



دانشکده علوم

جلسه دفاع از رساله دکتری

عنوان:

ارزیابی تنوع ژنتیکی و تأثیر رژیم‌های غذایی حاصل از زیست پسماندها و پروبیوتیک‌های

Lactobacillus acidophilus و *Bifidobacterium bifidum* بر پارامترهای زیستی لارو *Tenebrio molitor*
Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae)

ارائه دهنده: رضیه رشیدی ایل ذوله

زمان: ۱۴۰۵/۰۷/۲۹ ساعت ۱۱:۰۰



اینجانب رضیه رشیدی، در سال ۱۳۹۷ در مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی، گرایش بیوسیستماتیک جانوری، در دانشگاه رازی پذیرفته شدم و تحصیلات خود را در این مقطع آغاز کردم. پس از گذراندن واحدهای نظری فعالیتهای پژوهشی خود را در زمینه حشرات خوراکی، به‌ویژه سوسک زرد آرد (*Tenebrio molitor*)، با تمرکز بر بررسی تأثیر دما در محدوده ۲۲ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی رژیم‌های غذایی مبتنی بر سبوس غلات مختلف در سطوح جایگزینی ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰ درصد به‌جای سبوس گندم ادامه دادم و در شهریورماه ۱۴۰۰ از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود دفاع کردم و موفق به کسب رتبه اول در میان دانش‌آموختگان این مقطع شدم.

در سال ۱۴۰۱، در ادامه مسیر علمی و پژوهشی خود، در مقطع دکتری تخصصی همان رشته و گرایش، در دانشگاه رازی پذیرفته شدم و تحصیلات تکمیلی خود را در این دانشگاه ادامه دادم. در طول این دوره، فعالیتهای علمی و پژوهشی خود را با تمرکز بر

مطالعات مولکولی، بررسی تنوع ژنتیکی و ویژگی‌های زیستی و تکوینی حشرات خوراکی، به‌ویژه *Tenebrio molitor*، و همچنین بهره‌گیری از ظرفیت این حشرات در تبدیل زیستی پسماندهای کشاورزی و غذایی گسترش دادم و در نهایت موفق به کسب رتبه اول در مقطع دکتری نیز شدم.

مهارت‌های علمی و پژوهشی اینجانب شامل پرورش و مدیریت حشرات در شرایط کنترل‌شده‌ی آزمایشگاهی، طراحی و اجرای آزمایش‌های زیستی، تغذیه‌ای و رفتاری، انجام تلاقی‌های کنترل‌شده، استخراج DNA، انجام PCR، آماده‌سازی و تحلیل توالی‌های ژنی، بررسی تنوع ژنتیکی و هاپلوتیپ‌ها، کشت باکتری، فرمولاسیون جیره‌های غذایی، سنجش شاخص‌های رشد و تولیدمثل، اندازه‌گیری ماکرومولکول‌ها، ریزمغذی‌ها، ویتامین‌ها، عناصر معدنی و فلزات سنگین، ارزیابی کارایی تبدیل خوراک، تحلیل جدول زندگی سن-مرحله دوجنسی (Age-Stage, Two-Sex Life Table) با استفاده از نرم‌افزار TWOSEX-MSChart و تسلط بر نرم‌افزارهای تخصصی آماری و مولکولی است. در طول دوران تحصیل و فعالیت‌های پژوهشی، افتخار بهره‌مندی از دانش، تجربه و راهنمایی‌های ارزشمند اساتید گران‌قدر، دکتر وحید اکملی، دکتر احسان صادقی، دکتر سمیه اسمعیلی رینه، دکتر نصرالله رستگار پویانی، دکتر احمد قارزی، را داشته‌ام که نقش ارزنده‌ای در ارتقای دانش تخصصی و شکل‌گیری مسیر علمی و پژوهشی اینجانب ایفا کرده‌اند.

