



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Análisis comparativo de la morfometría, microbiota
y efectos de la endogamia en poblaciones globales
de Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae)*

AUTOR/A Ángel Ramos Martínez

DIRECTOR/ES José Galián Albaladejo

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Análisis comparativo de la morfometría, microbiota
y efectos de la endogamia en poblaciones globales
de Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae)*

AUTOR/A Ángel Ramos Martínez

DIRECTOR/ES José Galián Albaladejo

2025



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Ángel Ramos Martínez, habiendo cursado el Programa de Doctorado Biodiversidad y Gestión Ambiental de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

y dirigida por:

D.: José Galián Albaladejo

D.:

D.:

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 07/08/2025

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.





UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Comparative analysis of morphometrics, microbiota and inbreeding effects on global populations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

D. Ángel Ramos Martínez

2025



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos
de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor*
(Coleoptera: Tenebrionidae)

Ángel Ramos Martínez

2025

Escuela Internacional de Doctorado

Universidad de Murcia

Director:

Dr. José Galián Albaladejo

El trabajo titulado “Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)” realizado por Ángel Ramos Martínez en el Área de Biología Animal del Departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad de Murcia bajo la dirección del Doctor José Galián Albaladejo como parte del proyecto “Diagnóstico de enfermedades y control de patógenos en la insecticultura”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023, con referencia CPP2022-009725.



El trabajo titulado “Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)” realizado por Ángel Ramos Martínez en el Área de Biología Animal del Departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad de Murcia bajo la dirección del Doctor José Galián Albaladejo como parte del proyecto “Insect-IMP: Knowledge Transfer for Improved Insect Breeding” financiado por la COST Action CA22140.



El trabajo titulado “Análisis comparativo de la morfometría, microbiota y efectos de la endogamia en poblaciones globales de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).” realizado por Ángel Ramos Martínez en el Área de Biología Animal del Departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad de Murcia bajo la dirección del Doctor José Galián Albaladejo como parte del proyecto “Assessment of alternatives based on insects to reduce the carbon footprint and promote the circular economy in the valorization of agri-food by-products (Insect-Ecoval)”.



“No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente,
sino la que mejor se adapta al cambio”
Charles Darwin

Esta tesis representa el resultado de un proceso de adaptación continua,
donde el esfuerzo ha sido la constante que ha guiado mi metamorfosis académica.
Ángel Ramos

Agradecimientos

A veces me cuesta creer que haya llegado hasta aquí. Esta tesis es el resultado de años de esfuerzo, dedicación, momentos de entusiasmo y otros de absoluto agotamiento. Ha sido un camino largo, lleno de curvas, pero también de personas que lo han hecho más llevadero, más posible. Si algo tengo claro es que no he llegado solo, y por eso estas líneas son para agradecer, desde lo más profundo, a quienes me han acompañado en esta transformación.

En primer lugar, a mis padres Natividad Martínez López y Ángel Ramos Castro. Porque esta tesis es más suya que mía. Por su apoyo constante, su paciencia infinita, su fe ciega en mí incluso cuando yo mismo dudaba. A mi madre, especialmente, por enseñarme desde pequeño a ser constante, a no rendirme, a luchar por mis metas incluso cuando era inmaduro y me sentía por detrás de los demás. Ha sido una referencia silenciosa y firme, y gran parte de lo que he conseguido se lo debo a su ejemplo.

A mi abuelo Teodoro Martínez López, que ya no está, pero está. Él, junto con mi padre, me inculcó el amor por la biología, por el campo, por observar y entender la vida desde la raíz. Siempre confió en mí, incluso cuando yo solo era un niño curioso. Ahora puedo decir “lo conseguimos, como prometimos”. Esta tesis también es un homenaje a su memoria.

A José Galián, mi tutor, que ha sido mucho más que eso. Gracias por tu guía científica con *Tenebrio molitor*, por estar cuando todo parecía perdido, por confiar cuando incluso yo me cuestionaba. Tu apoyo ha sido fundamental, y siempre lo recordaré con gratitud sincera.

Al propio *T. molitor*, sí, al insecto. Aunque jamás lo entenderé (o quizás sí), ha sido protagonista silencioso de todo este proceso. Desde el TFG hasta hoy, me ha dado alegrías inesperadas. Quién iba a pensar que algo tan pequeño, tan aparentemente insignificante (incluso “asqueroso” para algunos), pudiera dar tanto de sí.

A mi más cercano apoyo Irene García Martín. Aunque solo lleva un año y medio acompañándome en esta locura, ha sufrido más de lo que debería: mis silencios, mis momentos de estrés, mi sequía social. Gracias por estar, por aguantar y por animarme.

A Pilar, compañera y antigua tutora de grado. Exigente, sí. Dura, también. Pero siempre empujándome a más, a no conformarme, a ir más allá. Gracias por enseñarme a querer ser mejor y presentarme a la especie *T. molitor*.

A Noelia Fernández y Roberto Sánchez, por abrirme las puertas de su casa en Salamanca cuando más lo necesitaba. En momentos de tristeza y estrés, me dieron calor humano, refugio y ánimo. Nunca lo olvidaré.

A mis compañeros de Murcia —Álvaro, Andrés, Jesús, Muhammad— por las ideas compartidas, las conversaciones largas y las pequeñas pero valiosas inquietudes científicas que alimentaron este trabajo. En especial Ana del laboratorio del departamento, que siempre estuvo dispuesta a echar una mano, con una sonrisa, sin una sola queja. Una persona de las que hacen falta más.

Y por supuesto, a mis compañeros de Valladolid: a Masalo, fiel compañero de aventuras; a mis compañeros de Covaresa —Pérez, Rodrigo, Salgado, Ortega, Urtiaga— y a mi coreano favorito, Jaesu Lee, por las “terapias” que tanto bien me hicieron. Gracias por las risas, los consejos, y por hacer que este camino fuese más llevadero.

Y finalmente, a toda esa gente que, de una forma u otra, directa o indirectamente, ha dejado su huella en este proceso. A quienes ofrecieron ayuda sin que la pidiera, a quienes me hicieron preguntas que me obligaron a pensar, a quienes simplemente estuvieron.

Gracias. De verdad.

CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	27
Introducción general	29
El creciente interés en los insectos criados por el ser humano	30
<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	32
Origen, expansión global y variabilidad de <i>Tenebrio molitor</i>	34
Efectos de la endogamia y el vigor híbrido en la cría intensiva de <i>Tenebrio molitor</i>	35
Influencia de la dieta en la microbiota de <i>Tenebrio molitor</i> : aparición de bacterias beneficiosas y potencialmente patógenas	36
OBJETIVOS	39
Objetivos generales de la tesis	41
Objetivos del Capítulo 1: Revisión sistemática sobre endogamia e insectos criados ...	41
Objetivos del Capítulo 2: Hibridación y caracteres productivos	41
Objetivos del Capítulo 3: Morfometría geométrica en el análisis evolutivo	42
Objetivos del Capítulo 4: Variabilidad de la microbiota entre poblaciones	42
Objetivos del Capítulo 5: Efecto de la dieta sobre la microbiota	42
Objetivos del Capítulo 6: Patógenos y probióticos en <i>T. molitor</i>	43
RESUMEN	45
CAPÍTULO 1	53
¿Por qué es importante estudiar la endogamia? una revisión sistemática de sus efectos en las poblaciones de insectos cautivos, especialmente centrada en la especie comestible <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae), según las directrices PRISMA.	53
Resumen	55
Palabras clave	55
Introducción	57
Métodos	57
Búsqueda sistemática	58
Criterios de inclusión	58
Criterios de exclusión	58
Búsqueda manual	59
Resultados	59
Discusión	61
Efectos de la endogamia sobre el comportamiento y los rasgos reproductivos en insectos	62
Incremento en la homocigosidad y disminución de la diversidad genética	64

Papel de las hormonas en estudios de endogamia	64
Endogamia y respuestas inmunitarias en insectos	65
CAPÍTULO 2.....	71
Efectos de la endogamia en los insectos: Datos experimentales en la producción intensiva de <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera:Tenebrionidae)	71
Resumen	73
Palabras clave.....	73
Introducción	75
Materiales y métodos	76
Origen y cría de los insectos	76
Diseño de los cruces y configuración experimental.	76
Recolección de muestras.....	77
Mediciones morfológicas y fenotípicas	77
Análisis estadístico.....	79
Control de calidad y ética.....	79
Resultados.....	80
Análisis descriptivo.....	80
Análisis Inferencial	82
Discusión.....	85
CAPÍTULO 3.....	89
Salvando las distancias: ¿son los kilómetros la única distancia entre las poblaciones mundiales de <i>Tenebrio molitor</i>? Una visión general mediante morfometría geométrica	89
Resumen	91
Palabras clave.....	91
Introducción	93
Materiales y métodos	94
Especímenes.....	94
Preparación de especímenes	95
Captura de imágenes.....	95
Definición de landmarks	95
Adquisición y procesamiento de datos morfométricos	96
Análisis estadístico.....	96
Software utilizado para el análisis	96
Control de calidad	96
Resultados.....	96
Análisis exploratorio	97

Análisis comparativos y estadísticos	98
Análisis según el método de cría	98
Análisis por origen geográfico.....	99
Análisis de las poblaciones españolas	101
Valores atípicos	101
Discusión.....	101
CAPÍTULO 4.....	103
Efectos de la dieta y el origen geográfico en la microbiota intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera:Tenebrionidae)	103
Resumen	105
Palabras clave.....	105
Introducción	107
Materiales y métodos	108
Recolección de larvas y diseño experimental.....	108
Conservación de las larvas	110
Extracción intestinal	110
Extracción de ADN	110
Análisis de comunidades bacterianas	111
Resultados.....	111
Análisis de diversidad alfa	111
Análisis de diversidad beta.....	122
Discusión.....	131
CAPÍTULO 5.....	133
Modulación de la microbiota intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> mediante subproductos fúngicos: comparación entre micelio y carpóforo	133
Resumen	135
Palabras clave.....	135
Introducción	137
Materiales y métodos	137
Recogida de larvas.....	138
Conservación de larvas.....	138
Extracción intestinal	138
Extracción de ADN	139
Análisis de la comunidad bacteriana	139
Resultados.....	140
Diversidad alfa.....	140

Diversidad beta	147
Discusión.....	148
CAPÍTULO 6.....	151
Evaluación de los efectos de diferentes microorganismos sobre <i>Tenebrio molitor</i> y aplicación de <i>Pediococcus pentosaceus</i> como probiótico potencial.....	151
Resumen	153
Palabras clave.....	153
Introducción	154
Materiales y métodos	155
Recolección de diferentes colonias de <i>T. molitor</i>	155
Extracción de intestinos e identificación de las bacterias más relevantes	155
Aislamiento de las colonias de microorganismos utilizados	156
Cría de las poblaciones experimentales	157
Tratamientos experimentales	157
Monitoreo del experimento	159
Análisis estadístico.....	160
Control de calidad	160
Consideraciones éticas	160
Resultados.....	161
Análisis descriptivo.....	161
Análisis inferencial	169
Comparación global	170
Comparación integral	173
Discusión.....	175
CONCLUSIONES	177
REFERENCIAS	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1: Variedad de escarabajos existentes.

Figura 2: Placa de Petri sembrada con microorganismos.

Capítulo 1

Figura 1: Palabras clave utilizadas para la búsqueda bibliográfica en Internet. La estrategia de búsqueda combinó términos relacionados con consanguinidad/reproducción, la especie de insecto *T. molitor* y factores como quinina, reproducción, metamorfosis, hormonas, peso y genes mediante operadores booleanos.

Figure 2: Diagrama de flujo PRISMA del proceso de selección de estudios. El diagrama ilustra la metodología paso a paso utilizada para identificar, cribar y seleccionar los estudios pertinentes para la revisión sistemática.

Figura 3: Mapa conceptual de los artículos incluidos en esta revisión sistemática, ordenados por tema de estudio y especie.

Capítulo 2

Figura 1: Diseño experimental y resumen de las variables medidas. La sección superior ilustra las poblaciones y los cruces de *T. molitor* incluidos en el estudio. La sección inferior izquierda presenta el coeficiente de consanguinidad de cada cruce y el número de cruces por caso. La sección inferior derecha resume las variables medidas: color, peso, malformaciones y longitud.

Figura 2: Las malformaciones estudiadas se basaban en defectos abdominales para los especímenes estudiados de *T. molitor*, concretamente casos en los que el abdomen sobresalía anormalmente entre los élitros.

Figura 3: Se recogieron datos de longitud de cada espécimen de *T. molitor* desde la punta del abdomen hasta la cabeza siguiendo el eje longitudinal.

Figura 4: Se tomaron fotografías para determinar el color en el baricentro del triángulo formado por los vértices que delimitan los élitros de cada espécimen de *T. molitor*.

Figura 5: Diagrama de cajas que muestra los valores atípicos de la variable color en los distintos cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK (China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Figura 6: Diagrama de cajas con valores atípicos para la variable peso en cada uno de los cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK

8China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Figura 7: Diagrama de cajas con valores atípicos para la variable longitud en los distintos cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK 8China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Figura 8: Comparación de la condición con las medias ajustadas al tamaño ($\pm 95\%$ C.L.) entre diferentes cruces en adultos de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK 8China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Figura 9: Representación gráfica de los centroides de cada cruce de *T. molitor* en función de las puntuaciones factoriales obtenidas por regresión para cada uno de los individuos del ACP. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK 8China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Capítulo 3

Figura 1: esquema del proceso de estudio seguido, 1 y 2: recogida de poblaciones de *T. molitor* en todo el mundo, 3: captura de imágenes ventrales y dorsales, 4: colocación de puntos de referencia, 5: estudio de los datos y 6: comparación entre poblaciones.

Figura 2: localización de los puntos de referencia elegidos para la posición dorsal y ventral para la especie *T. molitor*.

Figura 3: Variación de la morfología de la población china de *T. molitor* analizada por morfometría geométrica con la media del resto de las poblaciones, representada con un diagrama de nodos y bordes para las posiciones dorsal y ventral.

Figura 4: relación entre el número de componentes principales y % en que inciden en el estudio de la forma para la posición dorsal y ventral para la especie *T. molitor*.

Figura 5: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del método de producción de las poblaciones de *T. molitor* para la posición dorsal. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Figura 6: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del continente de origen de las poblaciones de *T. molitor* para la posición ventral.

Figura 7: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del país de origen de las poblaciones de *T. molitor* para la posición ventral. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Figura 8: análisis de las variables canónicas (CVA) en función de las poblaciones *T. molitor* agrupadas con características similares para la posición ventral.

Figura 9: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) de todas las poblaciones de *T. molitor* encontradas en España para la posición dorsal. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Capítulo 4

Figura 1: Esquema de los materiales y métodos utilizados para determinar la microbiota presente en el intestino de las poblaciones de *T. molitor* estudiadas.

Figura 2: Proporción de cada filo que aparece en los pools obtenidos de cada población de *T. molitor* con distinto origen.

Figura 3: gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de España). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 4: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población silvestre). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 5: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de Egipto). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 6: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de Alemania). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 7: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población del Reino Unido). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 8: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de Corea del Sur). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 9: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de China). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

Figura 10: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población española criada intensivamente.

Figura 11: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población salvaje española.

Figura 12: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población egipcia criada manualmente.

Figura 13: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población alemana criada intensivamente.

Figura 14: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población británica criada intensivamente.

Figura 15: Análisis de componentes principales de los 5 individuos de *T. molitor* de la población surcoreana criada intensivamente.

Figura 16: Análisis de componentes principales de los 5 individuos de *T. molitor* de la población china criada manualmente.

Capítulo 5

Figura 1: diagrama de las dietas utilizadas en cada tratamiento (de arriba abajo: control (salvado), dieta 1 (cuerpo fructífero + salvado), dieta 2 (micelio + salvado)) para la cría de *T. molitor*.

Figura 2: gráfico de barras que representa el filo mostrado para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Figura 3: gráfico de barras que representa las familias mostradas para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Figura 4: gráfico de barras que representa los géneros que aparecen para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Figura 5: gráfico de barras que representa las especies presentes en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Figura 6: diagrama que representa el índice de Shannon para cada tratamiento con *T. molitor*. (Ctrl = control; C20 = tratamiento carpóforo 20% en la dieta, C80 = tratamiento carpóforo 80% en la dieta, M20 = tratamiento micelio 20% en la dieta, M80 = tratamiento micelio 80% en la dieta).

Figura 7: curva de rarefacción para cada tratamiento con *T. molitor*.

Figura 8: dominancia de especies para cada uno de los tratamientos con *T. molitor* estudiados.

Figura 9: diversidad beta para los distintos tratamientos con *T. molitor* y sus réplicas.

Capítulo 6

Figura 1: proceso de cría de cada uno de los ensayos de *T. molitor* y efectos de los microorganismos objeto de estudio.

Figura 2: diagrama de líneas que muestra la evolución de las larvas de *T. molitor* que alcanzaron el estadio de pupa a lo largo del tratamiento con dieta líquida.

Figura 3: diagrama de líneas que muestra la evolución de las larvas de *T. molitor* que alcanzaron el estadio de pupa a lo largo del tratamiento con dieta seca.

Figura 4: diagrama de líneas que muestra la mortalidad de las larvas de *T. molitor* acumulada en el tratamiento por inyección directa.

Figura 5: gráfico tipo BoxPlot para la variable de peso larval de *T. molitor* en cada uno de los tratamientos, en el que aparecen los valores atípicos.

Figura 6: gráfico tipo BoxPlot para la variable de color en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*, en el que aparecen los valores atípicos.

Figura 7: gráfico tipo BoxPlot para la variable de peso en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*, en el que aparecen los valores atípicos.

Figura 8: Gráfico BoxPlot para la variable longitud en cada uno de los tratamientos con *T. molitor* en los que aparecen valores atípicos.

Figura 9: diagramas de barras de la variabilidad del tiempo hasta la pupación y la mortalidad entre los tratamientos secos con *T. molitor*.

Figura 10: diagramas de barras de la variabilidad del color, el peso de las larvas, el peso de los adultos, la longitud y la tasa de malformaciones entre los tratamientos secos con *T. molitor*.

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Capítulo 1

Tabla 1: Resumen de estudios sobre los efectos de la endogamia en insectos. La tabla presenta un resumen de los estudios que examinaron los efectos de la endogamia en insectos, destacando el enfoque de la investigación, la especie estudiada y el tipo de insecto (escarabajo, mosca, grillo o polilla). Se detallan el tamaño de las muestras, las metodologías empleadas y los principales resultados. Estos estudios proporcionan información valiosa sobre cómo influye la endogamia en rasgos biológicos esenciales, como la reproducción, la función inmunitaria y la diversidad genética.

Capítulo 2

Tabla 1: Diseño experimental y cruces entre las poblaciones de *T. molitor* estudiadas.

Tabla 2: Condiciones de cría de las bandejas con los respectivos cruces de *T. molitor* durante el experimento.

Tabla 3: Resultados del test de Kruskal-Wallis (U) y chi-cuadrado (χ^2) para cada variable cuantitativa estudiada en los cruces de *T. molitor*.

Tabla 4: número total de casos con diferencias significativas en las medianas de cada cruce de *T. molitor* en comparación con los demás cruces para cada variable cuantitativa.

Tabla 5: porcentaje para cada variable en el que la mediana entre cada cruce de *T. molitor* presenta diferencias significativas.

Tabla 6: valor de probabilidad para el chi-cuadrado de la variable cualitativa presencia de malformaciones para los cruces de *T. molitor*.

Tabla 7: valor de probabilidad para el coeficiente de Spearman que compara el color (C), la longitud (L), el peso (W) y la frecuencia de malformaciones (M) para cada cruce de *T. molitor*.

Tabla 8: resultados de los análisis ANCOVA de la condición en adultos de *T. molitor*. la longitud es la covariable, y la cruz es el factor fijo.

Tabla 9: matriz de componentes rotada para los componentes con valores superiores a 1 para los componentes 1 y 2 para los cruces de *T. molitor*.

Capítulo 3

Tabla 1. Código del estudio, origen y condiciones de cría para las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 2. Valores posibles para todas las variables estudiadas en las poblaciones de *T. molitor*.

Capítulo 4

Tabla 1: Variables que afectan a las poblaciones de *T. molitor* recogidas y sus posibles valores.

Tabla 2: Valores de cada uno de los componentes de la diversidad beta en los cinco individuos de la población española de *T. molitor* criada intensivamente y los colores que representan a cada individuo.

Tabla 3: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población salvaje española de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Tabla 4: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población egipcia de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Tabla 5: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población alemana de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Tabla 6: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población británica de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Tabla 7: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población surcoreana de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Tabla 8: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población salvaje china de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

Capítulo 5

Tabla 1: Condiciones de la cámara de cría para cada tratamiento dietéticos en las poblaciones de *T. molitor*.

Capítulo 6

Tabla 1: Condiciones de cría de las bandejas con los respectivos tratamientos en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 2: codificación utilizada para trabajar con los distintos tratamientos en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 3: manipulación y características de cada una de las combinaciones estudiadas en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 4: número de diferencias significativas entre un tratamiento y los demás para las variables estudiadas en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 5: tratamientos comparados con sus tratamientos relacionados respectivos en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 6: momentos en los que cambian la tasa de mortalidad y el tiempo hasta la pupación entre diferentes tratamientos en las poblaciones de *T. molitor*.

Tabla 7: momentos en que se modifican la tasa de malformación, coloración, longitud, peso adulto y larval para los tratamientos con dieta seca y húmeda en las poblaciones de *T. molitor*.

INTRODUCCIÓN

Introducción general

Los artrópodos representan el grupo animal más numeroso, diverso y ecológicamente dominante del planeta. Se estima que constituyen más del 85% de las especies animales conocidas (Zhang, 2011), con más de 1,2 millones descritas formalmente y cifras que podrían superar los 5 millones (Stork, 2018; Mora et al, 2011). Incluyen insectos, arácnidos, crustáceos y miriápodos, y su éxito evolutivo radica en una combinación de características: exoesqueleto quitinoso, segmentación corporal, apéndices articulados y una plasticidad fisiológica y ecológica sin parangón (Mark, 2003; Gullan and Cranston, 2014).

Los primeros artrópodos surgieron en el Cámbrico temprano, hace más de 500 millones de años, como demuestran registros fósiles excepcionales en yacimientos como Burgess Shale y Chengjiang (Chen et al, 1994; Briggs et al, 1994). Desde entonces, han colonizado prácticamente todos los hábitats posibles, desde desiertos hasta hábitats polares, pasando por ambientes acuáticos, subterráneos y urbanos. Su capacidad de adaptación, reproducción eficiente y variedad de estrategias alimenticias ha sido clave para su persistencia y diversificación (Figura 1) (Grimaldi and Engel, 2005; Rainford et al, 2014).

Los insectos, en particular, constituyen más del 70% de la diversidad animal conocida (Grimaldi and Engel, 2005). La evolución de la metamorfosis completa, el vuelo y la coevolución con las plantas con flores marcaron hitos evolutivos que dispararon su radiación adaptativa (Farrell, 1998; Misof et al, 2014). Los coleópteros, por ejemplo, forman el orden más numeroso del reino animal, superando las 400.000 especies descritas (Hunt et al, 2007).

Pero más allá de su relevancia biológica, los artrópodos están cobrando un creciente protagonismo en nuestra sociedad. Su estudio y manejo se han convertido en ejes clave en múltiples disciplinas aplicadas: agricultura, ecología, farmacología, medicina, biotecnología y, más recientemente, en alimentación y producción sostenible (Van Huis et al, 2013; Bessa et al, 2020). En las últimas décadas, el interés por la cría y el consumo de insectos ha crecido de forma exponencial, impulsado por la necesidad de encontrar alternativas sostenibles frente a las fuentes convencionales de proteína animal (Van Huis, 2015; Payne et al, 2016).

En paralelo, se ha observado un auge en su producción a escala industrial, con especies criadas en sistemas controlados para su aprovechamiento nutricional, biomédico y ecológico. Se están evaluando insectos como fuente de compuestos bioactivos (antioxidantes, antimicrobianos), quitina, aceites, y fertilizantes orgánicos derivados de sus residuos (Malawey et al, 2021).

Además de sus beneficios productivos, los artrópodos mantienen su papel ecológico insustituible. Son esenciales como polinizadores (Ollerton et al, 2011), recicladores de materia orgánica (Yang and Gratton, 2014), y reguladores de poblaciones mediante redes tróficas complejas (Symondson et al, 2002). Asimismo, las relaciones simbióticas con microorganismos intestinales —ahora objeto de intensa investigación— revelan cómo su fisiología depende en gran medida de sus comunidades microbianas asociadas (Engel and Moran, 2013; Douglas, 2015), abriendo vías para intervenciones como la incorporación de probióticos en su dieta para mejorar rendimiento y salud (Borrelli et al, 2017).

En conjunto, los artrópodos ya no son solo organismos fascinantes por su historia evolutiva y su biodiversidad, sino que también representan una vía estratégica hacia sistemas de

producción más eficientes, éticos y respetuosos con el medio ambiente. Como afirma Edward O. Wilson, “los insectos son los pequeños engranajes que mantienen al mundo en marcha” (Wilson, 1988). Comprenderlos, valorarlos y aprovechar su potencial será esencial en los grandes desafíos ecológicos y alimentarios del siglo XXI.



Figura 1: Variedad de escarabajos existentes (<https://culturacientifica.com/2018/07/29/una-desorbitada-debilidad-por-los-escarabajos/>)

El creciente interés en los insectos criados por el ser humano

El ser humano ha mantenido una relación compleja con los insectos a lo largo de su historia. Desde los albores de las civilizaciones, diversas especies han sido utilizadas con fines concretos, como la obtención de miel, seda, tintes naturales o incluso como parte de prácticas rituales. Sin embargo, más allá de estos usos tradicionales y localizados, la domesticación y cría sistemática de insectos ha sido históricamente limitada a unas pocas especies. En las últimas décadas, este escenario ha comenzado a cambiar de forma drástica. El interés global por los insectos criados por el ser humano ha crecido exponencialmente, impulsado por la necesidad de desarrollar modelos productivos más sostenibles, eficientes y resilientes frente a los retos del siglo XXI (Van Huis et al, 2013).

Entre los factores que explican este renovado entusiasmo, destaca en primer lugar el reconocimiento de los insectos como una fuente alternativa y prometedora de proteína para el consumo humano y animal. Diversos estudios han documentado su elevado valor nutricional, con un contenido en proteínas que puede oscilar entre el 30% y el 80% de su materia seca, así como la presencia de lípidos, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos como la quitina (Finke, 2013; Rumpold and Schlüter, 2013). Además, se ha comprobado que la cría de insectos presenta una eficiencia ecológica muy superior a la del

ganado convencional: consume menos agua y alimento, emite menos gases de efecto invernadero, requiere menor superficie de cultivo y genera una cantidad significativamente inferior de residuos (Oonincx and de Boer, 2012).

El concepto de “mini ganado” ha sido propuesto para describir a los insectos cultivados en sistemas controlados, destacando su potencial como nueva categoría productiva en la industria alimentaria y agrícola (Premalatha et al, 2011). En este contexto, especies como *Tenebrio molitor* (gusano de la harina), *Hermetia illucens* (mosca soldado negra), *Acheta domesticus* (grillo doméstico) y *Gryllobes sigillatus* se han posicionado como los principales candidatos para su explotación a escala industrial (Van Huis et al, 2013; Dobermann et al, 2017). Estas especies presentan ciclos de vida cortos, elevada tasa de conversión alimentaria, adaptabilidad a diversos sustratos y facilidad de manejo, lo cual permite su integración en sistemas intensivos de producción, incluso en entornos urbanos o periurbanos.

A nivel global, organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han promovido activamente la investigación y el uso de insectos comestibles, señalando su potencial para contribuir a la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental (Van Huis, 2015). De hecho, el informe “Edible Insects” publicado por esta institución marcó un punto de inflexión en la percepción pública y académica del tema, al resaltar la viabilidad de los insectos como recurso alimentario y de nutrición. Desde entonces, se han multiplicado los estudios centrados en aspectos biológicos, ecológicos, tecnológicos y regulatorios de la cría de insectos, configurando un nuevo campo multidisciplinar con una notable proyección de crecimiento.

Más allá de la alimentación, los insectos criados por el ser humano ofrecen múltiples aplicaciones en otros sectores. En la agricultura, se utilizan como agentes de control biológico de plagas, polinizadores o productores de biofertilizantes. En la industria farmacéutica y cosmética, se exploran sus propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras o regenerativas. En el ámbito industrial, materiales derivados de su biomasa, como la quitina y la quitosana, se aplican en la elaboración de materiales, adhesivos, membranas y otros compuestos biodegradables. Esta versatilidad convierte a los insectos en verdaderas biofactorías naturales, capaces de integrarse en modelos de economía circular mediante la valorización de residuos orgánicos y subproductos agroindustriales (Parodi et al, 2018).

En este sentido, un aspecto clave del desarrollo de la insecticultura —entendida como la cría técnica y planificada de insectos para usos humanos— es su papel en la valorización de residuos. Muchas especies pueden alimentarse de subproductos agrícolas, desechos orgánicos o residuos alimentarios, convirtiéndolos en biomasa útil con altos rendimientos. Este proceso de bioconversión no solo reduce la carga de residuos, sino que transforma un pasivo ambiental en un activo económico, con bajo costo y alto valor agregado (Surendra et al, 2016).

Sin embargo, el auge de la cría de insectos también implica importantes desafíos técnicos, sanitarios y éticos. La estandarización de protocolos de cría, el control de contaminantes microbianos, la trazabilidad genética de las poblaciones, la aceptación del consumidor, y el desarrollo de marcos regulatorios coherentes y seguros son algunos de los principales retos que enfrenta esta nueva industria. Por ejemplo, aunque se ha avanzado en la inclusión de insectos como ingrediente aprobado en piensos para acuicultura y avicultura

en Europa, aún persisten limitaciones normativas respecto a su uso en alimentos humanos y en otros segmentos de la cadena alimentaria (Turck et al, 2021).

La ciencia también ha comenzado a explorar con mayor profundidad las bases biológicas y ecológicas de las especies criadas. En particular, aspectos como la microbiota intestinal, el metabolismo, la inmunidad, la reproducción, la plasticidad fenotípica y las interacciones tróficas cobran una relevancia creciente, al permitir no solo optimizar la producción sino también garantizar su inocuidad y calidad (Engel and Moran, 2013). La relación simbiótica entre los insectos y sus comunidades microbianas ha revelado funciones claves en la digestión de sustratos complejos, la protección frente a patógenos, y la modulación del desarrollo larval, lo que abre nuevas posibilidades de intervención biotecnológica para mejorar el rendimiento productivo o la funcionalidad del producto final (Douglas, 2015; Schmidt and Engel, 2021).

En síntesis, el interés contemporáneo en los insectos criados por el ser humano responde tanto a necesidades urgentes del sistema alimentario global como a las oportunidades tecnológicas emergentes que ofrece la biología de estos organismos. La cría de insectos ya no se considera una curiosidad marginal ni una alternativa exótica, sino una vía concreta, viable y multifacética hacia un futuro alimentario más justo, eficiente y respetuoso con el entorno. En este marco, el estudio sistemático de especies como *Tenebrio molitor* adquiere un valor estratégico, no solo por su potencial nutricional, sino por su papel como modelo para entender mejor la ecología aplicada, la fisiología productiva y las complejas interacciones entre el animal, su dieta y su microbioma.

***Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)**

El uso de insectos como recurso biológico en la alimentación humana y animal ha experimentado un notable auge en las últimas dos décadas, impulsado por la necesidad de encontrar fuentes de proteínas sostenibles que puedan hacer frente al crecimiento poblacional, la degradación ambiental y los desafíos nutricionales del siglo XXI (Van Huis, 2015; Van Huis et al, 2013). En este contexto, el escarabajo de la harina, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), ha emergido como uno de los insectos más prometedores para su producción a escala industrial, tanto por su elevado valor nutricional como por su adaptabilidad, eficiencia de conversión alimentaria y potencial biotecnológico (Ghaly and Alkoik, 2009; Rumpold and Schlüter, 2013; Van Huis, 2020).

T. molitor es un insecto holometábolo originario de Eurasia pero cosmopolita en su distribución actual, ampliamente conocido por su ciclo de vida relativamente corto, facilidad de cría y tolerancia a distintas condiciones ambientales y dietéticas. Su desarrollo incluye las fases de huevo, larva, pupa y adulto, siendo la etapa larval la de mayor interés para el consumo, ya que en ella alcanza su máximo contenido proteico y lipídico (Oonincx and de Boer, 2012).

Las larvas de *T. molitor* presentan un perfil nutricional altamente competitivo en comparación con otras fuentes animales: entre 47–60% de proteína en base seca, hasta un 35% de lípidos, y una composición equilibrada de aminoácidos esenciales, ácidos grasos insaturados, minerales como hierro y zinc, y vitaminas del grupo B (Finke, 2013; Rumpold and Schlüter, 2013). Este perfil lo convierte en un ingrediente valioso tanto para la

formulación de piensos como para su incorporación en productos alimenticios destinados al consumo humano (Turck et al, 2021).

La aprobación de *T. molitor* como nuevo alimento en la Unión Europea por la EFSA en 2021 (Turck et al, 2021) ha abierto las puertas a un abanico de aplicaciones alimentarias, que incluyen su uso en forma deshidratada, pulverizada o como ingrediente en barritas energéticas, snacks, hamburguesas o pasta. Asimismo, el interés en su uso como alimento funcional ha crecido debido a la presencia de compuestos bioactivos como quitina, péptidos antimicrobianos y antioxidantes naturales.

En la industria ganadera, *T. molitor* se utiliza como suplemento proteico en dietas para aves, peces y cerdos, demostrando resultados positivos en términos de conversión alimentaria, salud intestinal y desarrollo inmune (Mikolajczak et al, 2020). Además, su capacidad para consumir una amplia variedad de subproductos agroindustriales lo convierte en un eslabón estratégico dentro de los sistemas de economía circular y aprovechamiento de residuos orgánicos (Surendra et al, 2016; Parodi et al, 2018).

Como en muchos insectos, la microbiota intestinal de *T. molitor* desempeña funciones clave en procesos fisiológicos del huésped, tales como la digestión de sustratos complejos, la biosíntesis de compuestos esenciales, la modulación del sistema inmunológico y la protección contra patógenos (Engel and Moran, 2013; Douglas, 2015). Estudios recientes han identificado diversos grupos bacterianos dominantes en su intestino, principalmente Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, incluyendo géneros como *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* (Stoops et al, 2016).

El equilibrio de esta comunidad microbiana puede estar influido por factores como la dieta, la densidad de cría, el ambiente físico y las prácticas postcosecha (Campos-Vega et al, 2015). Además, modificaciones en la dieta, tales como la inclusión de hongos, residuos vegetales o compuestos prebióticos y probióticos, pueden inducir cambios significativos en la estructura y función del microbioma intestinal (Gupta and Nair, 2020), lo que a su vez puede impactar el crecimiento, la conversión alimenticia y la seguridad del producto final.

Dada la creciente importancia de *T. molitor* como recurso zootécnico, se han propuesto diversas estrategias de intervención microbiológica para optimizar su producción y calidad. Entre ellas, destaca el uso de probióticos, como *Pediococcus pentosaceus*, con capacidad para modular favorablemente la microbiota intestinal, inhibir patógenos y mejorar parámetros productivos. Este enfoque cobra especial relevancia frente a desafíos como la exposición a patógenos como *Staphylococcus aureus* o la acumulación de micotoxinas producidas por hongos como *Fusarium spp.*, cuyos efectos negativos en la salud larval están documentados.

Aunque la investigación sobre *T. molitor* ha avanzado significativamente, existen aún lagunas importantes de conocimiento, especialmente en lo referente a la variabilidad geográfica de su microbiota, los efectos a largo plazo de dietas funcionales, y la interacción entre factores ambientales y comunitarios. Por ello, son necesarios estudios integrados que consideren factores ecológicos, filogenéticos y tecnológicos para desarrollar protocolos estandarizados que garanticen la inocuidad y eficiencia de su producción en distintos contextos agroindustriales.

Origen, expansión global y variabilidad de *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor, comúnmente conocido como gusano o escarabajo de la harina, es un insecto holometábolo del orden Coleoptera y la familia Tenebrionidae, una de las más diversas del reino animal, con más de 20.000 especies descritas (Matthews et al, 2010). Su valor como fuente de proteína, facilidad de cría y adaptabilidad a ambientes artificiales han despertado un interés creciente, pero su éxito ecológico y productivo no puede entenderse sin atender a su historia evolutiva, biogeográfica y genética.

Los análisis filogenéticos y biogeográficos sitúan el origen del género *Tenebrio* en la región paleártica, probablemente en zonas templadas de Eurasia (Arnett et al, 2002; et al, 2022). *T. molitor* habría evolucionado en hábitats secos y abiertos, adaptándose a explotar sustratos ricos en materia orgánica como granos y semillas almacenadas. Su notable capacidad para sobrevivir sin acceso directo al agua, obteniéndola metabólicamente de los alimentos, facilitó su establecimiento en ambientes marginales como despensas, graneros o molinos, convirtiéndose en comensal humano (Ghaly and Alkoaik, 2009).

Su domesticación parcial comenzó de manera no intencionada con el surgimiento de la agricultura sedentaria en el Neolítico, cuando el almacenamiento prolongado de granos proporcionó un nicho estable para su reproducción. Restos arqueológicos han sido identificados en yacimientos romanos, medievales y modernos de Europa y Asia, lo que confirma su persistencia en contextos humanos desde hace milenios. Posteriormente, su dispersión global se aceleró mediante el comercio de alimentos y el transporte marítimo durante el Imperio Romano y la expansión colonial entre los siglos XVI y XIX, lo que permitió su introducción accidental en América, África y Oceanía (Hagstrum and Subramanyam, 2009). Hoy, *T. molitor* se encuentra distribuido de forma cosmopolita, especialmente en entornos artificiales con condiciones controladas.

Esta expansión, moldeada por factores antrópicos, ecológicos y evolutivos, ha dado lugar a una notable variabilidad morfológica, genética y simbiótica entre sus poblaciones. Estudios han documentado diferencias en tamaño corporal, tasa de desarrollo, masa larval y parámetros reproductivos entre poblaciones geográficamente aisladas, incluso bajo condiciones de laboratorio, reflejando posibles procesos de adaptación local, selección no intencionada y deriva genética (Kacie, 2022; van Broekhoven et al, 2015). Por ejemplo, ejemplares de Asia Central presentan ciclos vitales más cortos y menor tamaño adulto, mientras que las poblaciones del norte de Europa muestran mayor longevidad y masa larval, probablemente como respuesta a climas fríos y mayor estacionalidad en los recursos.

A nivel genético, investigaciones con marcadores mitocondriales (COI y 16S) y nucleares han revelado estructuras poblacionales diferenciadas entre linajes de Europa, América, Asia y África, probablemente consecuencia de eventos fundadores repetidos y cuellos de botella poblacionales durante su dispersión (Liu et al, 2021). La hibridación entre estas poblaciones podría aumentar la variabilidad genética, mitigando riesgos de endogamia en sistemas industriales. Paralelamente, la genómica comparada ha identificado variantes alélicas asociadas a resistencia a patógenos, eficiencia alimentaria y metabolismo que parecen seleccionadas en ambientes de producción intensiva.

Una dimensión especialmente relevante de esta variabilidad es la composición de su microbiota intestinal, que se ha visto influida tanto por el origen geográfico como por el tipo de sustrato alimenticio. Las diferencias microbianas no solo afectan funciones fisiológicas

clave como la digestión, inmunidad y crecimiento larval, sino que también pueden tener aplicaciones prácticas en la mejora del rendimiento productivo. Por ejemplo, cepas europeas presentan mayor abundancia de *Enterococcus* y *Lactobacillus*, mientras que las asiáticas contienen más *Bacillus* y *Pseudomonas*, reflejo de distintas dietas y condiciones de cría (Oliveira-Junior et al, 2019).

Más recientemente, la expansión deliberada de *T. molitor* ha sido impulsada por su industrialización para consumo humano y animal, con centros de producción en América del Norte, Europa, Asia Oriental y América Latina (Van Huis, 2020). Esta explotación intensiva ha llevado a un creciente interés en el estudio de su fisiología, genética y relaciones simbióticas, pero también plantea interrogantes sobre la sostenibilidad del modelo, la conservación de su diversidad genética y los riesgos asociados a escapes ecológicos o transmisión de patógenos.

En conjunto, el origen euroasiático de *T. molitor*, su asociación histórica con el ser humano, su capacidad de adaptación y su variabilidad intraespecífica, explican tanto su éxito evolutivo como su potencial como biofactoría en sistemas de producción alimentaria sostenibles.

Efectos de la endogamia y el vigor híbrido en la cría intensiva de *Tenebrio molitor*

La cría intensiva de insectos comestibles, como *Tenebrio molitor* (gusano de la harina), ha cobrado una importancia estratégica creciente en el contexto de la seguridad alimentaria, la economía circular y la producción sostenible de proteínas. Sin embargo, al igual que ocurre en otros sistemas de producción animal, la selección artificial intensiva, las condiciones de confinamiento y el manejo de poblaciones reducidas pueden generar importantes consecuencias genéticas, como la pérdida de variabilidad, la acumulación de alelos deletéreos y los efectos negativos de la endogamia (Choi et al, 2020).

La endogamia, o reproducción entre individuos emparentados, puede reducir la aptitud biológica de las poblaciones al aumentar la probabilidad de homocigosidad para alelos recesivos deletéreos. En *T. molitor*, varios estudios han documentado que líneas endogámicas presentan reducciones significativas en tasas de fecundidad, viabilidad larval y velocidad de desarrollo, además de un incremento en malformaciones morfológicas y reducción del tamaño adulto (Xu et al, 2013).

Estos efectos se ven agravados en condiciones de cría cerrada y durante varias generaciones sin renovación genética, como suele suceder en instalaciones comerciales. A medida que la variabilidad genética disminuye, también lo hace la capacidad de adaptación a factores ambientales cambiantes o a desafíos sanitarios, comprometiendo la sostenibilidad a largo plazo de las colonias (Booth and Grieshop, 2022).

Frente a la depresión endogámica, una estrategia contrastada en entomocultura es la hibridación de líneas genéticamente divergentes, lo que puede dar lugar al fenómeno conocido como vigor híbrido o heterosis. Este fenómeno describe el aumento del rendimiento en la descendencia heterocigota, observable en rasgos como el crecimiento, la fertilidad y la resistencia a enfermedades (Charlesworth and Willis, 2009).

En el caso específico de *T. molitor*, estudios recientes han mostrado que el cruce entre poblaciones geográficamente distantes mejora el desempeño reproductivo y la eficiencia alimenticia, en comparación con líneas endogámicas mantenidas en condiciones estándar. Este vigor híbrido puede ser aprovechado de forma deliberada para optimizar los rendimientos de producción en sistemas industriales, aunque requiere estrategias de manejo genético activas y monitoreo constante de la diversidad alélica (Gasco et al, 2020).

El manejo genético de poblaciones de *T. molitor* debe por tanto equilibrar la eficiencia productiva con la conservación de la diversidad genética. Mantener múltiples líneas fundadoras, realizar cruces programados entre lotes reproductores y utilizar técnicas moleculares para evaluar la diversidad genómica son prácticas recomendadas para prevenir la fijación de alelos deletéreos y sostener el rendimiento biológico en el tiempo (Liu et al, 2021).

Además, dada la creciente profesionalización del sector de los insectos comestibles, la implementación de programas de mejoramiento genético formalizados, inspirados en modelos ya existentes en otras especies de interés zootécnico, será fundamental para garantizar la estabilidad y seguridad del sistema productivo.

Influencia de la dieta en la microbiota de *Tenebrio molitor*: aparición de bacterias beneficiosas y potencialmente patógenas

La microbiota intestinal es un componente clave en la fisiología de *Tenebrio molitor*, afectando no solo su crecimiento, digestión y eficiencia alimentaria, sino también su resistencia a patógenos y su calidad como fuente proteica en alimentación humana y animal (Garofalo et al, 2019; Grau et al, 2017). Entre los principales factores que modulan la composición y funcionalidad de esta microbiota se encuentra la dieta, la cual puede inducir cambios sustanciales en la abundancia relativa de ciertos grupos bacterianos, promoviendo tanto la aparición de microorganismos con propiedades probióticas como la proliferación de bacterias potencialmente perjudiciales (Jung et al, 2014; Przemieniecki et al, 2020). Dietas basadas en subproductos vegetales, como salvado de trigo o residuos de frutas, tienden a favorecer un microbioma más diverso y equilibrado, rico en bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus*, *Enterococcus* (Figura 2), *Weissella* o *Pediococcus pentosaceus*, muchas de las cuales han demostrado tener propiedades beneficiosas tanto en el insecto como en consumidores humanos o animales (Kingcha et al, 2012; Lecocq et al, 2021; Qi et al, 2021).

En contraste, cuando se utilizan sustratos ricos en azúcares simples, grasas animales o residuos orgánicos fermentables sin control microbiológico, se ha observado un aumento de géneros como *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter* o incluso *Bacillus cereus*, asociados a riesgos sanitarios (Wynants et al, 2018; Urbanek et al, 2020; Guo et al, 2021). Algunas cepas de *Pediococcus pentosaceus* aisladas en el intestino de *T. molitor* han demostrado capacidades antimicrobianas frente a patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, así como beneficios inmunomoduladores, lo que las convierte en candidatas atractivas como probióticos en la producción animal o humana (Nghe and Nguyen, 2014; Stoops et al, 2016; Escobar and Alquicira, 2019; Islam and Yang, 2016). Asimismo, se ha reportado que el uso de estos probióticos en dietas de larvas puede

mejorar su tasa de supervivencia, crecimiento larval y conversión alimenticia (Mikolajczak et al, 2020; Lecocq et al, 2021).



Figura 2: Placa de Petri sembrada con microorganismos. (https://www.freepik.es/fotos-premium/crecimiento-cultivo-bacterias-placa-petri-laboratorio-microbiologia_24756737.htm)

No obstante, el diseño inadecuado de dietas o el uso de sustratos no estabilizados puede provocar desequilibrios ecológicos en el intestino del insecto, facilitando la colonización por microorganismos indeseables. Esto plantea desafíos importantes en términos de seguridad alimentaria, ya que ciertos patógenos podrían resistir tratamientos térmicos si no se aplican con rigurosidad (Oelschlaeger, 2010). Por ello, la formulación de dietas funcionales que promuevan la colonización por bacterias beneficiosas, junto con el uso controlado de prebióticos o probióticos, representa una estrategia prometedora para optimizar la producción de *T. molitor* de forma sostenible, segura y eficiente (Ribeiro et al, 2018; Van Huis, 2020; Jamuna and Jeevaratnam, 2004).

OBJETIVOS

Objetivos generales de la tesis

El objetivo principal de esta tesis es analizar, cuantificar y caracterizar los cambios morfológicos, productivos, reproductivos y microbiológicos ocurridos en la especie *T. molitor* a lo largo del tiempo y en relación con su origen geográfico y condiciones de cría. Para ello, se evaluarán variables como el peso, la longitud, la coloración, la presencia de malformaciones, parámetros reproductivos, morfometría geométrica y composición de la microbiota intestinal.

El segundo gran objetivo es explorar las aplicaciones prácticas de estas diferencias intraespecíficas en el sector productivo, enfocándose en el aprovechamiento del vigor híbrido, la selección de líneas con características favorables y el uso de cepas bacterianas beneficiosas presentes en la microbiota para mejorar el rendimiento, la sanidad y la seguridad alimentaria en sistemas intensivos de cría.

Objetivos del Capítulo 1: Revisión sistemática sobre endogamia e insectos criados

Objetivo general:

Realizar una revisión sistemática del conocimiento científico actual sobre los efectos de la endogamia en insectos criados artificialmente, con especial atención a sus implicaciones en el rendimiento y bienestar de las poblaciones.

Objetivos específicos:

- Analizar los efectos de la consanguinidad en insectos desde una perspectiva productiva, reproductiva, hormonal, inmunológica y genética.
- Comparar los hallazgos reportados en diferentes especies para identificar los principales efectos negativos que podrían trasladarse a la cría intensiva de *T. molitor*.

Objetivos del Capítulo 2: Hibridación y caracteres productivos

Objetivo general:

Evaluar los efectos de la hibridación entre poblaciones globales de *T. molitor* sobre caracteres productivos clave como el peso, longitud, coloración y tasa de malformaciones.

Objetivos específicos:

- Comparar los resultados productivos obtenidos a partir de cruces entre poblaciones de diferentes orígenes geográficos.
- Determinar qué variables muestran diferencias estadísticamente significativas y cómo estas pueden ser aplicadas en la optimización de sistemas industriales de producción.

Objetivos del Capítulo 3: Morfometría geométrica en el análisis evolutivo

Objetivo general:

Aplicar herramientas de morfometría geométrica para comparar las formas corporales de *T. molitor* entre individuos procedentes de diferentes orígenes o criados bajo distintas condiciones.

Objetivos específicos:

- Investigar la capacidad adaptativa y evolutiva de *T. molitor* en respuesta a presiones ambientales y artificiales.
- Comprender la dinámica de expansión global de la especie y los cambios morfológicos asociados a esta dispersión.

Objetivos del Capítulo 4: Variabilidad de la microbiota entre poblaciones

Objetivo general:

Estudiar las variaciones en la composición de la microbiota intestinal de *T. molitor* entre diferentes poblaciones a nivel mundial, considerando sus condiciones de origen y manejo.

Objetivos específicos:

- Comparar los perfiles taxonómicos de la microbiota entre poblaciones criadas en sistemas intensivos, tradicionales o procedentes del medio silvestre.
- Analizar cómo variables ambientales como la temperatura, humedad y dieta afectan la estructura microbiana en función del país de origen.

Objetivos del Capítulo 5: Efecto de la dieta sobre la microbiota

Objetivo general:

Evaluar el impacto de dietas diferenciadas, particularmente aquellas enriquecidas con hongos, sobre la microbiota intestinal de una misma población de *T. molitor*.

Objetivos específicos:

- Analizar los cambios microbianos inducidos por dietas suplementadas con micelio o carpóforo fúngico.
- Determinar cómo la proporción de los ingredientes fúngicos (20% y 80%) modula la composición y diversidad de la microbiota.

Objetivos del Capítulo 6: Patógenos y probióticos en *T. molitor*

Objetivo general:

Investigar el efecto de diferentes patógenos relevantes en la cría de *T. molitor* y evaluar el potencial del probiótico *Pediococcus pentosaceus* como herramienta para mitigar sus impactos negativos.

Objetivos específicos:

- Determinar los efectos de la infección por *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter hormaechei* y *Fusarium spp.* sobre variables productivas y fisiológicas de *T. molitor*.
- Identificar el método de infección más agresivo en términos de letalidad y alteraciones morfológicas.
- Evaluar la capacidad de *P. pentosaceus* para modular la microbiota y aumentar la resistencia del insecto frente a dichos patógenos.

RESUMEN

Capítulo 1

El crecimiento acelerado de la población mundial, que se estima alcanzará los 10.000 millones de personas en 2050, ha intensificado la búsqueda de fuentes de proteína más sostenibles. En este contexto, la cría de insectos, como *T. molitor*, se ha consolidado como una alternativa viable por su alta eficiencia de conversión alimenticia y bajo impacto ambiental. Sin embargo, el avance de la producción masiva plantea preocupaciones sobre los efectos de la endogamia en las poblaciones explotadas industrialmente. Este capítulo presenta una revisión sistemática, desarrollada bajo las directrices PRISMA, que analiza las consecuencias del cruzamiento entre individuos emparentados en *T. molitor*, así como en otras especies de insectos de interés zootécnico, con el fin de contextualizar los hallazgos.

El análisis de 19 estudios revela que la endogamia puede tener efectos negativos significativos a nivel reproductivo, inmunológico, comportamental y genético. En *T. molitor*, los individuos endogámicos presentaron reducciones en la tasa de supervivencia, número y peso de huevos, peso larval y masa corporal adulta, así como un retraso en el desarrollo, particularmente en las hembras. Además, se observó una menor resistencia a infecciones por *Beauveria bassiana* y alteraciones comportamentales asociadas a señales químicas sexuales: las hembras evitaron feromonas emitidas por machos endogámicos. En especies como *Plodia interpunctella*, se registró una menor producción de feromonas sexuales por parte de machos consanguíneos, lo cual redujo su éxito reproductivo.

