاز و اتانول ارائه می‌دهد (Domingues et al., 2022). متداول‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده برای هیدرولیز زیست‌توده لیگنوسلولزی، سلولازها هستند (Gupta & Bisaria, 2018). سلولازها به عنوان آنزیم‌های ضروری برای هضم آنزیمی و سایر کاربردهای صنعتی شناخته می‌شوند. گستردگی کاربردهای صنعتی، تقاضای زیادی برای تولید آنزیم سلولاز در مقیاس انبوه و کم‌هزینه و همچنین آنزیم‌های دارای کارایی بالاتر ایجاد کرده است. با این حال استفاده از این آنزیم‌ها به دلیل بازده کم آن‌ها به شکل اصلی آنزیم همچنان محدود است. تکنولوژی DNA نوترکیب و مهندسی پروتئین راه‌های مناسبی برای غلبه بر این معایب می‌باشد. به عبارت دیگر یکی از روش‌های افزایش کارایی آنزیم‌ها تولید آنزیم‌های نوترکیب می‌باشد (Udhaya Kumar et al., 2025). زایلان ماده اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی گیاهان و فراوان‌ترین پلی‌ساکارید غیر سلولزی تجدیدپذیر موجود در طبیعت می‌باشد به‌طوریکه حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد وزن خشک چوب سخت گیاهان گرمسیری و یکساله را زایلان تشکیل می‌دهد. زایلانازها گروهی از آنزیم‌های مورد استفاده در پروسه‌ی تخمیر لیگنوسلولزها می‌باشند. این آنزیم‌ها از طریق تبدیل پلی ساکارید خطی ۱–β، ۴–زایلان به زایلوز موجب تجزیه همی‌سلولز می‌شوند (Andlar et al., 2018). زایلاناز علاوه بر کاربرد در صنعت خمیر و کاغذ (Battan et al., 2007)، به عنوان افزودنی خوراک طیور (Hussain et al., 2019) و در بهبود خواص تغذیه‌ای سیلوهای کشاورزی (Eun et al., 2007) نیز استفاده می‌شوند. همچنین آنزیم زایلاناز استخراج شده از جدایه‌های قارچی در پردازش زیستی پارچه و فرایندهای تصفیه کاغذ باطله استفاده می‌شود (Sharma et al., 2020). هدف از مطالعه حاضر، شناسایی مکان‌های ژنی، ژن‌های کاندید و نشانگرهای مولکولی مرتبط با بهبود عملکرد قابلیت هضم کاه گندم نان با استفاده از دو آنزیم سلولاز و زایلاناز نوترکیب و همچنین شناسایی لاین‌های امیدبخش دارای بالاترین قابلیت تولید قند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق، تعداد ۱۶۷ لاین خویش‌آمیخته‌ی نوترکیب (F9) حاصل از تلاقی ارقام روشن و سوپرهد مورد استفاده قرار گرفت. این لاین‌ها با استفاده از روش بالک تک بذر، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تولید شده بودند. رقم روشن یک رقم محلی با عملکرد بالا، پابلند و متحمل به تنش‌های خشکی و شوری است، در حالی که سوپرهد یک رقم آمریکایی پاکوتاه، پرعملکرد و حساس به تنش خشکی است (Sardouei-Nasab et al., 2024). با توجه به اینکه میزان کاه تولیدی از نظر کمیت با میزان تولید قند حاصل از هضم رابطه مستقیمی دارد لذا رقم‌های روشن و سوپرهد که از نظر ارتفاع بوته دارای اختلاف می‌باشند، جهت فراهم آوردن تنوع ژنتیکی مناسب در صفت ارتفاع بوته و صفات مرتبط با قابلیت هضم کاه، به عنوان والدین تلاقی انتخاب شدند. لاین‌های مذکور در قالب طرح لاتیس ساده در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان (طول جغرافیایی ۵۷ و عرض جغرافیایی۳۰ درجه و ارتفاع ۱۷۵۶متری از سطح دریا) کشت شدند. در طول فصل زراعی مراحل داشت انجام و پس از رسیدگی فیزیولوژیک گیاه، برداشت بوته انجام شد. خشک شدن بوته‌ها در هوای آزاد انجام شد.