اعضای کمیته دفاع از رساله

ردیف	نام و نام خانوادگی	سمت	مرتبه علمی
۱	دکتر وحید اکملی	استاد راهنمای اول	دانشیار
۲	دکتر احسان صادقی	استاد راهنمای دوم	استاد
۵	دکتر نصرالله رستگار پویانی	داور داخلی	استاد
۶	دکتر احمد قارزی	داور داخلی	دانشیار
۷	دکتر مریم عزیزی (دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه)	داور خارجی	دانشیار
۸	دکتر بهروز تاجدار (دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه)	داور خارجی	استادیار
۹	دکتر رعد چگل	نماینده تحصیلات تکمیلی	استادیار

چکیده

مقدمه: تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، تغییرپذیری فنوتیپی و تفاوت در ویژگی‌های زیستی و تکوینی از موضوعات مهم در بیوسیستماتیک جانوری به شمار می‌روند که بررسی آن‌ها به شناخت تمایز میان سویه‌ها و ارتباط احتمالی ویژگی‌های ژنتیکی با صفات فنوتیپی کمک می‌کند. سوسک زرد آرد (*Tenebrio molitor*) با برخورداری از فنوتیپ‌های رنگی زرد و سیاه و تفاوت در برخی صفات زیستی و تولیدمثلی، گونه‌ای مناسب برای بررسی این تغییرپذیری و پاسخ‌های تکوینی به شرایط محیطی و تغذیه‌ای محسوب می‌شود. از سوی دیگر، افزایش تقاضا برای منابع پروتئینی، پیامدهای زیست‌محیطی دامداری سنتی و انباشت پسماندهای کشاورزی و غذایی، ضرورت توسعه سامانه‌های تولیدی پایدار مبتنی بر اقتصاد چرخشی را افزایش داده است. توانایی *T. molitor* در تبدیل زیستی پسماندهای آلی به زیست‌توده‌ای با ارزش تغذیه‌ای، ظرفیت کاربردی این گونه را برجسته می‌سازد. پژوهش حاضر با رویکردی تلفیقی

در بیوسیستماتیک جانوری، زیست‌شناسی تکوینی و تغذیه، با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه‌های زرد و سیاه، بررسی تأثیر تلاقی‌های متقابل بین‌سویه‌ای بر صفات زیستی و تولیدمثلی و تعیین پاسخ‌های فنوتیپی و تغذیه‌ای این گونه به جیره‌های مبتنی بر زیست‌پسماندها، مکمل پودر شیر و پروبیوتیک‌های *Bifidobacterium bifidum* و *Lactobacillus acidophilus* انجام شد. کارایی تبدیل خوراک و ویژگی‌های فراس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایش‌ها در شرایط کنترل‌شده شامل دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و تاریکی کامل انجام شدند. اثر تلاقی‌های متقابل سویه‌های زرد و سیاه بر صفات زیستی، تولیدمثلی، تغذیه‌ای و جمعیتی بررسی و تنوع ژنتیکی با توالی‌یابی ژن میتوکندریایی COI ارزیابی شد. همچنین، پنج نوع پسماند کشاورزی شامل کاه جو، کاه گندم و بقایای عدس، نخود و ماشک در سطوح مختلف جایگزینی و در ترکیب با پسماندهای تر میوه و سبزیجات بررسی شدند. مجموعه‌ای دیگر از پسماندهای تر و خشک میوه و سبزیجات نیز در آزمایش‌های مستقل ارزیابی شد. اثر مکمل‌سازی پودر شیر در سطوح صفر، ۷، ۱۵ و ۲۵ درصد و تیمارهای پروبیوتیکی شامل شاهد، *B. bifidum* و *L. acidophilus* و ترکیب این دو باکتری نیز مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های رشد و نمو، بقا، تولیدمثلی، کارایی مصرف و تبدیل خوراک، ترکیبات تقریبی، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب، عناصر معدنی و فلزات سنگین و پارامترهای جدول زندگی سن-مرحله دوجنسی اندازه‌گیری و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تحلیل توالی‌های ژن COI وجود شش هاپلوتیپ با تنوع هاپلوتیپی 0.0801 ± 0.059 و تنوع نوکلئوتیدی 0.05567 را نشان داد. بیشترین واگرایی ژنتیکی بین گروهی میان والدین زرد و سیاه مشاهده شد (0.037729) و زاده‌های حاصل از تلاقی‌های متقابل، بر اساس میانگین واگرایی ژنتیکی گروهی، به سویه مادری خود نزدیک‌تر بودند؛ با این حال، اشتراک برخی هاپلوتیپ‌ها نشان داد که نشانگر COI به‌تنهایی برای تفکیک کامل منشأ ژنتیکی افراد کافی نیست. این یافته‌ها بیانگر تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای و ضرورت تلفیق شواهد مولکولی و فنوتیپی در بررسی تمایز میان سویه‌ها بودند. تلاقی ماده سیاه $\times$ نر زرد در برخی شاخص‌های زیستی و تغذیه‌ای عملکرد مطلوب‌تری نشان داد و با دوره لاروی ۷۲ روز، وزن لاروی ۱۷۷ میلی‌گرم، محتوای پروتئین ۵۴ درصد، نرخ ذاتی افزایش جمعیت 0.0353 روز⁻¹ و میانگین باروری 372.59 تخم به‌ازای هر ماده همراه بود. زاده‌های حاصل از ماده‌های سویه سیاه نیز به‌طور کلی بقای بیشتر و ناهنجاری‌های رشدی کمتری نشان دادند که بر اهمیت جهت تلاقی و بررسی اثرات احتمالی مادری بر تغییرپذیری فنوتیپی تأکید دارد.