Desde el punto de vista genético, la endogamia en *T. molitor* ha provocado una homogeneización de los acervos genéticos. En *Hermetia illucens*, se detectaron coeficientes de endogamia a nivel genómico superiores a los observados en *Tribolium castaneum*, y los valores de Fst entre poblaciones geográficamente distintas reflejan una divergencia considerable, especialmente entre poblaciones silvestres y aquellas adaptadas a ambientes industriales como molinos de harina.

A pesar de los avances, persisten lagunas importantes en la literatura, especialmente en relación con el impacto de la endogamia sobre la microbiota intestinal, el desarrollo completo del ciclo de vida, la movilidad o el perfil nutricional de los insectos criados. Superar estos vacíos resulta esencial para garantizar la sostenibilidad genética, sanitaria y productiva de los sistemas de cría intensiva de insectos comestibles.

Capítulo 2

La cría intensiva de insectos comestibles requiere un conocimiento detallado sobre los factores que influyen en la calidad y productividad de las poblaciones, especialmente en especies como *T. molitor*. Este capítulo analiza los efectos del cruzamiento entre distintas poblaciones geográficamente separadas y mantenidas bajo condiciones variables, evaluando su impacto sobre una serie de caracteres fenotípicos clave: peso corporal, longitud, coloración cuticular y frecuencia de malformaciones morfológicas. Estos rasgos, fácilmente medibles en condiciones de producción, ofrecen una vía práctica para mejorar la eficiencia del proceso selectivo y asegurar la calidad de las líneas de cría.

Los resultados obtenidos muestran que el 68,8 % de los cruzamientos interpopulacionales presentaron diferencias significativas en el peso, lo que refuerza el valor de esta variable como criterio primario para la clasificación de individuos de edad similar. Esta variabilidad entre líneas genéticas sugiere una fuerte influencia del origen poblacional sobre la expresión del tamaño corporal, factor determinante en el rendimiento productivo. Por otro lado, se observó una correlación positiva ($r = 0,55$) entre la intensidad de la coloración y la presencia de malformaciones, lo que apunta a la posibilidad de utilizar el grado de pigmentación como un marcador indirecto del estado de viabilidad o salud del individuo, especialmente útil en fases tempranas del desarrollo.

El análisis de los distintos tipos de cruces revela que aquellos realizados entre poblaciones homogéneas (por ejemplo, Spain x Spain o China x China) presentan mayores tasas de malformaciones. Este hallazgo es consistente con los efectos esperados de la depresión endogámica, que tiende a acumular alelos deletéreos y reduce la viabilidad de la descendencia. En cambio, los cruzamientos entre líneas genéticamente distantes mostraron una mayor estabilidad fenotípica y menor incidencia de defectos, reflejo del fenómeno de vigor híbrido o heterosis. Esta ventaja observada en los cruces heterogéneos proporciona un argumento sólido para su aplicación práctica en programas de mejora genética en insectos de interés comercial.

En conjunto, este estudio resalta la importancia de integrar evaluaciones fenotípicas detalladas dentro de las estrategias de gestión genética en sistemas de cría intensiva. El conocimiento generado permite no solo optimizar la selección de parentales con alto potencial productivo, sino también diseñar esquemas de cruzamiento que maximicen la robustez y calidad de las poblaciones de *T. molitor*. Estos resultados sientan las bases para la consolidación de protocolos de selección más eficientes, orientados a la estabilidad genética y al aprovechamiento de las ventajas del cruzamiento interpopulacional.

Capítulo 3

Tenebrio molitor, tradicionalmente considerado una plaga de productos almacenados debido a su capacidad de causar daños en granos y cereales, ha pasado en las últimas décadas a ser un organismo de interés creciente para la cría intensiva. Esta transformación responde al potencial del insecto como fuente sostenible de proteína y otros compuestos útiles en la alimentación animal, agricultura y cosmética. Paralelamente a este cambio de paradigma, se ha producido una expansión global de su cultivo, lo cual plantea interrogantes sobre la variabilidad fenotípica y morfológica de las poblaciones actuales respecto a las antiguas, así como sobre los efectos de la domesticación, el aislamiento geográfico y los sistemas de cría intensiva en la diversidad de la especie.

En este capítulo se aplica la técnica de morfometría geométrica con el objetivo de analizar los patrones de variación morfológica en poblaciones de *T. molitor* a lo largo del tiempo y el espacio. Se compararon poblaciones provenientes de cuatro continentes (América, Europa, África y Asia), representadas por ejemplares recolectados en diferentes siglos y bajo distintos métodos de cría (tradicional, intensiva o salvaje). Se capturaron imágenes dorsales y ventrales de 10 individuos adultos por población, identificando puntos de referencia anatómicos (landmarks) que fueron analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Variables Canónicas (CVA), con el fin de

explorar la estructura de la variación y clasificar las poblaciones según origen, antigüedad y sistema de cría.

Los resultados obtenidos revelan una clara pérdida de diversidad morfológica en las poblaciones modernas en comparación con las históricas, lo que sugiere un proceso de homogenización relacionado con la domesticación y selección intensiva. Asimismo, se observa una mayor similitud morfológica entre las poblaciones europeas y asiáticas, mientras que las de origen americano y africano presentan patrones diferenciales, posiblemente reflejando trayectorias evolutivas distintas o eventos de aislamiento reproductivo. Esta estructura geográfica de la variación sugiere que la expansión global de la especie no ha sido homogénea y ha estado influida por factores históricos como la expansión agrícola y los movimientos coloniales, que han facilitado la dispersión involuntaria de cepas locales.

Este estudio destaca el valor de la morfometría geométrica como herramienta para rastrear los efectos de la domesticación y el aislamiento geográfico en insectos de interés industrial. Los resultados alertan sobre la necesidad de conservar la variabilidad morfológica como parte del acervo genético de *T. molitor*, especialmente en contextos de mejora genética y sostenibilidad productiva.

Capítulo 4

La microbiota intestinal constituye un componente esencial en la fisiología de los organismos, al desempeñar un papel clave en procesos como la digestión, el metabolismo, la inmunidad y la resistencia frente a patógenos. En insectos, esta comunidad microbiana es especialmente relevante debido a su capacidad de adaptación rápida a cambios en el entorno, y su modulación puede influir directamente en el rendimiento productivo. Aunque se tiende a asumir que los organismos de una misma especie presentan una microbiota relativamente homogénea, estudios recientes demuestran que factores como el origen geográfico, la dieta, el sistema de cría y las condiciones ambientales pueden generar importantes variaciones en la composición y diversidad de la microbiota intestinal.

Este estudio analiza comparativamente las comunidades bacterianas presentes en el intestino de ejemplares adultos de *T. molitor* pertenecientes a cuatro colonias con orígenes geográficos distintos (América, Europa, Asia y África). Las muestras representan sistemas de cría diversos, desde explotaciones industriales intensivas hasta poblaciones criadas en condiciones más tradicionales o semicontroladas. El objetivo principal es evaluar hasta qué punto las condiciones locales —particularmente la dieta, la humedad, la temperatura y el método de cría— afectan la estructura microbiana intestinal del insecto.

La investigación se basa en técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicadas al ADN ribosomal 16S para identificar y cuantificar los distintos taxones bacterianos presentes en las muestras. A través de análisis de diversidad alfa y beta, así como representaciones gráficas mediante PCoA (Análisis de Coordenadas Principales), se caracterizó la riqueza, equitatividad y similitud entre comunidades bacterianas. Se prestó especial atención a la abundancia relativa de géneros potencialmente beneficiosos o perjudiciales, con implicaciones para la salud del insecto y su eficiencia productiva.

Los resultados muestran diferencias significativas entre las poblaciones analizadas, tanto en la diversidad total como en la composición específica de su microbiota. Las poblaciones criadas en ambientes más cálidos y húmedos tendieron a presentar una microbiota más rica y diversa, mientras que aquellas sometidas a regímenes alimentarios más homogéneos y condiciones controladas mostraron una menor variabilidad. Estas observaciones sugieren que la microbiota de *T. molitor* no solo refleja la historia ambiental y geográfica de cada población, sino también que puede ser modulada estratégicamente mediante ajustes en el manejo zootécnico.

Este capítulo contribuye a reforzar la idea de que el conocimiento profundo de la microbiota en insectos es indispensable para el diseño de programas de cría más eficientes, sostenibles y resilientes, donde se maximicen los beneficios de comunidades microbianas favorables y se minimicen los efectos de posibles disbiosis o patógenos oportunistas.

Capítulo 5

La microbiota intestinal desempeña un papel esencial en la salud, fisiología y rendimiento productivo de *T. molitor*, insecto cada vez más utilizado en la industria agroalimentaria por su eficiencia en la conversión de residuos orgánicos y su alto valor nutricional. Dado que el tipo de dieta influye significativamente en la composición de la microbiota, este estudio se centra en evaluar cómo distintas formulaciones alimenticias basadas en hongos pueden modular las comunidades bacterianas intestinales del insecto.

Se diseñó un experimento controlado en el que se compararon cinco dietas distintas: una dieta estándar compuesta por salvado de trigo y patata, y cuatro dietas experimentales suplementadas con micelio o carpóforo del hongo *Lentinula edodes*, en proporciones del 20% y 80%. Tras un periodo de alimentación, se extrajo ADN intestinal de los individuos alimentados con cada tratamiento y se realizó una secuenciación masiva de la región 16S del ADN ribosomal para identificar la estructura y composición bacteriana a diferentes niveles taxonómicos (filo, familia, género y especie).

Los resultados revelaron que la inclusión de micelio, particularmente al 20%, promovió una mayor diversidad bacteriana (mayor riqueza y equitatividad), lo cual podría relacionarse con beneficios fisiológicos y funcionales. En contraste, las dietas con carpóforo al 80% indujeron una disminución significativa de la diversidad microbiana y favorecieron la proliferación dominante de taxones específicos como *Enterobacter hormaechei*, especie con potencial patógeno. Este desequilibrio, o disbiosis, puede comprometer la salud intestinal y la eficacia productiva del insecto. Asimismo, se observó una sustitución progresiva de bacterias del filo Firmicutes por Proteobacteria en función del tipo y proporción del suplemento fúngico, con una clara relación dosis-dependiente.

Estos hallazgos permiten concluir que la composición de la dieta tiene un efecto profundo sobre la ecología microbiana intestinal de *T. molitor*, y que la inclusión de micelio de hongos puede representar una herramienta eficaz para modular positivamente la microbiota. Por el contrario, el uso excesivo de carpóforo debe abordarse con precaución debido a sus posibles efectos negativos sobre el equilibrio microbiano.

En conjunto, este capítulo aporta conocimientos valiosos para el desarrollo de dietas funcionales y adaptadas a las necesidades fisiológicas del insecto, con el objetivo de mejorar su bienestar y optimizar la producción en sistemas intensivos de cría sostenibles.

Capítulo 6

El uso de probióticos en la producción intensiva de insectos comestibles ha emergido como una herramienta biotecnológica prometedora para mejorar el rendimiento productivo y la resistencia frente a agentes patógenos, contribuyendo así a la sostenibilidad de los sistemas de cría. En este estudio, se evaluó el efecto del probiótico *Pediococcus pentosaceus* sobre diversos parámetros productivos, fisiológicos y morfológicos de *T. molitor*, tanto en condiciones estándar como bajo exposición a microorganismos patógenos de relevancia en la cría intensiva.

Se diseñó un experimento multifactorial que incluyó un grupo control, grupos tratados con patógenos (*Fusarium spp.*, *Enterobacter hormaechei* y *Staphylococcus aureus*) y grupos combinados con dichos patógenos y suplementación de *P. pentosaceus*, administrado en dietas líquidas y secas. Las variables evaluadas incluyeron el tiempo de desarrollo larval, tasas de mortalidad, peso y longitud de larvas y adultos, coloración del exoesqueleto (como aproximación al contenido de quitina/quitosano) y frecuencia de malformaciones.

Los resultados mostraron que la suplementación con *P. pentosaceus* no afectó negativamente ningún parámetro evaluado bajo condiciones normales, y de hecho mejoró ligeramente algunos indicadores productivos. Bajo exposición a patógenos, el efecto del probiótico fue marcadamente positivo: se observó una disminución significativa en la mortalidad, aceleración del desarrollo larval, aumento del peso corporal y de la longitud de los individuos. Asimismo, algunos tratamientos indujeron una mayor pigmentación del exoesqueleto, lo cual podría estar vinculado a un incremento en el contenido de compuestos estructurales como el quitosano, con potencial interés para aplicaciones en la industria farmacéutica y agrícola.

Estos hallazgos posicionan a *P. pentosaceus* como un probiótico eficaz en la cría de *T. molitor*, capaz de mejorar tanto la productividad como la resistencia frente a infecciones, y con posibles beneficios colaterales en la calidad morfológica del producto final. La implementación de estrategias basadas en probióticos se perfila, por tanto, como una vía realista para optimizar la producción de insectos comestibles en sistemas agroindustriales sostenibles, reduciendo la dependencia de antibióticos y mejorando el perfil biotecnológico de las harinas de insecto.

CAPÍTULO 1

¿Por qué es importante estudiar la endogamia? una revisión sistemática de sus efectos en las poblaciones de insectos cautivos, especialmente centrada en la especie comestible *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), según las directrices PRISMA

Resumen

Se espera que la población mundial alcance los 10 mil millones para 2050, aumentando la necesidad de fuentes sostenibles de proteína. La cría de insectos ofrece una solución prometedora, pero su rápido crecimiento genera preocupaciones sobre la endogamia y sus impactos en la productividad y salud genética. Esta revisión sistemática, siguiendo las directrices PRISMA, examinó los efectos de la endogamia en poblaciones de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), e incluyó datos de otros insectos de cría para un contexto más amplio. Diecinueve estudios revelaron diferencias conductuales, reproductivas, genéticas, inmunológicas y de desarrollo entre individuos endogámicos y exogámicos de *T. molitor*. Los individuos endogámicos mostraron disminuciones en supervivencia, número de huevos, peso de huevos y peso larval. El desarrollo de las hembras se retrasó y la masa adulta se redujo en ambos sexos. La resistencia a infecciones por *Beauveria bassiana* disminuyó en los escarabajos endogámicos. Conductualmente, las hembras pasaron menos tiempo cerca de las feromonas de machos endogámicos y los visitaron con menor frecuencia. En *Plodia interpunctella*, los machos endogámicos emitieron menos feromonas, reduciendo su éxito reproductivo. Genéticamente, las poblaciones de *T. molitor* mostraron un acervo génico homogenizado, mientras que *Hermetia illucens* presentó coeficientes de endogamia genómica superiores a los de *Tribolium castaneum*, y los valores F_{st} entre grupos regionales destacaron la divergencia entre poblaciones silvestres y aquellas recolectadas en molinos. A pesar de estos hallazgos, persisten vacíos importantes, especialmente sobre los efectos de la endogamia en microbiota intestinal, tiempo de ciclo de vida, movilidad y calidad nutricional de los insectos de cría. Abordar estas cuestiones es crucial para garantizar la sostenibilidad y productividad a largo plazo de los sistemas de cría de insectos.

Palabras clave

Diversidad genética, endogamia, cría de insectos, gusano de la harina, fuentes sostenibles de proteína.

Introducción

La endogamia ha sido ampliamente estudiada en mamíferos domesticados, particularmente en el ganado bovino y porcino, donde se sabe que impacta negativamente la eficiencia reproductiva, la productividad y la salud general. Por ejemplo, Van Kneegsel et al. (2014) encontraron que la depresión endogámica afectó de manera negativa los rasgos de producción y fertilidad en vacas lecheras, siendo los efectos de la endogamia reciente más severos que los de la endogamia antigua. De manera similar, Knol et al. (2002) reportaron que coeficientes más altos de endogamia en cerdos condujeron a disminuciones significativas en rasgos reproductivos, incluyendo tamaños de camada reducidos y menores tasas de supervivencia de los lechones. Estos hallazgos resaltan la importancia de mantener la diversidad genética en las poblaciones de ganado para mitigar los efectos perjudiciales de la endogamia.

Los efectos de la endogamia en vertebrados están bien documentados, pero pocos estudios han considerado sus impactos en insectos, especialmente en especies criadas comercialmente como *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758. Este coleóptero ha ganado prominencia en las industrias agrícola y alimentaria debido a su alto contenido proteico, su fácil cría y su capacidad para convertir desechos vegetales en biomasa. Las larvas sirven como una fuente sostenible de proteína para alimento animal y consumo humano, y los escarabajos adultos se utilizan en aplicaciones cosméticas, agrícolas e industriales (Van Broekhoven et al, 2015; Oonincx y de Boer, 2012).

Las preocupaciones sobre la diversidad genética han aumentado a medida que la cría de *T. molitor* se expande en Europa Occidental y América del Norte. A diferencia del ganado, que ha pasado por extensos programas de selección, las poblaciones de *T. molitor* criadas probablemente provienen de un acervo genético limitado, incrementando el riesgo de depresión endogámica. La combinación de similitud genética, altas tasas reproductivas y rápida rotación generacional puede acelerar la fijación de alelos deletéreos, lo que podría llevar a rasgos fenotípicos indeseables. Investigaciones en otros animales de cría han demostrado que la endogamia puede afectar negativamente rasgos clave de aptitud, incluyendo el éxito reproductivo, las tasas de desarrollo, la función inmune y la supervivencia general (Frankham, 2005; Charlesworth y Willis, 2009). Dado estos riesgos, investigar si ocurren patrones similares en *T. molitor* es esencial para evaluar las posibles consecuencias de la endogamia en instalaciones de cría comercial.

Basándose en investigaciones en ganado vertebrado y debido a la creciente importancia industrial de *T. molitor*, se recopilaron y analizaron en esta revisión sistemática estudios empíricos que examinaron los efectos de la endogamia dentro de las poblaciones de *T. molitor* y entre ellas. En particular, se evaluaron los impactos de la endogamia en rasgos clave de producción y reproducción, incluyendo tasas de crecimiento, fertilidad, función inmune y variabilidad genética. Al sintetizar la investigación existente, esta revisión proporciona valiosos conocimientos sobre las consecuencias de la endogamia en la cría de *T. molitor* y respalda el desarrollo de estrategias de manejo efectivas para mitigar sus efectos negativos.

Métodos

Se revisaron sistemáticamente estudios empíricos sobre producción de insectos, enfocándose en la endogamia y las similitudes genéticas entre poblaciones. Esta revisión

se realizó siguiendo las directrices PRISMA (Page et al, 2021) para garantizar transparencia, rigor y reproducibilidad en revisiones sistemáticas. Dichas directrices orientan la selección, evaluación y síntesis de estudios, minimizando sesgos. En el caso de la endogamia en insectos, ayudan a estructurar claramente la búsqueda y análisis de la literatura relevante, facilitando la comprensión de la metodología por parte de otros investigadores.

A continuación, se detalla la metodología paso a paso.

Búsqueda sistemática

La búsqueda sistemática se realizó en las bases de datos Scopus, PubMed, Web of Science y Google Scholar. Para asegurar la inclusión de investigaciones actualizadas, la búsqueda se restringió a artículos publicados desde 2018 en adelante, con la excepción de algunos estudios más antiguos seleccionados manualmente debido a su relevancia.

La búsqueda se realizó utilizando la siguiente combinación de términos (Fig. 1): ((consanguinity OR inbred) AND (insect OR "Tenebrio molitor" OR mealworm) AND (effect OR quinine OR reproduction OR metamorphosis OR hormone OR weight OR gene)).

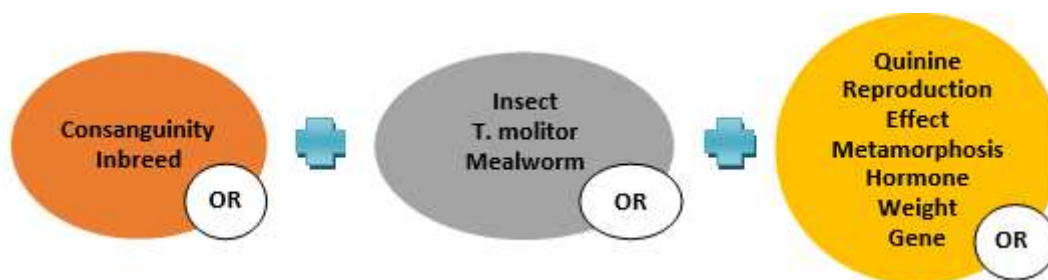


Figura 1: Palabras clave utilizadas para la búsqueda bibliográfica en Internet. La estrategia de búsqueda combinó términos relacionados con consanguinidad/reproducción, la especie de insecto *T. molitor* y factores como quinina, reproducción, metamorfosis, hormonas, peso y genes mediante operadores booleanos.

La búsqueda arrojó un total de 300 artículos de todas las fuentes. Para refinar la selección, se establecieron los siguientes criterios específicos de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión

- Se seleccionaron todos los artículos que cumplieron con los siguientes criterios:
- Investigación empírica basada en estudios experimentales.
- Insectos como sujetos principales de estudio.
- Comparaciones entre poblaciones con diferentes grados de endogamia.
- Especies con alta producción reproductiva y sin cuidado parental.
- Especies que puedan ser fácilmente criadas en condiciones domésticas o de granja.
- Publicaciones entre 2018 y 2025 (inclusive).

Criterios de exclusión

- Se excluyeron los siguientes estudios:
- Aquellos que se enfocaban en insectos acuáticos o especies con alguna etapa metamórfica en el agua.
- Investigaciones que involucraban insectos hemimetábolos.
- Especies sociales o coloniales, como hormigas, avispas, abejas y termitas.

- Especies con requerimientos de cría extremos o tiempos generacionales largos.

Búsqueda manual

Después de la selección de artículos, se incluyeron cuatro estudios adicionales citados en las referencias de la selección preliminar, a pesar de estar fuera del rango inicial de fechas de publicación o provenir de otras fuentes. Estos artículos fueron publicados en 2011, 2012, 2013 y 2014.

Resultados

Después de compilar todos los artículos obtenidos mediante la búsqueda sistemática, se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión previamente definidos. Basándose únicamente en la revisión de títulos, se seleccionaron inicialmente 291 artículos. Tras eliminar cuatro duplicados, el número final fue de $n = 287$ (Fig. 2).

Posteriormente, se excluyeron 148 artículos tras revisar los resúmenes, principalmente porque no abordaban específicamente el tema de estudio. La selección final fue de $n = 139$ artículos (Figura 2).

Finalmente, después de aplicar los criterios de exclusión —como estudios que involucraban insectos sociales o especies con patrones reproductivos muy prolongados o irregulares (por ejemplo, cigarras)— se descartaron 32 estudios. Como resultado, se conservaron 15 estudios relevantes ($n = 15$). De estos, siete se enfocaron en Coleópteros, mientras que los restantes abordaron otras especies de insectos como la mosca soldado negra, polillas y grillos.

Al incorporar los artículos seleccionados manualmente, el número total de estudios incluidos en la revisión sistemática fue de 19. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

Respecto a los efectos de la endogamia sobre el comportamiento y los rasgos reproductivos de los insectos, se identificaron nueve artículos que abordaban este tema, de los cuales cuatro se centraron en *T. molitor* y los restantes en otras especies. Estos estudios analizaron la relación entre endogamia y diversos rasgos conductuales y reproductivos para comprender los efectos más amplios de la consanguinidad en las poblaciones de insectos.

En cuanto a los estudios genéticos sobre la endogamia en insectos, se identificaron cuatro artículos relevantes. Dos de ellos no midieron directamente los niveles de endogamia, pero emplearon técnicas genéticas para evaluar el grado de parentesco entre poblaciones. Los otros dos se enfocaron explícitamente en las consecuencias de la endogamia y su gestión en poblaciones cautivas.

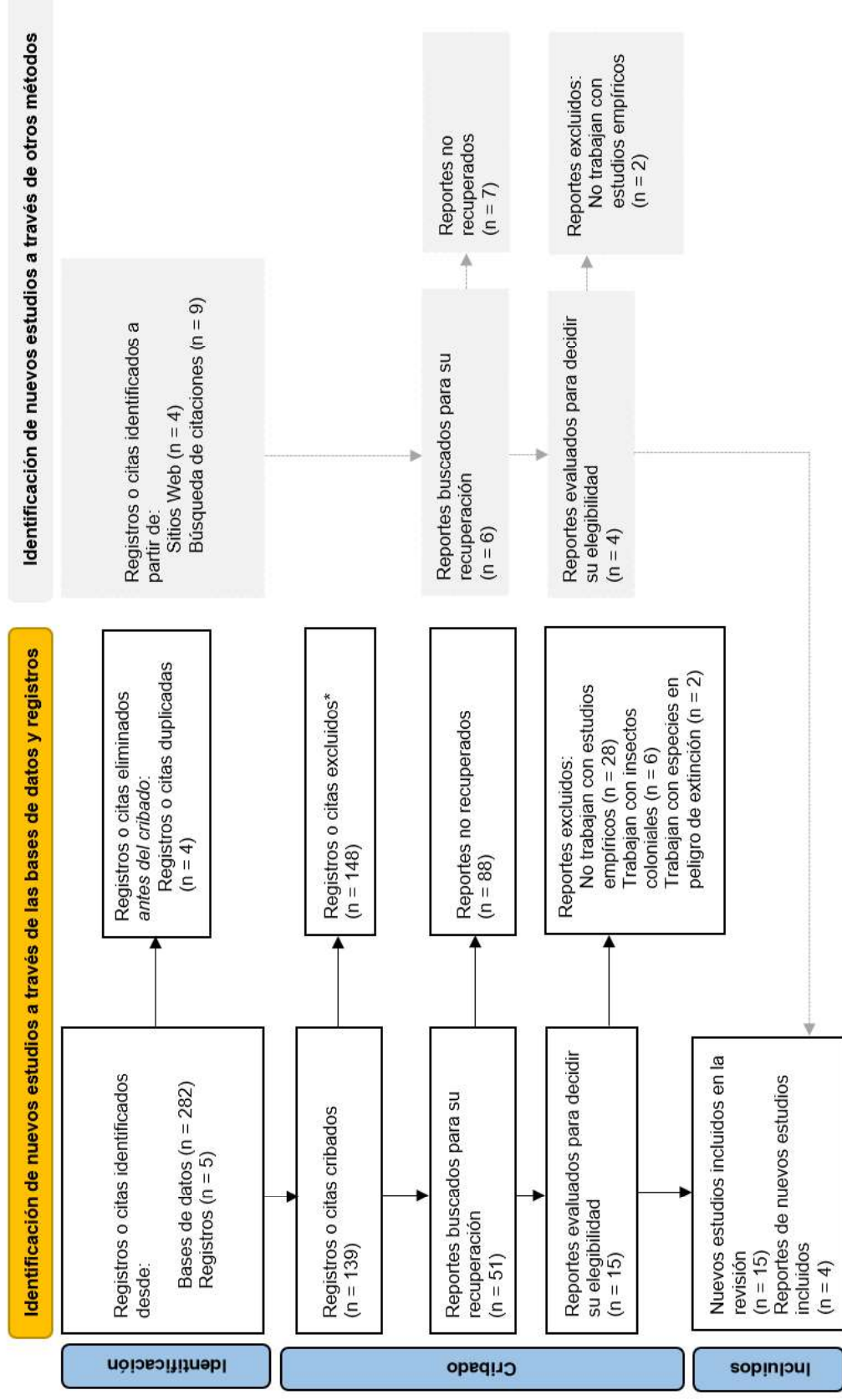


Figure 2: Diagrama de flujo PRISMA del proceso de selección de estudios. El diagrama ilustra la metodología paso a paso utilizada para identificar, cribar y seleccionar los estudios pertinentes para la revisión sistemática.

A pesar de los efectos bien documentados de la endogamia sobre el éxito reproductivo y la supervivencia, pocos estudios han investigado su impacto hormonal. En efecto, solo dos trabajos examinaron específicamente la relación entre hormonas y endogamia en insectos, destacando la influencia de las señales hormonales en la atracción sexual y el comportamiento reproductivo.

Las relaciones entre endogamia y funciones inmunológicas en insectos siguen sin estar claras, ya que los estudios muestran resultados mixtos. Cuatro investigaciones clave examinaron la respuesta inmune y la capacidad de encapsulación en insectos con altos niveles de endogamia para entender cómo esta afecta la resistencia a patógenos y la asignación de energía.

Discusión

La investigación sobre los efectos de la endogamia en animales domesticados ha avanzado significativamente, especialmente en vertebrados dentro de la cadena alimentaria humana, donde numerosos estudios han documentado sus consecuencias negativas. En contraste, pocos trabajos han abordado la endogamia en industrias de cría de invertebrados, lo que resalta la necesidad de mayores esfuerzos de investigación e inversión de recursos. Esta brecha de conocimiento es particularmente evidente en insectos, dado que la cría de estos aún es una industria emergente. Además, la amplia variedad de especies estudiadas sugiere que los efectos de la endogamia pueden variar considerablemente entre especies e incluso entre diferentes etapas del desarrollo. La endogamia es un fenómeno inevitable en la mayoría de las poblaciones cautivas de insectos, pero sus efectos perjudiciales pueden mitigarse mediante el refrescamiento genético continuo, la introducción periódica de poblaciones silvestres y el control de estrategias de reproducción para minimizar la consanguinidad.

Los estudios analizados en esta revisión demostraron de forma consistente los impactos adversos de la endogamia en múltiples ámbitos. Las crías resultantes de cruces entre individuos emparentados presentaron rasgos perjudiciales, incluyendo:

Características reproductivas y comportamentales: reducción en peso y tamaño, alteración de la coloración de la cutícula y mayor duración del proceso de metamorfosis.

Factores genéticos: incremento en la homocigosidad y disminución de la diversidad genética.

Cambios hormonales: disrupciones en la regulación endocrina.

Respuestas inmunológicas: defensas debilitadas frente a patógenos y estresores externos.

Estos hallazgos subrayan la necesidad crítica de implementar estrategias eficaces de gestión genética para mantener poblaciones de insectos sanas y productivas en entornos de cría.

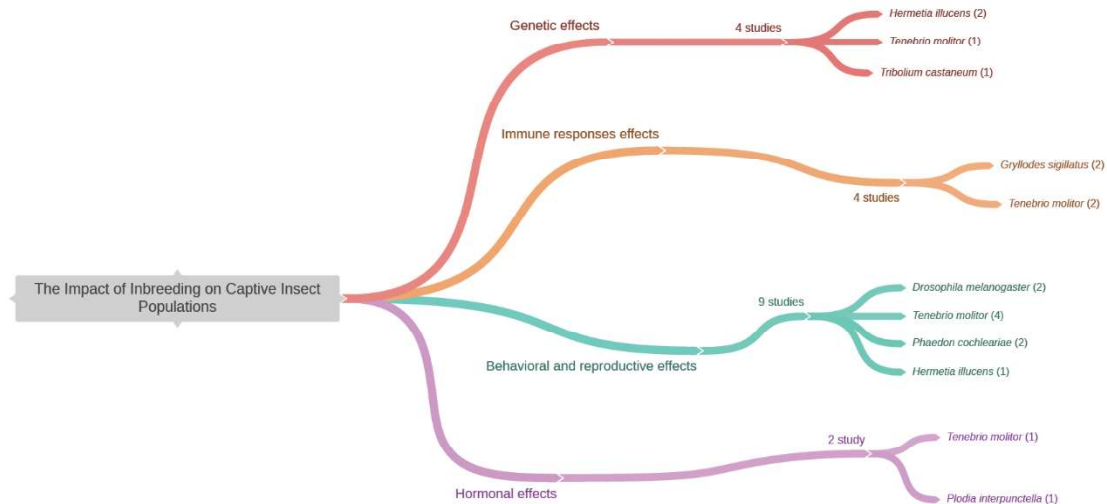


Figura 3: Mapa conceptual de los artículos incluidos en esta revisión sistemática, ordenados por tema de estudio y especie.

Efectos de la endogamia sobre el comportamiento y los rasgos reproductivos en insectos

Varios estudios demostraron cómo la endogamia puede influir en el comportamiento de los insectos, especialmente en lo relativo a la evasión de depredadores, estrategias de apareamiento y capacidad de respuesta al entorno. En *T. molitor*, Krams et al. (2014) examinaron tres conductas clave: evasión de la depredación, reflejo de inmovilidad y tiempo de latencia ante amenazas. Sus hallazgos indicaron que estos comportamientos se conservaban dentro de las poblaciones, pero existían diferencias entre poblaciones correlacionadas con la distancia genética. Aunque no se reportaron datos cuantitativos específicos, los autores subrayaron que los animales criados en laboratorio experimentan una selección natural relajada, lo que podría inducir cambios conductuales y reducir su adaptabilidad ambiental.

En línea con estos resultados, Müller et al. (2018a) estudiaron *Phaedon cochleariae* (escarabajo del berro) y hallaron que las poblaciones altamente endogámicas presentaban tasas de eclosión (~90 %), oviposición (~27.1 %) y supervivencia (~45.2 %) significativamente menores, aunque el tiempo de desarrollo apenas se vio afectado (+4.3 %). Además, compararon comportamientos exploratorios y defensivos frente a depredadores. Los escarabajos con alto coeficiente de endogamia tardaban más en buscar protección tras un estímulo amenazante y permanecían inmóviles por más tiempo tras su cese. Paradójicamente, mostraban comportamientos más osados en entornos no protegidos, lo que sugiere una mayor tendencia al riesgo.

Más allá de los cambios conductuales directos, la endogamia también afecta la comunicación química y el reconocimiento de pareja. Müller et al. (2018b) analizaron los hidrocarburos cuticulares de *P. cochleariae* y encontraron que las hembras endogámicas producían señales químicas más similares a las de los machos, reduciendo su atractivo sexual. Estas hembras también mostraban mayor agresividad, y los machos preferían a hembras exogámicas, lo que sugiere que la agresividad femenina podría ser una respuesta a dicha selección, complicando aún más la dinámica reproductiva.

En un estudio relacionado, Amanullah et al. (2023) analizaron los efectos de la endogamia sobre conductas innatas en *Drosophila melanogaster*, revelando una amplia gama de alteraciones conductuales y fisiológicas. Observaron una reducción significativa de la geotaxia negativa, debido a una menor capacidad de respuesta gravitacional. La fototaxia positiva disminuyó un 30.9 %, y se retrasó la aparición de comportamientos sociales clave como la agresión y el cortejo. Curiosamente, un subgrupo de moscas endogámicas que mantenía fototaxia positiva mostró mejoras en el aprendizaje, lo que sugiere que la endogamia podría purgar ocasionalmente alelos deletéreos relacionados con funciones cognitivas. No obstante, también se reportó una reducción de 1.78 veces en la viabilidad general, lo que resalta sus efectos mayoritariamente negativos.

Los efectos sobre la conducta reproductiva y la aptitud biológica son particularmente relevantes, ya que inciden directamente en la viabilidad poblacional. Krams et al. (2014) y Müller et al. (2018a) demostraron que los individuos endogámicos de *T. molitor* y *P. cochleariae* respondían más lentamente a amenazas, presentaban tiempos prolongados de inmovilidad y fuertes caídas en éxito reproductivo y supervivencia (superiores al 45 % en algunos parámetros). Complementando esto, Khodaei et al. (2020) identificaron un mecanismo de reconocimiento de parentesco en larvas de *D. melanogaster*. Observaron que las larvas endogámicas tenían un 50 % más de probabilidad de entrar en contacto con huevos no emparentados y mostraban mayor canibalismo hacia ellos, lo que sugiere un efecto de la endogamia sobre el comportamiento social, posiblemente como una forma de selección de parentesco.

Estudios recientes han resaltado los efectos complejos y, en ocasiones, contradictorios de la endogamia sobre el comportamiento reproductivo, especialmente en especies como *T. molitor*. Cargnelutti et al. (2021) cuantificaron los coeficientes de endogamia en *T. molitor* y encontraron que los machos muy endogámicos invertían más tiempo en comportamientos de cortejo clave, como frotar antenas y patas. Aunque la duración de la cópula no varió, este esfuerzo adicional se asoció a un mayor éxito reproductivo, lo que sugiere un posible mecanismo compensatorio.

De forma paralela, Adamaki-Sotiraki et al. (2023a) examinaron la compatibilidad de cruce entre cepas de *T. molitor* provenientes de Grecia, Bélgica, Italia y EE. UU. Todas las combinaciones fueron compatibles, aunque ciertos cruces exogámicos —especialmente entre cepas italiana–italiana, belga–italiana y belga–estadounidense— produjeron mayores tasas de eclosión, y las larvas de cruces endogámicos fueron hasta un 4.46 % más ligeras. Un estudio posterior (Adamaki-Sotiraki et al, 2023b) centrado en cepas endogámicas griegas e italianas mostró alto éxito reproductivo y supervivencia larval constante, aunque las larvas de cruces endogámicos presentaron mayor variabilidad en el peso. Esto ilustra la naturaleza impredecible de los efectos de la endogamia, donde posibles ventajas a corto plazo pueden ir acompañadas de rasgos inconsistentes o negativos.

Más allá de *T. molitor*, Zaalberg et al. (2024) investigaron estrategias de selección en *Hermetia illucens* (mosca soldado negra). Sus resultados mostraron que seleccionar adultos en función del peso larval mejoró el progreso genético, mientras que la cría controlada redujo los niveles de endogamia. Sin embargo, fijar el número de larvas fenotipadas por familia aumentó la endogamia, redujo la variabilidad genética y provocó una caída de hasta un 10 % en la supervivencia larval.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la endogamia altera significativamente los rasgos reproductivos en insectos: fecundidad, viabilidad larval, peso de las crías y dinámica del apareamiento. Aunque algunos individuos endogámicos pueden compensar desventajas genéticas mediante mayor esfuerzo de cortejo o mejoras inesperadas en supervivencia, la tendencia general indica un desempeño reproductivo reducido y una mayor variabilidad fenotípica. A medida que la cría de insectos se expande, gestionar la endogamia se vuelve esencial para mantener poblaciones estables, productivas y resilientes. Estrategias como programas de cría controlada, cruzamientos periódicos entre líneas, y uso estratégico de diversidad genética pueden mitigar los efectos negativos y favorecer la sostenibilidad del sistema productivo.

Incremento en la homocigosidad y disminución de la diversidad genética

Eleftheriou et al. (2022) analizaron poblaciones de *T. molitor* de granjas y centros de cría de todo el mundo y encontraron un alto grado de similitud genética independientemente de la ubicación geográfica. En contraste, las poblaciones silvestres de *T. molitor* mostraron una divergencia genética significativa, siendo las de Alemania y Serbia las que presentaron las mayores diferencias genéticas tanto entre sí como con respecto a las cepas domesticadas. Estos hallazgos sugieren que las prácticas de cría comercial han dado lugar a un reservorio genético homogeneizado en las poblaciones criadas de *T. molitor*.

Estos estudios demuestran los riesgos asociados con la homogeneidad genética en poblaciones de insectos criados, particularmente en *T. molitor*, ya que las poblaciones domesticadas en todo el mundo comparten un origen genético común y exhiben altos niveles de endogamia. La introducción de individuos silvestres en los programas de cría podría ayudar a mitigar estos riesgos al mantener la variabilidad genética, reduciendo así los efectos negativos de la endogamia y mejorando la adaptabilidad de los insectos criados.

Papel de las hormonas en estudios de endogamia

Pölkki et al. (2012) investigaron las señales hormonales producidas por machos endogámicos y exogámicos de *T. molitor* y evaluaron las respuestas de las hembras a estas señales químicas. Sus resultados mostraron que las hembras pasaron significativamente más tiempo cerca de discos impregnados con el olor de machos exogámicos (145.9 segundos) en comparación con los machos endogámicos (90.5 segundos), y también los visitaron con mayor frecuencia (6.3 frente a 4.9 visitas, respectivamente). Esto sugiere una fuerte preferencia femenina por las señales hormonales de los machos exogámicos. Por el contrario, los machos mostraron diferencias menos pronunciadas en el comportamiento: pasaron 107.3 segundos cerca de los discos de hembras exogámicas frente a 99.3 segundos para hembras endogámicas, y realizaron 6.4 frente a 5.3 visitas, respectivamente. Estos hallazgos indican una posible influencia específica del sexo de la endogamia en la comunicación por feromonas, siendo las hembras más sensibles a la calidad hormonal como señal para la selección de pareja.

De manera similar, Heydorn et al. (2018) estudiaron los impactos de la endogamia en la señalización de feromonas y la atracción de pareja en las polillas *Plodia interpunctella*. Encontraron que los machos endogámicos mostraban una capacidad reducida para producir feromonas, lo cual llevó a una menor tasa de éxito en la atracción de parejas. Esta capacidad de señalización disminuida podría afectar negativamente su éxito reproductivo, especialmente en entornos competitivos o con recursos limitados. Sin embargo, la

endogamia no afectó significativamente su comportamiento de vuelo general, lo que sugiere que, si bien la producción de feromonas se vio comprometida, otros rasgos conductuales permanecieron estables.

Las hormonas a menudo han sido pasadas por alto en la investigación sobre endogamia, pero desempeñan roles cruciales en la comunicación de los insectos, el éxito del apareamiento y la dinámica poblacional. Incluso cambios leves en la composición hormonal pueden influir significativamente en el ciclo reproductivo y las interacciones sociales de un insecto. Además, las respuestas hormonales no solo son específicas de la especie, sino también dependientes del sexo, lo que moldea aún más los resultados reproductivos en poblaciones endogámicas. Dada su importancia, los estudios futuros deberían integrar análisis hormonales para obtener una comprensión más completa de los efectos de la endogamia en las poblaciones de insectos.

Endogamia y respuestas inmunitarias en insectos

Rantala et al. (2011) y Prokkola et al. (2013) investigaron la capacidad de respuesta inmunitaria de *T. molitor* al probar la hipótesis de que la endogamia podría no afectar el potencial inmune innato de un insecto, pero sí alterar las respuestas inmunes reales. Rantala et al. (2011) encontraron que los individuos endogámicos tenían tasas de supervivencia más bajas frente a infecciones fúngicas (*Beauveria bassiana*, 37% de supervivencia en endogámicos frente al 44% en exogámicos), desarrollo más lento (promedio de 119 días en endogámicos frente a 113 en machos exogámicos) y menor masa corporal adulta (132.8 mg en endogámicos frente a 147.4 mg en exogámicos). Curiosamente, aunque el potencial de respuesta inmune (medido como respuesta de encapsulación) fue similar (58.4% en endogámicos frente a 56.9% en exogámicos), estos resultados sugieren que la endogamia reduce el rendimiento real más que la capacidad teórica. Prokkola et al. (2013), aunque no compararon directamente individuos endogámicos y exogámicos, concluyeron que la respuesta de encapsulación tenía baja heredabilidad y estaba más influenciada por condiciones ambientales, como la temperatura, mientras que la coloración del tegumento mostró heredabilidad inconsistente.

Duffield et al. (2019) exploraron aún más las compensaciones entre inmunidad y esfuerzo reproductivo en machos de *G. sigillatus*. Los machos endogámicos exhibieron una actividad antimicrobiana más fuerte, pero invirtieron más energía en el comportamiento de llamado cuando estaban infectados con patógenos leves, a diferencia de los machos exogámicos que redujeron el cortejo y priorizaron la inmunidad. Esto indica un posible cambio en la asignación de energía en individuos endogámicos, favoreciendo los comportamientos reproductivos incluso bajo riesgo de infección. Sin embargo, bajo infecciones severas, las diferencias entre machos endogámicos y exogámicos disminuyeron, lo que implica que los desafíos inmunitarios extremos pueden anular las distinciones conductuales vinculadas al trasfondo genético.

Letendre et al. (2022) examinaron cómo el sexo y la endogamia influyen en la inmunidad en *Gryllodes sigillatus*, utilizando diferentes patógenos. Encontraron que la susceptibilidad variaba según el patógeno: para *Serratia marcescens*, hubo una fuerte variación genética con un claro efecto de la endogamia; para *Bacillus cereus*, el impacto fue específico del sexo; y para *Metarhizium robertsii*, la endogamia tuvo efectos mínimos e inconsistentes.

Estos resultados sugieren que las consecuencias de la endogamia sobre la defensa inmune pueden depender del contexto y ser específicas del patógeno.

A pesar de los hallazgos diversos, la evidencia sugiere que los insectos endogámicos a menudo asignan más energía a las respuestas inmunes, potencialmente a expensas del crecimiento, la reproducción o el desarrollo del tegumento. Por ejemplo, los escarabajos *T. molitor* en líneas altamente endogámicas tendían a tener cutículas más blandas y marrones, un posible signo de inversión comprometida en defensas físicas. Comprender los efectos de la endogamia sobre la función inmunológica es fundamental, ya que una asignación energética desproporcionada puede tener efectos a largo plazo en la viabilidad de la colonia. Una sobreinversión en defensas inmunes puede limitar la capacidad reproductiva, mientras que una subinversión aumenta la vulnerabilidad a los patógenos. Estas compensaciones destacan la necesidad de más investigación sobre cómo la endogamia moldea la estrategia inmune y la aptitud general en poblaciones de insectos criados.

Este análisis sistemático de los estudios revisados destaca las consecuencias negativas significativas de la endogamia en *T. molitor* y otras poblaciones de insectos en cautiverio. Estos efectos se manifiestan en múltiples aspectos biológicos y conductuales, influyendo en la reproducción, diversidad genética, regulación hormonal y respuestas inmunes. Por ejemplo, los individuos endogámicos de *T. molitor* muestran una reducción notable en rasgos reproductivos como el número de huevos (−27.1%), el peso del huevo (−8.3%) y la tasa de supervivencia (−45.2%) en comparación con las poblaciones exogámicas (Müller et al, 2018b). De manera similar, en *Hermetia illucens*, los niveles de endogamia superaron consistentemente el 1.9% en todos los contextos de cría (Generalovic et al, 2021), y la viabilidad reproductiva cayó en un factor de 1.78 (Amanullah et al, 2023).

La evidencia revisada subraya la necesidad urgente de estrategias de manejo genético en los programas de cría de insectos en cautiverio. Mantener la diversidad genética mediante cría controlada y la introducción periódica de individuos silvestres puede mitigar los efectos adversos de la endogamia. Por ejemplo, Adamaki-Sotiraki et al. (2023a) reportaron hasta un 4.46% de reducción en el peso larval en líneas endogámicas, mientras que los cruces híbridos entre cepas endogámicas produjeron inesperadamente una mayor supervivencia larval (hasta +7%) y valores de rasgos más extremos (Adamaki-Sotiraki et al, 2023b), lo que sugiere beneficios potenciales del cruzamiento estratégico.

Tabla 1: Resumen de estudios sobre los efectos de la endogamia en insectos. La tabla presenta un resumen de los estudios que examinaron los efectos de la endogamia en insectos, destacando el enfoque de la investigación, la especie estudiada y el tipo de insecto (escarabajo, mosca, grillo o polilla). Se detallan el tamaño de las muestras, las metodologías empleadas y los principales resultados. Estos estudios proporcionan información valiosa sobre cómo influye la endogamia en rasgos biológicos esenciales, como la reproducción, la función inmunitaria y la diversidad genética.

Estudio	Especie	Tema	Tipo	Muestra	Metodología	Resultados
Rantala et al. (2011)	<i>Tenebrio molitor</i>	Respuesta inmune	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Colocación de implantes (nylon) y uso de patógenos (<i>B. bassiana</i>)	↑ la endogamia produce = respuesta potencial, pero ↓ respuesta real
Pölkki et al. (2012)	<i>Tenebrio molitor</i>	Hormonas	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Medición del tiempo y elecciones del individuo	↑ consanguinidad igual a ↓ atractivo del individuo para el sexo opuesto
Prokkola et al. (2013)	<i>Tenebrio molitor</i>	Respuesta inmune	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Colocación de implantes (nylon)	↑ mayor variación genética ↑ capacidad de adaptación para el desarrollo
Krams et al. (2014)	<i>Tenebrio molitor</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Medición del tiempo y los gestos del individuo	↑ existe endogamia ↓ en el comportamiento habitual del escarabajo
Müller et al. (2018a)	<i>Phaedon cochleariae</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Cálculo de los parámetros reproductivos y del tiempo de las funciones vitales	↑ producción endogámica ↓ tasa reproductiva y ↑ tiempo de inmovilización y exploración
Müller et al. (2018b)	<i>Phaedon cochleariae</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Composición química y comportamiento	↑ la endogamia produce ↓ calidad de la cutícula y ↓ capacidad social
Heydorn et al. (2018)	<i>Plodia interpunctella</i>	Hormonas	Polilla	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Medición del tiempo y los gestos del individuo	↑ la consanguinidad produce = comportamiento, pero ↓ calidad en las feromonas

Duffield et al. (2019)	<i>Gryllodes sigillatus</i>	Respuesta inmune	Grillo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Uso de bacteria (<i>E. coli</i>)	En una infección leve ↑ compromiso de tiempo de llamada en una población con ↑ consanguinidad
Khodaei et al. (2020)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Productiva o de comportamiento	Mosca	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Patrones de alimentación y canibalismo	↓ cercanía genética produce ↑ canibalismo
Rhode et al. (2020)	<i>Hermetia illucens</i>	Genética	Mosca	Una población con varias generaciones	Variabilidad alélica	↑ endogamia, ↑ selección de alelos «beneficiosos» por los que ↓ adaptabilidad
Shamjana et al. (2020)	<i>Tribolium castaneum</i>	Genética	Escarabajo	Existencias de diferentes regiones (domésticas + silvestres)	Comparación genética por FST entre distintas poblaciones	↑ similitud genética entre las poblaciones del este y de la peste. ↑ probabilidad de migración. ↓ similitud genética entre las poblaciones restantes
Generalovic et al. (2021)	<i>Hermetia illucens</i>	Genética	Mosca	Una población	Análisis del genoma y cromosomas asociados al sexo	↑ número de generaciones en laboratorio/granja ↑ consanguinidad
Cargnelutti et al. (2021)	<i>Tenebrio molitor</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Medición del tiempo y los gestos.	↑ endogamia ↑ esfuerzo se dedica ↑ a la reproducción
Letendre et al. (2022)	<i>Gryllodes sigillatus</i>	Respuesta inmune	Grillo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Análisis químico de la composición de la hemolinfa y colocación nailon.	= capacidad para defenderse de un organismo externo

Eleftheriou et al. (2022)	<i>Tenebrio molitor</i>	Genética	Escarabajo	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Comparación genética por FST entre distintas poblaciones	↑ similitud genética entre poblaciones domésticas. ↓ similitud genética entre poblaciones salvajes
Amanullah et al. (2023)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Productiva o de comportamiento	Mosca	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Comportamiento en vuelo y aprendizaje	↓ comportamiento positivo para la adaptación y el vuelo
Adamaki-Sotiraki et al. (2023a)	<i>Tenebrio molitor</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	4 líneas de distintos orígenes	Compatibilidad entre cruces y eficacia reproductiva	= compatibilidad reproductiva Diferente cantidad de puesta de huevos
Adamaki-Sotiraki et al. (2023b)	<i>Tenebrio molitor</i>	Productiva o de comportamiento	Escarabajo	4 líneas de distintos orígenes	Compatibilidad entre cruces y viabilidad de la descendencia	= compatibilidad reproductiva ↓ puesta de huevos y eclosión da lugar a poblaciones endogámicas
Zaalberg et al. (2024)	<i>Hermetia illucens</i>	Productiva o de comportamiento	Mosca	Dos poblaciones (consanguínea + exogámica)	Masa corporal y % de consanguinidad	Dependiendo del programa de mejora genética, el número de adultos a seleccionar es diferente

CAPÍTULO 2



Efectos de la endogamia en los insectos: Datos experimentales en la producción intensiva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae)

Resumen

Este estudio investiga el impacto de las estrategias de cruzamiento sobre rasgos fenotípicos clave en *Tenebrio molitor*, incluyendo el peso corporal, la longitud, la coloración de la cutícula y la incidencia de malformaciones. Entre los rasgos evaluados, el peso mostró una variación significativa en el 68,8% de los tipos de cruce, lo que subraya su valor como indicador discriminante para individuos del mismo estadio de desarrollo. Una correlación positiva moderada ($r = 0,55$) entre la frecuencia de malformaciones y la intensidad de pigmentación sugiere que la coloración puede servir como indicador no invasivo para identificar individuos con un desarrollo comprometido. Los cruces homogéneos (consanguíneos), como Spain $\times$ Spain y China $\times$ China, mostraron elevadas tasas de malformación, probablemente como reflejo de la depresión por endogamia, mientras que los cruces heterogéneos (no consanguíneos) mostraron una mayor estabilidad fenotípica y robustez general del desarrollo. Estos resultados ofrecen ideas prácticas para optimizar la selección de cepas y las estrategias de hibridación en los programas de cría de insectos. El estudio subraya la importancia de integrar la selección fenotípica en los protocolos de gestión genética para mejorar la eficacia y fiabilidad de los sistemas de producción de *T. molitor*.