هضم آنزیمی: به منظور هضم آنزیمی سلولز و زایلان موجود در دیواره سلولی، از آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز نوترکیب تهیه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران استفاده شد. به منظور هضم آنزیمی، از آنزیم با غلظت ۲ یونیت در میلی‌لیتر استفاده شد. جهت تهیه پودر کاه گندم، ساقه‌های خشک شده هر ژنوتیپ آسیاب شد و از الک ۱ میلی‌متری عبور داده شد. هضم آنزیمی جهت اندازه‌گیری میزان قند موجود در زیست‌توده لیگنوسلولزی بر اساس روش میلر (Miller, 1959) با استفاده از معرف ۳ و ۵ – دینیتروسالیسیلیک اسید (DNS) انجام شد و اندازه‌گیری قندهای آزاد شده از طریق مقایسه با منحنی استاندارد گلوکز توسط دستگاه Multimode reader ساخت امریکا در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد و صفت میزان قند آزاد شده از طریق هضم با آنزیم سلولاز (CEL) و زایلاناز (XYL) بدست آمد.

ژنوتیپ‌یابی: لاین‌های مورد استفاده، در کشور استرالیا و با استفاده از فناوری آرایه‌های تنوع (DArT) ژنوتیپ‌یابی شدند. بدین منظور DNA لاین‌های خویش‌آمیخته و والدین تلاقی‌ها (روشن و سوپرهد) به موسسه DNA Diversity Arrays technology Pty Limite Wilf Crane Cr, Australia جهت ژنوتیپ‌یابی ارسال گردید (Jahani et al., 2019).

طراحی نقشه پیوستگی و مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل‌کننده‌ی صفات: پس از حذف نشانگرهای مونومورف، نقشه ژنتیکی با استفاده از ۱۶۷ لاین و ۶۶۲ نشانگر DArT، در نرم‌افزار QTL IciMapping نسخه ۴ (Wang et al., 2014) ترسیم گردید. برای این منظور، تابع کوزامبی (۱۹۹۴) و مقدار لگاریتم نسبت احتمال (LOD) برابر با ۲/۵ در نظر گرفته شدند. حذف نشانگرهای اضافه با استفاده از تابع BIN انجام شد. در پارامتر ordering، الگوریتم nnTwoOpt و در پارامتر rippling، SARF[1] با اندازه پنجره‌ی ۵ نشانگر استفاده گردید.

[1] sum of adjacent recombination frequencies

شناسایی ژن‌های کاندید برای نواحی QTLی: شناسایی ژن‌های کاندید در نواحی QTLی با استفاده از توالی‌های مربوط به نشانگرهای DArT انجام شد. این توالی‌ها از پایگاه داده نشانگرهای DArT (http://www.diversityarrays.com/sequences) استخراج گردیدند. برای تعیین موقعیت فیزیکی نشانگرها بر روی ژنوم گندم، ابزار BLAST سرور URGI (https://urgi.versailles.inrae.fr/blast) مورد استفاده قرار گرفت. جهت شناسایی ژن‌های کاندید در فاصله اطمینان QTLها، از سرور URGI استفاده شد. جهت حاشیه نویسی ژن‌های شناسایی‌شده، از پایگاه داده‌های مرتبط با ژنوم گندم (https://persephonesoft.com) Persephone و Ensembl Plants (http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum) و NCBI استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه پیوستگی: نقشه ژنتیکی به طول ۴۳۱۵.۳۵ سانتی‌مورگان با استفاده از ۱۶۷ لاین و ۶۶۲ نشانگر در جمعیت حاصل از تلاقی روشن×سوپرهد تهیه گردید. ۲۹/۰۶ درصد نشانگرها بر روی ژنوم D و به ترتیب ۴۲/۴۴ و ۲۸/۵۰ درصد نشانگرها بر روی ژنوم‌های A و B قرار داشتند. کروموزوم‌های 3D, 5B و 7D به دلیل عدم اشباع نشانگری از تجزیه QTL حذف گردیدند. نتایج مربوط به ترسیم نقشه پیوستگی در جمعیت مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