در بسترهای مبتنی بر پسماندهای کشاورزی، نوع پسماند و سطح جایگزینی بر رشد، کارایی تغذیه‌ای و ترکیب شیمیایی لاروها تأثیر معنی‌داری داشتند و ارزش انرژی زیست‌توده تولیدی در محدوده 447.98 تا 495.69 کیلوکالری در 100 گرم قرار گرفت. در آزمایش ترکیب بقایای کشاورزی با پسماندهای تر، نوع کاه و نوع پسماند تر بر شاخص‌های رشد و نمو تأثیرگذار بودند. ترکیب کاه جو و پسماند هندوانه با وزن لاروی 151.35 میلی‌گرم، وزن شفیرگی 142.88 میلی‌گرم و بقای لاروی 100 درصد، عملکرد مطلوبی نشان داد؛ درحالی‌که ترکیب کاه عدس و پسماند هندوانه نرخ تبدیل زیستی 30.22 درصد را ثبت کرد. ارزیابی ترکیب معدنی جیره‌ها نیز نشان داد که نوع پسماند کشاورزی و نوع پسماند تر بر غلظت عناصر معدنی تأثیر معنی‌داری داشتند ($P < 0.001$) و برهم‌کنش آن‌ها برای بیشتر عناصر، به‌جز آهن، معنی‌دار بود. جیره‌های مبتنی بر کاه ماشک از نظر غلظت عناصری مانند روی، کلسیم، پتاسیم و فسفر مقادیر بالاتری نسبت به شاهد داشتند و افزودن پسماند کاهو نیز به‌طور کلی با افزایش غلظت عناصر معدنی همراه بود.

در میان پسماندهای تر، تیمار موز با دوره لاروی 63 روز و وزن نهایی حدود 177 میلی‌گرم، عملکرد برجسته‌ای در تولید سریع زیست‌توده نشان داد و پس از آن، خیار با دوره لاروی 67.37 روز و وزن 169.28 میلی‌گرم قرار گرفت. در برخی تیمارهای پسماند