Palabras clave

Líneas endógamas, líneas consanguíneas, cruces *Tenebrio*, endogamia, genética de insectos

Introducción

El estudio de la variabilidad genética dentro de las poblaciones de insectos es esencial para comprender los efectos de la hibridación sobre diversos rasgos fenotípicos. En particular, el escarabajo de la harina (*T. molitor*) ha sido ampliamente utilizado en investigaciones sobre fisiología, ecología y genética aplicada debido a su importancia en la industria de insectos comestibles, la alimentación animal y su posible papel en la gestión de residuos orgánicos (Grau et al, 2017; Van Huis et al, 2013). Sin embargo, los efectos de la hibridación entre poblaciones geográficamente distantes sobre rasgos como la longitud corporal, el peso, la coloración y la incidencia de malformaciones siguen siendo poco comprendidos (Ghosh, 2021).

Estudios previos han demostrado que la hibridación en poblaciones de insectos puede producir efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. Por ejemplo, investigaciones en *Drosophila melanogaster* han demostrado que los cruces entre poblaciones geográficamente distantes pueden aumentar la variabilidad genética, lo que en ocasiones conduce a un mayor vigor híbrido (Gibson and Dworkin, 2004). Sin embargo, ciertos cruces también se han asociado con incompatibilidades genéticas, lo que resulta en mayores tasas de malformaciones o una viabilidad reducida de la descendencia (Edmands, 2007; Templeton, 1986).

En *T. molitor*, los estudios recientes se han centrado principalmente en la producción a gran escala y las respuestas a factores ambientales (Morales-Ramos et al, 2020; Rumbos and Athanassiou, 2021). Sin embargo, se sabe poco sobre cómo la hibridación influye en sus rasgos fenotípicos y fisiológicos, lo que representa una brecha significativa en el conocimiento sobre su potencial de mejora genética (Zhang et al, 2022). Investigaciones de Adamaki-Sotiraki et al. (2023a) sugieren que la variabilidad genética en *T. molitor* podría ser clave para optimizar la cría selectiva, sin embargo, los efectos específicos de combinar poblaciones de diferentes regiones siguen siendo en gran medida inexplorados (Mamtimin et al, 2023).

Con el aumento continuo de la población mundial y la consiguiente mayor demanda de proteínas (Ravzanaadii et al, 2012; Van Huis, 2021), junto con el aumento de costos y la escasez de materias primas en la industria agroalimentaria, identificar los mecanismos de herencia de rasgos en *T. molitor* es crucial para maximizar su potencial industrial a lo largo de las generaciones (FAO, 2019).

Este estudio evalúa el impacto de la hibridación en *T. molitor* mediante el análisis de diez combinaciones cruzadas entre poblaciones de España (S), Inglaterra (I), China (C) y Corea del Sur (K). Se evaluaron cuatro rasgos fenotípicos clave: longitud corporal, peso, coloración (medida mediante la escala RGB) e incidencia de malformaciones.

Nuestros hallazgos destacan la importancia de la hibridación en *T. molitor* para mejorar los rasgos productivos en la cría selectiva y las aplicaciones industriales. Comprender los efectos del cruce entre poblaciones geográficamente distintas es esencial para optimizar las características morfológicas y fisiológicas, al mismo tiempo que se mitigan posibles efectos negativos como el aumento de malformaciones. Con base en estos hallazgos, este estudio tiene como objetivo analizar la variabilidad fenotípica en poblaciones híbridas de *T. molitor* y explorar su potencial para mejorar las estrategias de cría y producción a gran escala (Adamaki-Sotiraki et al, 2023a, 2023b).

Materiales y métodos

Origen y cría de los insectos

Se obtuvieron ejemplares adultos de *T. molitor* de cuatro poblaciones geográficamente distintas: España (S), Inglaterra (E), China (C) y Corea del Sur (K). Para asegurar el control genético, los individuos F1 de cada población se criaron por separado bajo condiciones idénticas, a fin de evitar el apareamiento previo al experimento. Todos los cruces se iniciaron utilizando adultos vírgenes (Tabla 1).

Tabla 1: Diseño experimental y cruces entre las poblaciones de *T. molitor* estudiadas.

Cruce 1		Cruce 2 (complementario)	
Origen del macho	Origen de la hembra	Origen del macho	Origen de la hembra
España	España	España	España
España	China	China	España
España	Corea del Sur	Corea del Sur	España
España	Inglaterra	Inglaterra	España
China	China	China	China
China	Corea del Sur	Corea del Sur	China
China	Inglaterra	Inglaterra	China
Corea del Sur	Corea del Sur	Corea del Sur	Corea del Sur
Corea del Sur	Inglaterra	Inglaterra	Corea del Sur
Inglaterra	Inglaterra	Inglaterra	Inglaterra
Control			

Se recolectaron cuatro larvas de *T. molitor* en cada una de las siguientes ubicaciones geográficas:

- España (S): Esparragal, 18, 47155 Santovenia de Pisuerga, Valladolid.
- Inglaterra (E): 60–61 Barnes High St, Londres SW13 9LF.
- China (C): Distrito de Xiacheng, Hangzhou, Zhejiang, China (310004).
- Corea del Sur (K): 6-1 Nangmin-ro, Nangmin-dong, Dongnae-gu, Busan.

Diseño de los cruces y configuración experimental.

Se establecieron diez combinaciones de cruces: S×S, S×C, S×K, S×E, C×C, C×K, C×E, K×K, K×E y E×E. La primera letra indica el origen de la hembra y la segunda el del macho. Para cada cruce, se realizaron tres réplicas, cada una con 50 hembras y 50 machos, lo que resultó en 60 bandejas experimentales, más una bandeja de control homogénea. Cada bandeja (20 × 30 cm, área superficial: 0.06 m²) se mantuvo en una cámara ambiental controlada bajo condiciones de cría estandarizadas detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de cría de las bandejas con los respectivos cruces de *T. molitor* durante el experimento.

Condiciones dentro de la cámara de cría	
Temperatura (°C)	22 - 26
Humedad relativa (%)	40 - 60
Nº de horas de luz al día	4
Tipo de sustrato	Salvado de trigo
Método de suministro de humedad	40 gramos suministrados cada 3 días
Densidad (individuos por bandeja)	100

El grupo control consistió en una sola población no manipulada mantenida bajo condiciones idénticas (Figura 1).

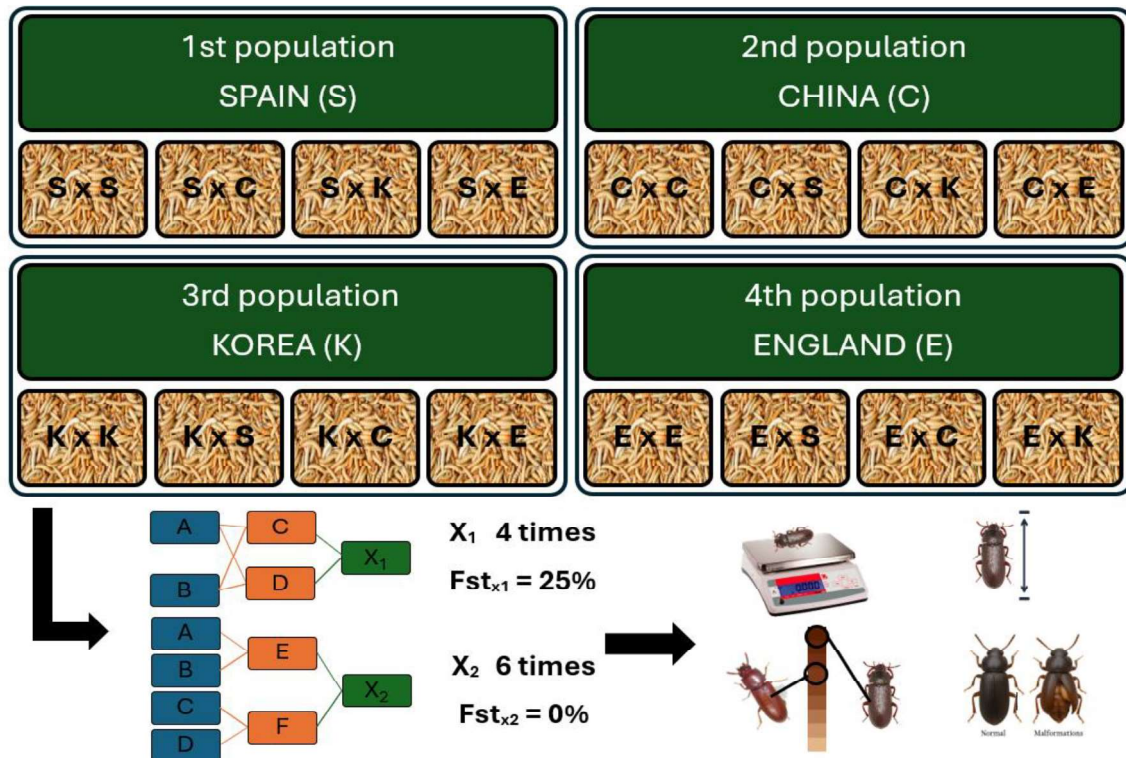


Figura 1: Figura 1: Diseño experimental y resumen de las variables medidas. La sección superior ilustra las poblaciones y los cruces de *T. molitor* incluidos en el estudio. La sección inferior izquierda presenta el coeficiente de consanguinidad de cada cruce y el número de cruces por caso. La sección inferior derecha resume las variables medidas: color, peso, malformaciones y longitud.

Recolección de muestras

Para cada cruce (generación F2), se seleccionaron 30 machos adultos, con 10 individuos por réplica. Para eliminar posibles efectos de alelos ligados al sexo, los machos se tomaron equitativamente de bandejas de cruces recíprocos. Todos los individuos se recolectaron al alcanzar la etapa adulta y se mantuvieron hasta completar su ciclo de vida natural y morir, para asegurar que la edad no afectara las variables estudiadas. Posteriormente, se secaron para eliminar variabilidad asociada al contenido de agua y el tiempo de desarrollo.

Mediciones morfológicas y fenotípicas

Se registraron las siguientes variables:

- Peso corporal: Medido con una balanza de precisión Accuris™ al miligramo más cercano (0.001 g).
- Malformaciones: Registradas como una variable binaria (presencia o ausencia de defectos morfológicos). Las malformaciones evaluadas incluyeron deformidades en los élitros o en el exoesqueleto abdominal, especialmente en casos donde el abdomen sobresalía anormalmente entre las alas (Figura 2).

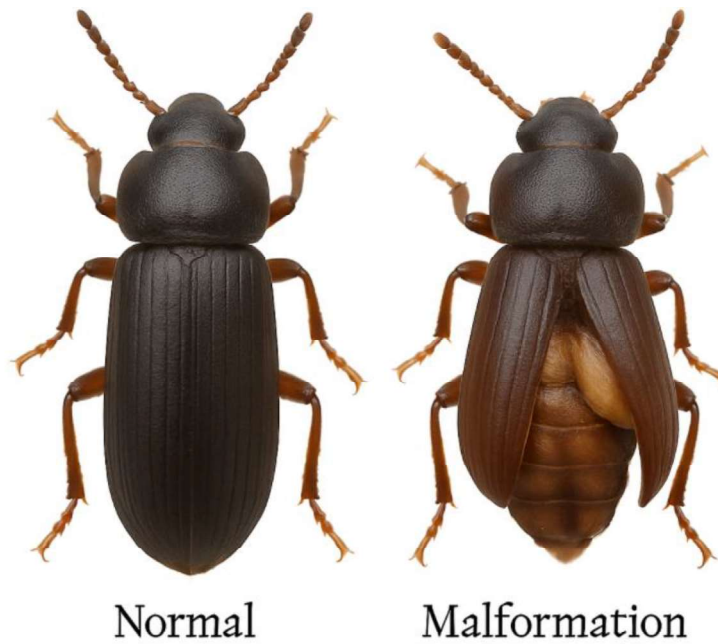


Figura 2: Las malformaciones estudiadas se basaban en defectos abdominales para los especímenes estudiados de *T. molitor*, concretamente casos en los que el abdomen sobresalía anormalmente entre los élitros.

- Longitud corporal: Medida desde la punta del abdomen hasta la base de las mandíbulas con un calibrador digital (Figura 3).



Figura 3: Se recogieron datos de longitud de cada espécimen de *T. molitor* desde la punta del abdomen hasta la cabeza siguiendo el eje longitudinal.

- Coloración: Los valores RGB se extrajeron de fotografías digitales estandarizadas tomadas con un estereomicroscopio STEMI-200-C, una computadora Lenovo ThinkPad y el software SPOT 4.6 Advanced™. El color se midió en el centroide de los élitros usando la herramienta cuentagotas de Photoshop (radio de 25 píxeles), bajo iluminación y posicionamiento constantes (Figura 4). Para medir la coloración a partir de las fotografías, primero se seleccionó un punto blanco de referencia en cada imagen para calibrar el balance de blancos, asegurando iluminación uniforme y corrección de color en todas las muestras. Luego, se midió el color en un punto específico de cada escarabajo. Los datos resultantes se registraron en la escala RGB (Rojo, Verde,

Azul), que representa los colores a través de combinaciones de estos tres componentes primarios de luz. Cada canal varía entre 0 y 255, donde (0, 0, 0) corresponde al negro, (255, 255, 255) al blanco, y otras combinaciones representan una amplia gama de colores.

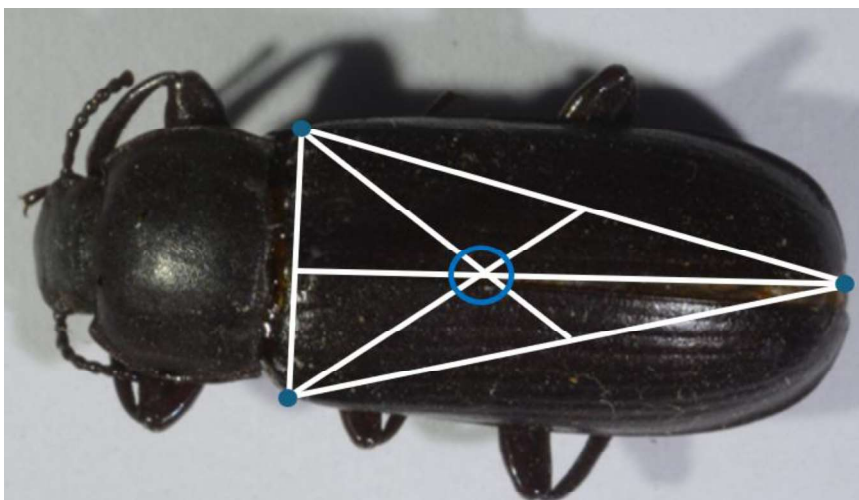


Figura 4: Se tomaron fotografías para determinar el color en el baricentro del triángulo formado por los vértices que delimitan los élitros de cada espécimen de *T. molitor*.

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron utilizando SPSS y Microsoft Excel. Se aplicaron los siguientes procedimientos estadísticos:

- Estadística descriptiva: Se calcularon medidas de tendencia central, dispersión y forma de la distribución para todas las variables cuantitativas por cruce.
- Incidencia de malformaciones: Analizada mediante prueba de Chi-cuadrado ($\alpha = 0.05$). Hipótesis nula: las frecuencias de malformaciones son iguales entre cruces.
- Rasgos cuantitativos: Se evaluó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Debido a la no normalidad en algunos casos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$) para evaluar diferencias en las medianas. Los casos significativos se analizaron con la prueba post hoc de Dunn.
- Análisis de correlación: Se utilizó la correlación por rangos de Spearman para evaluar asociaciones entre variables cuantitativas y cualitativas.
- ANCOVA: Se aplicó para evaluar diferencias en la condición (peso ajustado por longitud corporal) entre cruces. Los datos fueron transformados $\log_{10}$ y se excluyeron valores atípicos para cumplir con los supuestos paramétricos. La transformación logarítmica se utilizó exclusivamente para este análisis a fin de mejorar la normalidad de los residuos, estabilizar las varianzas de grupo y asegurar una relación lineal entre la covariable y la variable dependiente.
- Análisis de Componentes Principales (PCA): Se realizó para identificar patrones multivariantes y reducir la dimensionalidad entre los rasgos morfológicos.

Control de calidad y ética

La consistencia en las mediciones se aseguró repitiendo los registros en un subconjunto aleatorio de individuos. Se aplicó validación cruzada para identificar y excluir valores

atípicos. Todos los procedimientos cumplieron con las normas institucionales e internacionales sobre el uso ético de invertebrados en investigación.

Resultados

Los resultados se estructuran en tres subsecciones principales: (1) estadística descriptiva para cada variable y cruce, (2) comparaciones inferenciales entre tipos de cruces, y (3) correlaciones entre variables.

Análisis descriptivo

Los rasgos cuantitativos—incluyendo coloración, peso y longitud—se resumieron utilizando estadísticas descriptivas estándar (media, mediana, moda, desviación estándar, rango y cuartiles). La frecuencia de malformaciones se calculó como porcentaje para cada cruce.

Coloración

El color se evaluó utilizando el promedio de los componentes RGB (Figura 5). El cruce C×C presentó el valor medio más alto de coloración (24.69), mientras que el cruce C×K mostró el más bajo (7.51). Se observó simetría en la distribución en los cruces C×E y K×E, donde las medias coincidían con las medianas y modas. El cruce C×C presentó el rango más amplio (94.33) y la mayor varianza (479.08), indicando alta dispersión. Los valores de asimetría (skewness) y apuntamiento (kurtosis) variaron entre cruces: S×C mostró una distribución muy picuda (kurtosis = 14.68), mientras que S×K mostró la más plana (kurtosis = 0.12). Las distribuciones oscilaron entre altamente simétricas (S×K, skewness = 0.35) y fuertemente sesgadas (K×K, skewness = 4.51).

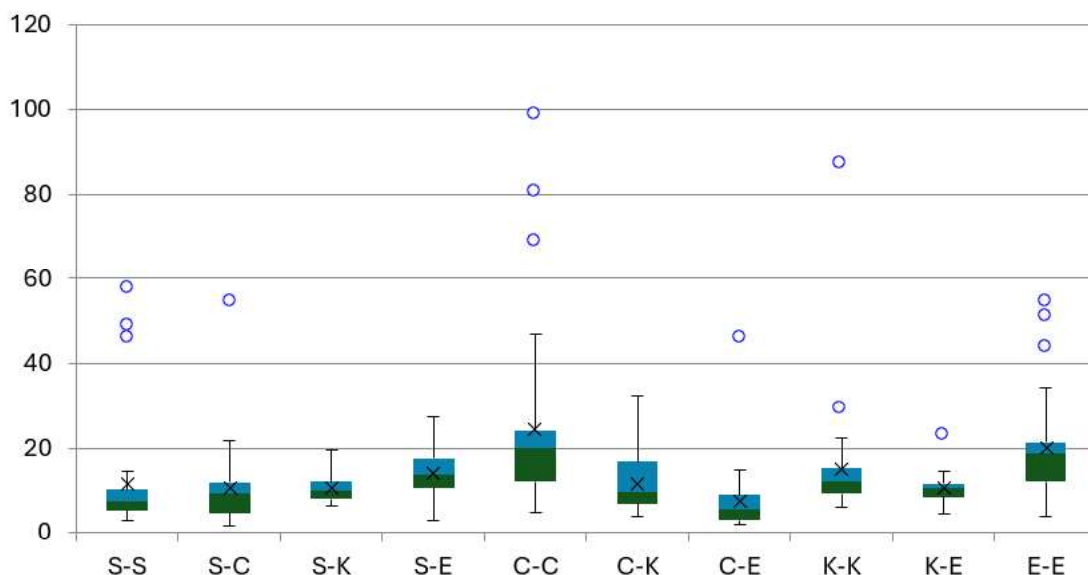


Figura 5: Diagrama de cajas que muestra los valores atípicos de la variable color en los distintos cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: S×S (España x España), S×C (España x China), S×K (España x Corea del Sur), S×E (España x Inglaterra), C×C (China x China), C×K (China x Corea del Sur), C×E (China x Inglaterra), K×K (Corea del Sur x Corea del Sur), K×E (Corea del Sur x Inglaterra) y E×E (Inglaterra x Inglaterra).

Peso

Los pesos medios más altos se observaron en los cruces S×S y S×C (0.074 g), mientras que el cruce K×K presentó el valor más bajo (0.027 g) (Figura 6). Algunas distribuciones, como

S×S y K×K, fueron aproximadamente simétricas. La mayor variabilidad ocurrió en el cruce S×S (rango = 0.148 g), y la menor en C×C (rango = 0.036 g). Las medidas de asimetría y apuntamiento indicaron notables asimetrías en ciertos cruces, particularmente en C×E (skewness = 3.88, kurtosis = 18.86).

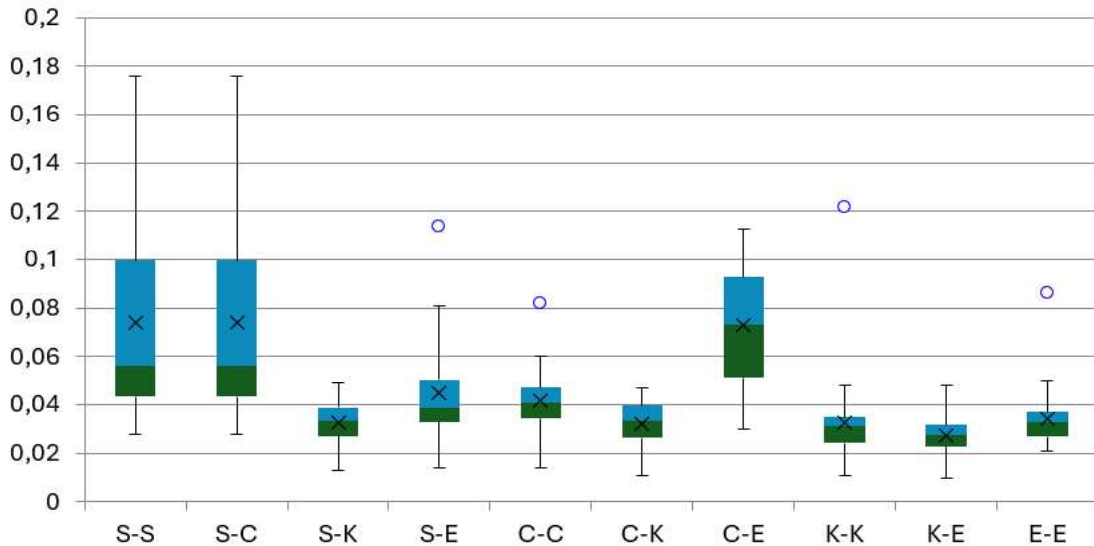


Figura 6: Diagrama de cajas con valores atípicos para la variable peso en cada uno de los cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: S×S (España x España), S×C (España x China), S×K (España x Corea del Sur), S×E (España x Inglaterra), C×C (China x China), C×K (China x Corea del Sur), C×E (China x Inglaterra), K×K (Corea del Sur x Corea del Sur), K×E (Corea del Sur x Inglaterra) y E×E (Inglaterra x Inglaterra).

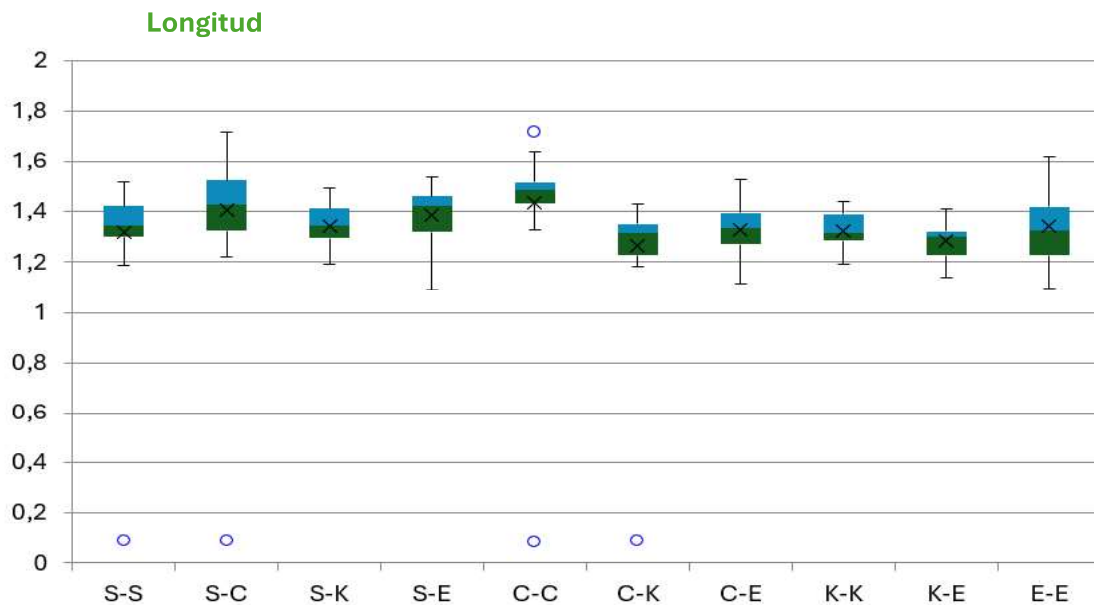


Figura 7: Diagrama de cajas con valores atípicos para la variable longitud en los distintos cruces de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: S×S (España x España), S×C (España x China), S×K (España x Corea del Sur), S×E (España x Inglaterra), C×C (China x China), C×K (China x Corea del Sur), C×E (China x Inglaterra), K×K (Corea del Sur x Corea del Sur), K×E (Corea del Sur x Inglaterra) y E×E (Inglaterra x Inglaterra).

Malformaciones

Se observó una variación marcada en la incidencia de malformaciones entre cruces. Las frecuencias más altas se presentaron en los cruces endogámicos C×C (13.3%) y S×S (10.0%), lo que concuerda con signos típicos de depresión por endogamia. En contraste, no se detectaron malformaciones en los cruces exogámicos S×K, S×E, C×K o K×E, lo que resalta el papel potencial de la craza externa para mitigar anomalías del desarrollo.

Análisis Inferencial

Rasgos cuantitativos

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre cruces para coloración, peso y longitud ($p < 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados del test de Kruskal-Wallis (U) y chi-cuadrado (χ^2) para cada variable cuantitativa estudiada en los cruces de *T. molitor*.

Variable	U	χ^2
Color	83,43	16,92
Peso	119,23	16,92
Longitud	72,82	16,92

Las pruebas post hoc de Dunn identificaron diferencias específicas por pares. Destacadamente:

- Coloración: El cruce C×E presentó el mayor número de diferencias significativas.
- Peso: Los cruces S×E y C×C mostraron la mayor variabilidad.
- Longitud: El cruce C×C difirió significativamente de múltiples otros (Tabla 4).

Tabla 4: número total de casos con diferencias significativas en las medianas de cada cruce de *T. molitor* en comparación con los demás cruces para cada variable cuantitativa.

	Color	Peso	Longitud
S×S	4	7	4
S×C	5	7	7
S×K	4	5	3
S×E	6	8	5
C×C	7	8	8
C×K	4	5	4
C×E	8	7	3
K×K	5	5	3
K×E	4	5	6
E×E	7	5	3

El peso fue la variable más diferenciadora, con diferencias medianas significativas en el 68.89% de las comparaciones por pares (Tabla 5).

Tabla 5: Tabla 5: porcentaje para cada variable en el que la mediana entre cada cruce de *T. molitor* presenta diferencias significativas.

Variable	Significante	Casos	%
Color	Acerto	54	60
	No acerto	36	40
Peso	Acerto	62	68,89
	No acerto	28	31,11
Longitud	Acerto	46	51,11
	No acerto	44	48,89

Incidencia de malformaciones

El análisis de Chi-cuadrado arrojó un valor $p = 0.083$, lo que indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de malformaciones entre cruces al nivel $\alpha = 0.05$. Sin embargo, la tendencia hacia una mayor incidencia en los cruces endogámicos sigue siendo biológicamente relevante (Tabla 6).

Tabla 6: valor de probabilidad para el chi-cuadrado de la variable cualitativa presencia de malformaciones para los cruces de *T. molitor*.

Variable	P-VALOR	α
Presencia de malformación	0,084	0,05

Análisis de correlación

Los coeficientes de correlación de Spearman revelaron varias relaciones clave:

Correlación negativa entre coloración y peso ($p < 0$), lo que sugiere que los individuos más claros tienden a tener menor masa corporal.

Correlaciones positivas entre peso y longitud, y entre longitud y coloración.

La correlación más fuerte fue entre coloración y presencia de malformaciones ($p = 0.55$), lo que indica que la pigmentación puede ser un indicador fenotípico de anomalías del desarrollo (Tabla 7).

Tabla 7: valor de probabilidad para el coeficiente de Spearman que compara el color (C), la longitud (L), el peso (W) y la frecuencia de malformaciones (M) para cada cruce de *T. molitor*.

p (C-W)	-0,213
p (C-L)	0,091
p (W-L)	0,447
p (C-M)	0,557
p (W-M)	0,479
p (L-M)	0,453

ANCOVA y Análisis de Componentes Principales (PCA)

El ANCOVA mostró diferencias significativas en la condición corporal (peso ajustado por longitud) entre cruces (Tabla 8).

Tabla 8: Tabla 8: resultados de los análisis ANCOVA de la condición en adultos de *T. molitor*. la longitud es la covariable, y la cruz es el factor fijo.

	F	D.f.	P
Longitud	67.22	1.19	<0.001
Cruce	2.90	9.19	<0.01
Longitud x cruce	2.95	9.19	<0.01

Las comparaciones post hoc indicaron que el cruce C×E tuvo el índice de condición más alto ($p < 0.001$), seguido por S×C y S×S (Figura 8).

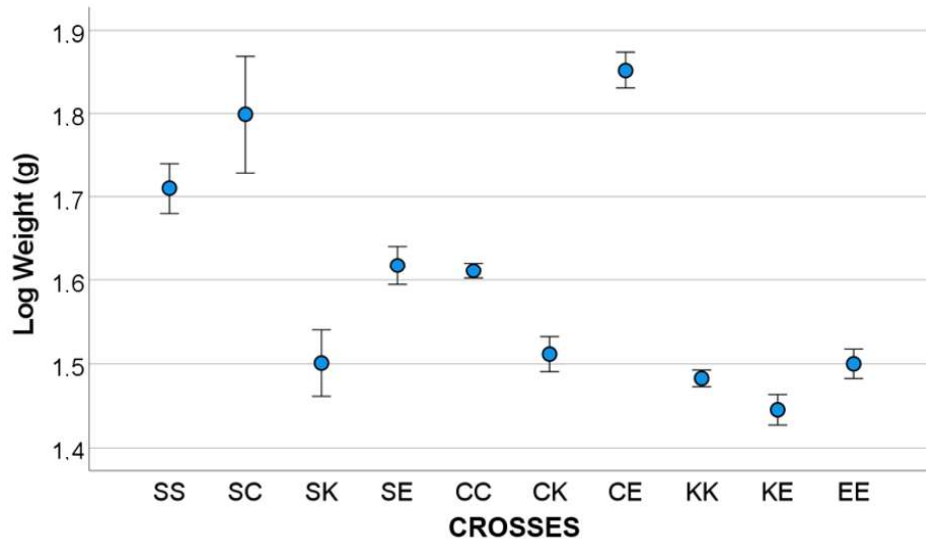


Figura 8: Comparación de la condición con las medias ajustadas al tamaño ($\pm 95\%$ C.L.) entre diferentes cruces en adultos de *T. molitor*. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: S×S (España x España), S×C (España x China), S×K (España x Corea del Sur), S×E (España x Inglaterra), C×C (China x China), C×K (China x Corea del Sur), C×E (China x Inglaterra), K×K (Corea del Sur x Corea del Sur), K×E (Corea del Sur x Inglaterra) y E×E (Inglaterra x Inglaterra).

El PCA explicó el 86.01% de la varianza total en dos componentes:

- CP1 (49.74%): Asociado positivamente con peso y longitud.
- CP2 (36.28%): Correlacionado con la coloración (Tabla 9).

Tabla 9: matriz de componentes rotada para los componentes con valores superiores a 1 para los componentes 1 y 2 para los cruces de *T. molitor*.

	Componente	
	1	2
Peso	0.781	-0.445
Longitud	0.900	0.209
Color	0.006	0.958

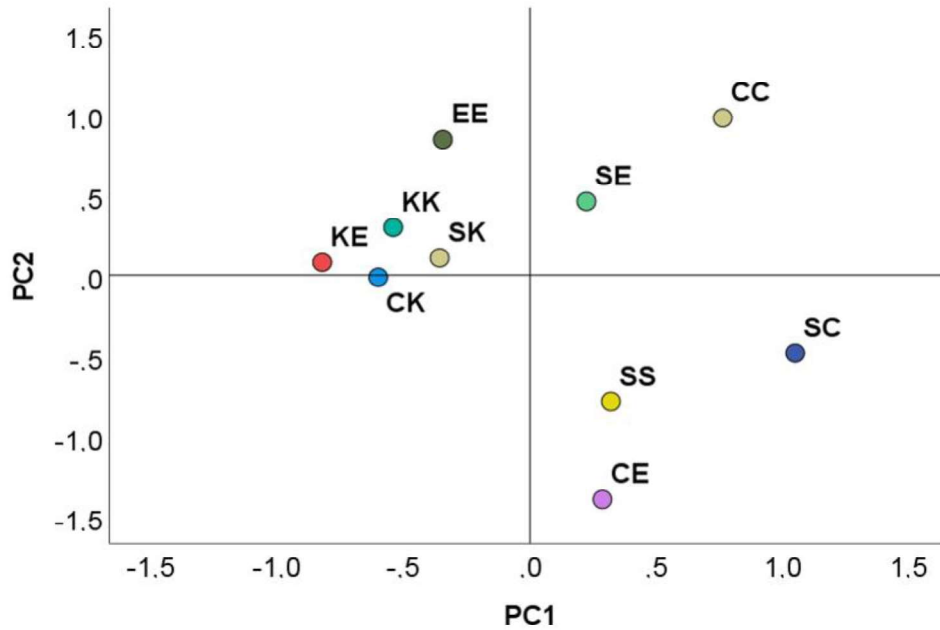


Figura 9: Representación gráfica de los centroides de cada cruce de *T. molitor* en función de las puntuaciones factoriales obtenidas por regresión para cada uno de los individuos del ACP. Los cruces estudiados en función del origen de los progenitores fueron clasificados en: SxS (España x España), SxC (España x China), SxK (España x Corea del Sur), SxE (España x Inglaterra), CxC (China x China), CxK 8China x Corea del Sur), CxE (China x Inglaterra), KxK (Corea del Sur x Corea del Sur), KxE (Corea del Sur x Inglaterra) y ExE (Inglaterra x Inglaterra).

Los cruces con progenitores coreanos (K) se agruparon en el cuadrante superior izquierdo del gráfico PCA, caracterizados por menor tamaño y pigmentación. En contraste, los cruces derivados de China (C), particularmente SxC, se agruparon en el lado opuesto, indicando mayor tamaño corporal y mejor condición (Figura 9).

Discusión

Este estudio aporta evidencia de que el cruzamiento entre poblaciones geográficamente distintas de *T. molitor* afecta rasgos fenotípicos, incluidos el peso, la longitud, la coloración y la tasa de malformaciones.

Heterogeneidad genética y expresión fenotípica. Las diferencias significativas entre cruces sugieren que la variación genética desempeña un papel clave en los rasgos fenotípicos. Los cruces entre poblaciones genéticamente distantes tendieron a mostrar vigor híbrido, mientras que las combinaciones endogámicas como CxC y SxS fueron más propensas a presentar malformaciones. Estos hallazgos respaldan investigaciones previas que vinculan la endogamia con inestabilidad del desarrollo y disminución de la aptitud biológica (Adamaki-Sotiraki et al. 2023a, 2023b). Tendencias similares se han observado en otros sistemas de insectos: Malfant et al. (2018) demostraron que los cruces interpoblacionales en *Ciona intestinalis* mejoraron la viabilidad y la consistencia del crecimiento, mientras que Lan y Nègre (2023) observaron un mejor desempeño larval y menos defectos del desarrollo en líneas híbridas de *Spodoptera frugiperda*. Además, Wang and Zhang. (2015) utilizaron perfiles de expresión génica en *Bombyx mori* para mostrar que la heterosis a menudo se basa en una regulación no aditiva de genes relacionados con el crecimiento y la inmunidad. En conjunto, estos estudios subrayan la relevancia biológica de las estrategias de cruzamiento para mejorar la estabilidad de los rasgos y mitigar los efectos negativos de la homogeneidad genética.

Incidencia de malformaciones. La ausencia de malformaciones en varios cruces heterogéneos resalta los beneficios de la diversidad genética para promover la estabilidad del desarrollo. En contraste, las tasas más altas de malformaciones en los cruces homogéneos pueden reflejar la expresión de alelos recesivos deletéreos, en línea con la teoría de la depresión por endogamia (Wright, 1931). Hallazgos recientes apoyan esta interpretación: Adamaki-Sotiraki et al. (2023b) reportaron que los cruces entre cepas genéticamente distantes de *T. molitor* resultaron en una mayor consistencia morfológica y menos anomalías del desarrollo en comparación con líneas endogámicas. De manera similar, Lan y Nègre (2023) observaron en otras especies de insectos que los híbridos intercepa de *Spodoptera frugiperda* presentaron menos defectos fenotípicos y mayor robustez, atribuida a la heterosis. Estos estudios reafirman que la hibridación no solo mejora los rasgos productivos, sino que también mitiga las consecuencias fisiológicas de la uniformidad genética.

Masa corporal y morfometría. El peso se destacó como una variable fenotípica clave, altamente sensible al fondo genético. La fuerte correlación entre peso y longitud indica que ambos rasgos pueden estar influenciados conjuntamente por el genotipo y el ambiente, en concordancia con trabajos previos sobre la fisiología del desarrollo de *T. molitor* (Morales-Ramos et al. 2012, Leclercq 1963). Estudios recientes han resaltado aún más la importancia de estos indicadores morfológicos bajo condiciones de cría variables. Por ejemplo, Rumbos et al. (2021) demostraron que el origen de la cepa afecta significativamente el tamaño y el peso larval, especialmente con diferentes sustratos alimenticios. Además, Adamaki-Sotiraki et al. (2023a) informaron que la masa corporal y la longitud están fuertemente moduladas por factores ambientales como la humedad y la temperatura, reforzando su valor para evaluar el rendimiento y seleccionar cepas adaptadas en programas de cría industrial.

Coloración y desarrollo. La coloración varió considerablemente entre cruces. Se observó una pigmentación más saturada en líneas endogámicas, posiblemente debido a la fijación de alelos. En contraste, los cruces con mayor diversidad genética mostraron una coloración intermedia o combinada, consistente con la recombinación alélica. Una fuerte correlación positiva entre la intensidad de la pigmentación y la frecuencia de malformaciones sugiere que la coloración puede actuar como un indicador indirecto de estrés durante el desarrollo. Estos resultados coinciden con hallazgos previos que respaldan el papel de la pigmentación de la cutícula como biomarcador de condición fisiológica en insectos. Lee et al. (2008) demostraron que la producción de melanina está limitada por la calidad proteica de la dieta, proponiendo que la expresión melánica puede funcionar como un indicador “honesto” del estado fisiológico del insecto. Asimismo, Ramniwas et al. (2013) encontraron que los rasgos de melanización abdominal en *Drosophila* estaban significativamente asociados con la regulación del equilibrio hídrico y estaban sujetos a presiones de selección bidireccional simultáneas. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la coloración cuticular refleja la calidad genética subyacente y la estabilidad del desarrollo, especialmente bajo condiciones de endogamia o cría subóptima o estrés ambiental. Más recientemente, Bomble et al. (2024) demostraron que en larvas de *Drosophila melanogaster*, la exposición a estresores ambientales como desecación, calor y hambre —individualmente o en combinación— activó respuestas de estrés oxidativo mediadas por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS), estrechamente ligadas a la función inmune y a la regulación metabólica. En este contexto, la variación observada en la coloración de la cutícula entre cruces de *T. molitor* puede

reflejar diferencias en la resiliencia fisiológica frente al estrés oxidativo. Dado que la síntesis de melanina es energéticamente costosa y depende de la disponibilidad de antioxidantes, la pigmentación intensa observada en individuos endogámicos podría indicar una flexibilidad fisiológica limitada y una menor capacidad para mitigar el estrés. En cambio, la pigmentación más variable en los individuos exogámicos podría señalar una mayor capacidad antioxidante y una mayor estabilidad del desarrollo bajo condiciones ambientales o metabólicas desafiantes.

Análisis de Componentes Principales y Condición Corporal. Los resultados del PCA confirmaron una agrupación morfológica basada en el origen genético. Los cruces con progenitores chinos presentaron mayor tamaño y peso (PC1), mientras que los cruces coreanos fueron más homogéneos y mostraron valores fenotípicos más bajos. El ANCOVA confirmó diferencias significativas en la condición corporal, siendo el cruce C×E el de mejor desempeño. Estas tendencias pueden reflejar historias de selección distintas, donde las líneas chinas han sido posiblemente moldeadas por una cría intensiva enfocada en rasgos comerciales (Song et al. 2022). Investigaciones recientes respaldan esta interpretación: Rumbos et al. (2021) encontraron que las cepas de gusano de la harina seleccionadas bajo condiciones industriales en China muestran mayores tasas de crecimiento y eficiencia en la conversión alimenticia en comparación con poblaciones silvestres o menos seleccionadas. Además, Eriksson y Picard (2021) destacaron que la selección de rasgos de mercado en insectos comestibles puede generar una divergencia fenotípica rápida entre colonias geográficamente separadas, incluso dentro de la misma especie. Estas observaciones subrayan cómo la presión selectiva a largo plazo, a menudo vinculada a objetivos productivos regionales, puede resultar en perfiles morfofisiológicos distintos entre cepas. En conjunto, estos resultados destacan el valor de la hibridación para optimizar los resultados de cría. Integrar datos genéticos y fenotípicos puede informar estrategias de selección que reduzcan malformaciones y mejoren los rasgos productivos en *T. molitor*.

CAPÍTULO 3



Salvando las distancias: ¿son los kilómetros la única distancia entre las poblaciones mundiales de *Tenebrio molitor*? Una visión general mediante morfometría geométrica

Resumen

Tenebrio molitor es una especie clasificada como plaga debido a los daños que puede causar en los almacenes de grano y cereales. Este insecto, perteneciente al orden Coleoptera, es cosmopolita y se distribuye por todo el mundo. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado significativamente el interés por su cría industrial e intensiva, con el objetivo de utilizar los productos que genera para aplicaciones en agricultura, alimentación animal y cosmética.

En este estudio se emplean técnicas de morfometría geométrica para clasificar las poblaciones de *T. molitor* en función de dos variables: método de cría y origen geográfico, con el fin de analizar cómo ha cambiado y se ha distribuido globalmente esta especie a lo largo del tiempo.

Se capturaron imágenes dorsales y ventrales de 10 individuos adultos de cada población (América, Europa, África y Asia). Posteriormente, se analizaron los puntos de referencia más representativos mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis Canónico de Variables (ACV) para clasificar las poblaciones.

Los resultados indican que las poblaciones modernas presentan una pérdida de diversidad morfológica en comparación con las silvestres, que son más diversas. Además, las poblaciones europeas y asiáticas están más emparentadas entre sí, mientras que las americanas y africanas muestran mayores diferencias con el resto.

Estos hallazgos sugieren que la pérdida de diversidad morfológica se ha intensificado a lo largo de la domesticación. Además, indican que el origen y la posterior expansión de la especie están correlacionados con el desarrollo de la agricultura y el colonialismo.

Palabras clave

Morfología, Cría intensiva, Morfometría geométrica, *Tenebrio molitor*, Domesticación

Introducción

Tenebrio molitor Linnaeus, 1758, conocido comúnmente como el gusano de la harina, es una especie de escarabajo cosmopolita ampliamente distribuida en todo el mundo. Tradicionalmente se lo considera una plaga importante en las industrias de la harina y los cereales debido al daño significativo que causa en instalaciones de almacenamiento de granos (Vigneron et al. 2019). Su impacto no se limita a pérdidas cuantitativas y cualitativas de los cereales almacenados; la presencia de fragmentos de insectos en productos alimenticios también puede provocar reacciones alérgicas en consumidores sensibles, representando un riesgo adicional para la seguridad alimentaria (Barre et al. 2019).

La globalización y el creciente intercambio internacional de materias primas agrícolas han facilitado la rápida expansión de *T. molitor* hacia nuevos entornos, permitiéndole establecer poblaciones robustas en diversas regiones climáticas y ecológicas. A pesar de su ubicuidad actual, la evidencia filogeográfica sugiere que su origen se encuentra en la cuenca del Mediterráneo (Mancini et al. 2019). A lo largo de los siglos, los seres humanos han invertido considerables esfuerzos y recursos en su control y erradicación, debido a su clasificación como plaga nociva. Los insecticidas químicos, particularmente los organofosforados como el pirimifos-metilo, han sido comúnmente empleados en estrategias de control (Grau et al. 2017; Boukouvala et al. 2023). Sin embargo, las preocupaciones sobre los residuos químicos, la resistencia y su impacto ecológico han llevado a una creciente restricción en su uso, especialmente en productos destinados al consumo humano o animal.

Paralelamente, *T. molitor* ha ganado atención como fuente alternativa y sostenible de proteína para la producción de alimentos y piensos (Ravzanaadii et al. 2012; Grau et al. 2017). Su perfil nutricional, alta eficiencia de conversión y bajo impacto ambiental relativo lo han posicionado como un candidato prometedor en el contexto de la bioeconomía circular. Esta doble condición—como plaga y como insecto beneficioso—resalta la importancia de comprender su biología, dinámica poblacional y estrategias adaptativas.

En este contexto, explorar la variabilidad morfológica de *T. molitor* es esencial para entender mejor cómo responden sus poblaciones a cambios ambientales, condiciones de cría y presiones antropogénicas. La morfometría geométrica ofrece un marco sólido y cuantitativo para analizar la variación de forma y la diferenciación morfológica entre poblaciones (Benítez et al. 2024). A diferencia de la morfometría tradicional, este enfoque preserva las propiedades geométricas de las estructuras y permite comparaciones detalladas de la forma, las cuales pueden vincularse a factores ecológicos, genéticos o funcionales.

Estudios previos han demostrado cómo los métodos de cría, los estresores ambientales e incluso la endogamia pueden influir en los rasgos morfológicos y fisiológicos de *T. molitor* (Grau et al. 2017). Además, los avances recientes en estudios genómicos han revelado diferencias estructurales significativas entre poblaciones de laboratorio y silvestres, lo que sugiere un trasfondo evolutivo complejo influido por la selección artificial y el aislamiento geográfico (Eleftheriou et al. 2022).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo aplicar técnicas de morfometría geométrica para evaluar la variación en forma y tamaño en poblaciones de *T. molitor* a través de diferentes contextos geográficos y de cría. Al analizar especímenes recolectados de distintos continentes (América, Europa, África y Asia), se busca dilucidar los patrones

de divergencia morfológica y sus posibles impulsores evolutivos. Esta investigación no solo contribuye a la comprensión fundamental de la evolución morfológica de la especie, sino que también ofrece conocimientos prácticos para su manejo, ya sea como plaga o como recurso en sistemas de cría industrial.

Materiales y métodos

Especímenes

Los especímenes de *T. molitor* fueron recolectados de poblaciones silvestres, de criaderos convencionales y de instalaciones industriales de cría de insectos. Cada grupo de insectos que compartía las mismas características fue designado como una población. Todas las poblaciones incluyeron 10 individuos adultos (Figura 1).

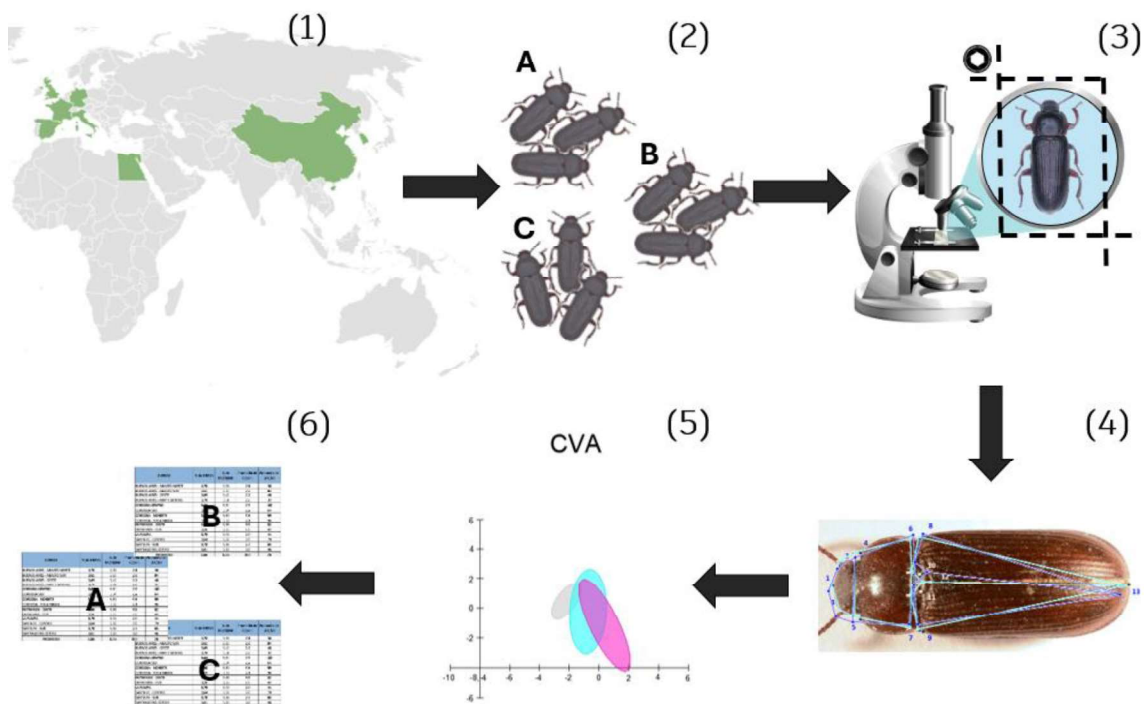


Figura 1: esquema del proceso de estudio seguido, 1 y 2: recogida de poblaciones de *T. molitor* en todo el mundo, 3: captura de imágenes ventrales y dorsales, 4: colocación de puntos de referencia, 5: estudio de los datos y 6: comparación entre poblaciones.

La Tabla 1 presenta la lista completa de poblaciones junto con sus características específicas en las tres variables estudiadas: país de origen y método de cría. También se proporcionan los códigos de población utilizados en el estudio y la leyenda correspondiente para las figuras.

Las larvas vivas se recibieron y criaron en condiciones controladas. La cría se realizó en bandejas de polietileno blanco (12 × 20 × 8 cm), con 250 larvas por bandeja. A cada población se le proporcionó inicialmente una capa de 3 cm de salvado de trigo orgánico como sustrato. Cada dos semanas se añadieron 150 g de salvado fresco. El tiempo de desarrollo varió según la población y el tamaño larval al momento de la adquisición, tardando aproximadamente de 1 a 2 meses hasta que 10 individuos alcanzaran el estadio adulto. Para mantener la hidratación, se añadieron 200 g de papa fresca semanalmente.