شناسایی QTLها: تجزیه QTL منجر به شناسایی سه QTL برای صفات مرتبط با میزان قند آزاد شده از زیست‌توده گردید. به‌طوریکه دو QTL برای صفت میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم سلولاز (CEL) بر روی کروموزوم‌های 7A و 6D و یک QTL برای صفت میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم زایلاناز (XYL) بر روی کروموزوم 7A مکان‌یابی شدند (جدول ۲). دو مکان کنترل‌کننده صفات کمی شناسایی شده *qCEL7A* و*qCEL6D* برای صفت میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم سلولاز، به ترتیب در موقعیت‌های ۸۲ و ۳۳۴ سانتی‌مورگان بر روی کروموزوم‌های 7A و 6D قرار دارند و این QTLها به ترتیب ۱.۱۲ و ۱.۴۴ درصد از واریانس فنوتیپی صفت هضم آنزیمی لیگنوسلولز را توجیه می‌نمایند. بررسی اثرات افزایشی QTLها نشان داد که *qCEL6D* با اثر افزایشی مثبت، آلل‌های مطلوب خود را از والد روشن دریافت کرده است و باعث افزایش ۴.۴۰ آمیلی‌گرم در میزان قند آزاد شده توسط هضم سلولز می‌شود. همچنین اثر افزایشی منفی *qCEL7A* نشان دهنده دریافت آلل‌های کاهنده میزان صفت از والد سوپرهد می‌باشد که باعث کاهش ۵.۹۲ میلی‌گرم در میزان قند آزاد شده توسط هضم سلولز می‌شود. از سوی دیگر، مکان کنترل کننده صفات کمی *qXYL7A* مرتبط با صفت میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم زایلاناز، بر روی کروموزوم 7A و در موقعیت ۸۱ سانتی‌مورگان شناسایی شد که ۱/۴۸ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمود. اثر افزایشی منفی این QTL نشان می‌دهد که آلل‌های مرتبط با این صفت از والد سوپرهد به ارث رسیده‌اند و باعث کاهش ۷.۶۶ میلی‌گرم در میزان قند آزاد شده توسط هضم زایلان می‌شود. این نتایج اهمیت کروموزوم‌های 6D و 7A را در کنترل

میزان قندهای آزاد شده از زیست‌توده توسط هضم آنزیمی تأیید می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر با قابلیت تولید بالای قند از زیست‌توده مؤثر باشد. چنین ژنوتیپ‌هایی پتانسیل بالایی برای تولید ارقامی با زیست‌توده قابل تجزیه بیشتر دارند که می‌توانند در شرایط مختلف محیطی عملکرد مطلوبی از خود نشان دهند.

جدول ۱. اطلاعات نقشه پیوستگی در جمعیت مورد مطالعه

Table 1. Linkage mapping information in the study population

شماره کروموزوم Chromosome number	تعداد نشانگر Number of marker	طول نقشه Length of map	متوسط فاصله Average distance
1A	29	357.29	12.32
2A	20	296.32	14.82
3A	17	155.04	9.12
4A	25	118.40	4.74
5A	27	286.81	10.62
6A	22	399.96	18.18
7A	33	217.60	6.59
1B	17	230.37	13.55
2B	21	152.89	7.28
3B	25	287.27	11.49
4B	11	320.46	29.13
5B	-	-	-
6B	8	118.99	14.87
7B	29	119.98	4.14
1D	15	161.57	10.77
2D	17	191.86	11.29
3D	-	-	-
4D	10	153.49	15.35
5D	29	401.20	13.83
6D	24	345.84	14.41
7D	-	-	-
Total	379	4315.353	11.39
A	173	1831.43	10.59
B	111	1229.96	11.08
D	95	1253.97	13.20

از سوی دیگر، مکان کنترل کننده صفات کمی *qXYL7A* مرتبط با صفت میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم زایلاناز، بر روی کروموزوم 7A و در موقعیت ۸۱ سانتی‌مورگان شناسایی شد که ۱/۴۸ درصد از واریانس فنوتیپی این صفت را توجیه نمود. اثر افزایشی منفی این QTL نشان می‌دهد که آلل‌های مرتبط با این صفت از والد سوپرهد به ارث رسیده‌اند و باعث کاهش ۷.۶۶ میلی‌گرم در میزان قند آزاد شده توسط هضم زایلان می‌شود. این نتایج اهمیت کروموزوم‌های 6D و 7A را در کنترل میزان قندهای آزاد شده از زیست‌توده توسط هضم آنزیمی تأیید می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر با قابلیت

تولید بالای قند از زیست‌توده مؤثر باشد. چنین ژنوتیپ‌هایی پتانسیل بالایی برای تولید ارقامی با زیست‌توده قابل تجزیه بیشتر دارند که می‌توانند در شرایط مختلف محیطی عملکرد مطلوبی از خود نشان دهند.