تر، الگوی U شکل مرگ‌ومیر شفیرگی مشاهده شد؛ به‌طوری‌که در تیمار هویج، بیشترین تلفات در سطح ۲۵ درصد به ۲۰۰۹۴ درصد رسید و در سطوح بالاتر کاهش یافت. ارتباط احتمالی این الگو با تغییر نسبت سبوس و تأثیر فیتات بر فراهمی زیستی روی و فرایندهای دگردیسی به‌عنوان تبیینی احتمالی مطرح شد. این تفاوت‌ها نقش شرایط تغذیه‌ای را در تغییرپذیری فنوتیپی و انعطاف‌پذیری تکوینی گونه نشان دادند. مکمل‌سازی با ۱۵ درصد پودر شیر، مناسب‌ترین توازن کلی را میان شاخص‌های رشد و بقا ایجاد کرد. همچنین، تیمار پروبیوتیکی ترکیبی *B. bifidum* و *L. acidophilus* موجب بهبود عملکرد زیستی و تغذیه‌ای شد؛ به‌طوری‌که محتوای پروتئین به ۵۷۰۲۹ درصد، کارایی تبدیل غذای بلعیده‌شده به ۳۵۰۷۶ درصد و طول عمر بالغین به ۸۱۰۵۷ روز رسید. بقای لاروی و شفیرگی نیز در این تیمار به‌ترتیب ۱۰۰ و ۹۸ درصد بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان دادند که سویه‌های زرد و سیاه *T. molitor* علاوه بر رنگ بدن، در ویژگی‌های ژنتیکی و برخی صفات زیستی، تولیدمثلی، تکوینی و تغذیه‌ای دارای تغییرپذیری درون‌گونه‌ای هستند. شناسایی هاپلوتیپ‌های متفاوت و واگرایی ژنتیکی میان سویه‌ها، همراه با تفاوت عملکرد زاده‌های حاصل از تلاقی‌های متقابل، اهمیت تلفیق داده‌های مولکولی و فنوتیپی را در مطالعات بیوسستماتیک جانوری نشان داد. عملکرد مطلوب‌تر برخی زاده‌های حاصل از ماده‌های سیاه نیز ضرورت بررسی اثرات احتمالی مادری را برجسته کرد؛ هرچند نزدیکی ژنتیکی زاده‌ها به سویه مادری بر اساس COI باید با توجه به وراثت مادری DNA میتوکندریایی تفسیر شود. همچنین، تفاوت در سرعت رشد، مدت نمو و عملکرد زیستی میان تیمارهای غذایی نشان داد که شرایط تغذیه‌ای نقش مهمی در تغییرپذیری فنوتیپی و انعطاف‌پذیری تکوینی این گونه دارد. این یافته‌ها زمینه‌ای برای بررسی سازوکارهای زمان‌بندی تکوین، از جمله فرضیه هتروکرونی، فراهم می‌کنند؛ بااین‌حال، تفاوت مدت نمو ناشی از جیره غذایی به‌تنهایی شاهی بر هتروکرونی تکاملی نیست. از نظر کاربردی، استفاده هدفمند از زیست‌پسماندها، مکمل‌سازی با ۱۵ درصد پودر شیر و تیمار پروبیوتیکی ترکیبی، ظرفیت بهبود رشد، کارایی تبدیل خوراک و کیفیت تغذیه‌ای زیست‌توده را نشان داد. تفاوت در ترکیب معدنی جیره‌ها نیز بر اهمیت کیفیت بستر غذایی در سامانه‌های پرورش تأکید داشت. در مجموع، تلفیق رویکردهای ژنتیکی، فنوتیپی، تکوینی و تغذیه‌ای در این پژوهش، ضمن گسترش شناخت تنوع درون‌گونه‌ای *T. molitor*، چارچوبی برای مطالعات تکمیلی بیوسستماتیک جانوری، انتخاب سویه‌های مناسب و طراحی جیره‌های هدفمند در راستای تبدیل زیستی پسماندها و توسعه سامانه‌های تولید پایدار مبتنی بر اقتصاد چرخشی فراهم کرد.

Abstract:

Introduction: Intraspecific genetic diversity, phenotypic variation, and differences in biological and developmental traits are important aspects of animal biosystematics, providing insights into strain differentiation and potential associations between genetic characteristics and phenotypic traits. The yellow mealworm, *Tenebrio molitor*, exhibits distinct yellow and black color phenotypes and variation in certain biological and reproductive traits, making it a suitable species for investigating intraspecific variation and developmental responses to environmental and nutritional conditions. Meanwhile, increasing demand for protein sources, the environmental impacts of conventional livestock production, and the accumulation of agricultural and food wastes have intensified the need for sustainable production systems based on circular economy principles. The ability of *T. molitor* to bioconvert organic residues into nutritionally valuable biomass highlights its potential for such systems. Accordingly, this study adopted an integrative approach encompassing animal biosystematics, developmental biology, and nutrition to evaluate genetic diversity between yellow and black strains, investigate the effects of reciprocal interstrain crosses on biological and reproductive traits, and determine phenotypic and nutritional responses to biowaste-based diets, milk powder supplementation, and the probiotics *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. Feed conversion efficiency and frass characteristics were also investigated.

Materials and Methods: Experiments were conducted under controlled conditions of 28 ± 1 °C, $65 \pm 5\%$ relative humidity, and complete darkness. The effects of reciprocal crosses between yellow and black strains on biological, reproductive, nutritional, and population parameters were evaluated, and genetic diversity was assessed by sequencing the mitochondrial COI gene. Five agricultural residues, including barley straw, wheat straw, and lentil, chickpea, and vetch residues, were examined at different dietary replacement levels and in combination with wet fruit and vegetable wastes. Additional wet and dry fruit and vegetable wastes were evaluated in separate experiments. Milk powder supplementation was tested at inclusion levels of 0, 7, 15, and 25%, while probiotic treatments comprised a control, *B. bifidum*, *L. acidophilus*, and their combination. Growth and developmental parameters, survival, reproduction, feed utilization and conversion efficiencies, proximate composition, amino acid and fatty acid profiles, mineral and heavy metal concentrations, and age-stage, two-sex life table parameters were measured and analyzed.