Durante el periodo de cría, la temperatura se mantuvo entre 20–24°C y la humedad relativa entre 35–45%.

Tabla 1. Código del estudio, origen y condiciones de cría para las poblaciones de *T. molitor*.

Código	Origen	Tipo de crianza
SPC201	España	Convencional
SPC202	España	Convencional
SPW20	España	Silvestre
SPI201	España	Intensivo
SPI202	España	Intensivo
FRC20	Francia	Convencional
GEC20	Alemania	Convencional
ITC201	Italia	Convencional
KOC20	Corea del Sur	Convencional
CHC20	China	Convencional
EGC20	Egipto	Convencional
ENC20	Inglaterra	Convencional

Preparación de especímenes

Los individuos criados vivos fueron inmovilizados colocándolos en una cámara fría durante 10 minutos antes de la captura de imágenes.

Captura de imágenes

Las fotografías se tomaron bajo condiciones estandarizadas para capturar las estructuras anatómicas relevantes, asegurando iluminación uniforme y resolución suficiente para el análisis posterior. Los individuos inmovilizados fueron fotografiados con un microscopio estereoscópico conectado a una cámara digital, usando el siguiente equipo:

- Microscopio estereoscópico STEMI-200-C
- Ordenador Lenovo ThinkPad
- Software SPOT 4.6 Advanced™

Se tomaron fotografías en vista dorsal para todas las poblaciones de museo. Para las poblaciones criadas desde larvas, se capturaron tanto vistas dorsales como ventrales. En cada imagen se incluyó una regla de escala de 1 mm para conservar la consistencia de escala.

Definición de landmarks

Se seleccionaron un total de 13 landmarks anatómicos para las imágenes dorsales y 28 para las ventrales. Estos puntos fueron elegidos por su relevancia biológica y repetibilidad, incluyendo sitios de inserción de apéndices, uniones intersegmentales y límites de áreas corporales. Se evitó el uso de pseudolandmarks subjetivos para asegurar la fiabilidad de los datos (Figura 2)

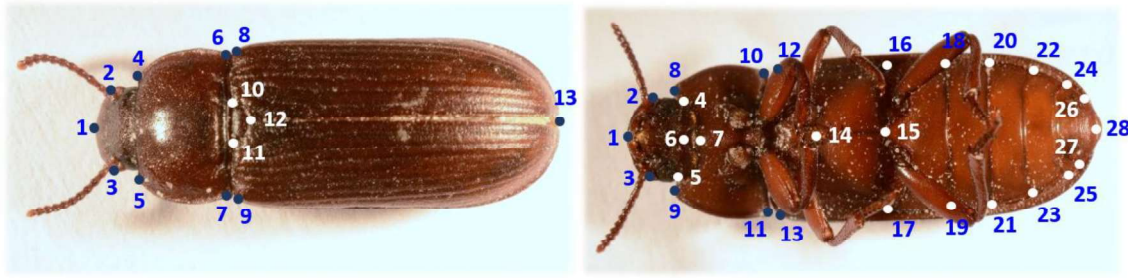


Figura 2: localización de los puntos de referencia elegidos para la posición dorsal y ventral para la especie *T. molitor*.

Adquisición y procesamiento de datos morfométricos

Las coordenadas de los landmarks se extrajeron utilizando tpsUtil v1.82 (64-bit) para organizar las bases de datos de imágenes y tpsDig v1.40 (64-bit) para digitalizar los landmarks. Todas las imágenes fueron calibradas para minimizar distorsiones y asegurar la comparabilidad entre individuos.

El análisis morfométrico se basó en la superposición de Procrustes para eliminar diferencias debidas a traslación, rotación y escala.

Análisis estadístico

Se utilizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Variantes Canónicas (CVA) para comparar poblaciones y explorar la variación en la forma. Para minimizar el sesgo relacionado con el tamaño o la orientación del espécimen, se utilizaron centroides poblacionales y configuraciones medias en las visualizaciones.

Se realizaron pruebas de permutación para evaluar la significancia estadística entre formas poblacionales. Las diferencias morfológicas se visualizaron mediante rejillas de deformación promedio para cada población.

Software utilizado para el análisis

Todos los análisis morfométricos y estadísticos se realizaron con el software MorphoJ. También se utilizó AutoCAD para asistir en la preparación de figuras y visualización gráfica de estructuras morfométricas.

Control de calidad

Se repitieron las mediciones en un subconjunto aleatorio de individuos para evaluar la precisión y repetibilidad en la colocación de landmarks. Se emplearon métodos de validación cruzada para detectar y eliminar puntos de datos inexactos.

Resultados

Se realizaron dos análisis por separado. El primero se basó en fotografías dorsales de *T. molitor* de todas las poblaciones disponibles. El segundo utilizó fotografías ventrales de poblaciones criadas a partir de larvas vivas, permitiendo la validación cruzada de los patrones morfológicos observados (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla 2. Valores posibles para todas las variables estudiadas en las poblaciones de *T. molitor*.

Método de cría	Origen geográfico
Intensivo	
Convencional	Diferentes países
Silvestre	

El análisis morfométrico geométrico reveló una variación significativa en la forma entre las poblaciones de *T. molitor*.

Análisis exploratorio

El Análisis de Componentes Principales (PCA) indicó una notable variación morfológica en varios puntos de referencia entre las distintas poblaciones de *T. molitor* (Figura 3).

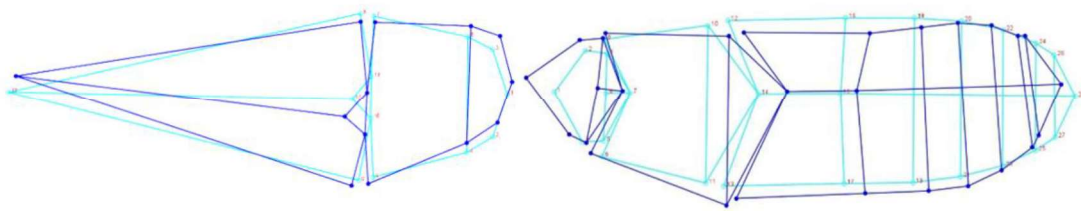


Figura 3: Variación de la morfología de la población china de *T. molitor* analizada por morfometría geométrica con la media del resto de las poblaciones, representada con un diagrama de nodos y bordes para las posiciones dorsal y ventral.

La variación de los puntos por orientación fue la siguiente:

- Imágenes dorsales: puntos de referencia 2, 3, 10, 11, 12 y 13, que corresponden a:
 - Inserción de las antenas, que varía en posición entre poblaciones.
 - Escutelo, que difiere en tamaño y desarrollo.
 - Morfología de la punta del abdomen.
- Imágenes ventrales: puntos 1, 10, 11, 12, 13, 14, 16 y 17, que representan:
 - Curvatura máxima en la parte anterior de la cabeza.
 - Curvatura posterior del tórax.
 - Curvatura anterior del abdomen.
 - Inicio del discrimen.
 - Inserción del primer segmento abdominal.

Para el análisis dorsal: se obtuvieron 22 PC, de los cuales los dos primeros explicaron el 73.01% de la varianza total de forma.

Y para el análisis ventral: se generaron 52 PC; los primeros explicaron el 31.1% de la varianza, lo que indica mayor complejidad morfológica (Figura 4).

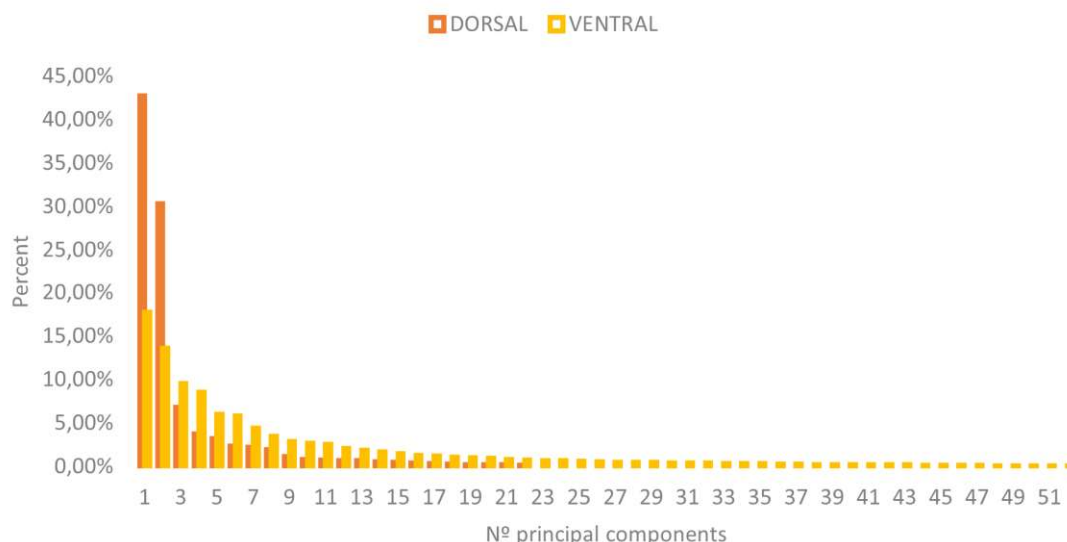


Figura 4: relación entre el número de componentes principales y % en que inciden en el estudio de la forma para la posición dorsal y ventral para la especie *T. molitor*.

El Análisis de Variables Canónicas (CVA) reveló diferentes conjuntos de puntos de referencia influyentes:

- Imágenes dorsales: puntos 2, 3, 6, 7 y 13. Los puntos 6 y 7 se ubican en las esquinas posteriores del tórax.
- Imágenes ventrales: puntos 1, 14, 26 y 27. Estos reflejan variaciones en la curvatura de la cabeza, inicio del discrimen y segmentos abdominales posteriores.

Análisis comparativos y estadísticos

Las poblaciones se compararon según tres variables principales de clasificación: año de recolección, método de cría y origen geográfico.

Para evaluar la eficacia de las vistas dorsales vs. ventrales en la discriminación de poblaciones, se realizó un MANOVA. Los resultados, presentados en los Anexos 1 (dorsal) y 2 (ventral), mostraron que las imágenes ventrales son significativamente más efectivas para la clasificación. En concreto, las comparaciones dorsales arrojaron $p > 0.05$ en el 74% de los casos, mientras que en las ventrales esto ocurrió solo en el 18% de las comparaciones. Esta diferencia se atribuye al menor número de puntos de referencia y a la mayor presencia de puntos tipo II y pseudopuntos en la vista dorsal.

Por lo tanto, se priorizaron las vistas ventrales en el análisis cuando estaban disponibles. No obstante, las imágenes ventrales no se obtuvieron de los especímenes de museo para preservar su integridad.

Análisis según el método de cría

El PCA indicó que las poblaciones silvestres presentaron la mayor variabilidad morfológica, seguidas por las criadas industrialmente y, por último, las criadas de manera tradicional por pequeños productores para autoconsumo.

Los resultados del CVA mostraron un solapamiento mínimo entre las poblaciones silvestres e industriales, lo que sugiere que son las más diferenciadas morfológicamente. Las poblaciones tradicionales ocuparon una posición intermedia (Figura 5).

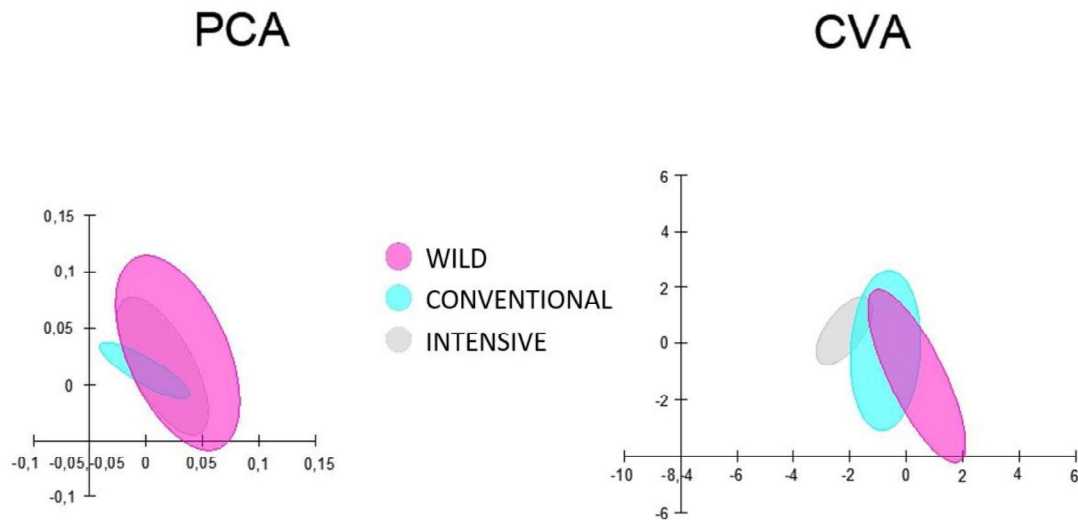


Figura 5: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del método de producción de las poblaciones de *T. molitor* para la posición dorsal. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Análisis por origen geográfico

Según el PCA, las poblaciones con menor variabilidad morfológica fueron las de África y América, seguidas por las asiáticas. Las poblaciones europeas mostraron la mayor variabilidad (Figura 6).

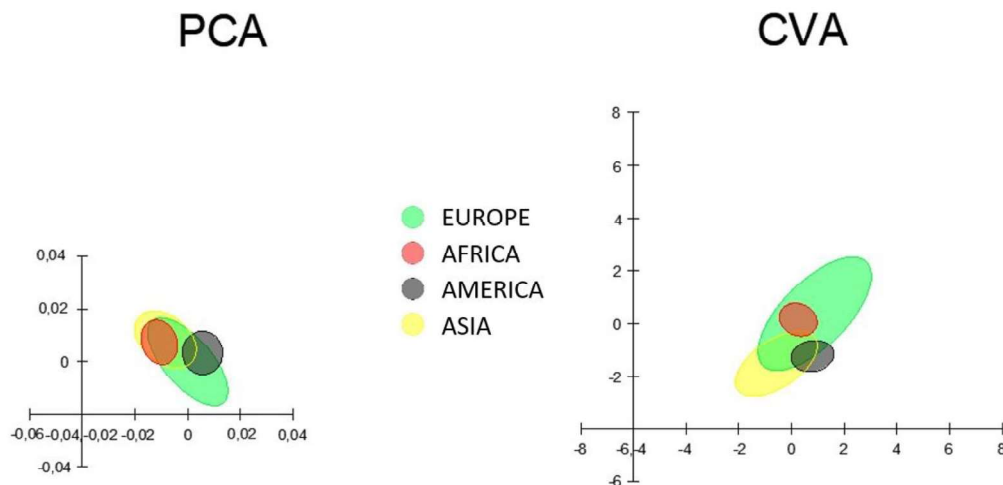


Figura 6: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del continente de origen de las poblaciones de *T. molitor* para la posición ventral.

El CVA mostró que las poblaciones africanas y americanas eran las más distintas entre sí, con diferencias también sustanciales en las comparaciones Asia-África. Las poblaciones europeas se solaparon con varios otros grupos regionales.

En el PCA, la población china presentó la mayor variabilidad interna en la forma, seguida por las poblaciones de Italia, Egipto y España. Las poblaciones de Corea del Sur y Francia mostraron la menor variabilidad (Figura 7).

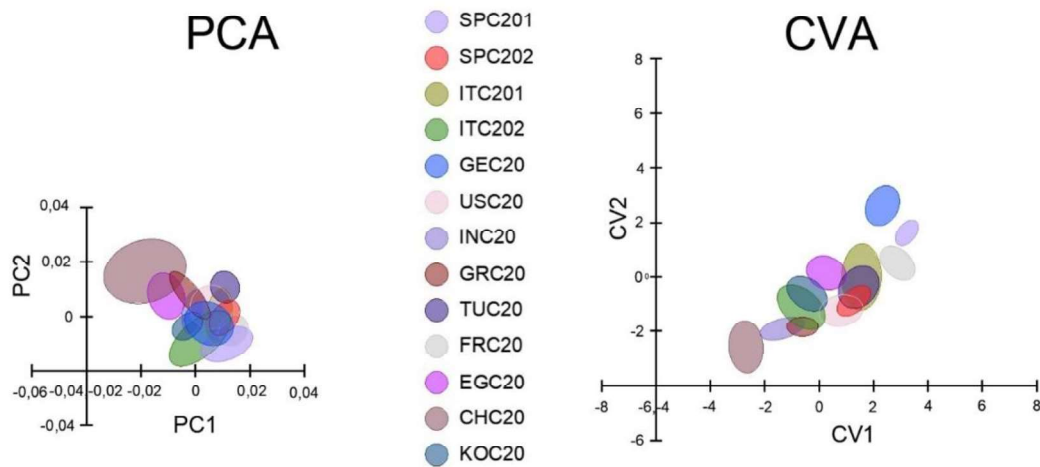


Figura 7: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en función del país de origen de las poblaciones de *T. molitor* para la posición ventral. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Los resultados del CVA indicaron que las poblaciones de Italia y una de España eran las más similares. Las más divergentes fueron las de Alemania y China.

En la Figura 8 puede observarse que, en el CVA, las poblaciones mediterráneas ocupan una posición central, desde la cual emergen dos “ramas”: la asiática e inglesa (bastante similares) y la germánica.

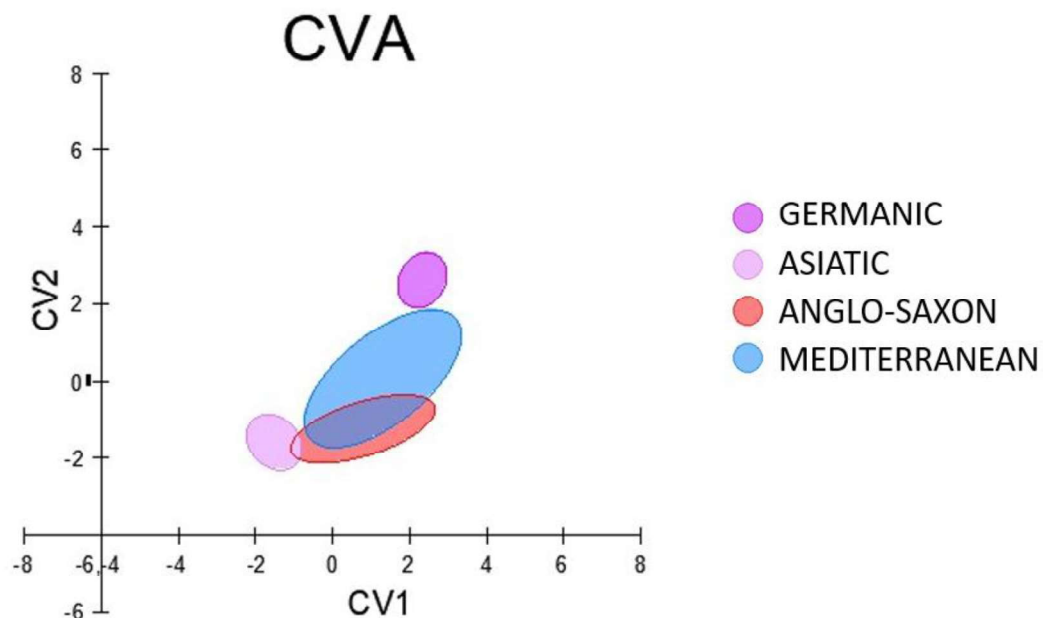


Figura 8: análisis de las variables canónicas (CVA) en función de las poblaciones *T. molitor* agrupadas con características similares para la posición ventral.

Análisis de las poblaciones españolas

Los resultados del PCA mostraron que, dentro de España, las poblaciones criadas de forma intensiva presentaron la mayor variabilidad en la forma, mientras que la menor correspondió a la cría convencional.

El CVA indicó que las poblaciones criadas intensivamente eran claramente distintas del resto. Las poblaciones criadas de forma convencional fueron más similares morfológicamente a las poblaciones silvestres, independientemente del siglo de recolección (Figura 9).

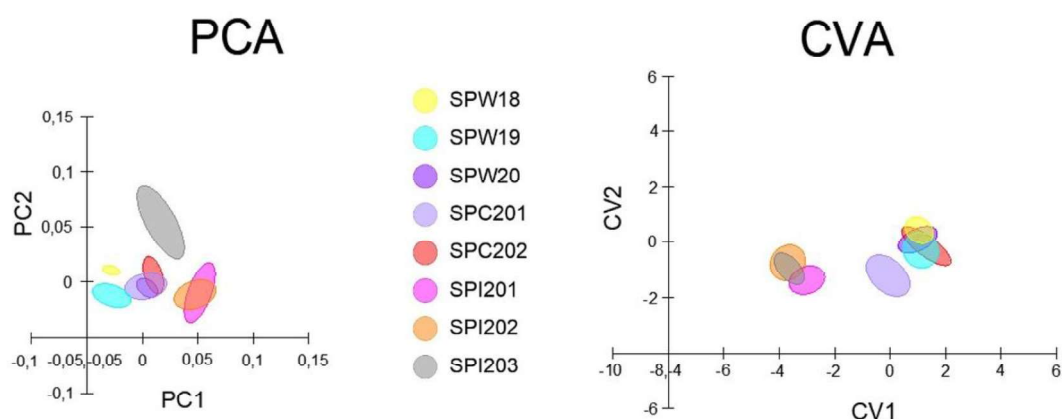


Figura 9: análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) de todas las poblaciones de *T. molitor* encontradas en España para la posición dorsal. Las codificaciones aparecen explicadas en la tabla 1.

Valores atípicos

La población china mostró el mayor número de valores atípicos, con distancias de Mahalanobis que oscilaron entre 6.4 (vs. la población de EE. UU.) y 8.8 (vs. la población española). Los valores detallados se encuentran en los Anexos 1 y 2.

Discusión

En este estudio se utilizó morfometría geométrica para analizar poblaciones de *T. molitor* recolectadas en distintas regiones del mundo. El objetivo fue contribuir a una comprensión más amplia de cómo las técnicas basadas en la forma pueden apoyar la clasificación de poblaciones de insectos, especialmente en especies agroalimentarias (Bravo Peña 2021; Zelditch et al. 2004; Lawing y Polly 2010).

Las muestras analizadas proceden de distintas partes del mundo y bajo diversas condiciones de cría. Aunque comúnmente se utilizan alas de insectos en análisis morfométricos —incluidos escarabajos—, otras estructuras anatómicas también pueden ofrecer datos valiosos (Adams y Funk 1997; Rosenberg 2002). En este estudio se analizó la forma del exoesqueleto de la cabeza, tórax y abdomen para obtener conclusiones significativas (Perić-Mataruga et al. 2008; Tatsuta et al. 2018; Claude et al. 2003).

Esta investigación representa la primera aplicación de morfometría geométrica para diferenciar poblaciones de *T. molitor* y evaluar la variación intraespecífica. Para el análisis

dorsal, se seleccionaron puntos en las posiciones más distales y vértices del tegumento, especialmente en las zonas de inserción elitral. Para el análisis ventral, se usaron puntos distales similares, junto con el discrimen (la línea media entre el primer y segundo par de patas) (Dujardin 2011; Phanitchat et al. 2019; Sasakawa 2016; Pretorius y Scholtz 2001; Rohlf y Slice 1990).

Aunque las poblaciones pueden parecer visualmente similares, un análisis detallado mediante herramientas de morfometría geométrica revela diferencias sutiles pero consistentes que son características de cada grupo (Yonehara et al. 2011; Alibert et al. 2001; Klingenberg y McIntyre 1998).

Nuestros datos sugieren que, si bien las poblaciones silvestres y las criadas convencionalmente difieren de las criadas de forma intensiva, las diferencias aún no son marcadamente significativas. No obstante, si las prácticas actuales de cría continúan, es probable que estas diferencias se acentúen en el próximo siglo. Además, se observó una progresiva reducción de la variabilidad morfológica a lo largo del tiempo, probablemente debido a prácticas intensivas con escaso control sobre los niveles de endogamia (Ariza-Marín y De Luna 2020; Krams et al. 2016; Klingenberg 2011). Esta reducción de la variabilidad podría dificultar la adaptabilidad futura frente a cambios ambientales o resistencia a enfermedades (Felsenstein 1985; Gould 1966).

Al analizar las poblaciones según el método de cría, las poblaciones silvestres mostraron mayor diversidad de forma. Además, en el análisis CVA, las poblaciones silvestres no se solaparon con las de cría intensiva, lo que indica una clara diferenciación. Estos resultados son consistentes con lo anterior y con investigaciones que sugieren que la endogamia afecta negativamente la aptitud y el comportamiento de los escarabajos (Müller et al. 2018a; Müller et al. 2018b; Konuma y Chiba 2007).

Es importante destacar que no se encontró evidencia de que individuos escapados de criaderos comerciales afecten los reservorios genéticos de poblaciones silvestres, lo cual sugiere un adecuado control y manejo en las operaciones comerciales (Lövei y Sunderland 1996; Roff 1990).

El análisis geográfico, respaldado por estudios recientes, sugiere que *T. molitor* probablemente se originó en la cuenca oriental del Mediterráneo. Desde allí se dispersó por Europa, Asia y África, llegando finalmente a América. Esta hipótesis se ve reforzada por la mayor variabilidad morfológica observada en las poblaciones asiáticas y, especialmente, europeas, así como por cierto grado de solapamiento entre estos grupos. La dispersión inicial de la especie parece correlacionarse con el desarrollo de la agricultura, mientras que su expansión transoceánica estaría ligada a las rutas comerciales coloniales (Harlan 1971; Beutel et al. 2008; Barton et al. 2011).

En particular, el gráfico correspondiente a España respalda estos hallazgos: se identificaron dos grupos claramente diferenciados —uno compuesto por poblaciones de cría intensiva y otro por poblaciones silvestres o de cría convencional—, sin evidencia de solapamiento espacial.

CAPÍTULO 4



Efectos de la dieta y el origen geográfico en la microbiota intestinal de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae)

Resumen

La microbiota intestinal, compuesta por los microorganismos que habitan en el intestino, es esencial para el buen funcionamiento del aparato digestivo. Aunque cabe suponer que la composición microbiana es homogénea entre individuos de la misma especie, diversos estudios han demostrado lo contrario. Este estudio analiza la diversidad alfa y beta de la microbiota intestinal en siete poblaciones de *Tenebrio molitor* procedentes de China, Corea del Sur, Reino Unido, España, Alemania, Egipto y una población silvestre. Se observó una considerable variabilidad en la diversidad alfa entre las poblaciones, siendo la egipcia la que presentaba la mayor diversidad, lo que sugiere una comunidad microbiana más heterogénea probablemente influida por factores dietéticos y ambientales. La población británica mostró la diversidad más baja, lo que indica un ecosistema más homogéneo. En términos de beta diversidad, las poblaciones egipcia y salvaje presentaron una mayor variabilidad interindividual, mientras que la población salvaje exhibió una microbiota más uniforme. Las diferencias observadas en las poblaciones española y surcoreana apuntan a la influencia de la dieta y de factores genéticos. Estos resultados subrayan el impacto de los factores ambientales y genéticos en la composición microbiana intestinal, lo que puede tener implicaciones para la cría y la producción sostenible de *T. molitor*.

Palabras clave

Mutualismo, *Tenebrio molitor*, microbiota, bacterias, intestino

Introducción

La microbiota intestinal de los insectos desempeña un papel crucial en la salud, el desarrollo y la adaptabilidad ecológica del hospedador. Estas complejas comunidades microbianas contribuyen a procesos fisiológicos clave como la digestión, adquisición de nutrientes, modulación del sistema inmunológico y protección contra patógenos (Dillon y Dillon 2004; Douglas 2015; Schmidt y Engel 2021).

En el gusano de la harina amarillo, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), una especie cada vez más reconocida por su valor como fuente sostenible de proteínas tanto para consumo humano como animal (Ravzanaadii et al. 2012; Ghaly y Alkoaik 2009; Siemianowska et al. 2013), la microbiota intestinal se considera un componente biológico fundamental que influye no solo en la fisiología del insecto, sino también en su rendimiento productivo y en la seguridad alimentaria (Worku et al. 2018; Osimani et al. 2018).

Como ocurre en muchos otros insectos, *T. molitor* alberga una microbiota intestinal diversa y dinámica, cuya composición está moldeada por una amplia variedad de factores internos y externos. Entre los más importantes se encuentran la dieta y el sustrato alimenticio, los cuales influyen significativamente en la riqueza microbiana y la estructura de la comunidad (Campos-Vega et al. 2015; David et al. 2014; Ángel-Sánchez y Galián 2022). Las variaciones derivadas de la dieta pueden modular no solo la abundancia microbiana, sino también la presencia de taxones funcionales específicos involucrados en la degradación de quitina, fermentación y metabolismo del nitrógeno (Ben Guerrero 2018; Engel y Moran 2013).

Parámetros ambientales como la humedad (Deruytter et al. 2020; Murray 1968), temperatura y exposición a la luz (Jiang et al. 2020; Liebert et al. 2019; Kim et al. 2019) también interactúan con la composición microbiana, mientras que los procesos de manejo, como el ayuno y el lavado post-cosecha, pueden impactar significativamente la microbiota intestinal residual en los gusanos comestibles (Wynants et al. 2017; Vandeweyer et al. 2017).

La adquisición microbiana en *T. molitor* puede ocurrir mediante transmisión vertical y horizontal, y las comunidades microbianas resultantes reflejan no solo el ambiente del insecto, sino también su historia evolutiva y filogenia (Yun et al. 2014; Engel y Moran 2013). Diversos estudios han identificado filos bacterianos comunes como Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria en múltiples especies de insectos, aunque sus abundancias relativas varían según la etapa de desarrollo, el hábitat ambiental y la dieta (Wang and Zhang 2015; Rajagopal 2009; Yun et al. 2014).

En *T. molitor*, se ha reportado frecuentemente la presencia de miembros de Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae y Bacillaceae (Jung et al. 2014; Stoops et al. 2016; Osimani et al. 2018), y algunas cepas han demostrado participar en la descomposición de polisacáridos, la asimilación de nutrientes o la defensa antimicrobiana (Gupta y Nair 2020; Vargas Jerez et al. 2012).

A pesar del creciente interés por la microbiota de *T. molitor*, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han limitado a condiciones de laboratorio controladas o a un número reducido de regiones geográficas y condiciones de alimentación (Worku et al. 2018; Vandeweyer et al. 2017). Esto crea una brecha de conocimiento respecto al grado en que la microbiota de *T. molitor* varía entre diferentes poblaciones globales sometidas a prácticas de cría, climas y dietas diversas.

Dado el creciente alcance global de la cría de insectos comestibles, comprender cómo difieren las comunidades microbianas entre poblaciones es crucial para optimizar protocolos de cría, garantizar la seguridad microbiológica y, potencialmente, seleccionar rasgos microbianos beneficiosos.

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar y comparar la microbiota intestinal de larvas de *T. molitor* provenientes de múltiples poblaciones globales criadas bajo condiciones ambientales y de manejo distintas. Mediante la integración de secuenciación de alto rendimiento y metadatos sobre prácticas de cría, este trabajo busca identificar señales geográficas y ambientales en la composición del microbioma, así como detectar taxones microbianos núcleo y variables asociados a distintos sistemas de producción. Estos conocimientos podrían, en última instancia, servir de base para desarrollar estrategias basadas en el microbioma que mejoren la salud del insecto, su productividad y la seguridad alimentaria en la cría industrial de *T. molitor*.

Materiales y métodos

Este estudio se centró en la caracterización de la microbiota intestinal de larvas de *Tenebrio molitor* obtenidas de diferentes regiones geográficas. A continuación, se describen los materiales utilizados y las metodologías empleadas para la recolección, conservación, extracción intestinal, análisis de ADN y evaluación de la diversidad bacteriana (Figura 1).

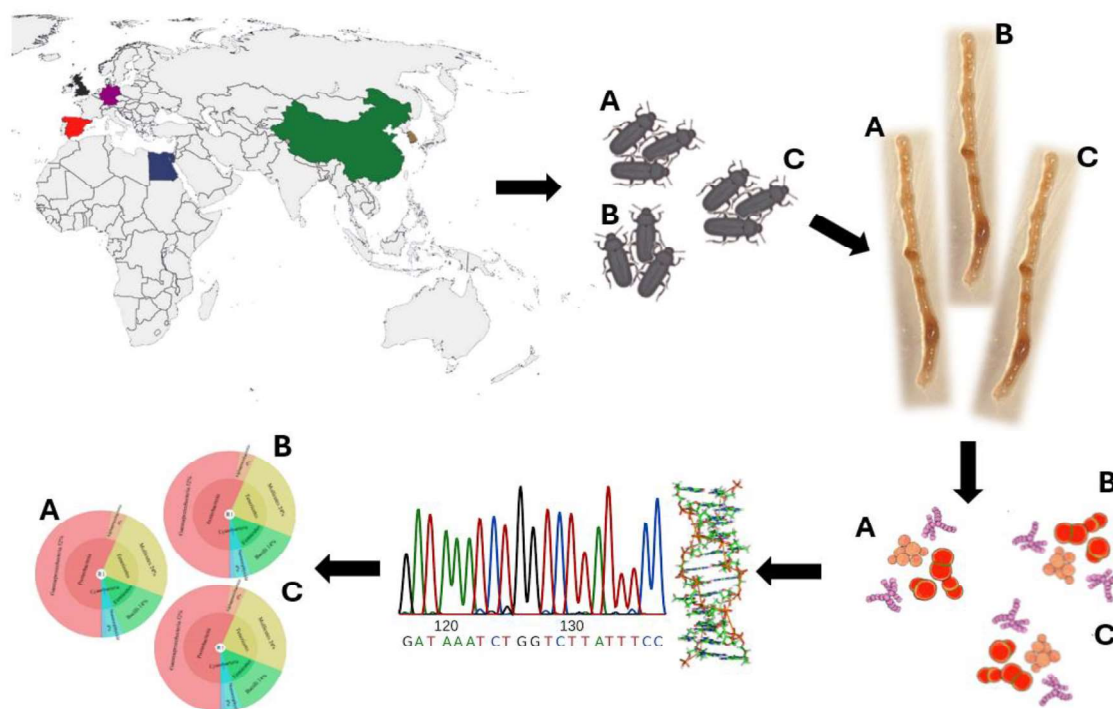


Figura 1: Esquema de los materiales y métodos utilizados para determinar la microbiota presente en el intestino de las poblaciones de *T. molitor* estudiadas.

Recolección de larvas y diseño experimental

Se recolectaron cinco larvas de *T. molitor* de cada una de las siguientes ubicaciones geográficas:

- España: C. Esparragal, 18, 47155 Santovenia de Pisuerga, Valladolid.
- Reino Unido: 60–61 Barnes High St, Londres SW13 9LF.

- China: Distrito Xiacheng, Hangzhou, Zhejiang, China (310004).
- Corea del Sur: 6-1 Nangmin-ro, Nangmin-dong, Dongnae-gu, Busan.
- Egipto: Mohye El-Deen, Gobernación de Alejandría.
- Alemania: Junkerstraße 17, 80689 Múnich.
- Población silvestre: Santa Marta de Tormes, Salamanca, España (40.948839, -5.617438).

Las poblaciones fueron clasificadas según su sistema de producción:

- Producción intensiva: Valladolid, Busan, Múnich y Londres.
- Producción manual: Alejandría y Hangzhou.
- Poblaciones silvestres: Especímenes recolectados en Salamanca.

Las diferencias en normativas ambientales y productivas entre países, así como las condiciones locales y climáticas, pueden influir en la composición de la microbiota intestinal. Todas las larvas analizadas estaban en una etapa larval temprana para evitar variaciones debidas al desarrollo (ver Tabla 1).

Tabla 1: Variables que afectan a las poblaciones de *T. molitor* recogidas y sus posibles valores.

Origen	Alimento seco	Alimento húmedo	Temperatura	Precipitaciones	Tipo de crianza
Valladolid, España	Salvado de trigo	Gel hidratante	Veranos calurosos e inviernos fríos	Escasas	Industrial
Busan, Corea del Sur	Salvado de trigo	Residuos orgánicos	Veranos calurosos e inviernos fríos	Abundantes	Industrial
London, Inglaterra	Salvado de trigo	Patata	Veranos suaves e inviernos fríos	Abundantes	Industrial
Múnich, Alemania	Salvado de trigo	Residuos orgánicos	Veranos suaves e inviernos fríos	Abundantes	Industrial
Hangzhou, China	Residuos orgánicos	Residuos orgánicos	Veranos cálidos e inviernos suaves	Abundantes	Tradicional
Alexandria, Egipto	Residuos orgánicos	Residuos orgánicos	Veranos e inviernos cálidos	Escasas	Tradicional
Silvestre, Salamanca, España	Sustrato vegetal	Residuos orgánicos	Veranos calurosos e inviernos fríos	Escasas	Silvestre

Conservación de las larvas

Las larvas fueron sumergidas en isopropanol al 99.5% para su conservación durante un período de cuatro meses. Cada muestra fue etiquetada individualmente con lápiz y una pequeña etiqueta para asegurar su correcta identificación. Posteriormente, las muestras se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL hasta su procesamiento.

Extracción intestinal

Tras el período de conservación, los sistemas digestivos de las larvas fueron extraídos bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. El procedimiento fue el siguiente:

- Secado de larvas: Se colocaron en una estufa a 35 °C durante 2 minutos para eliminar residuos de alcohol.
- Extracción del intestino: Cada larva fue colocada en una placa Petri de vidrio estéril y se realizó una incisión en la parte ventral del abdomen (segmentos 5–9) con pinzas de disección estériles. El intestino fue cuidadosamente extraído y transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Se obtuvieron 35 muestras en total, cada una identificada con el siguiente código: una letra mayúscula que indica el país de origen (C = China, K = Corea del Sur, R = Reino Unido, E = España, A = Alemania, G = Egipto, W = Silvestre) + un número del 1 al 5 que indica el espécimen individual.

Extracción de ADN

Se utilizó un protocolo optimizado con el Kit Promega Insect Lysis, siguiendo los siguientes pasos:

- Lisis celular: Se añadieron 100 µL de tampón de lisis y 20 µL de Proteinasa K (10 mg/mL).
- Incubación: Las muestras se incubaron a 56 °C con agitación constante durante 6 horas.
- Centrifugación inicial: Se centrifugaron a 2,000 rpm durante 15 segundos para eliminar condensación.
- Unión del ADN: Se añadieron 100 µL de Binding Mix, se mezclaron durante 15 segundos y se centrifugaron a 11,000 rpm por 20 segundos.
- Filtración: El contenido fue transferido a un tubo de 2 mL con columna de filtración y se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 minutos.
- Lavado del ADN:
 - Se añadieron 200 µL de tampón de lavado proteico y se centrifugó a 11,000 rpm por 2 minutos.
 - Se realizó un segundo lavado con 600 µL del mismo tampón.
- Elución del ADN:
 - Se añadieron 30 µL de agua bidestilada caliente (56 °C) directamente sobre la membrana de la columna.
 - Después de esperar un minuto, se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 minutos.
- Almacenamiento: Se desecharon las columnas y los tubos con el ADN extraído se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Análisis de comunidades bacterianas

Las muestras de ADN se enviaron al Servicio de Metagenómica LAIB para la identificación de comunidades bacterianas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Se realizaron dos análisis para el procesamiento de las muestras:

En el primer análisis, se agruparon las cinco muestras individuales de cada población en siete muestras compuestas para minimizar la variabilidad intra-poblacional.

En el segundo análisis, se analizaron las muestras individualmente para evaluar la diversidad beta.

Se utilizó el kit Ion 16S Metagenomics Kit (IonTorrent) para amplificar las regiones variables 2, 4 y 8 en el primer tubo (fragmentos de 250, 288 y 295 pb, respectivamente). En un segundo tubo, se amplificaron las regiones 3, 6–7 y 9 (fragmentos de 215, 260 y 209 pb, respectivamente). Los cebadores utilizados aseguraron una cobertura superior al 80% de las secuencias con una identidad del 100%.

Los datos resultantes se procesaron mediante Ion Reporter™, empleando un flujo de trabajo específico para 16S rRNA. Para el análisis bioinformático se utilizó la base de datos curada Greengenes v13.5 para la identificación taxonómica.

Se estableció un umbral mínimo de lectura de ≥ 10 para considerar válida una secuencia.

Se utilizó un umbral de identidad del 99.5% para asignaciones a nivel de especie.

La diversidad microbiana se evaluó de la siguiente forma:

- Diversidad alfa: Evaluación de la variabilidad dentro de una misma muestra a nivel de especie, género y familia.
- Diversidad beta: Comparación de la composición de comunidades bacterianas entre diferentes poblaciones.
- Se generaron gráficos Krona y tablas de abundancia relativa para interpretar los resultados.

Resultados

Los resultados obtenidos de la extracción y análisis de ADN de las distintas poblaciones de *T. molitor* se presentan en detalle mediante tablas y gráficos generados con software de análisis bioinformático.

Análisis de diversidad alfa

La diversidad alfa mide la riqueza y composición de especies dentro de una única muestra, en este caso, el intestino de cada larva analizada. Este análisis proporciona información sobre la complejidad y variedad de la microbiota intestinal presente en cada población estudiada.

Análisis a nivel de filo por población

En todas las poblaciones analizadas se detectaron los filos Proteobacteria, Tenericutes y Firmicutes, aunque sus proporciones variaron según el origen geográfico de las muestras (Figura 2).

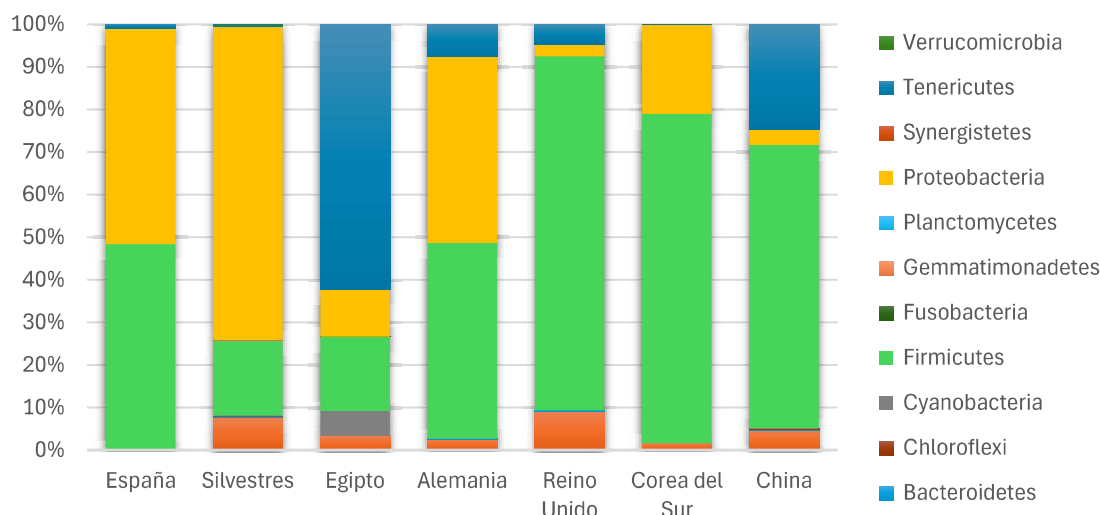


Figura 2: Proporción de cada filo que aparece en los pools obtenidos de cada población de *T. molitor* con distinto origen.

Los resultados por país se detallan a continuación:

- España: Las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por Proteobacteria (50.57%) y Firmicutes (48.4%), seguidas por Tenericutes (1.03%) y Actinobacteria (0.02%) en proporciones menores.
- Población silvestre: Mostró la mayor diversidad a nivel de filo, con Proteobacteria (73.63%) como grupo predominante, seguido de Firmicutes (17.7%), Actinobacteria (7.81%), Tenericutes (0.56%), Cyanobacteria (0.18%), Chloroflexi (0.1%), Bacteroidetes (0.08%), Fusobacteria (0.04%), Gemmatimonadetes (0.02%), Planctomycetes (0.02%) y Verrucomicrobia (0.01%).
- Egipto: Predominó Tenericutes (62.09%), seguido por Firmicutes (17.41%), Proteobacteria (11.17%), Cyanobacteria (5.86%), Actinobacteria (3.38%) y presencia mínima de Fusobacteria (0.01%).
- Alemania: Las comunidades bacterianas estuvieron compuestas principalmente por Firmicutes (46.03%) y Proteobacteria (43.89%), con menores proporciones de Tenericutes (7.43%), Actinobacteria (2.64%), Bacteroidetes (0.03%), Cyanobacteria (0.02%) y Synergistetes (0.01%).
- Reino Unido: Presentó un alto porcentaje de Firmicutes (83.2%), seguido por Actinobacteria (9.34%), Tenericutes (4.65%), Proteobacteria (2.79%) y Bacteroidetes (0.04%).
- Corea del Sur: La composición estuvo dominada por Firmicutes (77.33%) y Proteobacteria (20.93%), con cantidades menores de Actinobacteria (1.67%) y Tenericutes (0.05%).
- China: Se identificaron principalmente Firmicutes (66.53%) y Tenericutes (24.63%), seguidos por Actinobacteria (4.76%), Proteobacteria (3.69%), Bacteroidetes (0.23%), Cyanobacteria (0.18%), Chloroflexi (0.01%) y Synergistetes (0.01%).

Estos resultados reflejan una marcada variabilidad en la composición bacteriana entre las diferentes poblaciones analizadas, lo que sugiere una influencia de factores ambientales y geográficos en la microbiota intestinal de *T. molitor*.

Análisis a nivel de clase por población

El análisis taxonómico a nivel de clase reveló una variación significativa entre las poblaciones. Sin embargo, Gammaproteobacteria, Bacilli y Mollicutes estuvieron presentes en todas las muestras, aunque en diferentes proporciones relativas:

- España: La microbiota estuvo dominada por Gammaproteobacteria (50.48%) y Bacilli (48.24%), con niveles menores de Mollicutes (0.64%), Clostridia (0.15%) y clases menores como Alphaproteobacteria, Actinobacteria y Negativicutes.
- Población silvestre: Mostró la mayor diversidad a nivel de clase, con Gammaproteobacteria (71.09%) y Bacilli (17.6%) como más abundantes, seguidos por Actinobacteria (7.81%) y Alphaproteobacteria (2.42%). Se detectaron otras 15 clases en pequeñas cantidades.
- Egipto: Predominaron Mollicutes (62.09%), seguido de Bacilli (17.4%) y Gammaproteobacteria (8.56%). También se identificaron clases cianobacterianas como Nostocophycideae (4.97%) y Oscillatoriothyraceae (0.81%).
- Alemania: Principalmente compuesta por Bacilli (45.17%) y Gammaproteobacteria (43.38%), con contribuciones menores de Mollicutes (7.43%), Actinobacteria (2.63%) y Clostridia (0.84%).
- Reino Unido: Se caracterizó por un alto porcentaje de Bacilli (82.8%), junto con Actinobacteria (9.33%), Mollicutes (4.65%) y Gammaproteobacteria (2.62%).
- Corea del Sur: Predominaron Bacilli (77.12%) y Gammaproteobacteria (20.76%), seguidos por Actinobacteria (1.66%) y Clostridia (0.2%).
- China: Presentó altas proporciones de Bacilli (66.14%) y Mollicutes (24.63%), seguidos por Actinobacteria (4.75%) y Gammaproteobacteria (1.84%).

Estos resultados destacan diferencias significativas en la composición bacteriana entre las poblaciones, reflejando posibles variaciones ambientales y ecológicas que influyen en la microbiota intestinal de *T. molitor*.

Análisis a nivel de familia por población

El análisis a nivel taxonómico de familia mostró un alto grado de diversidad entre las poblaciones analizadas. Sin embargo, se observaron diferencias en la capacidad del software para clasificar todas las secuencias de ADN, apareciendo los primeros casos donde no fue posible asignar pares de bases a una familia conocida.

- España: Predominaron las familias Enterobacteriaceae (50.42%) y Enterococcaceae (32.61%), seguidas por Streptococcaceae (9.93%), Lactobacillaceae (5.56%) y Spiroplasmataceae (1.03%). Se detectaron 17 familias adicionales en proporciones inferiores al 1%, incluyendo Carnobacteriaceae, Sphingomonadaceae y Clostridiaceae.
- Población silvestre: La microbiota estuvo dominada por Enterobacteriaceae (68.46%) y Enterococcaceae (15.19%), con menor representación de Lactobacillaceae (1.89%), Nocardioideaceae (1.88%), Moraxellaceae (1.34%) y Microbacteriaceae (1.15%). Se identificaron más de 60 familias adicionales en proporciones bajas, incluyendo Rhodobacteraceae, Streptococcaceae y Flavobacteriaceae.
- Egipto: Predominó Spiroplasmataceae (62.03%), seguida por Staphylococcaceae (11.21%), Nostocaceae (4.97%), Enterobacteriaceae

(4.39%) y Streptococcaceae (3.62%). Además, se registraron 30 familias en proporciones inferiores al 1%, como Pseudomonadaceae, Corynebacteriaceae y Fusobacteriaceae.

- Alemania: Enterobacteriaceae (42.89%) y Streptococcaceae (40.35%) fueron las familias más abundantes, con presencia de Spiroplasmataceae (7.43%) y Staphylococcaceae (3.81%). También se detectaron 20 familias en proporciones bajas, como Corynebacteriaceae, Bacillaceae y Ruminococcaceae.
- Reino Unido: Staphylococcaceae (72.17%) fue la familia más abundante, seguida por Leuconostocaceae (6.63%), Spiroplasmataceae (4.65%) y Enterococcaceae (3.47%). Se identificaron además 15 familias adicionales en proporciones inferiores al 1%, como Lactobacillaceae, Microbacteriaceae y Flavobacteriaceae.
- Corea del Sur: Las familias más representadas fueron Staphylococcaceae (34.04%), Leuconostocaceae (33.26%), Enterobacteriaceae (20.75%), Enterococcaceae (5.94%) y Streptococcaceae (3.88%). Además, se identificaron 10 familias en proporciones bajas, entre ellas Corynebacteriaceae, Spiroplasmataceae y Erysipelotrichaceae.
- China: La microbiota estuvo dominada por Staphylococcaceae (64.07%) y Spiroplasmataceae (24.63%), con menores contribuciones de Micrococcaceae (2.85%), Sphingomonadaceae (1.46%) y Leuconostocaceae (1.45%). También se identificaron 25 familias adicionales en proporciones menores al 1%, como Lactobacillaceae, Vibrionaceae y Clostridiaceae.

Estos resultados revelan diferencias significativas en la composición bacteriana entre las poblaciones, lo que refleja posibles influencias ambientales y ecológicas sobre la microbiota intestinal de *T. molitor*.

Análisis a nivel de género para cada población

Para cada población de *T. molitor*, se identificaron diversos géneros bacterianos, con diferencias notables entre los orígenes geográficos. A continuación, se describen los hallazgos más relevantes:

- España: Predominaron géneros asociados con la fermentación y el procesamiento de carbohidratos, siendo *Enterococcus* (28.2%) el más abundante, seguido por *Leclercia*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* (cada uno entre 5% y 6%). Además, se hallaron otros 25 géneros en proporciones menores, como *Pantoea*, *Salmonella* y *Erwinia*.
- Población silvestre: Nuevamente destacó *Enterococcus* (10.48%), junto con *Pediococcus* y *Serratia*. Se registró una alta diversidad bacteriana, con más de 60 géneros identificados, incluyendo *Klebsiella*, *Listeria* y *Pseudomonas* en proporciones menores al 1%.
- Egipto: Se observó un predominio de *Spiroplasma* (19.14%) y *Staphylococcus* (11.11%), seguidos por *Acinetobacter* y *Arthrobacter*. También estuvieron presentes géneros fermentativos como *Lactobacillus* y *Weissella*, junto con algunas enterobacterias en menor cantidad.
- Alemania: El género dominante fue *Lactococcus* (27.69%), seguido por *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Erwinia*. Se identificaron 20 géneros

adicionales en proporciones bajas, principalmente de las familias Enterobacteriaceae y Lachnospiraceae.