جدول ۲. نتایج تجزیه QTL

Table 2. QTL analysis results

نام صفت	مکان ژنی	کروموزوم	موقعیت	نشانگر چپ	نشانگر راست	لگاریتم نسبت شانس	درصد توجیه واریانس	اثر افزایشی
Trait Name	QTL	Chromosome	Position	Left Marker	Right Marker	LOD	PVE (%)	Add
XYL	*qXYL7A*	7A	81	wPt-664218	wPt-664841	11.11	1.48	-7.66
CEL	*qCEL6D*	6D	334	wPt-8302	wPt-7108-19	5.01	1.44	4.40
CEL	*qCEL7A*	7A	82	wPt-664218	wPt-664841	7.84	1.12	-5.92

XYL: میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم زایلاناز :CELمیزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم سلولاز

شناسایی ژن‌های کاندید مرتبط با نواحی QTL: با استفاده از فاصله فیزیکی نشانگرهای مجاورQTL های مرتبط با صفت میزان قند تولید شده، ژن‌های کاندید شناسایی شدند. نتایج حاصل در جدول ۳ نشان داده شده است.

بر اساس فاصله فیزیکی نشانگرهای مجاورQTLها، دو ژن *TraesCS7A03G0781900LC* و *TraesCS7A03G0782000LC* بر روی کروموزوم 7A شناسایی شدند که با توجه به بررسی‌های انجام شده و اطلاعات به‌دست‌آمده از پایگاه‌های داده ژنوم گندم نقش‌های متفاوتی داشتند. نتایج نشان داد که این دو ژن در کنترل هضم آنزیمی سلولز و زایلان نقش دارند. ژن *TraesCS7A03G0781900LC* در تولید پروتئین‌کینازها نقش دارد. پروتئین‌کینازها در مسیرهای سیگنالی تنظیم بیان آنزیم‌های لازم برای تجزیه سلولز و همی‌سلولز مشارکت دارند و نقش مهمی در هضم لیگنوسلولز گیاهان بر عهده دارند. پروتئین‌کینازها برای تخریب لیگنوسلولز ضروری هستند. علاوه بر این، پروتئین‌کینازها در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی گیاه، از جمله رشد، پاسخ‌های هورمونی و دفاع در برابر تنش‌های زیستی نقش دارند که این می‌تولند به طور غیرمستقیم بر هضم لیگنوسلولز اثرگذار باشد (Gandhi & Oelmüller, 2023). همچنین ژن *TraesCS7A03G0782000LC* در تولید پروتئین‌های hypothetic نقش دارد. اگرچه نقش پروتئین‌های hypothetic نیازمند بررسی‌های بیشتر است ولی تحقیقات نشان داده که این پروتئین‌ها به همراه برخی پروتئین‌های دیگر نقش حیاتی در هیدرولیز سلولز دارند (Znameroski & Glass, 2013).

ژنوتیپ‌های برتر در تولید قند: نتایج حاصل از میزان قند تولید شده توسط هضم آنزیمی در ۱۶۷ ژنوتیپ مورد بررسی، نشان دهنده تنوع بالای بین ژنوتیپ‌ها برای صفت میزان قند تولیدی بود. ژنوتیپ‌های دارای بالاترین میزان قند تولیدی با هضم توسط آنزیم سلولاز به ترتیب عبارتند از ژنوتیپ‌های شماره، ۷۱۷، ۶۹۲، ۶۵۶، ۶۴۱، ۷۱۸، ۶۴۷، ۶۶۹ و ۷۱۵ همچنین ژنوتیپ‌های