Results: Mitochondrial COI sequence analysis identified six haplotypes, with a haplotype diversity of 0.801 ± 0.059 and nucleotide diversity of 0.05567. The greatest between-group genetic divergence was observed between the parental yellow and black strains (0.037729), while reciprocal-cross offspring showed greater similarity to their maternal strains based on mean group-level genetic divergence. However, shared haplotypes indicated that COI alone could not completely resolve the genetic origin of all individuals. These findings highlighted intraspecific genetic diversity and the importance of integrating molecular and phenotypic evidence in strain differentiation. The black female $\times$ yellow male cross exhibited favorable performance in several biological and nutritional traits, including a larval developmental period of 72 days, larval weight of 177 mg, protein content of 54%, intrinsic rate of increase of 0.0353 day^{-1} , and mean fecundity

of 372.59 eggs per female. Offspring derived from black-strain females also generally exhibited higher survival and fewer developmental abnormalities, emphasizing the importance of cross direction and the need to investigate potential maternal effects on phenotypic variation.

In agricultural waste-based diets, residue type and replacement level significantly affected growth, feed utilization efficiency, and larval chemical composition, with the energy value of the resulting biomass ranging from 447.98 to 495.69 kcal/100 g. In the experiment combining agricultural residues with wet wastes, straw type and wet waste type influenced growth and developmental parameters. The barley straw–watermelon waste combination showed favorable performance, with a larval weight of 151.35 mg, pupal weight of 142.88 mg, and 100% larval survival, whereas the lentil straw–watermelon waste combination achieved a bioconversion rate of 30.22%. Analysis of dietary mineral composition revealed significant effects of agricultural residue type and wet waste type on mineral concentrations ($P < 0.001$), while their interaction was significant for most minerals except iron. Vetch straw-based diets exhibited higher concentrations of minerals such as zinc, calcium, potassium, and phosphorus than the control, and lettuce waste supplementation was generally associated with increased mineral concentrations.

Among wet waste treatments, banana supported rapid biomass production, with a larval developmental period of 63 days and a final larval weight of approximately 177 mg, followed by cucumber, with a developmental period of 67.37 days and a weight of 169.28 mg. A U-shaped pattern of pupal mortality was observed in certain wet waste treatments; in the carrot treatment, mortality peaked at 20.94% at the 25% inclusion level and declined at higher levels. Changes in dietary bran proportions and the potential effects of phytate on zinc bioavailability and metamorphosis were considered possible explanations. These findings highlighted the role of nutritional conditions in phenotypic variation and developmental plasticity. Supplementation with 15% milk powder provided the most favorable overall balance between growth and survival parameters. Moreover, the combined probiotic treatment containing *B. bifidum* and *L. acidophilus* improved biological and nutritional performance, with protein content reaching 57.29%, efficiency of conversion of ingested food reaching 35.76%, and adult longevity reaching 81.57 days. Larval and pupal survival rates under this treatment were 100% and 98%, respectively.

Conclusion: The findings demonstrated that the yellow and black strains of *T. molitor* exhibit intraspecific variation not only in body coloration but also in genetic characteristics and several biological, reproductive, developmental, and nutritional traits. The identification of distinct haplotypes and genetic divergence between strains, together with differences in the performance of reciprocal-cross offspring, highlighted the importance of integrating molecular and phenotypic data in animal biosystematics. The favorable performance of certain offspring derived from black-strain females also emphasized the need to investigate potential maternal effects, although the greater similarity of offspring to maternal strains based on COI must be interpreted in the context of maternal inheritance of mitochondrial DNA. Differences in growth rate, developmental duration, and biological performance among dietary treatments further demonstrated the contribution of nutritional conditions to phenotypic variation and developmental plasticity. These findings provide a basis for investigating developmental timing mechanisms, including the

hypothesis of heterochrony; however, diet-induced differences in developmental duration alone do not constitute evidence of evolutionary heterochrony. From an applied perspective, the targeted use of biowastes, supplementation with 15% milk powder, and combined probiotic treatment demonstrated the potential to improve growth, feed conversion efficiency, and the nutritional quality of larval biomass. Variation in dietary mineral composition further emphasized the importance of substrate quality in insect-rearing systems. Overall, integrating genetic, phenotypic, developmental, and nutritional approaches expanded our understanding of intraspecific variation in *T. molitor* and provided a framework for further animal biosystematics research, strain selection, and targeted diet formulation to support waste bioconversion and sustainable production systems based on circular economy principles.