- Reino Unido: La comunidad bacteriana estuvo claramente dominada por *Staphylococcus* (71.59%), acompañado por *Weissella* y *Enterococcus*. Entre los 30 géneros minoritarios figuraron *Salmonella*, *Lactococcus* y *Vibrio*.
- Corea del Sur: La microbiota se caracterizó por una alta proporción de *Staphylococcus* (33.86%) y *Leuconostoc* (28.29%), con presencia de otros géneros fermentativos como *Weissella* y *Lactococcus*, además de algunas enterobacterias.
- China: La comunidad estuvo dominada por *Staphylococcus* (63.9%) y *Spiroplasma* (9.73%). Se detectaron más de 40 géneros adicionales en proporciones bajas, pertenecientes principalmente a las familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae y Lachnospiraceae.

Este análisis revela una alta diversidad bacteriana con una distribución específica para cada origen geográfico, con presencia recurrente de géneros como *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Spiroplasma* en distintas poblaciones.

Análisis a nivel de especie para cada población

El nivel taxonómico de especie permanece incompleto. Tras el análisis, el software no logró clasificar ni relacionar todas las secuencias de ADN con sus respectivas especies.

- España: Las especies principales detectadas fueron *Enterococcus mundtii* (7.06%), *Leclercia adecarboxylata* (5.9%) y *Lactococcus garvieae* (5.56%), seguidas de *Lactobacillus graminis* (1.27%), *Lactobacillus sakei* (1.25%), *Enterococcus villorum* (1.19%), *Lactobacillus curvatus* (0.77%), *Enterococcus faecalis* (0.26%), *Pantoea agglomerans* (0.25%), *Vagococcus penaei* (0.11%), *Pantoea calida* (0.11%), *Enterococcus faecium* (0.1%) y *Enterococcus gallinarum* (0.1%). Por debajo del 0.1%, destaca la presencia de *Trabulsiella odontotermis* debido a su potencial patológico. (Figura 3)

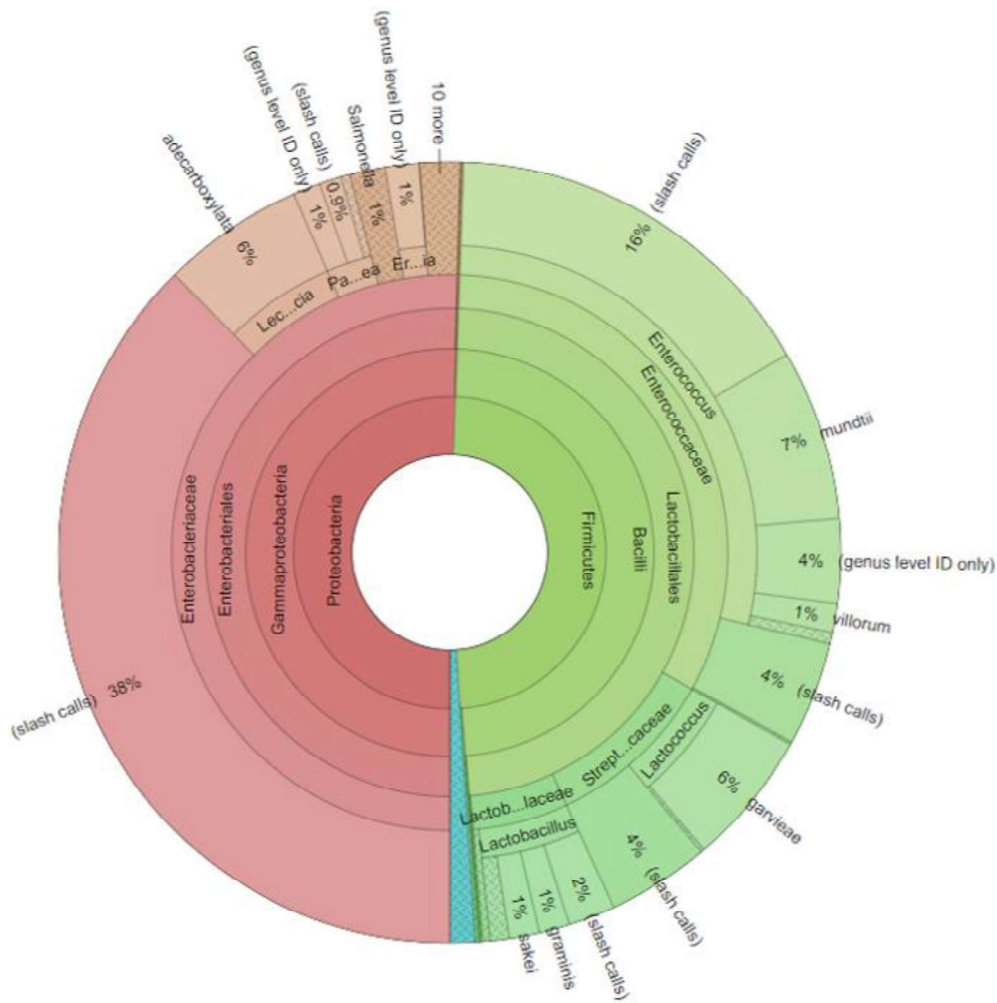


Figura 3: gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de España). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

- Población silvestre: Las especies más abundantes fueron *Enterococcus malodoratus* (3.41%), *Enterobacter asburiae* (0.42%), *Serratia quinivorans* (0.37%), *Gordonia humi* (0.19%), *Citrobacter murlinia* (0.14%) y *Klebsiella oxytoca* (0.11%). *Listeria ivanovii* y *Serratia marcescens* son destacadas por su relevancia patógena, aunque se encontraron en proporciones inferiores al 0.1%. (Figura 4)

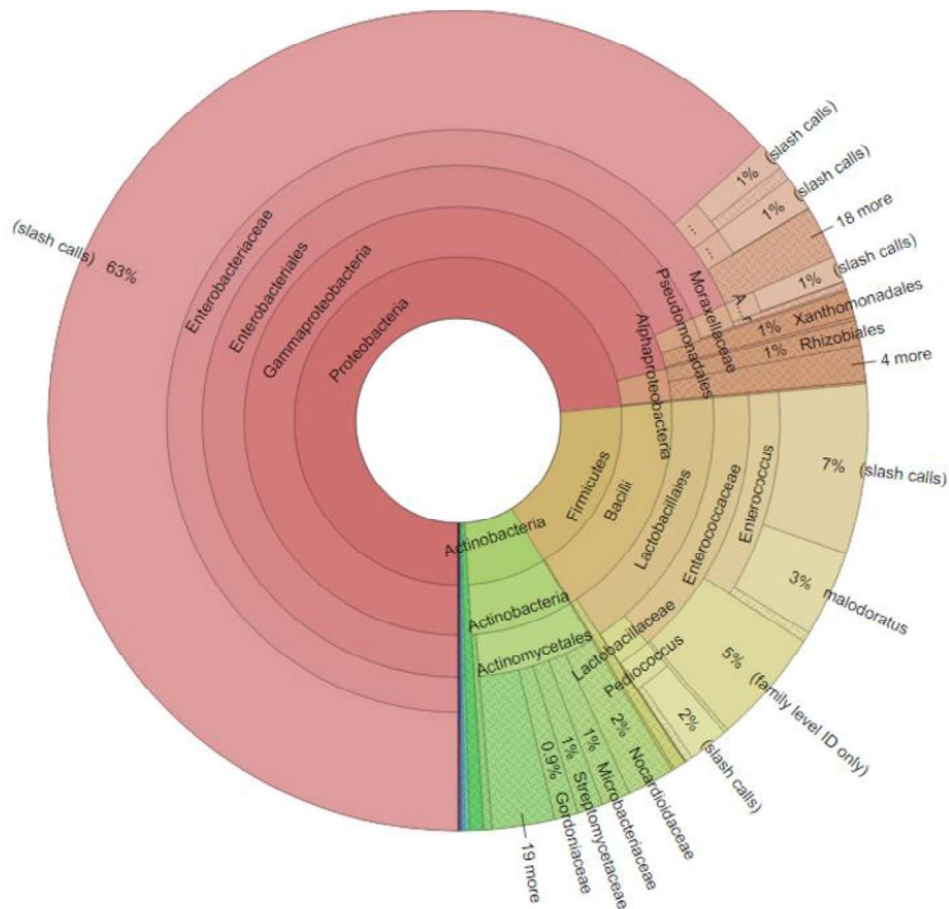


Figura 4: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población silvestre). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

- Egipto: Las especies más abundantes fueron *Staphylococcus gallinarum* (3.49%), *Staphylococcus sciuri* (1.36%), *Staphylococcus succinus* (0.82%), *Enterococcus faecalis* (0.5%), *Morganella morganii* (0.49%), *Staphylococcus kloosii* (0.47%), *Rosenbergiella nectarea* (0.39%), *Lactococcus lactis* (0.36%), *Lactococcus taiwanensis* (0.35%), *Lactococcus garvieae* (0.22%), *Acinetobacter johnsonii* (0.21%), *Pediococcus pentosaceus* (0.18%), *Weissella cibaria* (0.17%), *Acinetobacter calcoaceticus* (0.15%), *Arthrobacter bergerei* (0.14%), *Staphylococcus xylosus* (0.13%), *Vibrio fluvialis* (0.13%) y *Lactococcus piscium* (0.12%). Se detectó *Cronobacter dublinensis* por debajo del 0.1%, destacándose por su relevancia en seguridad alimentaria y patogenicidad. (Figura 5)

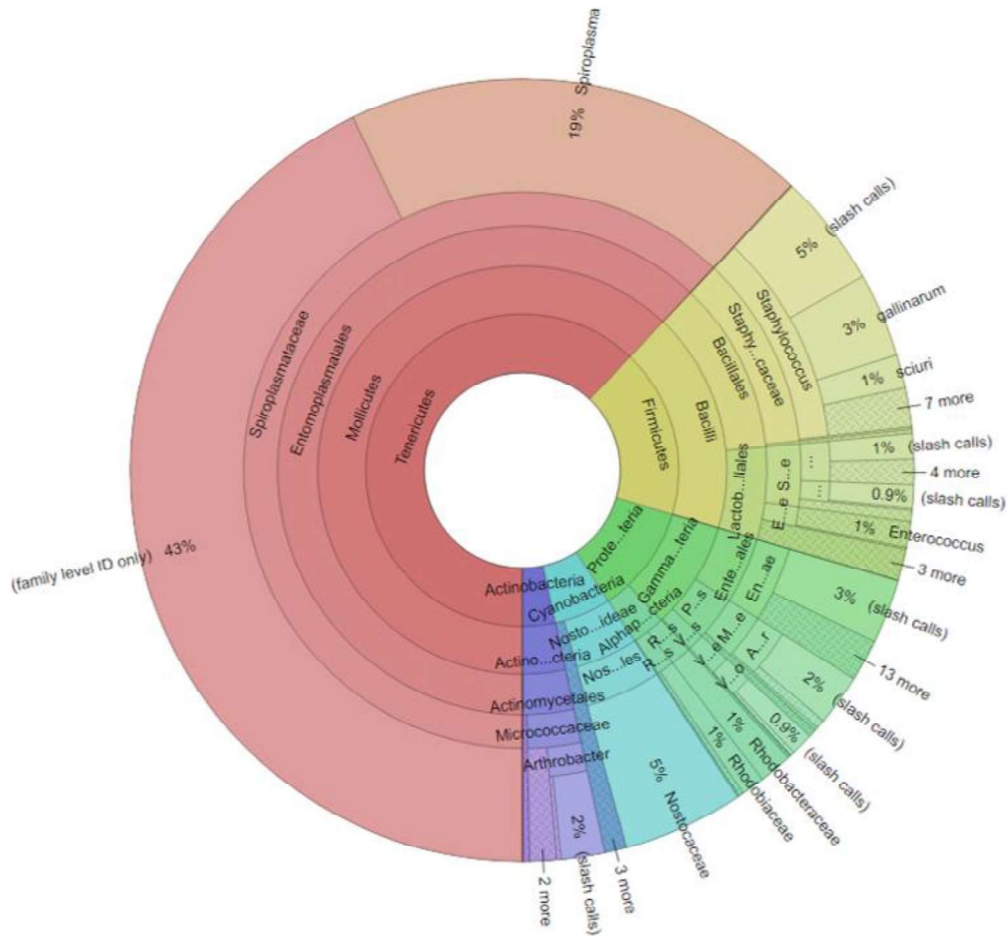
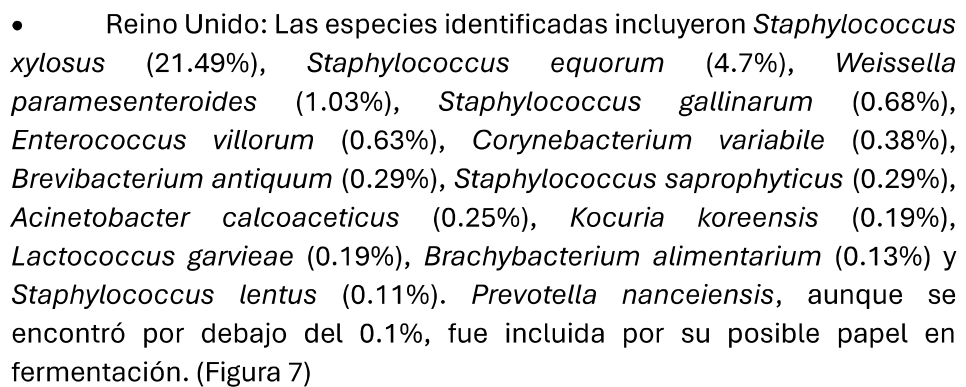


Figura 5: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de Egipto). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

- Alemania: Las especies destacadas incluyeron *Lactococcus garvieae* (11.31%), *Lactococcus lactis* (5.75%), *Erwinia oleae* (3.64%), *Pantoea cyripedii* (1.18%), *Staphylococcus kloosii* (0.97%), *Corynebacterium variabile* (0.45%), *Staphylococcus xylosus* (0.35%), *Staphylococcus saprophyticus* (0.31%), *Staphylococcus sciuri* (0.2%), *Corynebacterium terpenotabidum* (0.17%), *Serratia marcescens* (0.13%), *Kocuria halotolerans* (0.12%), *Propionibacterium acnes* (0.11%), *Enterococcus phoeniculicola* (0.11%) y *Sphingomonas echinoides* (0.11%). Se resalta *Edwardsiella tarda* por debajo del 0.1% debido a su importancia en infecciones. (Figura 6)



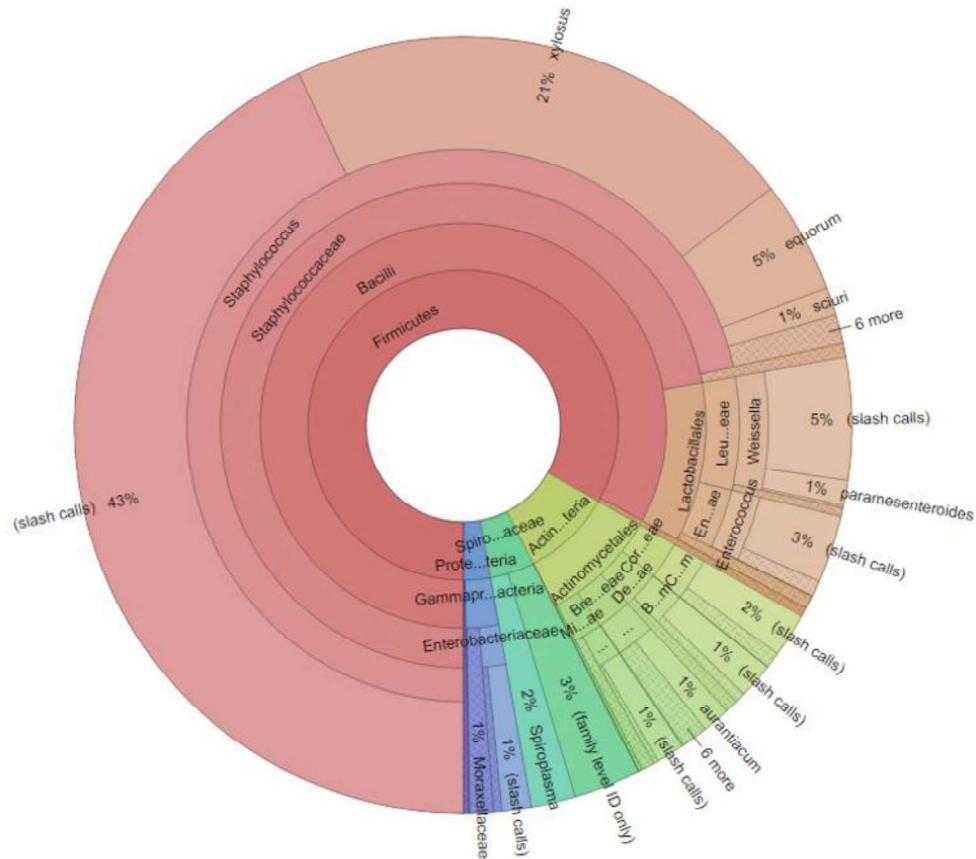


Figura 7: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población del Reino Unido). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

- **Corea del Sur:** Las especies más frecuentes fueron *Staphylococcus gallinarum* (12.15%), *Leuconostoc holzapfelii* (9.51%), *Staphylococcus succinus* (2.09%), *Citrobacter farmeri* (1.85%), *Weissella paramesenteroides* (1.72%), *Staphylococcus xylosus* (1.66%), *Staphylococcus sciuri* (1.26%), *Raoultella planticola* (1.12%), *Enterococcus avium* (0.8%), *Erwinia oleae* (0.35%), *Enterococcus villorum* (0.25%), *Enterococcus mundtii* (0.2%), *Corynebacterium variabile* (0.16%), *Lactococcus garvieae* (0.15%), *Lactococcus lactis* (0.11%) y *Pantoea cypripedii* (0.1%). *Salmonella enterica*, aunque presente por debajo del 0.1%, es relevante por su importancia epidemiológica. (Figura 8)

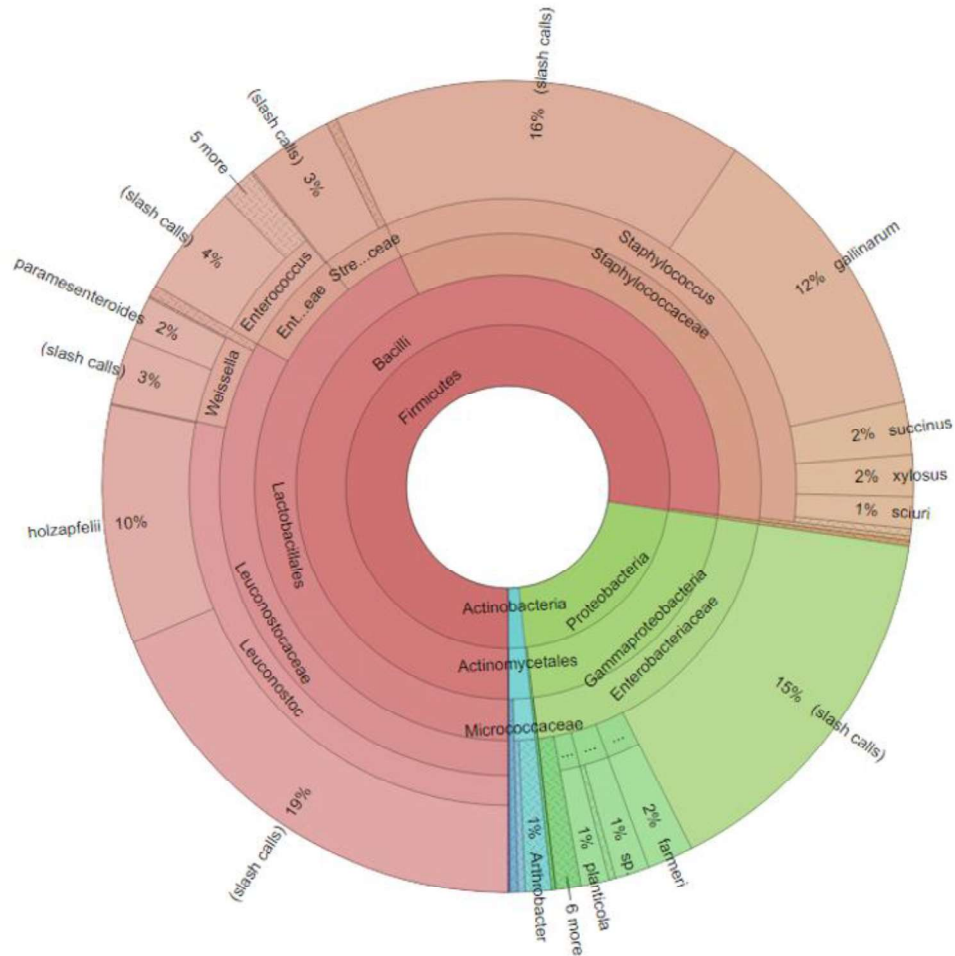


Figura 8: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de Corea del Sur). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

- China: Las especies más prominentes fueron *Staphylococcus gallinarum* (16.46%), *Staphylococcus xylosus* (8.4%), *Staphylococcus sciuri* (4.39%), *Staphylococcus succinus* (2.45%), *Staphylococcus equorum* (0.55%), *Corynebacterium variabile* (0.38%), *Sphingomonas echinoides* (0.33%), *Propionibacterium acnes* (0.26%), *Staphylococcus saprophyticus* (0.2%), *Corynebacterium terpenotabidum* (0.16%) y *Micrococcus lylae* (0.16%). Se destaca *Legionella drancourtii* por debajo del 0.1% por su potencial patógeno. (Figura 9)

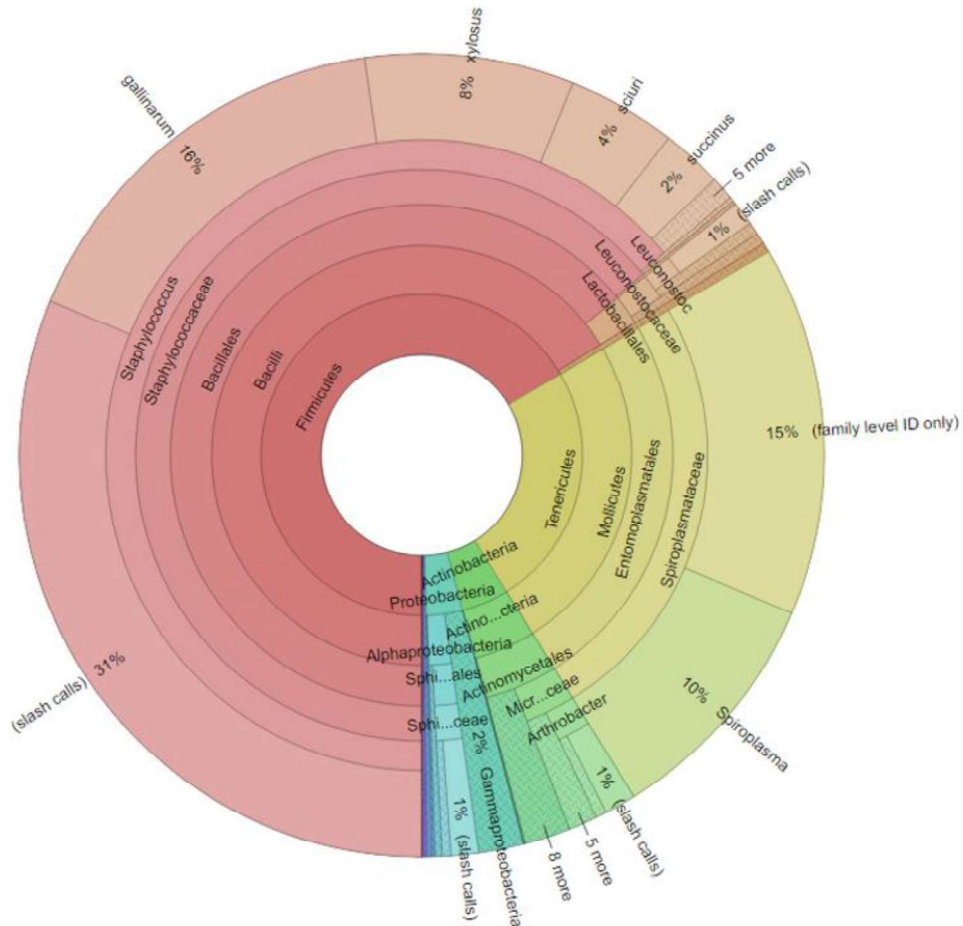


Figura 9: Gráfico Krona que muestra la composición taxonómica de la microbiota intestinal en larvas de *T. molitor* (población de China). Las abundancias relativas se basan en la secuenciación del gen 16S rRNA. Los códigos de color representan los filos bacterianos.

La composición de la microbiota del escarabajo puede variar significativamente dependiendo del origen geográfico y las condiciones ambientales bajo las cuales se obtuvieron las muestras. Factores como la dieta, la temperatura y las interacciones con otros organismos pueden influir en la presencia y abundancia de especies bacterianas específicas, lo que explica las diferencias observadas entre poblaciones de distintas regiones.

Análisis de diversidad beta

La diversidad beta mide las diferencias en la composición de especies entre distintas regiones, comparando el número de especies presentes en cada una con el total identificado en todo el sistema. En este estudio, cada región corresponde al intestino de una larva, mientras que el sistema abarca las cinco larvas analizadas por población.

Estudio de la población española

Los individuos fueron etiquetados con la letra S (España) y su número correspondiente (Tabla 2).

Tabla 2: Valores de cada uno de los componentes de la diversidad beta en los cinco individuos de la población española de *T. molitor* criada intensivamente y los colores que representan a cada individuo.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
S1		0,388	-0,145	0,048	0,321
S2		-0,077	0,330	-0,467	0,003
S3		0,372	-0,160	0,034	-0,326
S4		-0,500	-0,432	-0,011	0,009
S5		-0,184	0,407	0,396	-0,007

El análisis de componentes principales (PCA) permite visualizar la variabilidad en la composición de la microbiota entre los cinco individuos de la población española. En este caso, los tres primeros componentes principales explican el 87.51% de la variabilidad total (PC1: 34.61%, PC2: 30.29% y PC3: 22.61%), indicando que estas dimensiones capturan la mayor parte de las diferencias en la composición microbiana. (Figura 10)

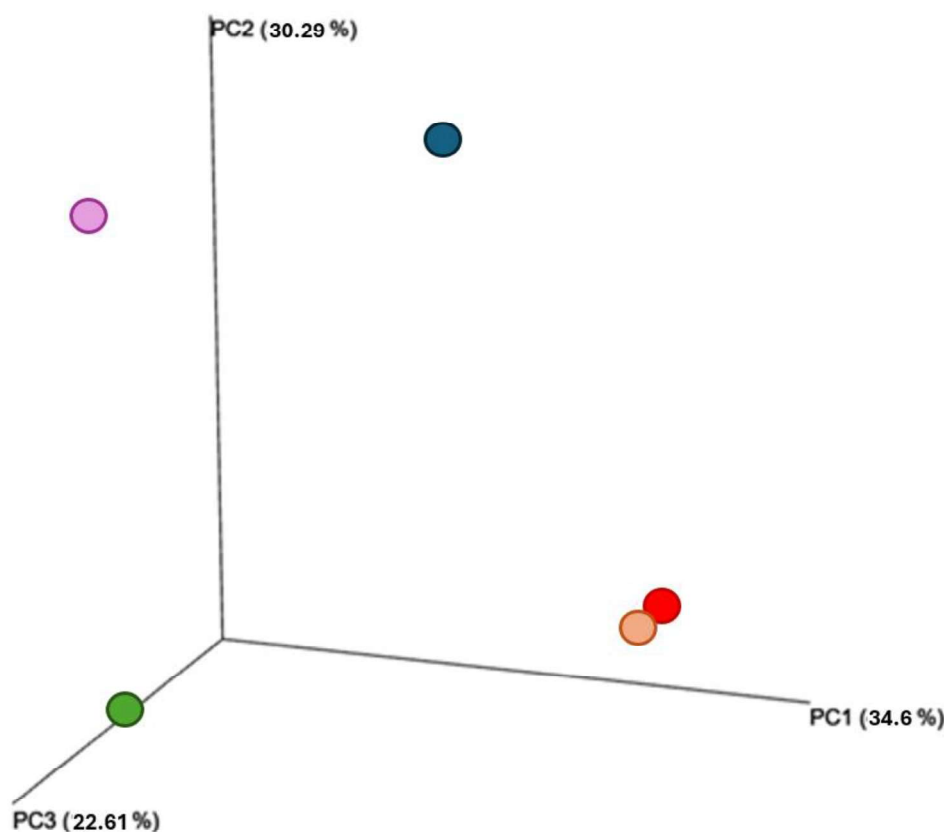


Figura 10: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población española criada intensivamente.

Los individuos S1 y S3 presentan valores positivos similares en PC1, lo que sugiere una composición microbiana relativamente similar. En contraste, S4 muestra una mayor separación en PC1 y PC2, lo que indica una microbiota más divergente. Mientras tanto, S2 y S5 presentan una distribución más equidistante, lo que refleja una variabilidad intermedia.

En general, estos resultados reflejan heterogeneidad en la composición bacteriana dentro de la población española, aunque algunos individuos comparten perfiles más similares

entre sí. Este patrón puede deberse a factores individuales como dieta, entorno o diferencias genéticas.

Estudio de la población silvestre

Los individuos fueron etiquetados con la letra W (Wild) y su número correspondiente (Tabla 3).

Tabla 3: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población salvaje española de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
W1		-0,147	0,017	0,062	0,001
W2		-0,139	0,131	-0,043	-0,006
W3		-0,070	-0,189	-0,024	-0,004
W4		0,217	0,023	0,009	-0,029
W5		0,139	0,018	-0,004	0,038

La tabla muestra resultados que van de 0 a ± 1 , donde los valores más cercanos a 0 indican mayor similitud entre las comunidades bacterianas de dos individuos, y los valores más cercanos a 1 indican microbiotas intestinales completamente distintas.

El PCA revela variabilidad en la composición microbiana entre los cinco individuos de la población silvestre. Los tres primeros componentes explican el 87.51% de la variabilidad total (PC1: 34.61%, PC2: 30.29%, PC3: 22.61%), lo que sugiere que estos ejes capturan la mayoría de las diferencias estructurales. (Figura 11)

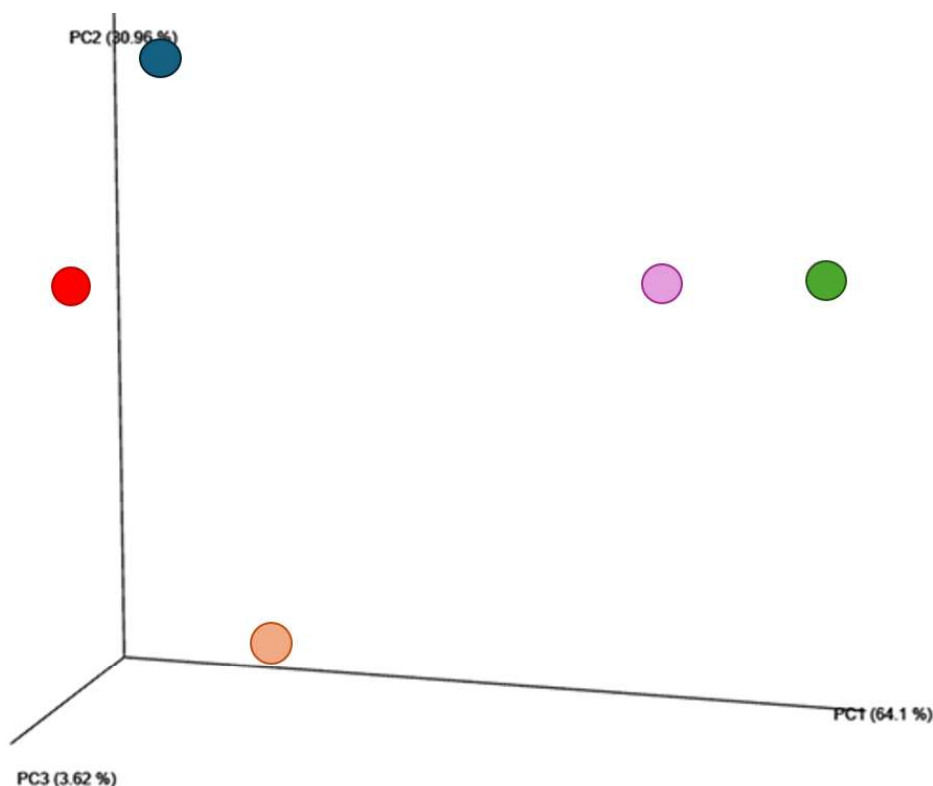


Figura 11: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población salvaje española.

En este caso, W1, W2 y W3 se agrupan en torno a valores negativos en PC1, lo que sugiere similitud en su composición microbiana. Sin embargo, W3 presenta mayor dispersión en PC2, posiblemente reflejando diferencias en ciertos taxones. W4 y W5 muestran valores positivos en PC1, siendo W4 el más distante, lo que indica una composición distintiva.

Estos resultados indican menor variabilidad dentro de la población silvestre comparada con la española, ya que los valores están más concentrados cerca del centro del espacio de coordenadas. Esto podría reflejar mayor homogeneidad, posiblemente por compartir factores ambientales y una dieta más uniforme.

El valor más alto es 0.22 para W4, aunque en general el promedio es bajo, lo que indica que todos los individuos albergan comunidades bacterianas similares.

Estudio de la población egipcia

Los individuos fueron etiquetados con la letra E (Egipto) y su número correspondiente (Tabla 4).

Tabla 4: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población egipcia de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
E1		-0,675	0,061	0,123	0,022
E2		0,271	-0,073	0,329	-0,145
E3		0,294	0,145	0,085	0,211
E4		0,082	0,411	-0,302	-0,095
E5		0,028	-0,544	-0,236	0,006

El ACP (Análisis de Componentes Principales) refleja la variabilidad de la microbiota entre los cinco individuos egipcios. Aquí, los tres primeros componentes principales explican el 100% de la variabilidad total (CP1: 61.42%, CP2: 30.93%, CP3: 7.65%), lo que indica que las diferencias en la composición microbiana están bien capturadas por estos ejes. (Figura 12).

Los datos muestran una dispersión marcada entre individuos. E1 destaca con un valor altamente negativo en CP1, lo que sugiere una composición microbiana distinta. En cambio, E2 y E3 tienen valores positivos en CP1 y están agrupados estrechamente, lo que indica similitudes en sus perfiles microbianos. E4 se separa en CP2, lo que sugiere variación en ciertos taxones en comparación con los demás. E5 muestra mayor distancia en CP2 y CP3, lo que probablemente refleja una microbiota distinta.

A diferencia de las poblaciones española y salvaje, la población egipcia muestra mayor variabilidad a lo largo de CP1, lo que podría indicar una diversidad microbiana más amplia entre individuos, posiblemente debido a diferencias en dieta, ambiente o genética.

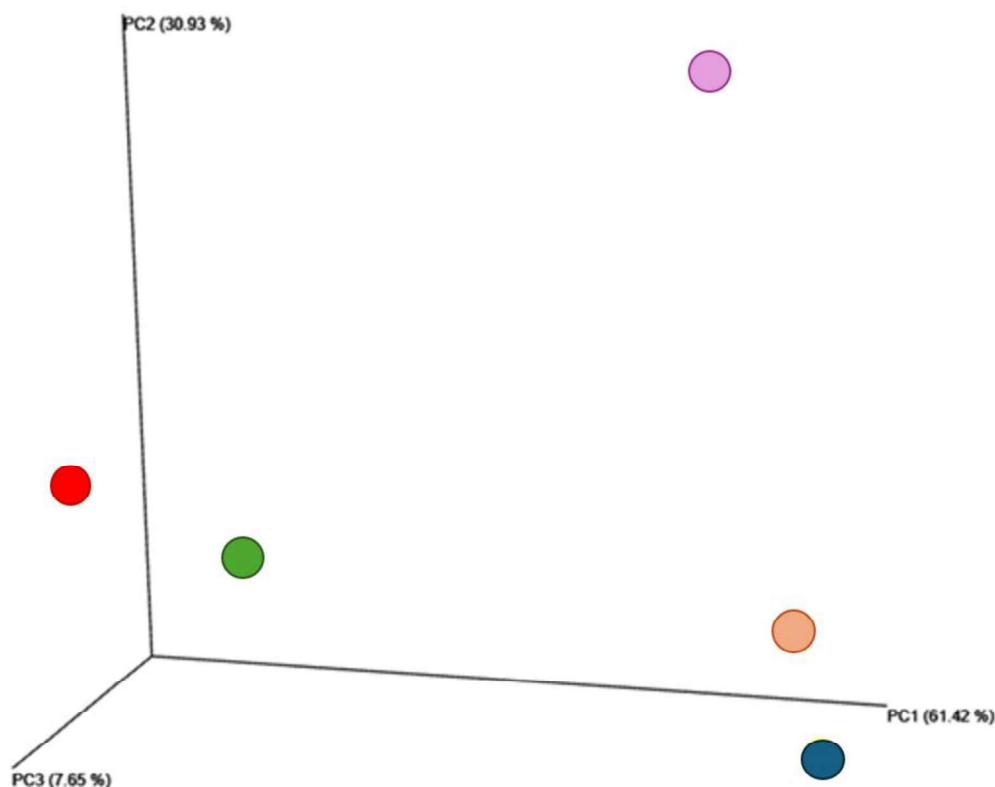


Figura 12: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población egipcia criada manualmente.

Estudio de la población alemana

Los individuos fueron etiquetados con la letra G (Alemania) y su número correspondiente (Tabla 5).

Tabla 5: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población alemana de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
G1		-0,122	0,246	-0,369	-0,108
G2		0,353	0,462	0,206	0,030
G3		-0,377	-0,157	0,215	-0,239
G4		0,483	-0,460	-0,066	-0,010
G5		-0,335	-0,090	0,014	0,327

El ACP muestra variabilidad de la microbiota entre los cinco individuos alemanes. Los tres primeros componentes explican el 88.61% de la variabilidad total (CP1: 40.4%, CP2: 33.42%, CP3: 14.79%), capturando la mayoría de las diferencias en composición microbiana. (Figura 13).

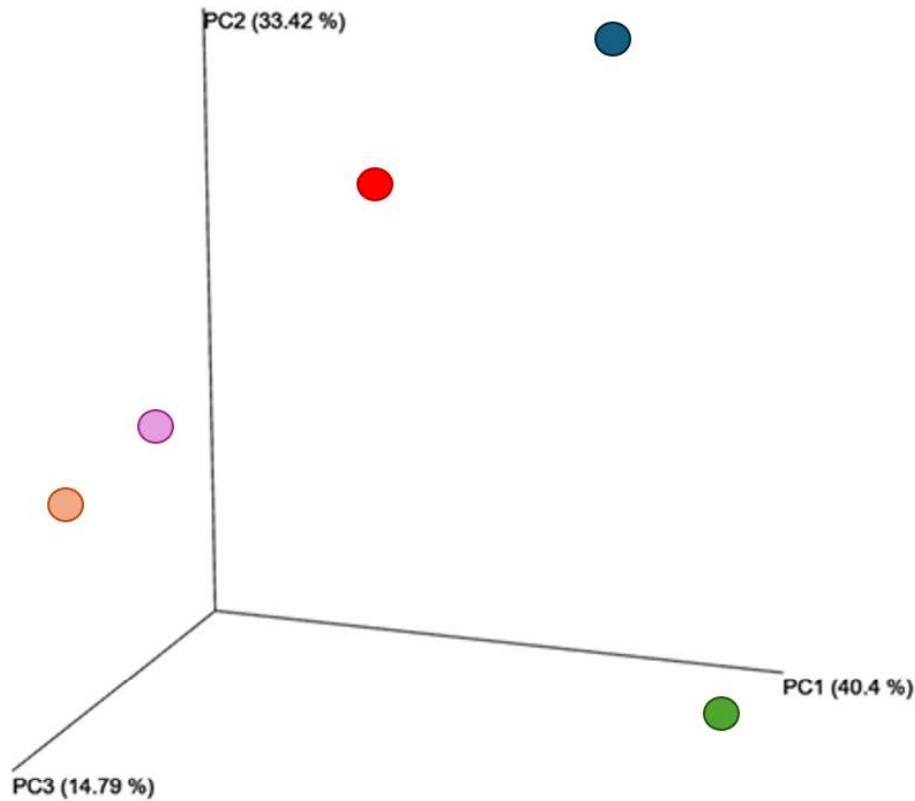


Figura 13: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población alemana criada intensivamente.

G4 se desplaza notablemente en CP1 con un valor positivo alto, lo que sugiere una composición microbiana distintiva. En cambio, G3 y G5 tienen valores negativos en CP1, lo que podría indicar perfiles microbianos similares pero distintos de G4.

En CP2, G2 tiene un valor positivo alto, mientras que G4 presenta uno negativo, lo que sugiere diferencias taxonómicas marcadas. G1 se encuentra en una posición intermedia, posiblemente compartiendo características con varios individuos.

El CP3, que explica una proporción menor de la variabilidad (14.79%), muestra una mayor separación en G5, lo que sugiere una microbiota única no capturada en CP1 o CP2.

En general, la población alemana muestra una distribución amplia a lo largo de los tres ejes, lo que indica una considerable variabilidad individual en la diversidad microbiana.

Estudio de la población británica

Los individuos fueron etiquetados con la letra B (Gran Bretaña) y su número correspondiente (Tabla 6).

Tabla 6: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población británica de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
B1		-0,699	0,010	0,018	0,002
B2		0,119	-0,204	-0,101	-0,027
B3		0,212	0,057	0,165	-0,037
B4		0,161	0,195	-0,138	0,001
B5		0,207	-0,058	0,056	0,061

El ACP muestra que la mayor parte de la variabilidad en la microbiota de los individuos británicos es explicada por el CP1 (80.2%), seguido por el CP2 (11.23%) y el CP3 (7.8%), lo que indica que el CP1 es la principal fuente de variación microbiana. (Figura 14).

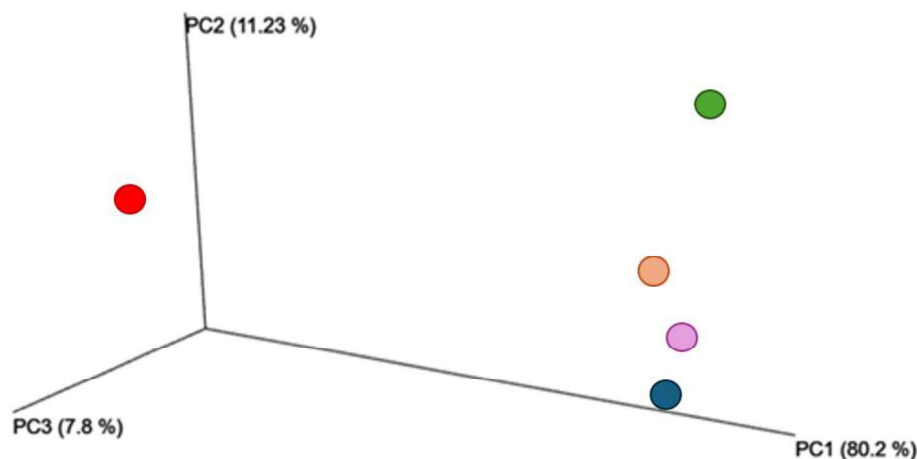


Figura 14: Análisis de componentes principales para los 5 individuos de *T. molitor* de la población británica criada intensivamente.

B1 tiene un valor muy negativo en CP1, lo que sugiere una microbiota significativamente diferente del resto. En cambio, B2, B3, B4 y B5 tienen valores positivos en CP1 con diferencias menores, lo que indica características microbianas más similares.

En CP2, B2 muestra un valor fuertemente negativo mientras que B4 presenta uno positivo alto, lo que sugiere diferenciación en ciertos taxones. B3 y B5 están en posiciones intermedias, lo que implica similitud con distintos subgrupos.

El CP3, con menor contribución (7.8%), muestra una ligera separación en B5, indicando diferencias sutiles en la microbiota.

En resumen, la población británica muestra una diferenciación marcada en CP1, siendo B1 el individuo más distintivo, mientras que los demás están más agrupados. Esto sugiere que la variabilidad microbiana en esta población está influenciada principalmente por factores representados en CP1.

Estudio de la población surcoreana

Los individuos fueron etiquetados con la letra K (Corea) y su número correspondiente (Tabla 7).

Tabla 7: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población surcoreana de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
K1	■	-0,128	0,566	0,004	-0,001
K2	■	-0,700	-0,235	-0,002	0,000
K3	■	0,283	-0,113	-0,062	-0,086
K4	■	0,273	-0,120	0,179	0,017
K5	■	0,271	-0,098	-0,119	0,071

El ACP muestra que la mayor parte de la variabilidad microbiana es explicada por CP1 (60.72%), seguido por CP2 (34.09%) y, en menor medida, por CP3 (4.14%). Esto indica que CP1 y CP2 capturan las principales diferencias microbianas. (Figura 15).

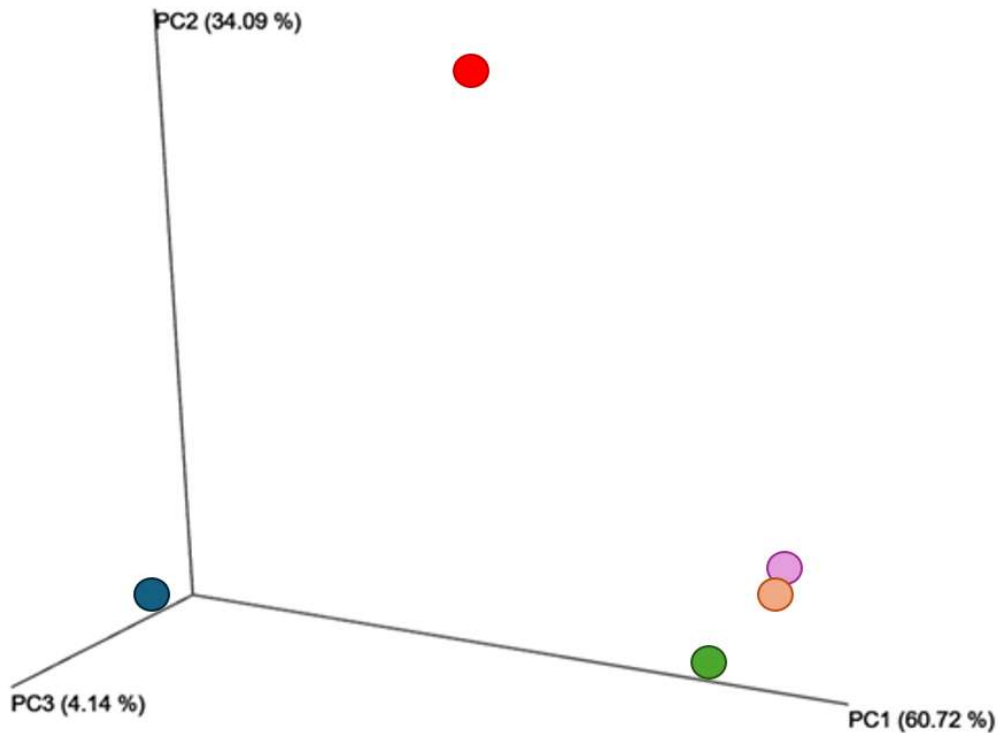


Figura 15: Análisis de componentes principales de los 5 individuos de *T. molitor* de la población surcoreana criada intensivamente.

K2 destaca con un valor muy negativo en CP1, lo que sugiere que posee la microbiota más distinta. En cambio, K3, K4 y K5 muestran valores positivos en CP1 con variaciones menores, lo que indica una mayor similitud entre ellos.

En CP2, K1 tiene un valor positivo alto, lo que indica una microbiota diferenciada. K2, K3, K4 y K5 muestran valores negativos en CP2, lo que implica características microbianas compartidas, aunque con diferencias sutiles.

El CP3 (4.14%) refleja variaciones menores. K5 tiene un valor ligeramente positivo, pero debido al menor poder explicativo del CP3, estas diferencias son menos relevantes.

En conjunto, la población surcoreana muestra una separación clara en CP1, siendo K2 el individuo más distintivo, mientras que los demás están más agrupados a lo largo de CP2. La mayor parte de la variabilidad microbiana está influenciada por los factores capturados en CP1.

Estudio de la población china

Los individuos fueron etiquetados con la letra C (China) y su número correspondiente (Tabla 8).

Tabla 8: Valores para cada componente de diversidad beta en los cinco individuos de la población salvaje china de *T. molitor* y los colores que representan cada uno.

	Color	PC1	PC2	PC3	PC3
C1		-0,265	0,076	-0,087	-0,168
C2		0,627	0,186	-0,008	-0,019
C3		-0,040	-0,353	0,205	-0,018
C4		-0,284	0,432	0,056	0,104
C5		-0,037	-0,340	-0,166	0,102

El ACP muestra que la mayor parte de la variabilidad microbiana en la población china es explicada por CP1 (47.79%), seguido por CP2 (40.82%) y, en menor medida, por CP3 (7.01%). Esto indica que los dos primeros componentes explican casi toda la variabilidad, siendo CP1 el factor más decisivo. (Figura 16).

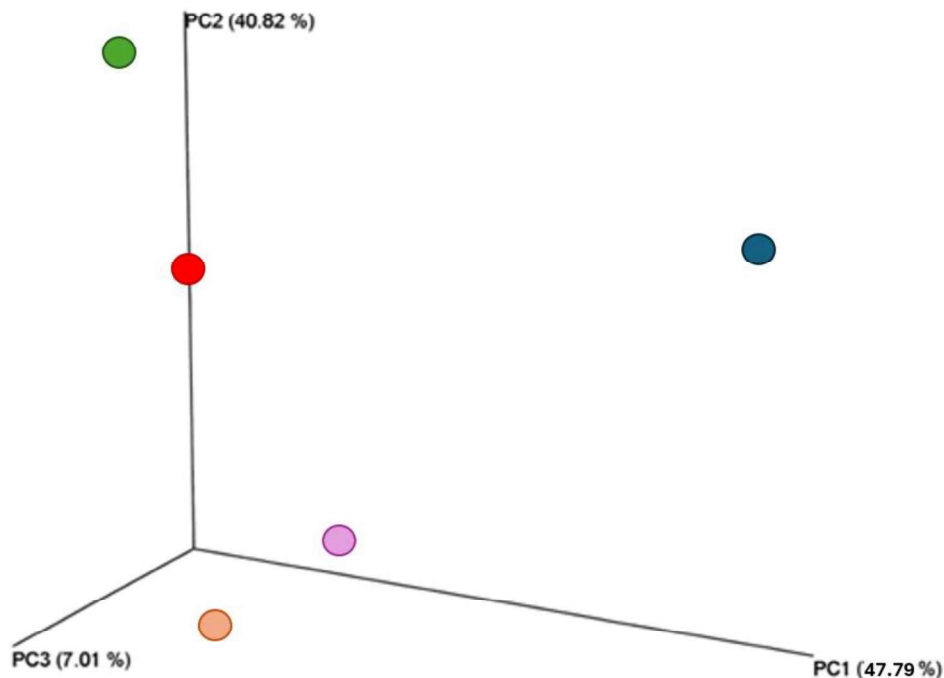


Figura 16: Análisis de componentes principales de los 5 individuos de *T. molitor* de la población china criada manualmente.

C2 destaca claramente con un valor positivo alto en CP1, lo que sugiere una microbiota distintiva. En cambio, C1, C3, C4 y C5 presentan valores negativos en CP1, indicando características microbianas más similares.

En CP2, C4 muestra un valor positivo alto, indicando una diferenciación adicional. C3 y C5 tienen valores negativos, lo que refleja similitudes en su composición microbiana.

El CP3 (7.01%) revela diferencias más sutiles: C4 y C5 tienen valores positivos, mientras que C1 y C3 muestran valores negativos. Sin embargo, debido a la baja variabilidad explicada por este componente, estas diferencias son menos relevantes.

En resumen, la población china muestra una diferenciación clara en CP1, siendo C2 el individuo más distintivo. La variabilidad en CP2 sugiere que C4 también posee una

microbiota única. Combinados, estos dos ejes explican la mayor parte de la diversidad beta observada.