دارای بالاترین میزان قند تولیدی با هضم توسط آنزیم زایلاناز به ترتیب شامل ژنوتیپ‌های شماره ۶۹۲، ۶۵۶، ۷۱۷، ۶۴۷، ۷۱۵، ۷۳۱، ۷۵۷، ۷۱۸، ۶۵۱، ۶۴۱ و ۶۰۳ بودند. برخی از ژنوتیپ‌ها قابلیت تولید میزان قند بالایی در اثر فرایند هضم توسط هر دو آنزیم سلولاز و زایلاناز را دارا می‌باشند. ژنوتیپ‌های شماره ۶۴۱، ۶۴۷، ۶۵۶، ۶۹۲، ۷۱۵، ۷۱۷ و ۷۱۸ دارای قابلیت هضم پذیری بالا و تولید قند بیشتر در فرایند هضم توسط هر دو آنزیم سلولاز و زایلاناز بودند.

جدول ۳. ژن‌های کاندید شناسایی شده برای QTLها

Table3. Candidate genes identified for QTLs

مکان کنترل‌کننده صفت کمی QTL	شناسه ژن Gene ID	شروع start	پایان end	رشته Strand	عملکرد ژن Gene function
qXYL7A , *qCEL7A*	*TraesCS7A03G0782000LC*	460052293	460056363	-	Hypothetical protein
	TraesCS7A03G0781900LC	459927620	459937618	-	Protein kinases

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق منجر به معرفی سه QTL مرتبط با صفت میزان قند آزاد شده از زیست‌توده لیگنوسلولزی گردید. QTLهای *qCEL6D* و *qCEL7A*، بر روی کروموزم‌های 7A و 6D موثر بر میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم سلولاز و همچنین مکان کنترل‌کننده صفت کمی *qXYL7A* مرتبط با میزان قند آزاد شده توسط هضم با آنزیم زایلاناز روی کروموزوم 7A، نشان‌دهنده نقش ژنتیکی مهم این مناطق در کنترل صفات مرتبط با هضم آنزیمی زیست‌توده گندم می‌باشد. QTLهای شناسایی شده در این پژوهش به‌عنوان ناحیه کاندید مهمی برای شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفت مورد نظر پیشنهاد می‌شوند. به‌کارگیری نشانگرهای با تراکم بالا، مانند نشانگرهای SNP، می‌تواند میزان پیوستگی ژنتیکی (LD) بین نشانگرهای مجاور را افزایش داده و دقت در ریزمکان‌یابی QTLها را بهبود ببخشد. همچنین ژن‌های کاندید شناسایی شده در این مناطق ژنومی می‌توانند هدف مناسبی برای مطالعات بیشتر و به‌کارگیری در برنامه‌های آینده‌ی به‌نژادی در زمینه بهبود خصوصیت هضم‌پذیری آنزیمی زیست‌توده گندم نان باشند. استفاده از ژن‌های معرفی شده در پروژه‌های اصلاحی می‌تواند موجب افزایش میزان قند به دست آمده از کاه و در نتیجه باعث افزایش ارزش اقتصادی ضایعات کشاورزی گردد. همچنین این تحقیق منجر به شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در زمینه تولید قند گردید که این ژنوتیپ‌ها می‌توانند در پروژه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام با قابلیت تولید قند بیشتر مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری: از پژوهشکده فناوری و تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل حمایت مالی برای انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in

lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, *18*(11), 768-778. https://doi.org/10.1002/elsc.201800039

Battan, B., Sharma, J., Dhiman, S. S., & Kuhad, R. C. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by Bacillus pumilus ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, *41*(6-7), 733-739. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.006

Domingues, S. Z., Timmers, L. F. S., & Granada, C. E. (2022). Cellulase production by bacteria is a strain-specific characteristic with a high biotechnological potential. A review of cellulosome of highly studied strains. *Cellulose*, *29*(15), 8065-8083. https://doi.org/10.1007/s10570-022-04790-5

Eun, J.-S., Beauchemin, K & ,.Schulze, H. (2007). Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. *Journal of Dairy Science*, *90*(3), 1440-1451. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71629-6

Gandhi, A., & Oelmüller, R. (2023). Emerging Roles of Receptor-like Protein Kinases in Plant Response to Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), 14762. https://doi.org/10.3390/ijms241914762

Gomiero, T. (2016). Soil degradation, land scarcity and food security: Reviewing a complex challenge. *Sustainability*, *8*(3), 281. https://doi.org/10.3390/su8030281