Discusión

El estudio de la microbiota intestinal de los insectos ha ganado una atención considerable en los últimos años debido a su papel fundamental en la nutrición, salud y adaptabilidad del huésped (Engel y Moran 2013; Douglas 2015). Los insectos albergan comunidades microbianas complejas que influyen en la digestión, la modulación del sistema inmune y la aptitud general, posicionándolos como modelos prometedores para la investigación del microbioma y aplicaciones en biotecnología (Yun et al. 2014; Ben Guerrero 2018). En el contexto de la cría de insectos, particularmente para especies como *T. molitor*, comprender la estructura y función de la microbiota intestinal es crucial para optimizar las prácticas de crianza y mejorar la eficiencia productiva en sistemas alimentarios sostenibles (Worku et al. 2018; Wynants et al. 2017).

Los resultados de este estudio respaldan firmemente la hipótesis de que la microbiota intestinal de *T. molitor* está fuertemente influenciada por el origen geográfico, una variable multifactorial que abarca condiciones ambientales, prácticas de manejo y estrategias de crianza. Esto concuerda con hallazgos previos en investigaciones sobre el microbioma de insectos, que han destacado la naturaleza dinámica y plástica de las comunidades microbianas dependiendo de factores externos (Engel y Moran 2013; Yun et al. 2014). En nuestro caso, tanto la diversidad alfa (riqueza y equitatividad intrapoblacional) como la diversidad beta (variabilidad entre individuos) fueron notablemente moldeadas por el entorno de crianza y las prácticas asociadas.

La elevada diversidad alfa observada en la población egipcia es particularmente destacable. Este grupo fue criado bajo condiciones agrícolas tradicionales, con dietas basadas en residuos orgánicos heterogéneos, control ambiental mínimo y exposición a una gama más amplia de reservorios microbianos. Tales condiciones probablemente favorecen el establecimiento de comunidades microbianas más diversas y funcionalmente versátiles. Las microbiotas complejas pueden conferir múltiples ventajas al insecto huésped, incluyendo capacidades metabólicas ampliadas, mayor actividad enzimática, mejor modulación inmunitaria y mayor resiliencia frente a fluctuaciones ambientales (Osimani et al. 2018; Douglas 2015). La presencia de microbios involucrados en la degradación de fibras, la producción de compuestos antimicrobianos o la activación del sistema inmune podría representar respuestas adaptativas a las presiones ecológicas presentes en entornos menos estandarizados.

Por el contrario, la población británica, criada en instalaciones industriales bajo estrictos protocolos higiénicos y alimentada con una dieta uniforme compuesta principalmente por salvado de trigo y patata, mostró baja diversidad alfa y una microbiota intestinal dominada por un número limitado de géneros bacterianos, notablemente *Staphylococcus*. Este patrón es consistente con lo que se ha informado previamente en insectos criados intensivamente, donde las presiones selectivas, incluidas las dietas simplificadas y la exposición microbiana reducida, conducen a una composición microbiana más estrecha (Worku et al. 2018; Wynants et al. 2017). Aunque esta simplificación puede mejorar la consistencia y la previsibilidad en la producción, también podría reducir la redundancia funcional y la capacidad adaptativa de la microbiota, lo que en última instancia impacta en

la salud, la tasa de crecimiento y la capacidad del insecto para enfrentar estresores ambientales o dietéticos.

Además, el análisis de la diversidad beta revela una capa adicional de complejidad. Los insectos egipcios mostraron un alto grado de variación interindividual en sus perfiles microbianos intestinales, lo que sugiere que los sistemas de producción tradicionales y menos controlados generan un paisaje microbiano más amplio. Esta variabilidad puede deberse a varios factores, como la inconsistencia en los insumos alimenticios, diferencias en los inóculos microbianos entre lotes y una mayor exposición a microbios ambientales. En contraste, la población silvestre —a pesar de estar sujeta a la variabilidad natural del entorno— mostró perfiles microbianos más homogéneos, lo que posiblemente refleje un nicho ecológico estable y una coevolución a largo plazo entre huésped y microbioma (Poveda Arias 2019; Stoops et al. 2016). Esta observación desafía la suposición de que los entornos silvestres siempre promueven una mayor diversidad microbiana y destaca la importancia de la previsibilidad ambiental en la configuración de las comunidades microbianas.

La dieta emerge como un determinante clave en la estructuración de la microbiota intestinal. Los sustratos fermentables, especialmente aquellos ricos en material lignocelulósico o materia orgánica parcialmente descompuesta, tienden a enriquecer la diversidad bacteriana y seleccionan taxones con funciones enzimáticas especializadas (Ben Guerrero 2018; Wang and Zhang 2015). Los insectos que consumen estos sustratos tienen más probabilidades de albergar consorcios microbianos capaces de descomponer polímeros vegetales complejos, facilitando la absorción de nutrientes y aumentando la eficiencia de conversión de biomasa. Además, la humedad dietética —frecuentemente pasada por alto en la cría de insectos— impacta significativamente en la fisiología intestinal y la composición microbiana. Como se ha demostrado en estudios previos, tanto la sequedad excesiva como la alta humedad pueden alterar el desarrollo larval y desplazar las comunidades microbianas hacia taxones tolerantes al estrés u oportunistas (Deruytter et al. 2020; Murray 1968).

En conjunto, estos hallazgos subrayan el papel central de la microbiota en la configuración del rendimiento zootécnico de *T. molitor*. La comunidad microbiana intestinal no es un subproducto pasivo del entorno del insecto, sino un socio dinámico en su biología, que influye en la digestión, la inmunidad, la tolerancia al estrés e incluso en la eficiencia de conversión de sustratos en biomasa valiosa (Grau et al. 2017; Ghaly y Alkoik 2009). Comprender cómo se estructura esta microbiota y cómo responde a manipulaciones ambientales es crucial para optimizar los protocolos de cría. En el contexto del creciente interés por los insectos como fuente sostenible de proteína y solución para la bioconversión de residuos orgánicos, las estrategias de manejo informadas por el microbioma podrían conducir a sistemas de producción más eficientes, resilientes y respetuosos con el medio ambiente.

La interacción entre dieta, entorno y ecología microbiana representa un campo prometedor para el desarrollo de una cría de insectos de precisión. Investigaciones futuras deberían explorar el uso de prebióticos, probióticos e inoculantes microbianos, así como investigar la estabilidad a largo plazo y la heredabilidad de microbiotas beneficiosas en *T. molitor*. Tales esfuerzos serán esenciales para liberar todo el potencial de la cría de insectos dentro de marcos de bioeconomía circular.

CAPÍTULO 5



Modulación de la microbiota intestinal de *Tenebrio molitor* mediante subproductos fúngicos: comparación entre micelio y carpóforo

Resumen

La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la fisiología, salud y rendimiento productivo de *Tenebrio molitor*, un insecto de creciente interés en la industria agroalimentaria. En este estudio, se analizó el efecto de cinco dietas experimentales sobre la estructura microbiana intestinal del insecto: una dieta control (salvado de trigo + patata) y cuatro dietas suplementadas con micelio o cuerpo fructífero del hongo *Lentinula edodes*, en proporciones del 20% y 80%. Mediante análisis de secuenciación de la región 16S rRNA, se evaluó la diversidad alfa y beta en distintos niveles taxonómicos (filo, familia, género y especie).

Los resultados mostraron que la inclusión de micelio, especialmente al 20%, promovió una microbiota más rica, diversa y equilibrada, mientras que las dietas con un 80% de cuerpo fructífero redujeron significativamente la diversidad y condujeron a una marcada dominancia de especies específicas, como *Enterobacter hormaechei*. Se observó un claro patrón de reemplazo de Firmicutes por Proteobacteria, dependiendo del tipo y proporción del suplemento fúngico, con efectos dependientes de la dosis.

Estos hallazgos sugieren que el micelio puede ser una estrategia nutricional adecuada para modular positivamente la microbiota de *T. molitor*, con beneficios potenciales para su cría industrial. En contraste, el uso del cuerpo fructífero debe abordarse con precaución debido a su efecto reductor sobre la microbiota. Este trabajo aporta información relevante para el diseño de dietas funcionales orientadas a optimizar la salud intestinal y el desempeño de los insectos en sistemas de producción sostenibles.

Palabras clave

Cuerpo fructífero, micelio, fungicultura, dietas para insectos, efectos dietéticos

Introducción

El uso de insectos como fuente alternativa de alimento y forraje ha generado un creciente interés en los últimos años, tanto por su valor nutricional como por su eficiencia ecológica en la producción (Ghaly and Alkoaik, 2009; Ravzanaadii et al, 2012). Entre ellos, *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), comúnmente conocido como gusano de la harina, ha emergido como uno de los candidatos más prometedores para la producción a escala industrial debido a su alto contenido de proteínas, lípidos y su capacidad de adaptarse a dietas diversas (Aguilar-Miranda et al, 2001; Grau et al, 2017).

Además de su perfil nutricional, *T. molitor* es un modelo adecuado para estudiar las interacciones entre insectos y microbioma. Al igual que en otros insectos, la microbiota intestinal en esta especie desempeña un papel clave en la digestión, la inmunidad, el desarrollo y la adaptación a cambios ambientales, incluyendo modificaciones dietéticas (Dillon and Dillon, 2004; Engel and Moran, 2013; Schmidt and Engel, 2021). Esta comunidad microbiana puede variar significativamente según múltiples factores como el entorno, la etapa de desarrollo y, especialmente, la dieta (Yun et al, 2014; Wang and Zhang, 2015; Osimani et al, 2018).

Se ha demostrado que las variaciones en la dieta alteran rápidamente la composición del microbioma intestinal en vertebrados (David et al, 2014), y evidencia similar ha comenzado a surgir también en insectos (Jung et al, 2014; Gupta and Nair, 2020). En *T. molitor*, los cambios en la dieta no solo afectan la tasa de crecimiento o el valor nutricional (Deruytter et al, 2020; Mendaza Lainez, 2017), sino también la estructura y función de su microbiota (Worku et al, 2018; Ángel-Sánchez and Galián, 2022). Esto abre nuevas posibilidades para manipular su dieta con el fin de optimizar la producción o modificar su perfil microbiano con fines biotecnológicos o de seguridad alimentaria (Stoops et al, 2016; Vandeweyer et al, 2017).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo comparar la composición de la microbiota intestinal de *T. molitor* alimentado con cinco dietas diferentes: una dieta control (salvado de trigo + patata), dos dietas suplementadas con micelio del hongo (20% y 80%) y dos dietas con cuerpo fructífero del mismo hongo en las mismas proporciones. El objetivo principal es evaluar cómo varía la comunidad microbiana intestinal según el tipo y proporción del ingrediente fúngico añadido. Este análisis permitirá identificar posibles patrones de modulación microbiana asociados con componentes fúngicos y evaluar su impacto potencial sobre la fisiología del insecto. A través de este enfoque, el estudio busca contribuir al diseño de estrategias alimenticias más funcionales y eficientes en la cría de insectos comestibles.

Materiales y métodos

Este estudio se centró en la caracterización de la microbiota intestinal de larvas de *T. molitor* criadas con diferentes dietas. A continuación se detallan los materiales utilizados y las metodologías aplicadas para la recogida de larvas, conservación, extracción del intestino, análisis de ADN y evaluación de la diversidad bacteriana.

Recogida de larvas

Tras la eclosión, las larvas se colocaron en bandejas para su desarrollo y cría. Las bandejas tenían una superficie de 0,06 m² (20 × 30 cm) y se mantuvieron en una cámara de cría en las condiciones indicadas en la tabla 1 y figura 1.

Tabla 1: Condiciones de la cámara de cría para cada tratamiento dietéticos en las poblaciones de *T. molitor*.

Temperatura (°C)	22 – 26
Humedad relativa (%)	40 – 60
Número de horas de luz diarias	4 horas
Sustrato	Dependiendo del tratamiento
Suministro de humedad	40 gramos de gel cada 3 días
Densidad de larvas	100 individuos por bandeja

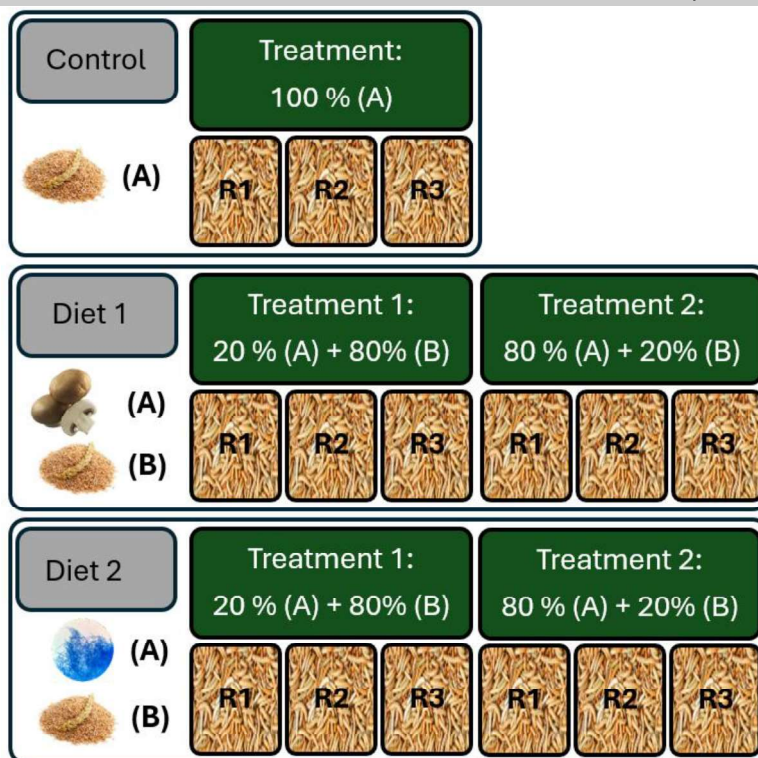


Figura 1: diagrama de las dietas utilizadas en cada tratamiento (de arriba abajo: control (salvado), dieta 1 (cuerpo fructífero + salvado), dieta 2 (micelio + salvado)) para la cría de *T. molitor*.

El experimento concluyó cuando al menos una larva en cada tratamiento se transformó en pupa, lo que indica el inicio de la metamorfosis.

Conservación de larvas

Al finalizar el experimento, cinco larvas seleccionadas fueron sumergidas en isopropanol al 99,5% durante tres semanas para su conservación previa al análisis de microbiota. Cada muestra fue etiquetada individualmente con lápiz y una pequeña etiqueta para asegurar una correcta identificación, y posteriormente almacenada en tubos Falcon de 15 mL hasta su procesamiento.

Extracción intestinal

Tras la conservación, los sistemas digestivos de las larvas fueron extraídos bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. El procedimiento fue el siguiente:

Secado de las larvas: Las larvas se colocaron en un horno a 35 °C durante 2 minutos para eliminar el alcohol residual.

Extracción intestinal: Cada larva fue colocada en una placa Petri de vidrio estéril y se realizó una incisión ventral en el abdomen (segmentos 5–9) usando pinzas de disección estériles. Luego, los intestinos se extrajeron cuidadosamente y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

En total, se obtuvieron 9 muestras, cada una etiquetada con el siguiente código: una letra mayúscula que indica la dieta (– = control negativo, C = cuerpo fructífero, M = micelio), seguida de un número del 1 al 5 que representa la larva individual.

Extracción de ADN

Se utilizó un protocolo de extracción de ADN optimizado para insectos, con el kit de lisis de insectos de Promega, siguiendo estos pasos:

- Lisis celular: Se añadieron 100 µL de Insect Lysis Buffer y 20 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) a cada muestra.
- Incubación: Las muestras se incubaron a 56 °C con agitación constante durante 6 horas.
- Centrifugación inicial: Se centrifugaron a 2.000 rpm durante 15 segundos para eliminar la condensación.
- Unión del ADN: Se añadieron 100 µL de Binding Mix, la muestra se vortexó durante 15 segundos y se centrifugó a 11.000 rpm durante 20 segundos.
- Filtración: El contenido se transfirió a un tubo de 2 mL con una columna de filtración y se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos.
- Lavado del ADN: se añadieron 200 µL de Protein Wash Buffer y se centrifugó a 11.000 rpm durante 2 minutos. Luego se repitió el lavado con 600 µL del mismo buffer.
- Elución del ADN: se añadieron 30 µL de agua bidestilada caliente (56 °C) directamente sobre la membrana de la columna. Tras esperar 1 minuto, se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos.
- Almacenamiento: Las columnas se descartaron y los tubos con el ADN extraído se almacenaron a –20 °C hasta su análisis.

Análisis de la comunidad bacteriana

Las muestras de ADN fueron enviadas al Servicio de Metagenómica de LAIB para la identificación de la comunidad bacteriana mediante secuenciación del gen 16S rRNA.

Para el análisis, se agruparon 5 individuos de cada repetición (3 por dieta). Se utilizó el Ion 16S Metagenomics Kit (IonTorrent) para amplificar las regiones variables 2, 4 y 8 en un tubo (fragmentos de 250, 288 y 295 pb, respectivamente), y las regiones 3, 6–7 y 9 en otro tubo (fragmentos de 215, 260 y 209 pb, respectivamente). Los cebadores (primers) garantizaban más del 80% de cobertura de las secuencias con un 100% de identidad.

Los datos fueron procesados con Ion Reporter™ utilizando un flujo de trabajo específico para 16S rRNA. Para la identificación taxonómica se utilizó la base de datos Curated

Greengenes v13.5. Se estableció un umbral mínimo de ≥ 10 lecturas para considerar una secuencia válida, y un criterio de identidad del 99,5% para asignación a nivel de especie.

Para evaluar la diversidad microbiana:

- Diversidad alfa: Se evaluó la variabilidad dentro de cada muestra a nivel de especie, género y familia.
- Diversidad beta: Se comparó la composición bacteriana entre diferentes poblaciones.

Se generaron gráficos Krona y tablas de abundancia relativa para la interpretación de resultados.

Resultados

Los resultados se estudiaron en los niveles taxonómicos de filo, familia, género y especie, tanto para diversidad alfa como beta.

Diversidad alfa

Fue analizada para cada nivel taxonómico.

Filo

La caracterización taxonómica a nivel de filo reveló la presencia dominante de Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteriota y Bacteroidota en todas las muestras, con diferencias relativas según el tratamiento.

Firmicutes fue el grupo más abundante en la mayoría de las muestras, especialmente en los tratamientos control (C1–C3), donde representó entre el 52% y el 65% de la microbiota total (Figura 2). En los tratamientos con micelio y cuerpo fructífero, su abundancia disminuyó conforme aumentaba el suplemento fúngico, alcanzando entre el 20% y 40% en M80 y CAR80. Esto sugiere un efecto modulador de los componentes fúngicos sobre este grupo bacteriano.

Proteobacteria mostró la tendencia opuesta. Fue menos prevalente en el grupo control (15–25%), pero aumentó notablemente en las dietas con alto contenido de micelio (M80) y cuerpo fructífero (CAR80), alcanzando hasta un 45–50% en algunos individuos. Esto puede indicar una expansión de este filo bajo condiciones de mayor fermentación fúngica o disponibilidad alterada de nutrientes.

Actinobacteriota mantuvo una presencia moderada y estable en todos los tratamientos, con proporciones ligeramente más altas en el grupo con 20% de cuerpo fructífero (~10–15%) y entre 5–10% en los demás tratamientos.

Bacteroidota apareció en proporciones generalmente bajas, pero mostró aumentos puntuales en las muestras M20 y CAR80, sin un patrón claro, variando entre un 2% y 10%.

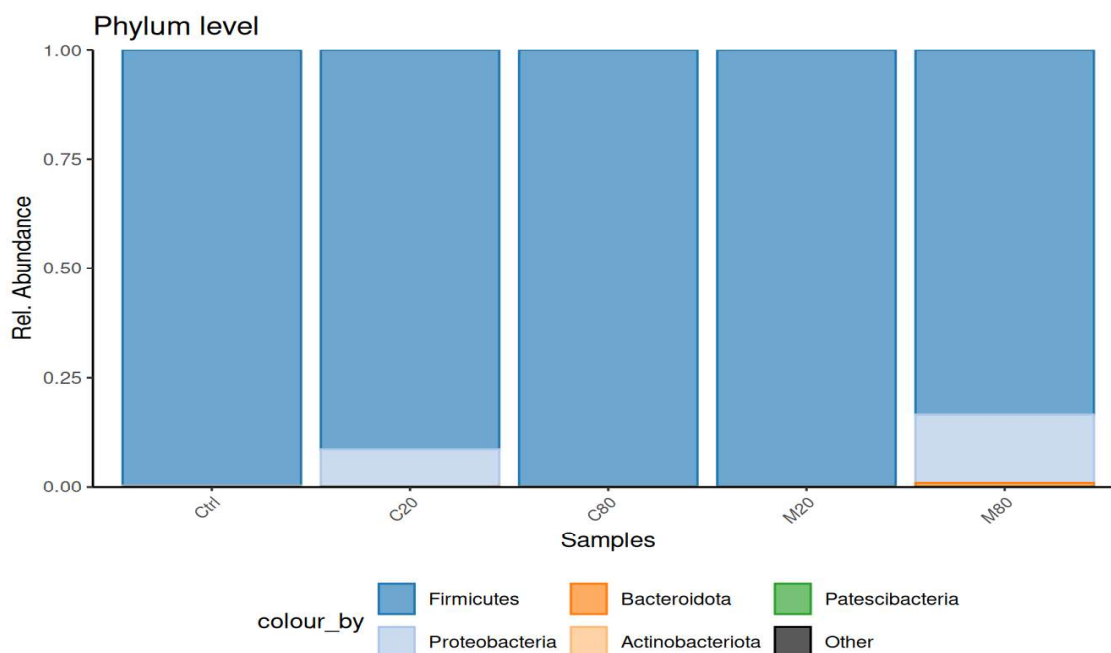


Figura 2: gráfico de barras que representa el filo mostrado para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Familia

A nivel de familia, se observa una clara influencia de la dieta en la composición de la microbiota de *T. molitor*. En el grupo control (salvado + patata), predominaron las familias Enterococcaceae y Enterobacteriaceae, con una elevada representación de Firmicutes y Proteobacteria, respectivamente.

En los individuos alimentados con carpóforo (CAR20 y CAR80), se produjo una disminución progresiva de la abundancia relativa de Enterococcaceae, mientras que Enterobacteriaceae aumentó, especialmente en CAR80. También aparecieron otras familias como Lactobacillaceae y Staphylococcaceae, aunque en menor proporción (Figura 3).

En los tratamientos con micelio (M20 y M80), la tendencia se acentúa: Las Enterobacteriaceae se vuelven ampliamente dominantes, sobre todo en M80, lo que indica un cambio importante en el equilibrio microbiano. Paralelamente, las Lactobacillaceae y otras familias del filo Proteobacteria se vuelven más prominentes.

Este patrón sugiere que las dietas ricas en componentes fúngicos favorecen el crecimiento de Proteobacterias, especialmente de la familia Enterobacteriaceae, en detrimento de Firmicutes como Enterococcaceae. El cambio es más pronunciado con el aumento del porcentaje de micelio o carpóforo, lo que indica una respuesta de la microbiota intestinal dependiente de la dosis.

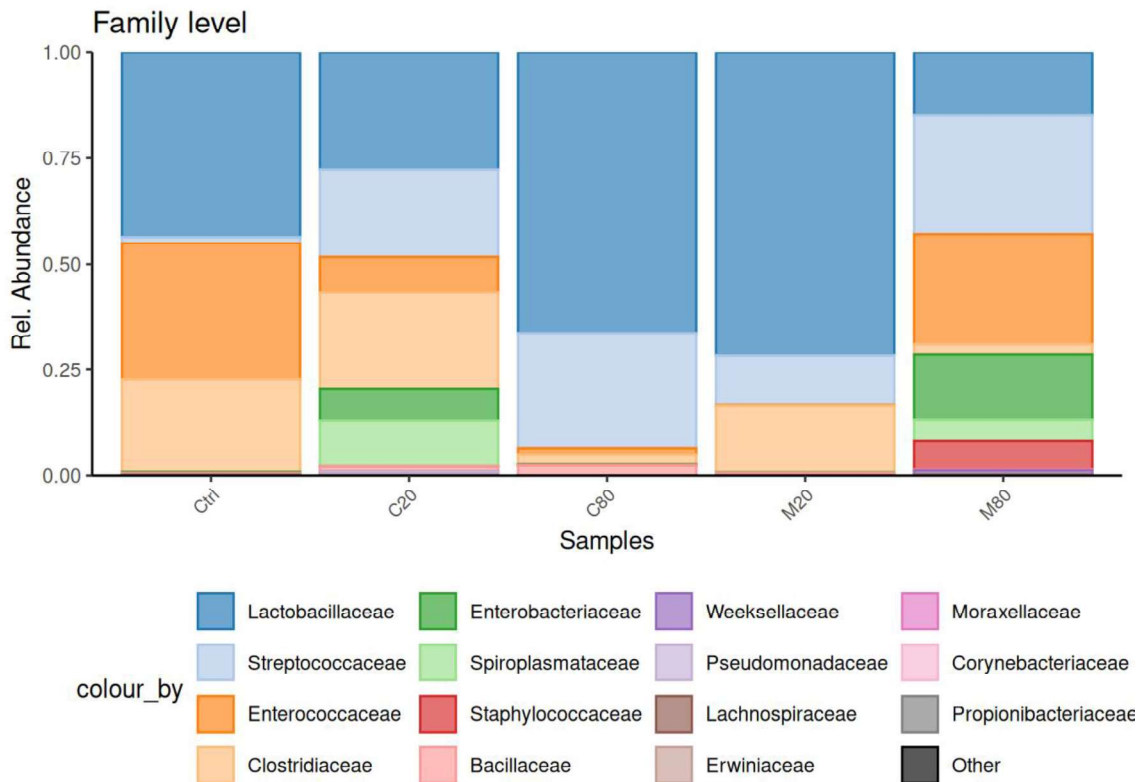


Figura 3: gráfico de barras que representa las familias mostradas para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Género

A nivel de género, la variación de la microbiota intestinal de *T. molitor* entre dietas se hace aún más específica y revela una clara reestructuración de la comunidad microbiana.

En el grupo de control se observó un notable predominio del género *Enterococcus*, seguido de *Enterobacter* y otros géneros como *Weissella* en menor proporción. Esta composición es coherente con una dieta estándar basada en salvado y patata, que parece favorecer a los géneros pertenecientes a los *Firmicutes*.

Con la inclusión de carpóforo (CAR20 y CAR80) en la dieta, se registró una disminución significativa de *Enterococcus*, mientras que *Enterobacter* aumentó en abundancia, especialmente en CAR80. También se detectaron géneros como *Staphylococcus* y *Lactococcus*, aunque a niveles bajos, lo que indica una transición parcial hacia una comunidad más diversa.

El efecto fue aún más pronunciado en los tratamientos con micelio (M20 y M80). En estos grupos, *Enterobacter* se convirtió en el género dominante, sobre todo en M80, con una notable pérdida de representación de *Enterococcus*. Además, aparecieron otros géneros asociados a las Proteobacterias, incluidos miembros del género *Serratia* en algunas muestras (Figura 4).

Este cambio en la composición microbiana sugiere que el aumento de la proporción de componentes fúngicos en la dieta induce un cambio hacia géneros típicos de Proteobacterias, lo que puede reflejar adaptaciones funcionales del microbioma a compuestos presentes en el micelio o carpóforo, posiblemente ricos en quitina u otros polisacáridos fúngicos.

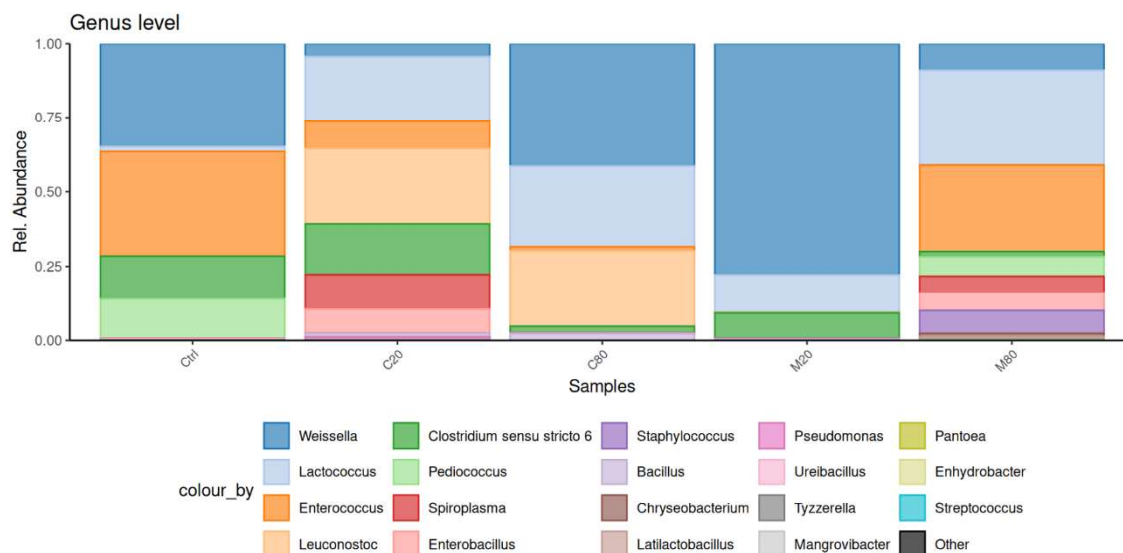


Figura 4: gráfico de barras que representa los géneros que aparecen para cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Especie

A nivel de especies, el análisis reveló marcadas diferencias en la microbiota intestinal de *T. molitor* según la dieta, con un alto grado de especificidad microbiana.

En el grupo de control (C1, C2, C3), la especie dominante fue claramente *Enterococcus faecalis*, acompañada en menor medida por *Enterobacter hormaechei* y otros taxones como *Weissella cibaria*, lo que indica una comunidad microbiana fuertemente asociada al entorno natural y a la dieta estándar del insecto (Figura 5).

Cuando se introdujo el carpóforo (CAR20, CAR80) en la dieta, se observó una marcada disminución de *E. faecalis*, siendo sustituido progresivamente por *E. hormaechei*, especialmente en CAR80. Este cambio sugiere que el carpóforo podría inhibir el crecimiento de Firmicutes típicos, favoreciendo en su lugar a ciertas especies de Proteobacterias.

En los tratamientos con micelio (M20, M80), la tendencia fue aún más pronunciada. *E. faecalis* desapareció casi por completo, siendo *E. hormaechei* la especie predominante, acompañada de *Serratia marcescens* en algunas muestras M80. Estos perfiles indican una alteración drástica de la comunidad intestinal hacia una configuración dominada por bacterias oportunistas o más versátiles, capaces de metabolizar componentes miceliales.

La diferencia entre M20 y M80 también sugiere un efecto dependiente de la dosis de micelio, donde una mayor proporción de este ingrediente intensifica la selección de especies específicas como *E. hormaechei* y reduce la diversidad de especies firmicutes.

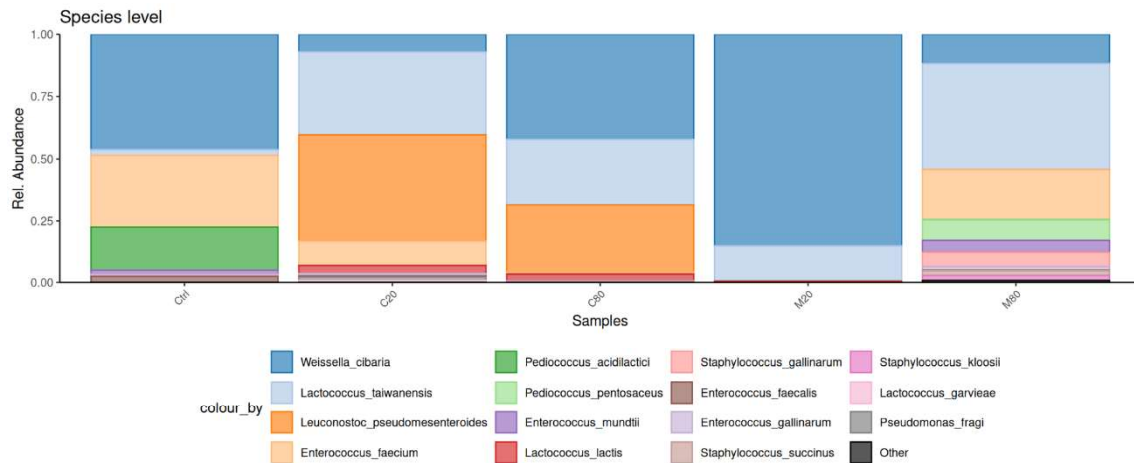


Figura 5: gráfico de barras que representa las especies presentes en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*.

Comparación global

El análisis de la diversidad microbiana mediante el índice de Shannon reveló diferencias notables entre los tratamientos dietéticos aplicados a *T. molitor*. El grupo control (salvado de trigo + patata) mostró una diversidad relativamente alta, comparable a la observada en los tratamientos M20 (20% de micelio) y M80 (80% de micelio), sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,4$) (Figura 6). Por el contrario, los grupos suplementados con carpóforo, especialmente CAR80 (80% carpóforo), mostraron una marcada disminución de la diversidad microbiana, siendo CAR80 el tratamiento con menor valor del índice de Shannon (mediana < 1), con diferencias marginalmente significativas respecto al control y M80 ($p = 0,2$ y $p = 0,1$, respectivamente). Estos resultados sugieren que altas concentraciones de carpóforo en la dieta pueden reducir la diversidad de la microbiota intestinal de *T. molitor*, mientras que la inclusión de micelio, incluso en altas proporciones, no parece afectar negativamente a este parámetro.

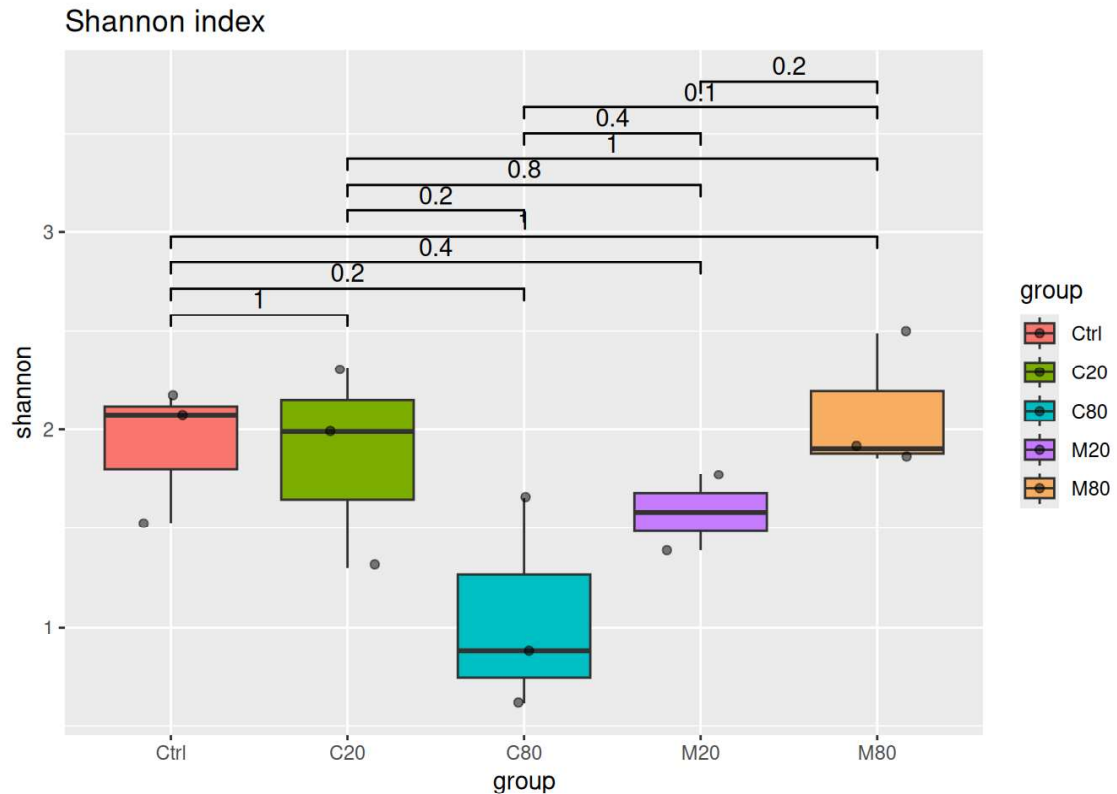


Figura 6: diagrama que representa el índice de Shannon para cada tratamiento con *T. molitor* (Ctrl = control; C20 = tratamiento carpóforo 20% en la dieta, C80 = tratamiento carpóforo 80% en la dieta, M20 = tratamiento micelio 20% en la dieta, M80 = tratamiento micelio 80% en la dieta).

Curva de rarefacción

Las curvas de rarefacción mostraron claras diferencias en la riqueza de variantes de amplicones (ASVs) entre tratamientos dietéticos en *T. molitor*. El tratamiento M2_20 (20% de micelio) alcanzó la mayor riqueza, con más de 120 ASVs, indicando una alta diversidad microbiana potencial. Este resultado contrasta con el tratamiento de control (C1), que tuvo la riqueza más baja (alrededor de 20 ASVs), lo que sugiere que la dieta estándar limita la complejidad de la microbiota intestinal (Figura 7). Otros tratamientos basados en micelio (como M2_80 y M3_80) también mostraron altos niveles de riqueza (60-90 ASVs), mientras que las dietas con carpóforo (especialmente C3_80) presentaron curvas más bajas, indicando una menor diversidad. En conjunto, estos datos sugieren que la inclusión de micelio, especialmente al 20%, favorece el establecimiento de una comunidad microbiana más diversa, mientras que las dietas con alto contenido en carpóforo tienden a reducir la riqueza microbiana asociada a *T. molitor*.

Número	Tratamiento	Repetición
1	Control	N/A
2		N/A
3		N/A
4	Carpóforo	20
5		20
6		20
7	Carpóforo	80
8		80
9		80
10	Micelio	20
11		20
12		20
13	Micelio	80
14		80

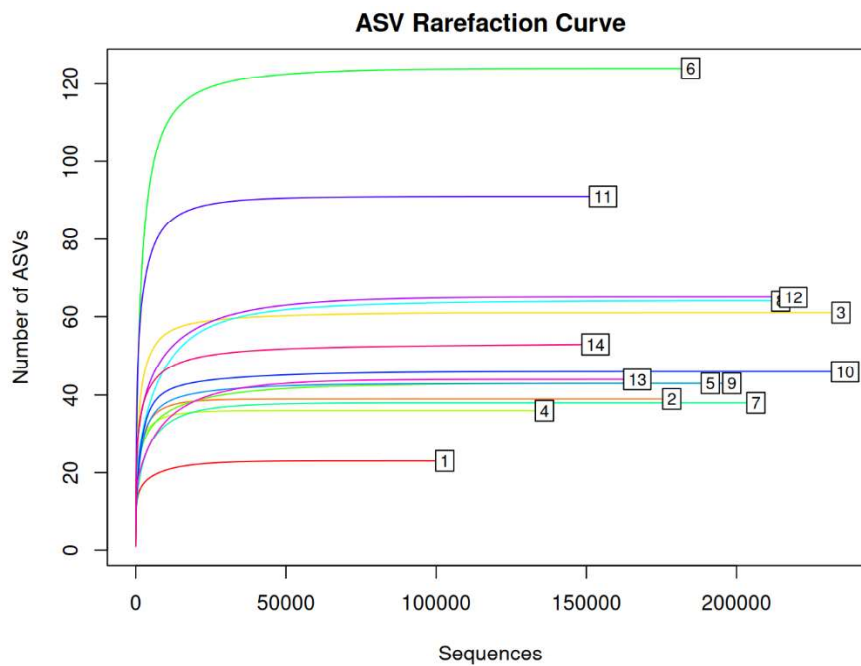


Figura 7: curva de rarefacción para cada tratamiento con *T. molitor*.

Dominancia

El gráfico muestra la distribución de las especies bacterianas dominantes en los distintos grupos de tratamiento dietético: control (Ctrl), carpóforo 20% (C20), carpóforo 80% (C80), micelio 20% (M20) y micelio 80% (M80). Se observan varias especies recurrentes, lo que sugiere cierta estabilidad en los taxones dominantes, aunque con interesantes diferencias según el tratamiento:

Enterococcus faecium aparece como dominante principalmente en el grupo control y en uno de los tratamientos con micelio (M80), lo que indica que esta especie podría estar

asociada a unas condiciones de alimentación más estándar o a una baja interferencia fúngica.

Lactococcus taiwanensis es dominante tanto en C20 como en M80, lo que sugiere que esta especie podría beneficiarse tanto de los componentes del carpóforo como del micelio a dosis elevadas (Figura 8).

Leuconostoc pseudomesenteroides aparece en C20 y C80, lo que indica una posible afinidad por el carpóforo como sustrato.

Weissella cibaria aparece en el control, C80 y M20, mostrando cierta plasticidad ecológica y adaptación a diferentes entornos dietéticos.

Este patrón sugiere que la dieta influye significativamente en la estructura de la microbiota dominante, con cierta especialización o favorecimiento de especies dependiendo del tipo y proporción de suplementación fúngica administrada.

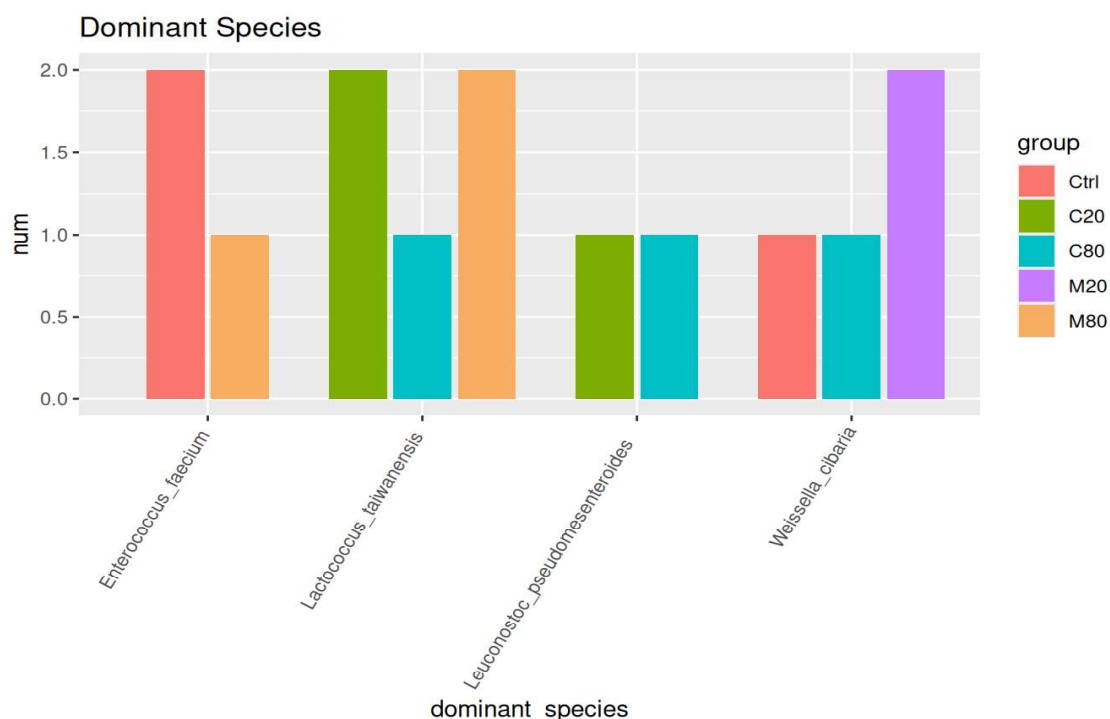


Figura 8: dominancia de especies para cada uno de los tratamientos estudiados con *T. molitor*.

Diversidad beta

El análisis de diversidad beta, visualizado mediante escalado multidimensional no métrico (NMDS) basado en la disimilitud de Bray-Curtis, mostró diferencias sustanciales en la composición de la comunidad asociadas a los distintos tratamientos dietéticos administrados a *T. molitor*. Las muestras correspondientes al tratamiento de control (salvado de trigo + patata) se agruparon separadamente de las que incluían componentes fúngicos. En particular, las dietas con alta proporción de micelio (M80) y carpóforo (C80) mostraron una clara separación espacial en el plano NMDS, indicando una marcada diferenciación en la composición (alta diversidad beta) respecto al control (Figura 9). Asimismo, los tratamientos con menor proporción de micelio (M20) o carpóforo (C20) mostraron patrones intermedios, indicando una relación dosis-dependiente en la influencia del hongo sobre la comunidad analizada. Estos resultados sugieren que tanto la

naturaleza del suplemento fúngico (micelio vs. carpóforo) como su concentración modifican significativamente la estructura de la comunidad, reflejando probablemente cambios en la microbiota intestinal u otros parámetros ecológicos internos del hospedador.

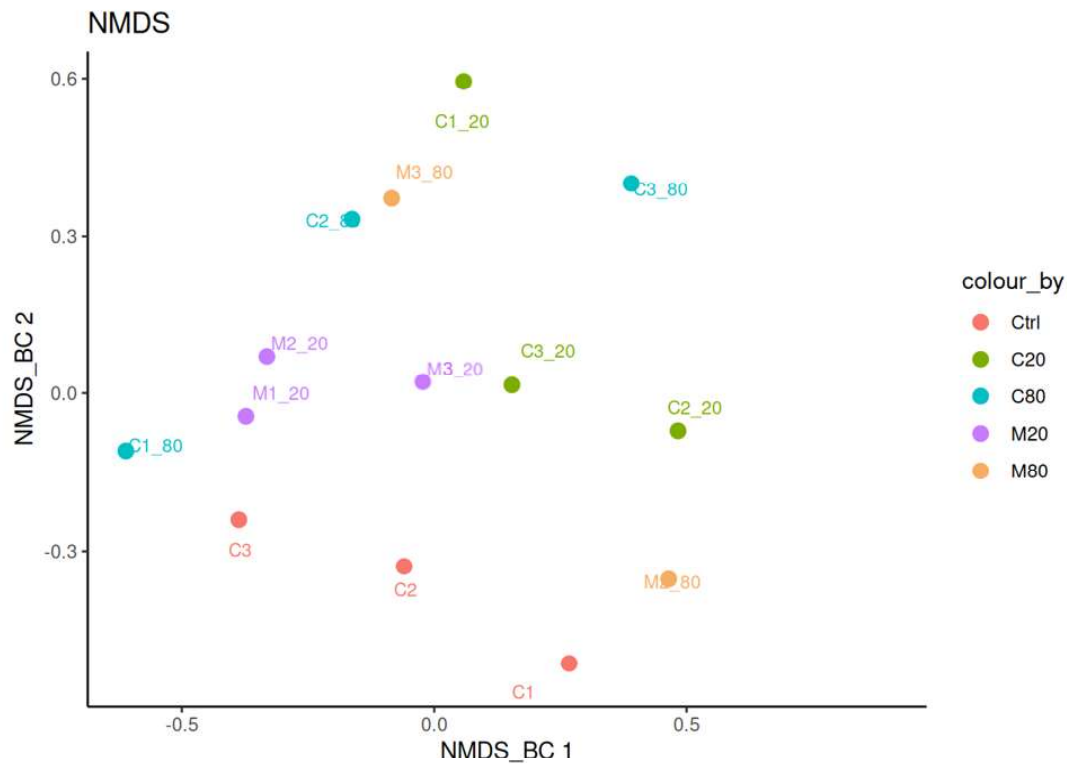


Figura 9: diversidad beta para los distintos tratamientos con *T. molitor* y sus réplicas.

Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que la composición y estructura de la microbiota intestinal de *T. molitor* puede ser modulada significativamente mediante la inclusión de distintos tipos y proporciones de hongos comestibles en la dieta, específicamente del carpóforo (cuerpo fructífero) y el micelio. Este hallazgo tiene importantes implicaciones tanto para la comprensión ecológica de los insectos saprófagos como para la optimización de su cría industrial, donde la salud intestinal, la eficiencia digestiva y la seguridad microbiológica son aspectos clave.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la importancia de la microbiota intestinal de *T. molitor* y su sensibilidad a cambios ambientales, especialmente la dieta y la iluminación, factores que ya han sido reportados previamente como moduladores clave de la microbiota en insectos (Engel and Moran, 2013; Yun et al, 2014). El presente trabajo coincide con estudios previos que evidencian que la dieta determina en gran medida la composición y diversidad microbiana intestinal (David et al, 2014; Douglas, 2015), lo cual es fundamental para el crecimiento, desarrollo y aprovechamiento nutricional de esta especie (Aguilar-Miranda et al, 2001; Ravzanaadii et al, 2012).

En el caso de dietas basadas en subproductos agroindustriales, como residuos de café o cereales, se ha observado su potencial como sustratos sostenibles para la cría de insectos comestibles (Campos-Vega et al, 2015; Van Huis, 2021). Sin embargo, la modificación de la

microbiota por estas dietas puede influir tanto en la eficiencia de conversión alimenticia como en su perfil nutricional final (Deruytter et al, 2020; Mendaza Lainez, 2017). Algunos estudios han sugerido que el microbioma de *T. molitor* podría contribuir a la digestión de polisacáridos complejos gracias a bacterias simbióticas productoras de hidrolasas glicosídicas (Ben Guerrero, 2018; Poveda Arias, 2019).

Por otro lado, la exposición a diferentes condiciones de luz constituye un factor de estrés que impacta la microbiota intestinal de los animales (Kim et al, 2019; Wei et al, 2020), y en los insectos, específicamente, puede afectar su ritmo circadiano, desarrollo y composición microbiana (Jung et al, 2014; Ángel-Sánchez and Galián, 2022). Balfour and Carmichael (1928) y Jiang et al. (2020) demostraron que la alteración lumínica genera cambios en el comportamiento y la fisiología de insectos y aves, respectivamente, los cuales podrían estar mediados, en parte, por alteraciones en la microbiota intestinal (Liebert et al, 2019).

En este sentido, se ha demostrado que el microbioma de *T. molitor* está compuesto predominantemente por bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Staphylococcus*, cuya proporción varía según la dieta, la etapa de desarrollo y las condiciones de cría (Osimani et al, 2018; Wynants et al, 2017; Wang and Zhang, 2015). Este estudio confirma dicha tendencia, encontrando diferencias significativas en las comunidades bacterianas tras la modificación de los sustratos alimenticios, en concordancia con Engel and Moran (2013) y Rajagopal (2009), quienes señalan que los insectos mantienen interacciones mutualistas con su microbiota, las cuales facilitan la asimilación de nutrientes y la detoxificación de compuestos.

Además, los resultados coinciden con lo señalado por Murray (1968) y Deruytter et al. (2020), quienes indican que la disponibilidad de agua y la forma de presentación del alimento (húmeda o seca) afectan el crecimiento larval y, por lo tanto, la dinámica microbiana intestinal. Cabe destacar que la manipulación de la microbiota en insectos comestibles como *T. molitor* podría utilizarse estratégicamente para mejorar su perfil nutricional y la seguridad alimentaria (Ghaly and Alkoaik, 2009; Siemianowska et al, 2013; Grau et al, 2017).

Finalmente, es importante considerar que la microbiota intestinal de los insectos cumple funciones equivalentes a las de los vertebrados en cuanto al metabolismo de nutrientes, protección frente a patógenos y modulación del sistema inmunológico (Dillon and Dillon, 2004; Schmidt and Engel, 2021; Ley et al, 2008). Estos hallazgos abren oportunidades para optimizar la producción de *T. molitor* en sistemas agroindustriales sostenibles, mejorando su calidad como ingrediente alimenticio para consumo animal y humano (Baek et al, 2015; Hicks, 2017; Ramos-Elorduy et al, 2002).

CAPÍTULO 6



Evaluación de los efectos de diferentes microorganismos sobre *Tenebrio molitor* y aplicación de *Pediococcus pentosaceus* como probiótico potencial

Resumen

El uso de probióticos en la cría de insectos comestibles representa una estrategia prometedora para mejorar la productividad y la resistencia a patógenos. En este estudio se evaluó el efecto del probiótico *Pediococcus pentosaceus*, aplicado en dietas líquidas y secas, sobre parámetros de desarrollo, rendimiento y calidad morfológica de *Tenebrio molitor*. Los tratamientos control se compararon con otros suplementados con patógenos (*Fusarium spp.*, *Enterococcus hormaechei* y *Staphylococcus aureus*) y con combinaciones de éstos con *P. pentosaceus*. Se analizaron variables como el tiempo de desarrollo larvario, la mortalidad, el peso de larvas y adultos, la longitud, el color del exoesqueleto (como indicador indirecto del contenido de quitosano) y las tasas de malformación.

Los resultados mostraron que, en condiciones normales, *P. pentosaceus* no afectaba negativamente a ninguna variable y mejoraba ligeramente algunos atributos productivos. En presencia de patógenos, su efecto fue significativamente positivo: redujo la mortalidad, aceleró el desarrollo larvario y mejoró el peso y la longitud de los insectos. Además, en algunos tratamientos se observó un oscurecimiento del exoesqueleto, lo que podría indicar un aumento del contenido en quitosano, con implicaciones para aplicaciones biotecnológicas. La suplementación con *P. pentosaceus* se consolida así como una herramienta eficaz para mitigar el impacto negativo de los microorganismos patógenos en la cría de *T. molitor*, y para optimizar parámetros clave en la producción de este insecto, considerado una fuente sostenible de proteína.

Palabras clave

Gram negativo, gram positivo, hongo, entomopatógeno, probiótico

Introducción

El gusano de la harina amarillo, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), ha ganado una atención considerable en los últimos años como una fuente alternativa y sostenible de proteína para el consumo humano y animal (Ribeiro et al, 2018). Este insecto destaca por su capacidad eficiente de bioconversión de subproductos agrícolas en proteína de alta calidad, posicionándolo como un actor prometedor dentro de la economía circular y la seguridad alimentaria global (Van Huis, 2020).

La microbiota intestinal de *T. molitor* desempeña un papel crucial en su fisiología y desarrollo. Compuesta principalmente por Tenericutes, Proteobacteria y Firmicutes, esta comunidad microbiana es esencial para la digestión de nutrientes y la respuesta inmune del insecto (Garofalo et al, 2019). Sin embargo, la composición de esta microbiota es altamente sensible a los cambios en la dieta y a la exposición a microorganismos exógenos, lo que puede impactar significativamente la salud larval y la productividad (Wynants et al, 2018).

Estudios recientes han mostrado que la exposición a patógenos como *Staphylococcus aureus* puede afectar negativamente el desarrollo larval de *T. molitor*. Este patógeno oportunista, conocido por su capacidad de producir enterotoxinas, puede causar una reducción significativa en el crecimiento y la tasa de supervivencia larval (Jung et al, 2014). Por otro lado, ciertas cepas de *Enterobacter hormaechei* han demostrado propiedades probióticas, modulando positivamente la microbiota intestinal del insecto y mejorando la resistencia frente a patógenos (Grau et al, 2017).

El hongo *Fusarium spp.* presenta una interacción particularmente interesante con *T. molitor*. Este hongo fitopatógeno produce micotoxinas que pueden ser perjudiciales tanto para los insectos como para los consumidores finales. Sin embargo, también sintetiza compuestos que actúan como atrayentes alimenticios para las larvas de *T. molitor*, lo que plantea posibles riesgos de bioacumulación de metabolitos secundarios tóxicos en los insectos (Guo et al, 2021).

En este contexto, la suplementación con probióticos como *Pediococcus pentosaceus* surge como una estrategia prometedora para mejorar la salud intestinal y el rendimiento en *T. molitor*. Esta bacteria ácido-láctica ha demostrado capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos mediante la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas, además de estimular respuestas inmunes en diversos modelos animales (Kingcha et al, 2012). Un estudio reciente mostró que dietas enriquecidas con *P. pentosaceus* pueden incrementar significativamente la supervivencia larval en *T. molitor* bajo infección fúngica, lo que sugiere su potencial para contrarrestar la colonización microbiana indeseada (Grau et al, 2017).

La optimización de los sistemas de cría a gran escala de *T. molitor* requiere una comprensión profunda de estas interacciones microbianas. El manejo adecuado de la microbiota intestinal no solo puede mejorar los parámetros productivos, sino también garantizar la inocuidad alimentaria al reducir la presencia de microorganismos potencialmente patógenos o la acumulación de metabolitos tóxicos en insectos destinados al consumo (Mikolajczak et al, 2020).

Este estudio tiene como objetivo evaluar el impacto diferencial de *S. aureus*, *E. hormaechei* y *Fusarium spp.* sobre los parámetros productivos de *T. molitor* (color, longitud, tasa de

mortalidad y peso del individuo adulto; peso y mortalidad larval; y tiempo requerido para completar la metamorfosis), y analizar posteriormente la capacidad de *P. pentosaceus* para modular estas interacciones. Los hallazgos de este estudio proporcionarán una base científica sólida para el desarrollo de estrategias de manejo microbiológico dirigidas en la cría de *T. molitor*, con el objetivo de optimizar la producción y minimizar los riesgos sanitarios asociados a contaminantes biológicos en la cadena alimentaria.

Materiales y métodos

A continuación, se describen los pasos seguidos durante el presente informe para el aislamiento y estudio de los efectos de diferentes microorganismos sobre la cría y el desarrollo de *T. molitor*.

Recolección de diferentes colonias de *T. molitor*

Se recolectaron cinco poblaciones de larvas de *T. molitor* en cada una de las siguientes ubicaciones geográficas:

- España: Esparragal, 18, 47155 Santovenia de Pisuerga, Valladolid.
- Reino Unido: 60-61 Barnes High St, London SW13 9LF.
- China: Distrito de Xiacheng, Hangzhou, Zhejiang, China (310004).
- Corea del Sur: 6-1 Nangmin-ro, Nangmin-dong, Dongnae-gu, Busan.
- Egipto: Mohye El-Deen, Gobernación de Alejandría, Egipto.
- Alemania: Junkerstraße 17, 80689 Múnich.
- Silvestre: Santa Marta de Tormes, Salamanca, España (40.948839, -5.617438).

Las diferencias en las condiciones ambientales y las normativas de producción de cada país podrían influir en la microbiota intestinal, junto con el clima y otras condiciones ecológicas del lugar donde se obtuvieron las poblaciones. El objetivo fue estudiar las poblaciones de microorganismos hallados en su intestino, tanto patógenos como organismos beneficiosos para el análisis.

Extracción de intestinos e identificación de las bacterias más relevantes

Las larvas fueron sumergidas en isopropanol al 99,5% para su conservación durante un período de cuatro meses. Cada muestra fue etiquetada individualmente con lápiz y una pequeña etiqueta para asegurar una correcta identificación. Posteriormente, se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL hasta su procesamiento.

Después del período de conservación, los sistemas digestivos de las larvas fueron extraídos en condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Secado de larvas: Las larvas se colocaron en un horno a 35°C durante 2 minutos para eliminar el alcohol residual.
- Extracción del intestino: Cada larva fue colocada en una placa Petri de vidrio estéril y se realizó una incisión en la parte ventral del abdomen (segmentos 5–9) utilizando pinzas de disección estériles. El intestino fue extraído cuidadosamente y transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Se obtuvieron un total de 35 muestras, cada una etiquetada con el siguiente código: una letra mayúscula indicando el país de origen (C = China, K = Corea del Sur, R = Reino Unido, E = España, A = Alemania, G = Egipto, W = Silvestre) seguida de un número del 1 al 5 correspondiente al individuo.

Para la extracción de ADN se empleó un protocolo optimizado utilizando el kit de lisis para insectos de Promega, siguiendo estos pasos:

- Lisis celular: Se añadieron 100 µL de Insect Lysis Buffer y 20 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) a cada muestra.
- Incubación: Las muestras se incubaron a 56°C con agitación constante durante 6 horas.
- Centrifugación inicial: Se centrifugaron a 2.000 rpm durante 15 segundos para eliminar condensación.
- Unión del ADN: Se añadieron 100 µL de Binding Mix, se mezclaron por 15 segundos y se centrifugaron a 11.000 rpm durante 20 segundos.
- Filtración: El contenido se transfirió a un tubo de 2 mL con una columna de filtrado y se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos.
- Lavado del ADN: Se añadieron 200 µL de Protein Wash Buffer y se centrifugó a 11.000 rpm durante 2 minutos. Se realizó un segundo lavado con 600 µL del mismo buffer.
- Elución del ADN: Se añadieron 30 µL de agua bidestilada caliente (56°C) directamente sobre la membrana de la columna. Tras esperar un minuto, se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos.
- Almacenamiento: Se desecharon las columnas y los tubos con el ADN extraído fueron almacenados a -20°C hasta su análisis.

Aislamiento de las colonias de microorganismos utilizados

Las muestras de ADN fueron enviadas al Servicio de Metagenómica de LAIB para la identificación de comunidades bacterianas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Una vez obtenidos los resultados, se estudiaron las bacterias que aparecieron en cantidades considerables (por encima del 1%) y que podrían tener interés tanto negativo como positivo en la cría de *T. molitor*. Siguiendo estos criterios, se seleccionaron *Enterobacter hormaechei*, *Staphylococcus aureus* y *Pediococcus pentosaceus*. Se sembraron placas, y las colonias que aparecieron fueron maceradas, posteriormente secuenciadas y enviadas de nuevo al servicio anteriormente mencionado.

También se adquirió *Fusarium* spp. con el fin de contar con un hongo de efectos negativos. Esto completó un grupo de microorganismos que incluye bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y una bacteria con efectos potencialmente positivos (Kingcha et al, 2012; Qi et al, 2021; Escobar et al, 2019).

Las colonias aisladas se multiplicaron utilizando los siguientes medios específicos:

- *E. hormaechei*: agar con extracto de hígado
- *S. aureus*: agar con extracto de hígado
- *P. pentosaceus*: agar MRS
- *Fusarium* spp.: agar dextrosa de patata (PDA)

Las muestras de ADN fueron enviadas al Servicio de Metagenómica de LAIB para la identificación de comunidades bacterianas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Una vez obtenidos los resultados, se estudiaron las bacterias presentes en cantidades superiores al 1% y que pudieran tener relevancia positiva o negativa en la cría de *T. molitor*. Siguiendo estos criterios, se seleccionaron *E. hormaechei*, *S. aureus* y *P. pentosaceus*. Se sembraron placas y cualquier colonia que apareciera fue aislada, secuenciada y enviada nuevamente al servicio mencionado (Figura 1).

Fusarium spp. también fue adquirido para incorporar un hongo con efectos negativos. Esto completó un conjunto de microorganismos que incluye bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y una bacteria con posibles efectos beneficiosos (Kingcha et al, 2012; Qi et al, 2021; Escobar et al, 2019).

Las colonias aisladas se multiplicaron utilizando los medios líquidos correspondientes ya mencionados.

Cría de las poblaciones experimentales

Los huevos fueron recolectados de una población saludable originaria de Valladolid, España. Tras la eclosión, las larvas fueron colocadas en bandejas para su desarrollo y cría. Las bandejas tenían una superficie de 0.06 m² (20 × 30 cm) y se mantuvieron en una cámara de cría bajo las condiciones mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de cría de las bandejas con los respectivos tratamientos de *T. molitor*.

Temperatura (°C)	22 - 26
Humedad relativa (%)	40 - 60
Horas de luz al día	4
Tipo de sustrato	Salvado de trigo estéril
Alimento húmedo	Depende del tratamiento (siempre estéril)
Densidad (individuos por bandeja)	100

Las larvas seleccionadas para iniciar el tratamiento experimental destinado a comprobar los efectos de los microorganismos tenían un peso homogéneo comprendido entre 0,14 y 0,145 g.

Tratamientos experimentales

Se establecieron ocho tratamientos con el fin de evaluar los efectos de diferentes microorganismos sobre *T. molitor* y el posible efecto protector de *Pediococcus pentosaceus*:

- Control negativo: sin microorganismos.
- *P. pentosaceus* (without pathogenic organisms).
- *S. aureus*.
- *S. aureus* + *P. pentosaceus*.
- *E. hormaechei*.
- *E. hormaechei* + *P. pentosaceus*.
- *Fusarium spp.*
- *Fusarium spp.* + *P. pentosaceus*.

Tabla 2: codificación utilizada para trabajar con los distintos tratamientos de *T. molitor*.

	Cont rol	<i>P.</i> <i>pentosa</i> <i>ceus</i>	<i>S.</i> <i>aure</i> <i>us</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i> + <i>P.</i> <i>pentosa</i> <i>ceus</i>	<i>E.</i> <i>horma</i> <i>echei</i>	<i>E.</i> <i>horma</i> <i>echei</i> + <i>P.</i> <i>pentosa</i> <i>ceus</i>	<i>Fusari</i> <i>um</i> <i>spp</i>	<i>Fusariu</i> <i>m spp.</i> + <i>P.</i> <i>pentosa</i> <i>ceus</i>
Inyecc ión (I)	I (C)	I (Pp)	I (Sa)	I (Sa + Pp)	I (Eh)	I (Eh + Pp)	I (F)	I (F + Pp)
Seco (D)	D (C)	D (Pp)	D (Sa)	D (Sa + Pp)	D (Eh)	D (Eh + Pp)	D (F)	D (F + Pp)
Húme do (H)	H (C)	H (Pp)	H (Sa)	H (Sa + Pp)	H (Eh)	H (Eh + Pp)	H (F)	H (F + Pp)

Cada tratamiento se aplicó mediante tres técnicas diferentes: inyección directa, incorporación al pienso seco e incorporación al pienso húmedo (Tabla 2). En total, se generaron 72 combinaciones experimentales:

8 tratamientos × 3 repeticiones × 3 métodos de inoculación = 72 combinaciones.

Se utilizó un total de 720 individuos experimentales. La concentración de todos los microorganismos (tanto patógenos como probióticos) fue de 10^7 UFC/mL. Los métodos de inoculación utilizados fueron:

- Inyección directa: Se inyectaron 0,2 mL del microorganismo por larva. Una semana después, se añadió *P. pentosaceus* (en su caso) al pienso seco, y se repitió la aplicación del probiótico dos semanas después de la primera dosis. Al grupo de control se le inyectó agua estéril.
- Aplicación en pienso seco: Se mezclaron 2,5 mL de medio de cultivo que contenía el microorganismo correspondiente con 750 µL de agua estéril y 20 g de salvado de trigo estéril. El patógeno se aplicó el primer día, con una dosis de refuerzo el día 4. La primera dosis del probiótico se administró una semana después, y la segunda dosis se aplicó dos semanas después de la primera.
- Aplicación en pienso húmedo: Se inocularon doce colonias del microorganismo en cubos de patata irradiados (dos colonias en cada cara del cubo). El programa de aplicación fue idéntico al utilizado para el pienso seco (Tabla 3).

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Tabla 3: manipulación y características de cada una de las combinaciones estudiadas de *T. molitor*.

Método de inoculación	Tratamiento	Nº larvas	Patógeno inoculado	Día aplicación	Probiótico inoculado	Día aplicación
Inyección	Control	10	Agua 1	1	Agua 2 Agua 3	7 14
	<i>P. pentosaceus</i>	10	Agua 1	1	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>S. aureus</i>	10	Patógeno 1	1	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>S. aureus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	10	Patógeno 1	1	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>E. hormaechei</i>	10	Patógeno 1	1	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>E. hormaechei</i> + <i>P. pentosaceus</i>	10	Patógeno 1	1	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>F. spp.</i>	10	Patógeno 1	1	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>F. spp.</i> + <i>P. pentosaceus</i>	10	Patógeno 1	1	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
Alimento seco o húmedo	Control	20	Agua 1 Agua 2	1 4	Agua 3 Agua 4	7 14
	<i>P. pentosaceus</i>	20	Agua 1 Agua 2	1 4	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>S. aureus</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>S. aureus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>E. hormaechei</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>E. hormaechei</i> + <i>P. pentosaceus</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14
	<i>F. spp.</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Agua 1 Agua 2	7 14
	<i>F. spp.</i> + <i>P. pentosaceus</i>	20	Patógeno 1 Patógeno 2	1 4	Probiótico 1 Probiótico 2	7 14

Monitoreo del experimento

Cada semana (lunes y jueves) se registraron los siguientes parámetros:

- Mortalidad.
- Número de individuos que cambiaron de estadio de desarrollo (pupa o adulto).

- Peso larval promedio en el momento de aparición de la primera pupa en cada grupo.

Al finalizar el experimento (una vez que todas las larvas alcanzaron la etapa adulta), se tomaron las siguientes mediciones:

- Peso del adulto (utilizando una balanza de precisión Accuris™, 0.001 g).
- Longitud desde el abdomen hasta la cabeza (medida con un calibrador digital).
- Color de los élitros (escala RGB, capturado con un estereomicroscopio STEMI-200-C y analizado en Photoshop mediante la herramienta cuentagotas sobre un radio de 25 píxeles centrado en el centroid del élitro).
- Tasa de malformaciones (% de individuos con deformidades en los élitros).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Microsoft Excel y SPSS. Las etapas del análisis incluyeron:

- Descriptivo: media, error estándar, mediana, moda, desviación estándar, varianza, curtosis, asimetría, rango, mínimo y máximo para cada variable.
- Inferencial: debido a la no normalidad de los datos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó la prueba post hoc de Dunn.
- Representación gráfica: diagramas de caja (boxplots) y gráficos de líneas.
- Análisis global: comparación mediante gráfico de barras entre el tratamiento problema (con patógeno) y el mismo tratamiento con la aplicación posterior de *P. pentosaceus*.

Control de calidad

Las mediciones se repitieron en un subconjunto aleatorio de especímenes para validar su reproducibilidad. Los valores atípicos fueron descartados mediante validación cruzada.

Consideraciones éticas

El estudio cumplió con las normativas éticas nacionales e internacionales sobre el uso de insectos en la investigación científica. Todos los procedimientos fueron diseñados para minimizar el estrés y el daño a los organismos.

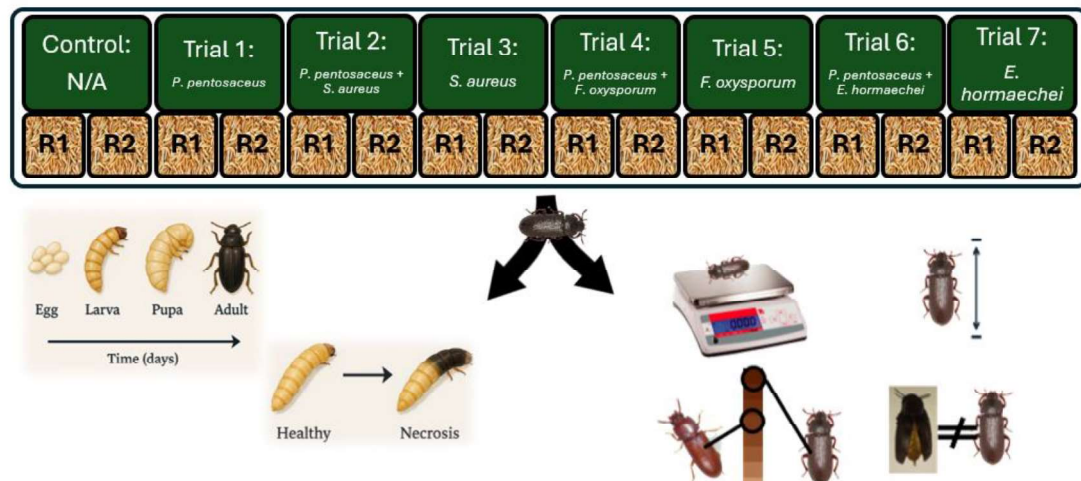


Figura 1: proceso de cría de cada uno de los ensayos de *T. molitor* y efectos de los microorganismos objeto de estudio.

Resultados

Los resultados se han organizado en tres secciones: a) Análisis descriptivo, tanto de los individuos adultos como a lo largo de la duración del experimento; b) Análisis inferencial, evaluando si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las variables estudiadas; y c) Comparación global.

Análisis descriptivo

Dependiendo de las variables analizadas y del momento de la recolección de los datos, se obtuvieron distintos resultados.

Los datos sobre mortalidad y número de días necesarios para alcanzar el estadio de pupa se recopilaron únicamente para el método de inyección, ya que esta técnica resulta altamente agresiva para los insectos, y la mayoría de los individuos murió durante las dos primeras semanas.

Análisis temporal de la tasa de mortalidad y del tiempo requerido para completar la metamorfosis

El análisis del porcentaje de individuos que alcanzaron el estadio de pupa reveló diferencias significativas según la técnica de inoculación y el tratamiento aplicado. El método de inyección demostró ser el más perjudicial para el desarrollo de *T. molitor*, ya que todos los tratamientos con patógenos —ya fueran bacterianos, fúngicos o combinados con el probiótico *P. pentosaceus*— resultaron en una inhibición completa de la pupación (0%) a lo largo del experimento, debido a la alta mortalidad temprana. Solo el tratamiento con *P. pentosaceus* por sí solo mostró una tasa de pupación muy limitada (6.67%), ligeramente superior al grupo control (3.33%), lo que sugiere que esta vía de inoculación puede inducir un estrés considerable o una mortalidad elevada en etapas tempranas.

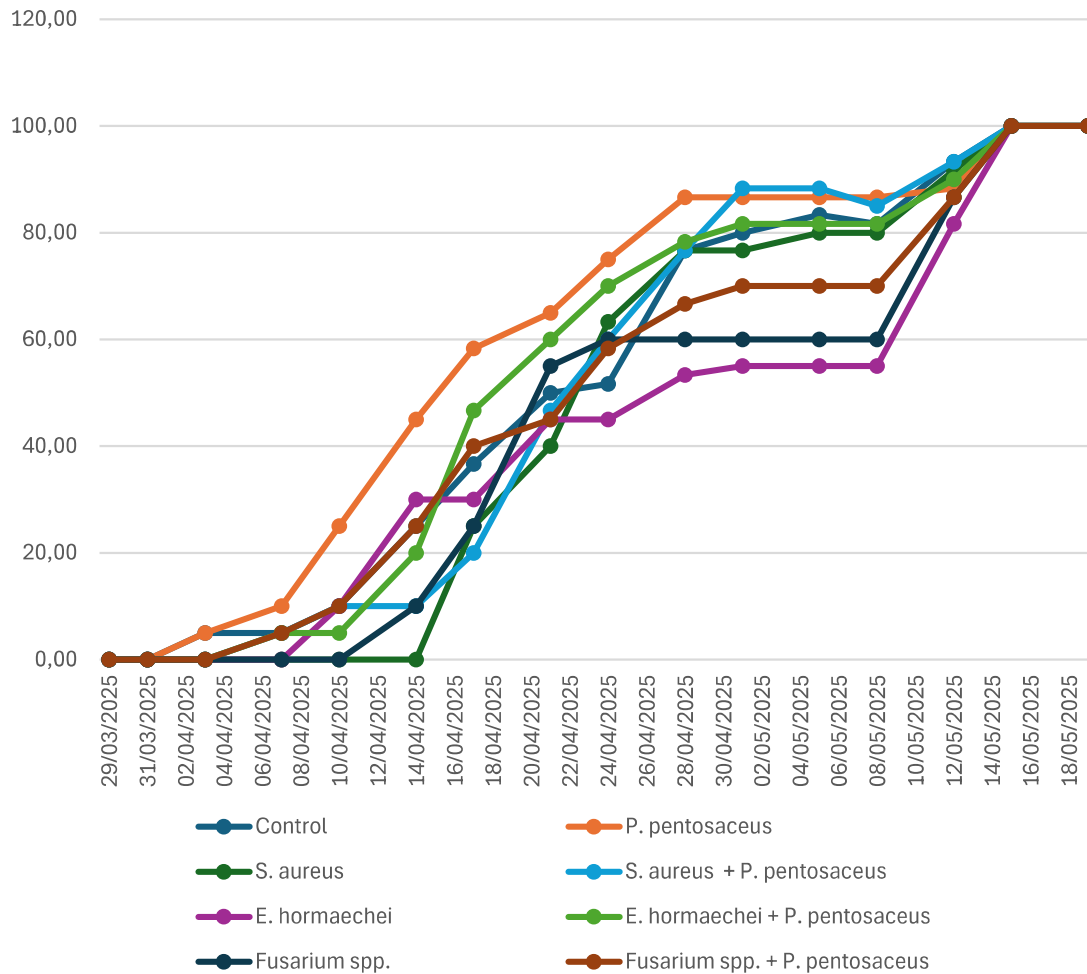


Figura 2: diagrama de líneas que muestra la evolución de las larvas *T. molitor* que alcanzaron el estadio de pupa a lo largo del tratamiento con dieta líquida.

En contraste, la técnica de alimento húmedo favoreció una pupación más rápida y completa, alcanzando el 100% de pupación hacia el final del periodo en los grupos control y *P. pentosaceus* (Figura 2). Los tratamientos con patógenos redujeron la velocidad de metamorfosis, pero el uso combinado con el probiótico mitigó parcialmente este efecto, acelerando la pupación en varios casos, particularmente con *S. aureus* y *E. hormaechei*. De forma similar, en la técnica de alimento seco se observó una progresión más lenta comparada con el alimento húmedo, pero con una tendencia final también hacia el 100% de pupación (Figura 3). En este caso, *P. pentosaceus* también mostró efectos beneficiosos al mejorar las tasas y tiempos de pupación frente a los tratamientos con patógenos. En general, el probiótico demostró ser un modulador positivo del desarrollo larval, especialmente cuando se administró junto con patógenos por vía alimentaria, mientras que la inyección resultó ser la vía más dañina para lograr una metamorfosis completa del insecto.

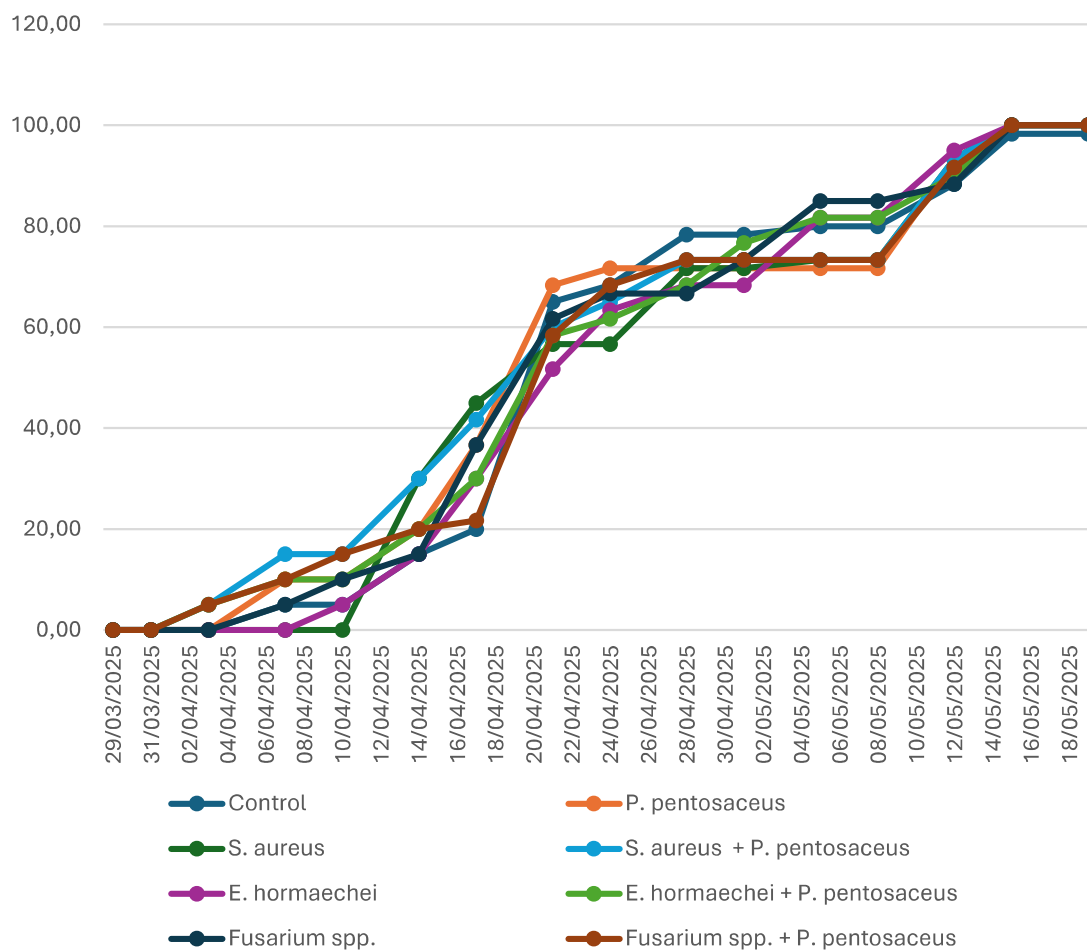


Figura 3: diagrama de líneas que muestra la evolución de las larvas *T. molitor* que alcanzaron el estadio de pupa a lo largo del tratamiento con dieta seca.

En cuanto a la mortalidad, los resultados muestran que la técnica de inyección genera una mortalidad significativamente más alta y rápida en comparación con las aplicaciones por alimento húmedo o seco (Figura 4). En todos los tratamientos por inyección, la mortalidad alcanzó el 100% en un periodo relativamente corto (alrededor del 21/04/2025), independientemente de si *P. pentosaceus* se aplicó solo o en combinación con patógenos. Los tratamientos con patógenos solos (como *S. aureus*, *E. hormaechei* y *Fusarium spp.*) mostraron una mortalidad acelerada, y el uso de *P. pentosaceus* no mitigó claramente esta progresión mediante esta vía.

Por otro lado, en la técnica de alimento húmedo, los niveles de mortalidad fueron considerablemente más bajos y progresivos, con diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos con *P. pentosaceus* solos mantuvieron una mortalidad cercana a cero durante la mayor parte del experimento. Cuando se aplicó en combinación con los patógenos, se observó un impacto reducido, especialmente contra *S. aureus* y *E. hormaechei*, lo que sugiere un posible efecto protector del probiótico, aunque no completamente inhibitorio. En el caso del hongo, la mortalidad fue más alta, pero también moderadamente atenuada por la presencia del probiótico.

En la técnica de alimento seco se observó una tendencia intermedia. La mortalidad fue mayor que con alimento húmedo pero menor que por inyección. *P. pentosaceus* por sí solo generó poca mortalidad, pero en combinación con patógenos —especialmente con *S.*

aureus y *Fusarium spp.*— se notó una disminución de la tasa de mortalidad en comparación con los patógenos aplicados sin el probiótico. Destaca el efecto protector más claro frente a *E. hormaechei*, donde la combinación con *P. pentosaceus* logró una marcada reducción en la mortalidad en comparación con el tratamiento con el patógeno solo.

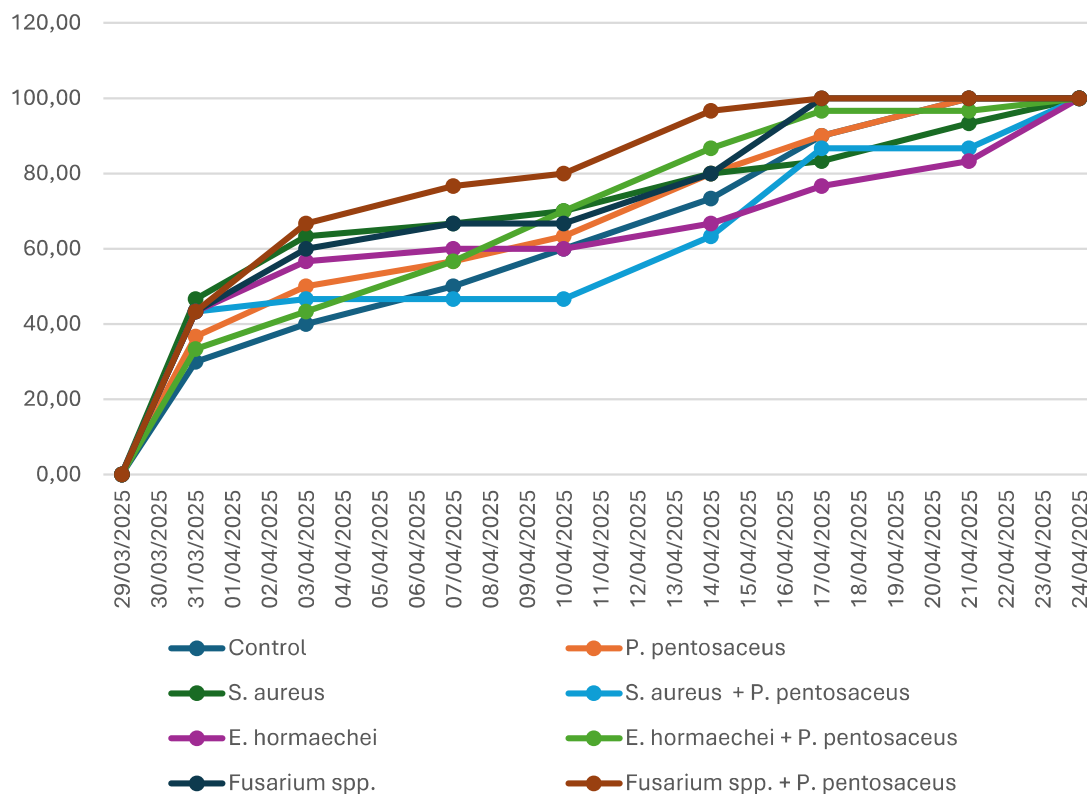


Figura 4: diagrama de líneas que muestra la mortalidad acumulada de las larvas de *T. molitor* en el tratamiento por inyección directa.

Análisis del peso larval antes de la metamorfosis

Respecto al peso larval, se observaron diferencias sutiles pero significativas entre los tratamientos. Los valores medios oscilaron entre 0.13 g (L(Eh)) y 0.18 g (D(Pp)), siendo los tratamientos que incluyeron *P. pentosaceus* en la dieta (D(Pp): 0.18 g y D(F+Pp): 0.17 g) los que mostraron valores ligeramente superiores a los tratamientos líquidos, especialmente en comparación con el patógeno *E. hormaechei*. Esto sugiere un posible efecto positivo del probiótico en la ganancia de peso larval, particularmente cuando se administra a través de la dieta.

Los tratamientos líquidos que involucraron patógenos (Eh, F) o sus combinaciones (L(Eh+Pp), L(F+Pp)) mostraron pesos promedio más bajos (0.13–0.16 g), lo que podría indicar una ligera inhibición del crecimiento larval en respuesta a estos microorganismos, especialmente cuando *E. hormaechei* se aplica sin probióticos. Sin embargo, en algunos casos —como L(Sa+Pp) y L(F+Pp)— los pesos medios se mantuvieron comparables al control (L(C): 0.16 g), lo que sugiere que los efectos negativos de los patógenos pueden ser parcialmente mitigados por la inclusión del probiótico.

La desviación estándar fue baja en todos los grupos (0.02–0.03 g), lo que indica consistencia en la distribución del peso. Los valores de curtosis revelaron distribuciones

más planas que lo normal (valores negativos) en la mayoría de los tratamientos, excepto en L(C) (1.67) y D(Sa+Pp) (0.95), donde se observó una mayor concentración de valores alrededor de la media. La asimetría fue generalmente cercana a cero, aunque algunos tratamientos —como L(C) (0.96) y L(Eh) (0.54)— mostraron una asimetría positiva, posiblemente indicando una mayor proporción de larvas con pesos superiores a la media en esos casos.

Los rangos de peso fueron más amplios en los tratamientos D(Eh) (0.14 g) y D(Sa) (0.13 g), lo que podría reflejar variabilidad individual en la respuesta a estos tratamientos. Los valores mínimos y máximos no siguieron una tendencia clara, pero los tratamientos con pesos promedio más altos también tendieron a mostrar rangos más amplios, lo cual es esperable.

En resumen, los resultados sugieren que la administración dietética de *P. pentosaceus* puede favorecer la ganancia de peso larval, incluso en presencia de patógenos. En cambio, *E. hormaechei* en tratamientos líquidos parece tener un efecto más restrictivo sobre el crecimiento larval (Figura 5).

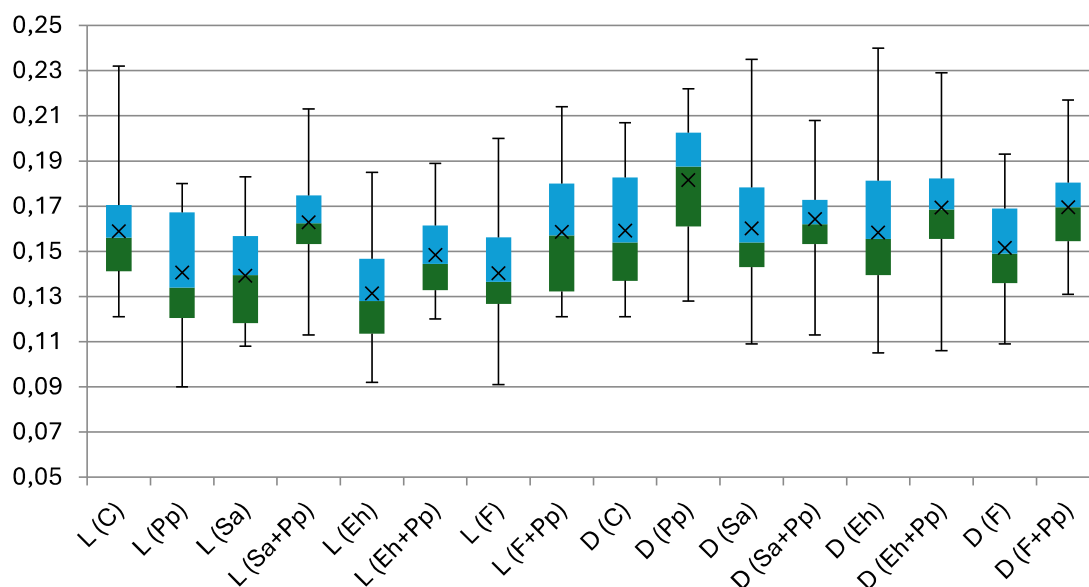


Figura 5: gráfico tipo BoxPlot para la variable de peso larval de *T. molitor* en cada uno de los tratamientos, en el que aparecen los valores atípicos.

Análisis del peso, coloración, longitud y tasa de malformaciones en adultos

Respecto a la variable de coloración en adultos de *T. molitor*, se observaron diferencias notables entre tratamientos, tanto según el microorganismo aplicado como el método de administración (alimento seco o líquido). El grupo control (L(C): 21.53; D(C): 20.64) mostró valores intermedios, mientras que el tratamiento con *P. pentosaceus* solo resultó en una marcada reducción en los valores de color (L(Pp): 13.69; D(Pp): 14.14), lo que indica un efecto de oscurecimiento del probiótico sobre la pigmentación del adulto.

En contraste, la inoculación con *S. aureus* produjo los valores más altos (L(Sa): 24.82; D(Sa): 23.90), lo que indica un efecto de aclaramiento relativo. Este efecto se redujo al

combinarse con *P. pentosaceus* (L(Sa+Pp): 20.86; D(Sa+Pp): 21.53), lo que sugiere un rol modulador del probiótico frente a este patógeno.

En el caso de *E. hormaechei* y *Fusarium spp.*, los tratamientos combinados con el probiótico no mostraron mejoras claras respecto al patógeno solo (por ejemplo, L(Eh): 19.17 vs. L(Eh+Pp): 18.48; L(F): 22.19 vs. L(F+Pp): 20.11).

La variabilidad fue mayor en los tratamientos con patógenos, con desviaciones estándar altas (hasta 7.64 en D(Sa+Pp)), lo que refleja respuestas heterogéneas en la pigmentación. Asimismo, se identificaron curtosis negativas y asimetrías de leves a moderadas en varios tratamientos, indicando distribuciones con colas extendidas o asimetrías, especialmente en los grupos combinados (Figura 6).

En general, los resultados sugieren que *P. pentosaceus* ejerce un efecto de oscurecimiento en la coloración adulta, especialmente en presencia de *S. aureus*, con efectos menos consistentes cuando se combina con *E. hormaechei* o *Fusarium spp.*, independientemente de si se administró con alimento seco o líquido.

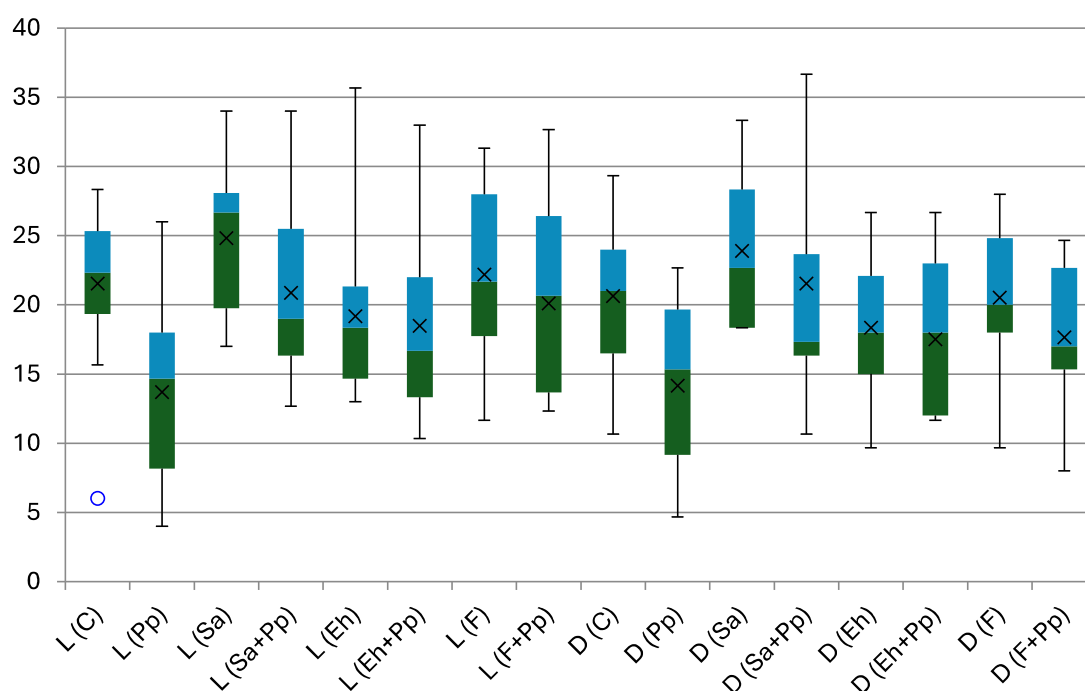


Figura 6: gráfico tipo BoxPlot para la variable de color en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*, en el que aparecen los valores atípicos.

El análisis del peso en adultos de *T. molitor* reveló ligeras variaciones entre tratamientos, con valores globales bastante homogéneos, aunque ciertas tendencias fueron atribuibles al tipo de microorganismo y a la vía de administración. El peso medio osciló entre 0.09 g y 0.13 g, observándose valores más altos en los grupos tratados con *P. pentosaceus*, particularmente cuando se administró con alimento seco (D(Pp): 0.13) y en combinación con patógenos como *Fusarium spp.* (D(F+Pp): 0.12). Los tratamientos con *Fusarium spp.* solo, ya fuera por vía seca o líquida, mostraron valores ligeramente más bajos (L(F): 0.10; D(F): 0.11), lo que sugiere un impacto leve pero negativo del hongo sobre el desarrollo del peso.

Por otro lado, el tratamiento combinado de *S. aureus* y *P. pentosaceus* mostró uno de los pesos promedio más altos (L(Sa+Pp): 0.12; D(Sa+Pp): 0.12), incluso superando a los grupos tratados solo con el patógeno (L(Sa): 0.10; D(Sa): 0.11), lo que indica un posible efecto compensatorio del probiótico frente a la reducción de peso inducida por *S. aureus*.

En cuanto a la variabilidad, las desviaciones estándar fueron muy bajas en todos los tratamientos (entre 0.01 y 0.02 g), lo que refleja una alta homogeneidad dentro de cada grupo. Los coeficientes de asimetría fueron en su mayoría cercanos a cero, indicando distribuciones aproximadamente simétricas, aunque algunos tratamientos, como L(F+Pp) (1.10) y L(Sa+Pp) (0.91), mostraron una asimetría positiva moderada. De forma similar, la curtosis fue generalmente negativa, lo que indica distribuciones más planas comparadas con una curva normal, excepto en el tratamiento L(Sa+Pp) (1.39), que mostró una distribución más acentuada. El rango de peso fue similar en todos los tratamientos (entre 0.04 g y 0.08 g), lo que confirma que las diferencias individuales de peso fueron mínimas (Figura 7).

En conjunto, estos resultados sugieren que *P. pentosaceus*, especialmente cuando se administra junto con patógenos como *S. aureus* o *Fusarium spp.*, puede contribuir a una ligera mejora en el peso final del adulto, mientras que el efecto negativo de los patógenos no fue lo suficientemente pronunciado como para causar reducciones significativas en la masa corporal dentro del contexto experimental.

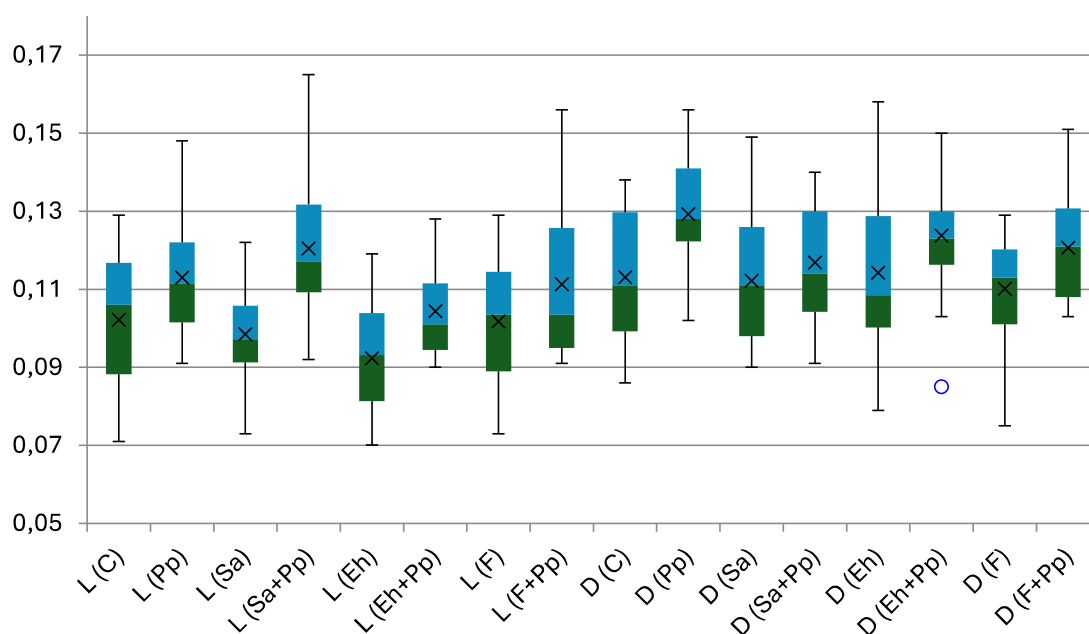


Figura 7: gráfico tipo BoxPlot para la variable de peso en cada uno de los tratamientos con *T. molitor*, en el que aparecen los valores atípicos.

En cuanto a la longitud corporal de los adultos de *T. molitor*, los resultados reflejan una respuesta diferenciada a los tratamientos microbianos y sus combinaciones. La longitud corporal media general varió entre 1.33 cm y 1.53 cm, registrándose los valores más altos en los tratamientos con *S. aureus* + *P. pentosaceus* (L(Sa+Pp): 1.53 cm), *Fusarium spp.* (L(F): 1.52 cm) y el grupo control (L(C): 1.52 cm). Esto sugiere que ni los probióticos ni los patógenos aplicados bajo estas condiciones redujeron significativamente el crecimiento lineal.

En contraste, los valores más bajos se observaron en el tratamiento con *E. hormaechei* (L(Eh): 1.33 cm) y su combinación con *P. pentosaceus* (L(Eh+Pp): 1.42 cm), lo cual indica una posible inhibición del crecimiento corporal asociada a este patógeno.

Las desviaciones estándar se mantuvieron bajas (0.05 a 0.15 cm), indicando baja variabilidad en la mayoría de los grupos, especialmente en los tratamientos líquidos con *S. aureus* (L(Sa+Pp): 0.06 cm) y *E. hormaechei* (L(Eh): 0.05 cm). La curtosis fue predominantemente negativa o cercana a cero, sugiriendo distribuciones mesocúrticas o platicúrticas, excepto en tratamientos como D(F+Pp) (5.54) y D(F) (1.45), que mostraron distribuciones más picudas (Figura 8).

Los coeficientes de asimetría revelaron ligeros sesgos en distintas direcciones: tratamientos como D(F) (1.10) y D(F+Pp) (-1.33) mostraron asimetrías notables, lo cual podría reflejar efectos variables sobre ciertos individuos dentro de esos grupos.

El rango de longitudes varió de 0.18 cm (L(Eh)) a 0.54 cm (D(Pp)), mientras que los valores mínimos y máximos fueron consistentes con la tendencia general: las longitudes más altas ocurrieron en tratamientos sin patógenos o con la combinación Sa+Pp, y las más bajas en presencia de *E. hormaechei* o su combinación con probióticos. Este patrón sugiere que la exposición a ciertos microorganismos patógenos—particularmente *E. hormaechei*—puede reducir la longitud corporal de los escarabajos adultos, mientras que *P. pentosaceus*, solo o en combinación, no parece tener un efecto negativo e incluso podría estar asociado a mejoras leves en algunos casos.

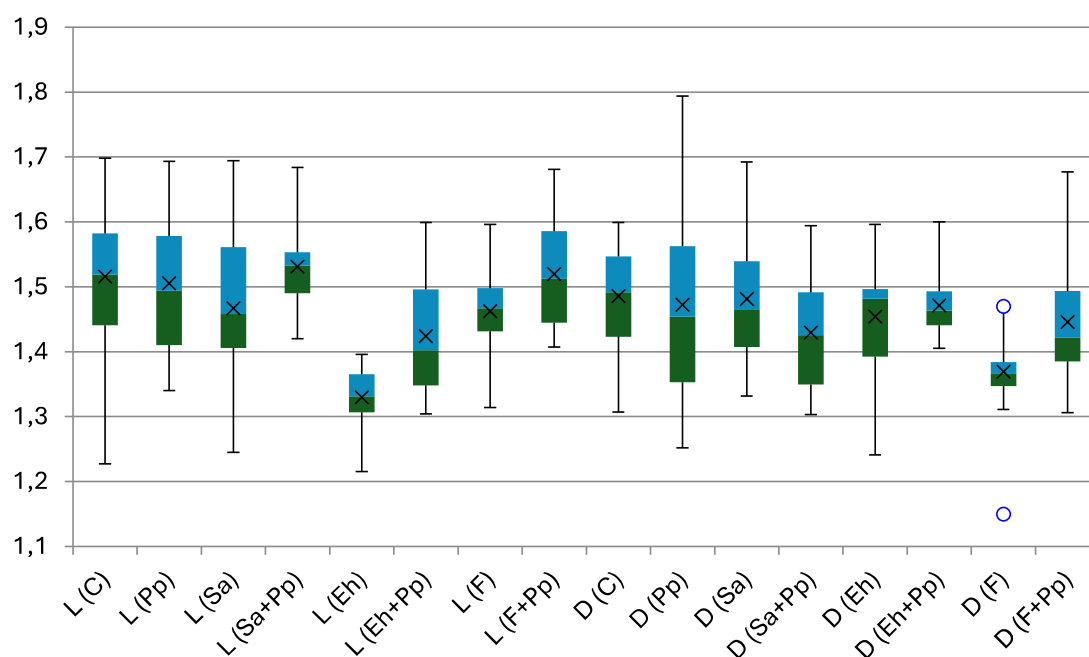


Figura 8: Gráfico BoxPlot para la variable longitud en cada uno de los tratamientos con *T. molitor* en los que aparecen valores atípicos.

Las tasas de malformación en las larvas de *T. molitor* se mantuvieron muy bajas en todos los tratamientos ($\leq 0.13\%$), lo que indica una buena calidad morfológica general durante el desarrollo.