Grasser, L., Fadel, J., Garnett, I., & DePeters, E. (1995). Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *Journal of Dairy Science*, *78*(4), 962-971. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76711-X

Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 550-567. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032

Gupta, M. N., & Bisaria, V. S. (2018). Stable cellulolytic enzymes and their application in hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Journal*, 13(6), 1700633. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07322-2

Hussain, M ,.Mirza, M., Nawaz, H., Asghar, M., & Ahmed, G. (2019). Effect of exogenous protease, mannanase, and xylanase supplementation in corn and high protein corn DDGS based diets on growth performance, intestinal morphology and nutrient digestibility in broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21(04), eRBCA-2019-1088. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1088

Jahani, M., Mohammadi-Nejad, G., Nakhoda, B., & Rieseberg, L. H. (2019). Genetic dissection of epistatic and QTL by environment interaction effects in three bread wheat genetic backgrounds for yield-related traits under saline conditions. *Euphytica*, 215(6), 103. https://doi.org/10.1007/s10681-019-2426-1

Kamm, B., & Kamm, M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(2), 137-145. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Nagendran, R. (2011). Agricultural waste and pollution. Waste, *Academic Press*, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381475-3.10024-5

Nguyen, D. T., Gomez, L. D., Harper, A., Halpin, C., Waugh, R., Simister, R., Whitehead, C., Oakey, H., Nguyen ,H. T., & Nguyen, T. V. (2020). Association mapping identifies quantitative trait loci (QTL) for digestibility in rice straw. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 1-16. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01807-8

Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A ,. Frederick Jr, W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., & Liotta, C. L. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, *311*(5760), 484-489. https://doi.org/10.1126/science.1114736

Sardouei-Nasab, S., Mohammadi-Nejad, G., & Nakhoda, B. (2024). Identification of stable QTLs and candidate genes associated with plant height and spike length in common wheat. *Crop and Pasture Science*, *75* (1). https://doi.org/10.1071/CP23197

Sharma, D., Chaudhary, R., Kaur, J., & Arya, S. K. (2020). Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *25*, 101604. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101604

Silveira, M. H. L., Morais, A. R. C., da Costa Lopes, A. M., Olekszyszen, D. N., Bogel-Łukasik, R., Andreaus, J., & Pereira Ramos, L. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*, *8*(20), 3366-3390. https://doi.org/10.1002/cssc.201500282

Taha, M., Foda, M., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Adetutu, E., & Ball, A. (2016). Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. *Current Opinion in Biotechnology*, *38*, 190-197 . https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.012

Tian, S.-Q., Zhao, R.-Y., & Chen, Z.-C. (2018). Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*, 483-489. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.113

Tuck, C. O., Pérez, E., Horváth, I. T., Sheldon, R. A., & Poliakoff, M. (2012). Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science*, *337*(6095), 695-699. DOI:10.1126/science.1218930

Udhaya Kumar, M., Arockiam Jeyasundar, P. G. S., Ayyappa Das, M., Azeem, M., Manon Mani, V., & Ayswaria, R .(2025). Recombinant DNA Technology in the Improvement of Microbial Enzyme Production. *Microbial Enzymes: Production, Purification and Industrial Applications*, *2*, 1-22. https://doi.org/10.1002/9783527844340.ch37

Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*, *26*(3), 753. https://doi.org/10.3390/molecules26030753

Vogt, E. T., & Weckhuysen, B. M. (2024). The refinery of the future. *Nature*, 629(8011), 295-306. https://doi.org/10.1002/biot.201700633

Wang, X., Pang, Y., Zhang, J., Zhang, Q., Tao, Y., Feng, B., Zheng, T., Xu, J., & Li, Z. (2014). Genetic background effects on QTL and QTL× environment interaction for yield and its component traits as revealed by reciprocal introgression lines in rice. *The Crop Journal*, *2*(6), 345-357. https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.06.004

Zheng, Q., Zhou, T., Wang, Y., Cao, X., Wu, S., Zhao, M., Wang, H ,.Xu, M., Zheng, B., & Zheng, J. (2018). Pretreatment of wheat straw leads to structural changes and improved enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, *8*(1), 1321. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19517-5

Znameroski, E. A., & Glass, N. L. (2013). Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels*, *6*, 1-8. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-6