Sin embargo, se observaron ligeros aumentos en la incidencia de malformaciones en los tratamientos con el patógeno *E. hormaechei* (L(Eh): 0.12%, L(Eh+Pp): 0.08%, D(Eh): 0.12%,

D(Eh+Pp): 0.10%) y con el hongo *Fusarium spp.* (L(F): 0.12%, L(F+Pp): 0.13%, D(F): 0.08%, D(F+Pp): 0.13%). Esto sugiere que estos agentes pueden inducir cierto estrés fisiológico o daño estructural, aunque la magnitud del efecto es limitada.

En contraste, los tratamientos líquidos y dietéticos con *P. pentosaceus* como único suplemento (L(Pp) y D(Pp)) mostraron niveles más bajos de malformación (0.05% y 0.07%, respectivamente), comparables al grupo control, lo que podría indicar un posible efecto protector del probiótico.

En general, aunque la malformación no parece ser un problema crítico bajo estas condiciones, los datos apuntan a una leve influencia negativa de los patógenos—especialmente *E. hormaechei* y *Fusarium spp.*—que podría ser parcialmente mitigada mediante la inclusión del probiótico.

Análisis inferencial

Tras analizar los valores obtenidos para las variables medidas en cada tratamiento mediante las diferentes técnicas de inoculación, se descartó el método de inyección debido al elevado tiempo que requería para llevar a cabo el estudio, así como a la alta tasa de mortalidad que provocaba, incluso cuando se usaba el probiótico.

La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro–Wilk, seleccionado porque el tamaño de muestra era inferior a 30 individuos (se seleccionaron 30 de los 60 utilizados en los tratamientos secos y húmedos para excluir individuos muertos o malformados). Dado que no se cumplió el supuesto de normalidad para algunos datos, se reemplazó el análisis de varianza (ANOVA) por la prueba Kruskal–Wallis para determinar si las diferencias en las medianas eran estadísticamente significativas con $P < 0.05$ ($\alpha = 0.05$).

Tabla 4: número de diferencias significativas entre un tratamiento y los demás para las variables estudiadas de *T. molitor*.

Tratamiento	% diferencias significativas
L (C)	34,2
L (Pp)	28,3
L (Sa)	31,7
L (Sa+Pp)	25,0
L (Eh)	39,2
L (Eh+Pp)	25,0
L (F)	28,3
L (F+Pp)	22,5
D (C)	30,8
D (Pp)	22,5
D (Sa)	20,0
D (Sa+Pp)	19,2
D (Eh)	24,2
D (Eh+Pp)	25,0
D (F)	25,8
D (F+Pp)	20,8

Todas las variables mostraron diferencias significativas, aunque no en todos los tratamientos. La tabla 4 muestra los tratamientos con mayor número de diferencias significativas frente a los demás.

El tratamiento con *E. hormaechei* en aplicación líquida y los grupos control mostraron la mayor cantidad de diferencias significativas—positivas o negativas—respecto a los demás tratamientos. En cambio, la aplicación seca de *S. aureus*, *S. aureus* + *P. pentosaceus* y *Fusarium spp.* + *P. pentosaceus* mostró las diferencias más reducidas.

Comparación global

Se calcularon las diferencias para todas las variables, diferenciando entre variables medidas durante la duración del experimento (tasa de mortalidad y tasa de pupación por día) y variables medidas al final del experimento (Tabla 5).

Tabla 5: tratamientos comparados con sus tratamientos relacionados respectivos de *T. molitor*.

Tratamiento 1		Tratamiento 2
<i>P. pentosaceus</i>	-	Control
<i>S. aureus</i>	-	Control
<i>S. aureus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	-	<i>S. aureus</i>
<i>E. hormaechei</i>	-	Control
<i>E. hormaechei</i> + <i>P. pentosaceus</i>	-	<i>E. hormaechei</i>
<i>F. spp.</i>	-	Control
<i>F. spp.</i> + <i>P. pentosaceus</i>	-	<i>F. spp.</i>

Variables medidas durante el transcurso del experimento

Estas variables son la tasa de mortalidad diaria, registrada dos veces por semana, y el tiempo hasta la pupación, medido como porcentaje del número total de individuos que alcanzaron la etapa de pupa, también registrado dos veces por semana (Tabla 6).

Tabla 6: momentos en los que cambian la tasa de mortalidad y el tiempo hasta la pupación entre diferentes tratamientos de *T. molitor*.

Nº veces que incrementa o se reduce cada variable entre tratamientos		
Comparación	Velocidad metamorfosis	Mortalidad
L (Pp) - L (C)	0,550	1,050
L (Sa) - L (C)	-0,700	0,000
L (Sa+Pp) - L (Sa)	0,550	0,283
L (Eh) - L (C)	-1,483	-0,967
L (Eh+Pp) - L (Eh)	1,283	-0,017
L (F) - L (C)	-1,375	-2,800
L (F+Pp) - L (F)	0,808	2,333
D (Pp) - D (C)	0,117	0,050
D (Sa) - D (C)	-0,050	-1,183
D (Sa+Pp) - D (Sa)	0,233	1,450
D (Eh) - D (C)	-0,583	-2,983
D (Eh+Pp) - D (Eh)	0,633	4,000
D (F) - D (C)	-0,033	-0,617
D (F+Pp) - D (F)	-0,200	-0,417

Los datos del tratamiento por inyección fueron excluidos, ya que la mortalidad se concentró durante las tres primeras semanas debido a la agresividad del procedimiento. Prácticamente ningún individuo alcanzó la etapa de pupa, con solo una excepción observada en el grupo tratado con *P. pentosaceus*.

En el análisis comparativo de los tratamientos líquidos (L) y secos (D), se evaluaron las diferencias relativas en la velocidad de culminación de la metamorfosis y la tasa de mortalidad, utilizando el tratamiento control (C) como referencia y considerando los efectos individuales y combinados de los patógenos y el probiótico (Pp).

Con respecto a la tasa de llegada a la etapa de pupa, el tratamiento líquido con Pp solo aumentó la velocidad de desarrollo en comparación con el control (+0.550 veces), mientras que la inclusión de Sa o F causó una marcada desaceleración (−0.700 y −1.375 veces, respectivamente). Sin embargo, cuando Sa o F se combinaron con el probiótico, se observó una notable recuperación en la tasa de desarrollo (+0.550 y +0.808 veces, respectivamente), lo que sugiere un efecto compensatorio del probiótico frente al retraso inducido por los patógenos. El tratamiento con Eh fue el más lento (−1.483 veces vs. control), aunque su combinación con Pp mejoró significativamente el parámetro (+1.283 veces).

En los tratamientos secos, los efectos fueron más moderados: Pp, Sa y F por separado produjeron cambios mínimos en la velocidad (valores cercanos a cero). Aun así, cuando se combinaron con el probiótico, se observó una ligera aceleración con Sa (+0.233) y Eh (+0.633), mientras que F resultó en una leve desaceleración (−0.200). Esto sugiere que el impacto del probiótico en la velocidad de desarrollo depende tanto del tipo de patógeno como de la formulación del tratamiento.

En cuanto a la mortalidad, los tratamientos líquidos mostraron tendencias más variables. El probiótico solo aumentó la mortalidad (+1.050 veces), y su combinación con patógenos como Sa y F también condujo a un aumento en la mortalidad (aunque moderado), especialmente cuando se combinó con F (+2.333), revirtiendo el efecto protector observado con F solo (−2.800). En contraste, Eh solo redujo significativamente la mortalidad (−0.967), y el probiótico tuvo un efecto casi nulo cuando se combinó (−0.017).

En los tratamientos secos, los resultados generales fueron similares, aunque con efectos más pronunciados en algunos casos. Sa y Eh individualmente redujeron considerablemente la mortalidad (−1.183 y −2.983, respectivamente), pero estas mejoras se perdieron —o incluso se revirtieron— cuando se combinaron con Pp, especialmente en el caso de Eh (+4.000), lo que sugiere una posible interacción negativa entre el probiótico y algunos patógenos en formulación seca. Sin embargo, en el caso de F, la inclusión del probiótico en forma seca aún logró una ligera reducción adicional en la mortalidad (−0.417), manteniendo parte del efecto beneficioso observado con F solo.

En resumen, estos resultados sugieren que el probiótico puede tener efectos beneficiosos en la velocidad de desarrollo, particularmente contrarrestando los retrasos causados por ciertos patógenos. Sin embargo, su influencia sobre la mortalidad es compleja y parece depender críticamente del tipo de patógeno involucrado y de la formulación del tratamiento.

Variables medidas al final del experimento

Estas son el peso, la longitud, la tasa de malformaciones y el color registrados entre tratamientos (Tabla 7).

Tabla 7: momentos en que se modifican la tasa de malformación, coloración, longitud, peso adulto y larval para los tratamientos con dieta seca y húmeda de *T. molitor*.

Comparación	L (Pp) - L (C)	L (Sa) - L (C)	L (Sa+Pp) - L (Sa)	L (Eh) - L (C)	L (Eh+Pp) - L (Eh)	L (F) - L (C)	L (F+Pp) - L (F)
Media color	-7,844	3,289	-3,967	-2,367	-0,689	0,656	-2,078
Media peso larvas	-0,018	-0,020	0,024	-0,027	0,017	-0,019	0,018
Media peso adultos	0,011	-0,004	0,022	-0,010	0,012	0,000	0,010
Media longitud	-0,010	-0,049	0,064	-0,186	0,095	-0,053	0,057
Ratio malformación	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000

Comparación	D (Pp) - D (C)	D (Sa) - D (C)	D (Sa+Pp) - D (Sa)	D (Eh) - D (C)	D (Eh+Pp) - D (Eh)	D (F) - D (C)	D (F+Pp) - D (F)
Media color	-6,500	3,256	-2,367	-2,311	-0,833	-0,133	-2,867
Media peso larvas	0,022	0,001	0,004	-0,001	0,011	-0,008	0,018
Media peso adultos	0,016	-0,001	0,005	0,001	0,009	-0,003	0,011
Media longitud	-0,013	-0,004	-0,052	-0,031	0,017	-0,116	0,076
Ratio malformación	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001

Además de la velocidad de desarrollo y las tasas de mortalidad, se evaluaron otras variables morfológicas y fisiológicas en respuesta a los distintos tratamientos.

Respecto a la coloración del exoesqueleto, la mayoría de los tratamientos con probióticos y patógenos provocaron un oscurecimiento en comparación con el control, tanto en formulaciones líquidas como secas. Este efecto fue especialmente pronunciado con el probiótico solo en tratamientos líquidos (-7.844) y secos (-6.500). En contraste, Sa causó un ligero aclaramiento del exoesqueleto (+3.289 en líquido y +3.256 en seco), el cual se redujo o revirtió al agregar el probiótico. En el tratamiento combinado con Eh, el oscurecimiento fue evidente (-2.367 en líquido, -2.311 en seco), pero la inclusión del probiótico redujo este efecto, lo que sugiere una posible modulación de la melanización.

En cuanto al peso larval promedio, la mayoría de los tratamientos patógenos redujeron este parámetro respecto al control, en particular Eh (-0.027 en líquido) y F (-0.019 en líquido). No obstante, al combinarse con el probiótico se observó una recuperación parcial en ambos casos (+0.017 y +0.018, respectivamente), indicando un efecto restaurador del probiótico en el crecimiento larval. En tratamientos secos, los cambios fueron más sutiles, aunque se mantuvo la misma tendencia compensatoria del probiótico.

Para el peso adulto, los efectos fueron en general menos marcados, pero se observaron ligeras mejoras con el probiótico, especialmente cuando se combinó con Sa y Eh en forma

líquida (+0.022 y +0.012, respectivamente), y con F en forma seca (+0.011). Esto podría reflejar una mejor eficiencia en la conversión alimenticia o un desarrollo más efectivo.

Con respecto a la longitud, los tratamientos patógenos generalmente causaron una reducción del tamaño corporal, particularmente notable con Eh y F en formulación líquida (−0.186 y −0.053, respectivamente). Sin embargo, al combinarse con el probiótico no solo se mitigó la pérdida, sino que se promovió una recuperación significativa de la longitud (+0.095 para Eh+Pp y +0.057 para F+Pp en líquido), patrón también observado en los tratamientos secos. Estos resultados refuerzan la idea de un rol positivo del probiótico bajo condiciones de estrés patógeno.

Finalmente, respecto a la tasa de malformaciones, se registraron aumentos mínimos en algunos tratamientos, particularmente con Eh y F (+0.001), tanto en forma líquida como seca, pero la adición del probiótico no empeoró esta condición en la mayoría de los casos, manteniéndose en cero o sin cambios en comparación con el tratamiento base.

En resumen, estos hallazgos sugieren que el probiótico tiene un potencial efecto protector o restaurador sobre varios parámetros fisiológicos y morfológicos, especialmente cuando los individuos están expuestos a agentes patógenos. Sin embargo, su efectividad varía según el tipo de formulación y el patógeno específico involucrado.

Comparación integral

El análisis integral de los datos revela que la adición del probiótico *P. pentosaceus* (Pp), tanto en condiciones de alimentación líquida como seca, en general produce efectos positivos en el desarrollo de *Tenebrio*, especialmente bajo estrés patógeno.

Uno de los efectos más notables es el aumento en el peso larval y adulto, con incrementos de hasta el 21.5% en adultos bajo tratamientos líquidos (Sa+Pp vs Sa), y hasta 14.3% bajo condiciones secas (Pp vs C). La longitud corporal también tiende a aumentar ligeramente con la aplicación del probiótico, particularmente en tratamientos combinados con patógenos como Eh y F, donde se reportan incrementos de hasta 6.2% y 5.1%, respectivamente.

En cuanto a la mortalidad, la aplicación de Pp frecuentemente reduce significativamente el número de individuos muertos, especialmente en condiciones secas con patógenos (Eh+Pp vs Eh: −4 veces; F+Pp vs F: −0.4 veces), reforzando su rol protector. De forma similar, el tiempo necesario para alcanzar la etapa de pupa mejora en muchos casos con Pp, indicando un desarrollo más rápido; por ejemplo, en Eh+Pp vs Eh (líquido) se observa una aceleración de 1.28 veces. En contraste, los tratamientos con patógenos, pero sin Pp (por ejemplo, Eh o F) muestran claros retrasos en la metamorfosis (Figura 9).

En cuanto al color del exoesqueleto, los valores negativos indican oscurecimiento, y aunque se observan algunas variaciones con Pp (como un marcado oscurecimiento en L(Pp) vs L(C): −36.4%), este cambio no representa una desventaja funcional clara y, por tanto, se considera un efecto secundario sin impacto negativo evidente.

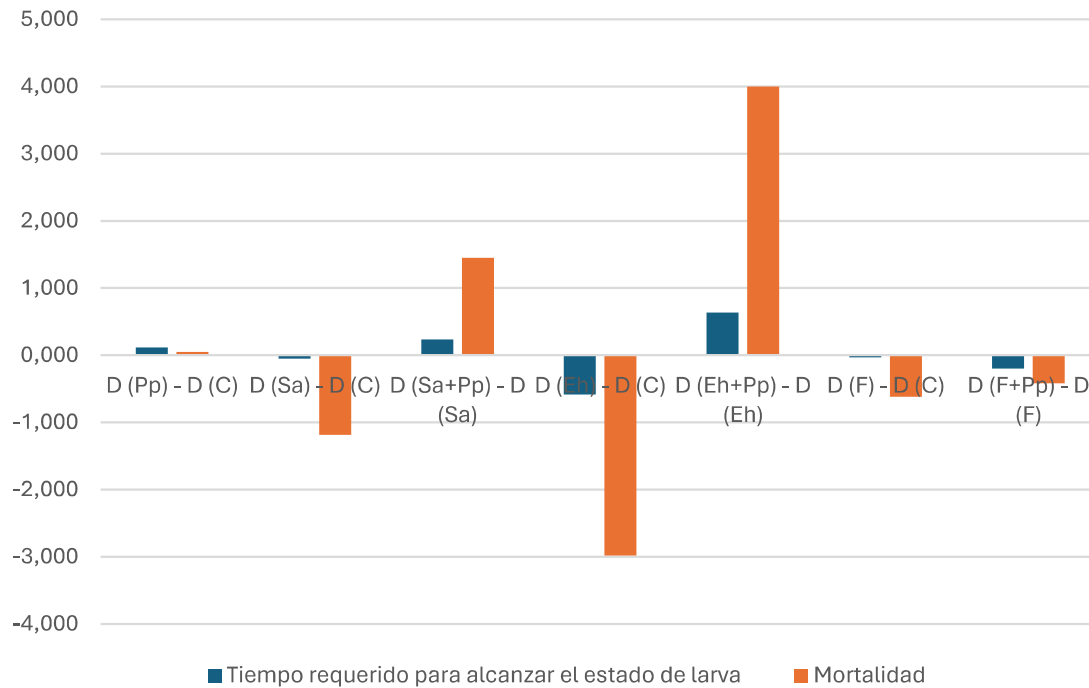


Figura 9: diagramas de barras de la variabilidad del tiempo hasta la pupación y la mortalidad entre los tratamientos secos con *T. molitor*.

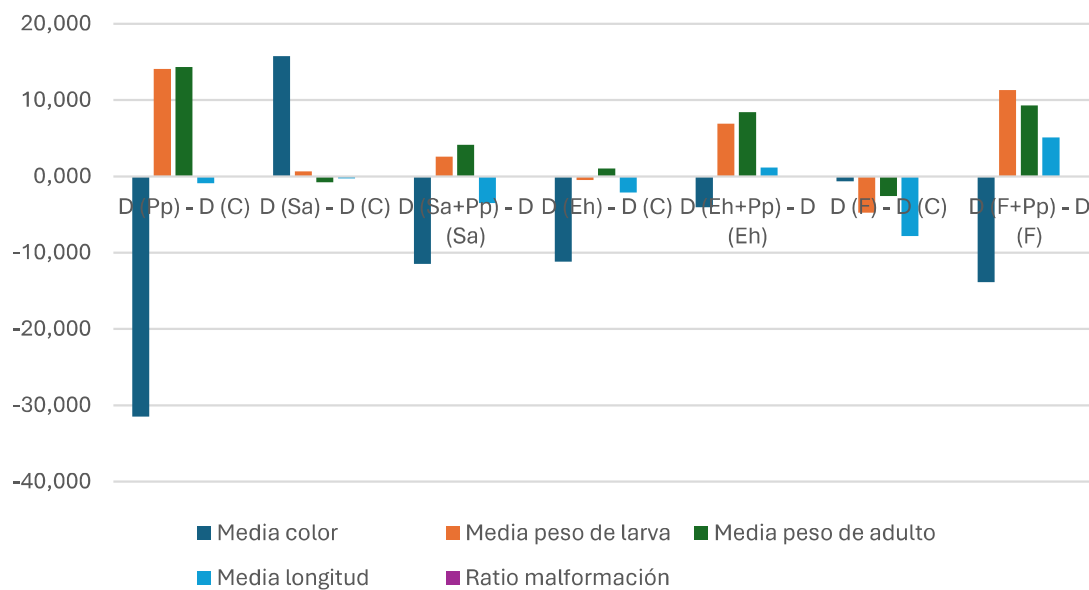


Figura 10: diagramas de barras de la variabilidad del color, el peso de las larvas, el peso de los adultos, la longitud y la tasa de malformaciones entre los tratamientos secos con *T. molitor*.

La tasa de malformaciones, por su parte, se mantiene prácticamente sin cambios en todos los tratamientos, lo que demuestra que Pp no incrementa las deformidades, incluso bajo condiciones de estrés inducidas por patógenos (Figura 10).

Para maximizar el desarrollo del *Tenebrio* (en términos de peso y velocidad de metamorfosis) y minimizar la mortalidad, el uso de Pp en combinación con alimento seco parece ser una de las estrategias más eficaces, especialmente bajo condiciones patógenas. Sin embargo, incluso en contextos no patógenos, incluir Pp puede ser beneficioso para ciertos parámetros, particularmente el peso.

Por lo tanto, la aplicación del probiótico es una herramienta robusta para mejorar la productividad en la cría de tenebrio, y se recomienda especialmente cuando se utiliza con sustratos secos y en presencia de agentes patógenos.

Discusión

Este estudio demuestra que la suplementación de *T. molitor* con el probiótico *Pediococcus pentosaceus* (Pp) tiene efectos positivos sobre múltiples parámetros productivos y biotecnológicos, destacando su potencial para una producción de insectos más eficiente, sostenible y con valor añadido. De manera notable, *P. pentosaceus*, combinado con dietas secas o líquidas, mejora el crecimiento, reduce la mortalidad y optimiza tanto características morfológicas como fisiológicas del insecto.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos que destacan el potencial probiótico de *P. pentosaceus* en la modulación de la microbiota intestinal y el fortalecimiento de las respuestas inmunológicas (Oelschlaeger, 2010). En *T. molitor*, la modulación de la microbiota intestinal ha demostrado ser un factor clave en el desarrollo larval y la eficiencia de conversión alimenticia (Jung et al, 2014; Przemieniecki et al, 2020). Además, *P. pentosaceus* produce péptidos antimicrobianos como las pediocinas, que presentan actividad frente a una amplia gama de patógenos (Jamuna and Jeevaratnam, 2004; Skyttä et al, 1993; Nghe and Nguyen, 2014), lo cual sugiere un papel importante en la supresión de patógenos dentro del entorno intestinal del insecto.

En un contexto productivo, el aumento del peso y la longitud tanto en larvas como en adultos son rasgos cruciales, ya que se asocian directamente con el rendimiento de biomasa (Ribeiro et al, 2018). En nuestros experimentos, la suplementación con *P. pentosaceus* bajo ambas condiciones dietéticas resultó en incrementos significativos en el peso larval (hasta un 14.8%) y en el peso adulto (hasta un 21.4%). Esto coincide con lo señalado por Van Huis (2020), quien resaltó la importancia de mejorar la eficiencia del crecimiento para la futura escalabilidad de la cría de insectos.

Un rasgo menos explorado, pero relevante a nivel industrial, es el color del exoesqueleto, el cual puede correlacionarse con el contenido de quitina y quitosano. Una pigmentación más oscura, indicada por valores de color más bajos, se asocia con una mayor esclerotización y mayor contenido de melanina y quitina (Grau et al, 2017). Estos individuos más oscuros podrían tener mayor utilidad en la extracción de biopolímeros, especialmente quitosano, con aplicaciones en medicina, cosmética y agricultura (Garofalo et al, 2019).

El tiempo de desarrollo es otra consideración importante. Un menor tiempo hasta la pupación reduce los ciclos de producción y el consumo de recursos. En nuestro estudio, la suplementación con Pp redujo el tiempo de pupación en la mayoría de las condiciones, particularmente bajo estrés biótico. Esto es relevante considerando que patógenos como *Fusarium spp.* son conocidos por ralentizar el desarrollo y aumentar la mortalidad (Guo et al, 2021). Los efectos protectores de los probióticos frente a dichos patógenos han sido observados en otros modelos de insectos y animales (Islam and Yang, 2016), lo que respalda el papel protector de *P. pentosaceus* observado en nuestros ensayos.

Evitar tasas altas de mortalidad es vital en la cría de insectos. El hecho de que los grupos tratados con Pp experimentaran hasta una reducción de cuatro veces en la mortalidad en comparación con los controles infectados subraya su potencial inmunoprotector (Mikolajczak et al, 2020). Esto es consistente con la creciente evidencia de que los

probióticos mejoran la inmunidad del huésped tanto por mecanismos directos como indirectos (Oelschlaeger, 2010).

Además, la baja tasa de malformaciones, incluso bajo estrés biótico, sugiere que Pp no interfiere con el desarrollo normal. Esto es esencial para mantener un producto homogéneo, requisito tanto en aplicaciones alimentarias como industriales (Lecocq et al, 2021).

La composición de la microbiota en *T. molitor* es dinámica y está influenciada por la dieta, el ambiente y la suplementación microbiana (Stoops et al, 2016; Urbanek et al, 2020). Nuestros hallazgos contribuyen a la creciente evidencia de que la modulación de esta microbiota mediante estrategias probióticas dirigidas puede mejorar el rendimiento del huésped, la tolerancia al estrés y la resistencia a patógenos.

La suplementación con *P. pentosaceus* no solo mejora el rendimiento zootécnico de *T. molitor*, sino que también representa una estrategia prometedora para mitigar el impacto de microorganismos patógenos en los sistemas de cría de insectos. Su capacidad para reducir la mortalidad bajo estrés biótico apunta a su función como modulador inmunológico natural. En un modelo de producción orientado a la sostenibilidad, la integración de Pp en los protocolos de cría podría reducir la dependencia de antimicrobianos sintéticos, mejorar el bienestar animal y asegurar rendimientos más consistentes. A medida que la cría de insectos se expande globalmente, probióticos como *P. pentosaceus* probablemente se convertirán en una pieza clave de sistemas productivos bioseguros y sostenibles.

CONCLUSIONES

Capítulo 1

- Impacto negativo de la endogamia: Se confirma que la endogamia en poblaciones de insectos afecta negativamente la reproducción, inmunidad, expresión hormonal y viabilidad general.
- Reducción del éxito reproductivo:
 - Menor atracción de hembras hacia machos consanguíneos.
 - Disminución en el número y peso de huevos.
 - Reducción en el peso de larvas y adultos.
- Debilitamiento inmunológico: Los individuos endogámicos presentan mayor susceptibilidad a infecciones y menores tasas de supervivencia.
- Pérdida de diversidad genética:
 - Se detectan niveles críticos de homogeneización genética en líneas industriales.
 - Poblaciones silvestres exhiben alta diversidad (F_{ST} hasta 0.904), lo que resalta su valor estratégico para programas de mejora.
- Necesidades prioritarias de investigación:
 - Ampliar la evidencia científica en genética, inmunología, comportamiento reproductivo y comunicación química.
 - Explorar la interacción entre endogamia y microbiota intestinal.
 - Analizar el efecto modulador de factores ambientales (temperatura, humedad) sobre los efectos de la consanguinidad.
 - Diseñar dietas específicas para compensar los déficits fisiológicos de poblaciones endogámicas.
- Recomendación general: Incorporar un enfoque integral (genético, ecológico y nutricional) en los programas de cría para garantizar sostenibilidad y rendimiento productivo en *T. molitor*.

Capítulo 2

- Importancia de la variabilidad genética: Se demuestra que la estructura genética influye directamente en los caracteres fenotípicos y en la eficiencia productiva bajo cría intensiva.
- Peso como parámetro clave:
 - El 68,8% de los cruces mostró diferencias significativas en el peso medio.
 - El peso permite clasificar de forma efectiva individuos de la misma edad o cohorte.
 - Correlación peso-longitud: Existe una asociación positiva entre peso y longitud corporal, lo que valida su uso conjunto como criterios de selección en programas de mejora genética.
- Impacto negativo de la endogamia:
 - Los cruces homogéneos presentaron mayor tasa de malformaciones.
 - Se confirma que la endogamia compromete el desarrollo morfológico normal.
- Coloración como indicador morfológico:
 - Se detectó una correlación moderada ($r = 0,55$) entre malformaciones y coloración anómala del exoesqueleto.
 - El color podría utilizarse como herramienta diagnóstica precoz y no invasiva.
- Evidencia de vigor híbrido:

- Los cruces heterogéneos mostraron menor variabilidad fenotípica y menos defectos morfológicos.
 - Se confirma el efecto positivo de la heterosis sobre la estabilidad del desarrollo.
- Aplicaciones prácticas:
 - Los resultados pueden ser aplicados a estrategias de selección y descarte temprano.
 - La identificación de combinaciones genéticas óptimas mejora la eficiencia de los sistemas de cría.

Capítulo 3

- Eficacia de la morfometría geométrica:
 - Herramienta precisa para detectar variaciones morfológicas sutiles entre poblaciones.
 - Permite clasificar individuos según el método de cría y origen geográfico.
- Disminución de diversidad morfológica: Esta pérdida se asocia a procesos de domesticación, selección intensiva y cuellos de botella genéticos.
- Implicaciones productivas: La reducción morfológica podría comprometer la capacidad adaptativa frente a desafíos ambientales y sanitarios en contextos industriales.
- Reconstrucción del origen y dispersión:
 - Evidencias morfológicas respaldan un origen en el este del mar Mediterráneo.
 - Expansión inicial vinculada a la agricultura; posterior dispersión global relacionada con movimientos coloniales y comerciales.
- Aplicación práctica y valor para programas de selección y conservación:
 - La forma corporal refleja el contexto de cría.
 - La morfometría permite identificar y conservar líneas morfológicamente diversas.

Capítulo 4

- Variabilidad de la microbiota entre poblaciones:
 - La composición microbiana intestinal varía según el origen geográfico.
 - Y también varía en función de las condiciones de cría (tipo de dieta, fuente de agua, sistema de producción (industrial vs. tradicional) y clima local).
- Efectos del sistema de cría sobre la diversidad microbiana:
 - Poblaciones de cría tradicional presentan microbiotas más diversas y equilibradas.
 - Sistemas industriales generan comunidades bacterianas reducidas y menos diversas, con potenciales consecuencias negativas sobre la fisiología del insecto.
- Impactos fisiológicos de una microbiota empobrecida:
 - Reducción de funciones clave: digestión, absorción de nutrientes, inmunidad y adaptación ambiental.
 - Riesgos para la eficiencia y resiliencia productiva en contextos intensivos.
- Implicaciones para el manejo productivo:
 - La microbiota intestinal debe considerarse un factor funcional en la gestión de colonias.

- Estrategias recomendadas: dietas con residuos orgánicos, sustratos mixtos, y control de la variabilidad ambiental para fomentar un microbioma más robusto.
- Aplicación práctica e integración del microbioma en programas de mejora:
 - Posibilidad de seleccionar líneas con microbiotas asociadas a mayor rendimiento y resistencia.
 - Aplicación de probióticos y precursores dietéticos como herramientas para optimizar el sistema digestivo y la productividad.

Capítulo 5

- Dieta como modulador clave de la microbiota intestinal:
 - La inclusión de *Lentinula edodes* en la dieta (micelio y carpóforo) modifica significativamente la composición, diversidad y estructura de las comunidades microbianas intestinales.
 - El tipo y proporción del suplemento determinan la respuesta microbiana, con efectos diferenciados.
- Efectos del micelio como suplemento funcional:
 - Las dietas con micelio al 20% favorecen una microbiota más diversa y equilibrada.
 - Este perfil microbiano está asociado a un intestino funcional, resiliente y ecológicamente estable.
- Impacto negativo del carpóforo en altas concentraciones:
 - Suplementos con carpóforo al 80% reducen la diversidad bacteriana y promueven la dominancia de *Enterobacter hormaechei*.
 - Se observa una transición dosis-dependiente de comunidades dominadas por Firmicutes a otras dominadas por Proteobacteria, asociada a posibles estados de disbiosis.
- Hacia un modelo nutricional sostenible y resiliente:
 - En el contexto de expansión de la producción industrial de insectos, se requiere un enfoque nutricional que contemple explícitamente la microbiota como objetivo de manejo.
 - La formulación racional de dietas debe alinearse con los principios de la economía circular y la seguridad alimentaria.
 - Integrar la microbiota intestinal como criterio central permitirá mejorar la eficiencia, sostenibilidad y competitividad del sistema de producción de *T. molitor*.
- Aplicación práctica en la cría industrial:
 - El micelio representa un suplemento prometedor para mantener una microbiota saludable, con potenciales beneficios en crecimiento, conversión alimentaria, supervivencia y calidad nutricional.
 - El uso de carpóforo debe ser cuidadosamente dosificado para evitar impactos negativos sobre la salud intestinal del insecto.

Capítulo 6

- Eficacia del probiótico en condiciones estándar:

- La suplementación con *P. pentosaceus* (líquido y seco) mejora discretamente peso larval, peso adulto, longitud corporal y tiempo de desarrollo, sin efectos adversos bajo condiciones normales.
 - Actúa como complemento nutricional funcional incluso en ausencia de estrés biológico.
- Efecto protector en presencia de patógenos:
 - En escenarios con exposición a *Fusarium spp.*, *E. hormaechei* y *S. aureus*, el probiótico reduce la mortalidad y mitiga el impacto negativo sobre el desarrollo y la morfología.
 - Probable mecanismo: estimulación inmunitaria y modulación de la microbiota intestinal.
- Valor añadido biotecnológico:
 - Se observa una posible relación entre la suplementación y el oscurecimiento del exoesqueleto, asociado a mayor contenido de quitina y quitosano.
 - Implicaciones industriales en sectores como cosmética, medicina, agricultura y biotecnología.
- Indicadores productivos sensibles a la suplementación:
 - Variables como peso larval, peso adulto, longitud y tasa de malformaciones se ven positivamente influenciadas.
 - Estas métricas confirman el valor de *P. pentosaceus* como herramienta de mejora sanitaria y productiva.
- Relevancia zootécnica y estratégica:
 - La inclusión del probiótico fortalece la resiliencia del sistema de producción frente a desafíos biológicos.
 - Mejora simultáneamente el rendimiento, la bioseguridad y el bienestar del insecto.
- Aplicaciones prácticas en la industria entomológica:
 - El uso de *P. pentosaceus* se perfila como una solución sostenible, escalable y eficaz en cría intensiva de *T. molitor*.
 - Responde a exigencias del mercado agroalimentario y biotecnológico con una visión moderna, eficiente y orientada a la sostenibilidad.

REFERENCIAS

- Adamaki-Sotiraki C., Deruytter D., Rumbos C. I., et al. (2023a). Cross-breeding of *Tenebrio molitor* strains from a large-scale perspective. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(aop), 1-10. <https://doi.org/10.1163/23524588-20230116>
- Adamaki-Sotiraki C., Rumbos C. I., and Athanassiou C. G., et al. (2023b). Mating compatibility and offspring traits evaluation among different strains of *Tenebrio molitor*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(43), 97052-97062. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29116-1>
- Aguilar-Miranda, E., López, M., Escamilla-Santana, C., et al. (2001). Characteristics of Maize Flour Tortilla Supplemented with Ground *Tenebrio molitor* Larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 192–195. <https://doi.org/10.1021/jf010691y>
- Amanullah A., Arzoo S., Aslam A., et al. (2023). Inbreeding-driven innate behavioral changes in *Drosophila melanogaster*. *Biology*, 12(7), 926. <https://doi.org/10.3390/biology12070926>
- Ariza-Marín, E. R., and De Luna, E. (2020). Linear and geometric morphometric analyses of variation of the plectrum in four species of bess beetles, tribe Proculini (Coleoptera: Passalidae). *Arthropod structure and development*, 59, 100994. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100994>
- Arnett, R. H., Thomas, M. C., Skelley, P. E., et al. (2002). *American Beetles, Volume II: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea* (Vol. 2). CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781420041231>
- Baek, S., Perez, A., Turcotte, R., et al. (2015). Response of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults to potato: Implications for monitoring and sampling. *Journal Of Stored Products Research*, 60, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.11.002>
- Balfour, C., y Carmichael, L. (1928). The Light Reactions of the Meal Worm (*Tenebrio molitor* Linn). *The American Journal Of Psychology*, 40(4), 576–584. <https://doi.org/10.2307/1414336>
- Barre, A., Pichereaux, C., Velazquez, E., et al. (2019). Insights into the allergenic potential of the edible yellow mealworm (*Tenebrio molitor*). *Foods*, 8(10), 515. <https://doi.org/10.3390/foods8100515>
- Ben Guerrero, E. (2018). Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6533_BenGuerrero
- Borrelli, L., Coretti, L., Dipineto, L., et al. (2017). Insect-based diet, gut microbiota, and fermentation products in laying hens. *Scientific Reports*, 7(1), 16269. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16560-6>
- Box, G. E. (1953). Non-normality and tests on variances. *Biometrika*, 40(3/4), 318–335. <https://doi.org/10.2307/2333350>

- Briggs, D. E. G., Fortey, R. A., and Wills, M. A. (1994). Morphological disparity in the Cambrian. *Science*, 256(5064), 1670–1673. <https://doi.org/10.1126/science.256.5064.1670>
- Campos–Vega, R., Loarca–Piña, G., Vergara–Castañeda, H., et al. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends In Food Science and Technology*, 45(1), 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.012>
- Cargnelutti, F., Reyes Ramírez, A., Cristancho, S., et al. (2021). Condition-dependent male copulatory courtship and its benefits for females. *Ecology and Evolution*, 11(14), 9848–9855. <https://doi.org/10.1002/ece3.7815>
- Charlesworth, D., and Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>
- Chen, J. Y., et al. (1994). Evidence for monophyly and arthropod affinity of Cambrian giant predators. *Nature*, 372(6504), 661–664. <https://doi.org/10.1126/science.264.5163.1304>
- Choi, J., Koo, H. N., Kim, S. I., et al. (2020). Target-site mutations and glutathione S-transferases are associated with acequinocyl and pyridaben resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insects*, 11(8), 511. <https://doi.org/10.3390/insects11080511>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Deruytter, D., Coudron, C., and Claeys, J. (2020). The influence of wet feed distribution on the density, growth rate and growth variability of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(2), 141–149. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.0049>
- Dillon, R. J., and Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- Dos Reis, L., de Oliveira, V., Hagen, M., et al. (2015). Effect of cooking on the concentration of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1) grown in an organic system. *Food Chemistry*, 172, 770–777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.124>
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60, 17–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>
- Duffield K. R., Hampton K. J., Houslay T. M., et al. (2019). Inbreeding alters context-dependent reproductive effort and immunity in male crickets. *J. Evol. Biol.*, 32(7), 731–741. <https://doi.org/10.1111/jeb.13478>
- Dujardin, J. P. (2011). Modern morphometrics of medically important insects. In *Genetics and evolution of infectious disease* (pp. 473–501). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00016-9>

- Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular ecology*, 16(3), 463-475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x>
- Eleftheriou, E., Vacherie, B., Labadie, K., et al. (2022, July). *Tenebrio molitor* genomic structure among available populations. In *WCGALP 2022 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (pp. 2549-2551). Wageningen Academic Publishers. <https://hal.science/hal-04196166/>
- Engel, P., and Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Escobar, M., and Alquicira, E. P. (2019). *Pediococcus pentosaceus*: cultivo iniciador con potencial probiótico en la industria cárnica. *Nacameh*, 13(2), 37-47. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7260448>
- Field, A. (2024). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. Sage publications limited.
- Finke, M. D. (2013). Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology*, 32(1), 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). The state of the world's biodiversity for food and agriculture. *FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments*, 572. <https://doi.org/10.4060/CA3129EN>
- Frankham R. (2005). Genetics and extinction *Biol. Conserv.*, 126(2), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., et al. (2019). Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International*, 125, 108527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., et al. (2017). The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology*, 62, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.012>
- Gasco, L., et al. (2020). Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 360–372. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1743209>
- Generalovic T. N., McCarthy S. A., Warren I. A., et al. (2021). A high-quality, chromosome-level genome assembly of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.). *G3*, 11(5), jkab085. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab085>
- Ghaly, A. E., and Alkoaik, F. N. (2009). The Yellow Mealworm as a Novel Source of Protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 319–331. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2009.319.331>

- Ghosh, A., Jangra, S., Dietzgen, R. G., et al. (2021). Frontiers approaches to the diagnosis of thrips (thysanoptera): how effective are the molecular and electronic detection platforms?. *Insects*, 12(10), 920. <https://doi.org/10.3390/insects12100920>
- Gibson, G., and Dworkin, I. (2004). Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 681–690. <https://doi.org/10.1038/nrg1426>
- Grau, T., Vilcinskis, A., and Joop, G. (2017). Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 72(9-10), 337-349. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0033>
- Grimaldi, D., and Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. https://assets.cambridge.org/97805218/21490/frontmatter/9780521821490_frontmatter.pdf
- Gullan, P. J., and Cranston, P. S. (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley and Sons.
- Guo, Z., Döll, K., Dastjerdi, R., et al. (2021). Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). *PLoS ONE*, 9(6), e100112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100112>
- Gupta, A., and Nair, S. (2020). Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiotic traits. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1357. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357>
- Hagstrum, D., and Subramanyam, B. (2017). *Stored-product insect resource*. Elsevier. <https://shop.elsevier.com/books/stored-product-insect-resource/hagstrum/978-1-891127-66-3>
- Harlan, J. R. (1971). Agricultural Origins: Centers and Noncenters: Agriculture may originate in discrete centers or evolve over vast areas without definable centers. *Science*, 174(4008), 468-474. <https://doi.org/10.1126/science.174.4008.468>
- Heydorn P. (2018). Inbreeding decreases upwind pheromone-mediated male flight and frequency in female calling behavior in a lab culture of the pyraloid moth *Plodia interpunctella* [degree project]. Per Heydorn University of Kristianstad. <https://researchportal.hkr.se/ws/portalfiles/portal/35198651/FULLTEXT02.pdf>
- Hicks, K. A. (2017). Population Assay of *Tenebrio molitor* (Linnaeus)(Coleoptera: Tenebrionidae): Growth and Development Analysis. *Instars: A Journal of Student Research*, 3. <https://instars-ojs-tamu.tdl.org/instars/article/view/118>
- Hunt, T., et al. (2007). A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 318(5858), 1913–1916. <https://doi.org/10.1126/science.1146954>
- Jiang, J., He, Y., Kou, H., et al. (2020). The effects of artificial light at night on Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*): Behavioral rhythm disruption, melatonin

- suppression and intestinal microbiota alterations. *Ecological Indicators*, 108, 105702. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105702>
- Jung, J., Heo, A., Park, Y., et al. (2014). Gut Microbiota of *Tenebrio molitor* and Their Response to Environmental Change. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 24(7), 888–897. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05016>
 - Athey, K. J., Peterson, J. A., Dreyer, J., et al. (2022). Effect of breathable row covers and ground cover on pest insect levels and cucurbit yield. *Journal of economic entomology*, 115(1), 193-200. <https://doi.org/10.1093/jee/toab212>
 - Khodaei L., and Long T. A. (2020). Kin recognition and egg cannibalism by *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Behavior*, 33(1), 20-29. <https://doi.org/10.1007/s10905-020-09742-0>
 - Kim, Y., Snijders, A., Brislawn, C., et al. (2019). Light–Stress Influences the Composition of the Murine Gut Microbiome, Memory Function, and Plasma Metabolome. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00108>
 - Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., et al. (2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*, 25(1), 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.005>
 - Knol E. F., Nielsen B., and Knap P. W. (2002). Genetic aspects of piglet survival. *Livestock Production Science*, 78(1), 47-55. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00184-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00184-7)
 - Krams I., Kivleniece I., Kuusik A., et al. (2014). High repeatability of anti-predator responses and resting metabolic rate in a beetle. *Journal of Insect Behavior*, 27, 57-66. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9408-2>
 - Krams, I., Burghardt, G. M., Krams, R., et al. (2016). A dark cuticle allows higher investment in immunity, longevity and fecundity in a beetle upon a simulated parasite attack. *Oecologia*, 182, 99-109. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3654-X>
 - Lee, W. J., and Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
 - Letendre C., Duffield K. R., Sadd B. M., et al. (2022). Genetic covariance in immune measures and pathogen resistance in decorated crickets is sex- and pathogen-specific. *Journal of Animal Ecology*, 91(7), 1471-1488. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13709>
 - Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., et al. (2008). Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 776-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>
 - Liebert, A., Bicknell, B., Johnstone, D., et al. (2019). “Photobiomics”: Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome? *Photobiomodulation*,

Photomedicine, And Laser Surgery, 37(11), 681–693. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4628>

- Liu, X., Tong, N., Wu, Z et al. (2021). Identification of chemosensory genes based on the antennal transcriptomic analysis of *Plagiodera versicolora*. *Insects*, 13(1), 36. <https://doi.org/10.3390/insects13010036>
- Malawey, A. S., Zhang, H., McGuane, A. S., et al. (2021). Interaction of age and temperature on heat shock protein expression, sperm count, and sperm viability of the adult black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(1), 21-34. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0017>
- Mamtimin, T., Han, H., Khan, A., et al. (2023). Gut microbiome of mealworms (*Tenebrio molitor* Larvae) show similar responses to polystyrene and corn straw diets. *Microbiome*, 11(1), 98. <https://www.scienceopen.com/document?vid=eae1739b-6080-4797-9f57-f0720d8e0536>
- Mancini, S., Fratini, F., Turchi, B., et al. (2019). Former foodstuff products in *Tenebrio molitor* rearing: Effects on growth, chemical composition, microbiological load, and antioxidant status. *Animals*, 9(8), 484. <https://doi.org/10.3390/ani9080484>
- Mark E. Siddall, *Invertebrates.—R.C. Brusca and G. J. Brusca.* (2003). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. xix + 936 pp. ISBN 0–87893–097–3. \$109.95(cloth)., *Systematic Biology*, Volume 53, Issue 4, August 2004, Pages 664–666, <https://doi.org/10.1080/10635150490472968>
- Matthews, E. G., Lawrence, J. F., Bouchard, P., et al. (2010). *Tenebrionidae* Latreille, 1802. *Handbook of Zoology. Coleoptera, Beetles*, 2, 574-659. https://www.researchgate.net/publication/309669308_Tenebrionidae_Latreille_1802
- Mendaza Lainez, E. (2017). Influencia de diferentes dietas en la composición nutricional del insecto comestible *Tenebrio molitor* y estudio de su pardeamiento. <https://academica-e.unavarra.es/entities/publication/886d1d9b-5ff1-4acd-90e3-fd2df6a0ce90>
- Mikolajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., et al. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10(6), 1031. <https://doi.org/10.3390/ani10061031>
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763-767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., et al. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean?. *PLoS biology*, 9(8), e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., and Shapiro-Ilan, D. I. (Eds.). (2022). Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens.

Academic

Press.

https://www.researchgate.net/publication/270274339_Mass_Production_of_Beneficial_Organisms_Invertebrates_and_Entomopathogens

- Müller T. and Juškauskas A. et al. (2018a). Inbreeding affects personality and fitness of a leaf beetle. *Animal Behaviour*, 138, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.02.002>
- Müller T., Lachenicht L. and Müller C. (2018b). Inbreeding alters the chemical phenotype and mating behavior of a beetle. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 177. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00177>
- Murray, D. (1968). The importance of water in the normal growth of larvae of *Tenebrio molitor*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 11(2), 149–168. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1968.tb02041.x>
- Oliveira-Junior, J. M. B., and Juen, L. (2019). Structuring of dragonfly communities (Insecta: Odonata) in eastern Amazon: effects of environmental and spatial factors in preserved and altered streams. *Insects*, 10(10), 322. <https://doi.org/10.3390/insects10100322>
- Ollerton, J., Winfree, R., and Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3), 321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Oonincx, D. G. A. B., and de Boer, I. J. M. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans: A life cycle assessment. *PLOS ONE*, 7(12), e51145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., et al. (2018). The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. *International Journal Of Food Microbiology*, 272, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.001>
- Page M. J., McKenzie J. E., Bossuyt P. M., et al. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, 372. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- Parodi, A., Leip, A., de Boer, I. J. M., et al. (2018). The potential of future foods for sustainable and healthy diets. *Nature Sustainability*, 1(12), 782–789. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0189-7>
- Payne, C. L. R., Scarborough, P., Rayner M., et al. (2016). Are edible insects more or less ‘healthy’ than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70, 285–291. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.149>
- Perić-Mataruga, V., Prolić, Z., Nenadović, V., et al. (2008). The effect of a static magnetic field on the morphometric characteristics of neurosecretory neurons and corpora allata in the pupae of yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae). *International Journal of Radiation Biology*, 84(2), 91-98. <https://doi.org/10.1080/09553000701797047>

- Phanitchat, T., Apiwathnasorn, C., Sungvornyothin, S., et al. (2019). Geometric morphometric analysis of the effect of temperature on wing size and shape in *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 33(4), 476-484. <https://doi.org/10.1111/mve.12385>
- Pölkki M., Krams I., Kangassalo K., et al. (2012). Inbreeding affects sexual signalling in males but not females of *Tenebrio molitor*. *Biology Letter*, 8(3), 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.1135>
- Poveda Arias, J. (2019). Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. *Revista Digital Universitaria*, 20(1). <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a2>
- Premalatha, M., Abbasi, T., Abbasi, T., et al. (2011). Energy-efficient food production to reduce global warming and ecodegradation: The use of edible insects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4357–4360. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.115>
- Pretorius, E., and Scholtz, C. H. (2001). Geometric morphometrics and the analysis of higher taxa: a case study based on the metendosternite of the Scarabaeoidea (Coleoptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 74(1), 35-50. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01375.x>
- Prokkola J., Roff D., Kärkkäinen T., et al. (2013). Genetic and phenotypic relationships between immune defence, melanism and life-history traits at different temperatures and sexes in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 111(2), 89-96. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.20>
- Qi, Y., Huang, L., Zeng, Y., et al. (2021). *Pediococcus pentosaceus*: screening and application as probiotics in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 12, 762467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.762467>
- Rainford, J. L., et al. (2014). Phylogenetic distribution of extant richness suggests metamorphosis is a key innovation driving diversification in insects. *PLoS ONE*, 9(10), e109085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109085>
- Rajagopal, R. (2009). Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian Journal Of Microbiology*, 49(2), 114–119. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0023-z>
- Ramos-Elorduy, J., González, E., Hernández, A., et al. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to Recycle Organic Wastes and as Feed for Broiler Chickens. *Journal Of Economic Entomology*, 95(1), 214–220. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.214>
- Rantala M. J., Viitaniemi H., and Roff D. A. (2011). Effects of inbreeding on potential and realized immune responses in *Tenebrio molitor*. *Parasitology*, 138(7), 906-912. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000473>
- Ravzanaadii, N., Kim, S., Choi, W., et al. (2012). Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *International Journal Of Industrial Entomology*, 25(1), 93–98. <https://doi.org/10.7852/ijie.2012.25.1.093>

- Rhode C., Badenhorst R., Hull K. L., et al. (2020). Genetic and phenotypic consequences of early domestication in black soldier flies (*Hermetia illucens*). *Animal Genetics*, 51(5), 752-762. <https://doi.org/10.1111/age.12961>
- Ribeiro, N., Abelho, M., and Costa, R. (2018). A review of the scientific literature for optimal conditions for mass rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science*, 53(4), 434-454. <https://doi.org/10.18474/JES17-67.1>
- Rumbos, C. I., and Athanassiou, C. G. (2021). The superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae): a 'sleeping giant' in nutrient sources. *Journal of Insect Science*, 21(2), 13. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab014>
- Rumpold, B. A., and Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Sasakawa, K. (2016). Utility of geometric morphometrics for inferring feeding habit from mouthpart morphology in insects: tests with larval Carabidae (Insecta: Coleoptera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 118(2), 394-409. <https://doi.org/10.1111/bij.12727>
- Schmidt, K., y Engel, P. (2021). Mechanisms underlying gut microbiota–host interactions in insects. *Journal Of Experimental Biology*, 224(2). <https://doi.org/10.1242/jeb.207696>
- Shamjana U., Mahamood R., and Grace T. (2020). Genetic structure of *Tribolium castaneum* populations in and around a grain storage facility. *Journal of Advanced Research*, 11(01 Suppl 1), 380-386. <https://sciensage.info/index.php/JASR/article/view/458>
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., et al. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 4(6), 287–291. <https://doi.org/10.4236/as.2013.46041>
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., et al. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology*, 53, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>
- Stoops, J., Vandeweyer, D., Crauwels, S., et al. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae. *Food Microbiology*, 53, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>
- Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63, 31–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Surendra, K. C., Olivier, R., Tomberlin, J. K., et al. (2016). Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming. *Renewable Energy*, 98, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.022>

- Symondson, W. O. C., Sunderland, K. D., and Greenstone, M. H. (2002). Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology*, 47(1), 561–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>
- Tatsuta, H., Takahashi, K. H., and Sakamaki, Y. (2018). Geometric morphometrics in entomology: Basics and applications. *Entomological Science*, 21(2), 164–184. <https://doi.org/10.1111/ens.12293>
- Templeton, A. R. (1986). Coadaptation and outbreeding depression. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=1db5e19e-aed5-4202-855c-f661c8ad799f>
- Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., et al. (2021). EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) Safety of Dried Yellow Mealworm (*Tenebrio Molitor* Larva) as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J*, 19, e06343. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>
- Van Broekhoven S., Oonincx D. G., Van Huis, et al. (2015). Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal of Insect Physiology*, 73, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.12.005>
- Van Broekhoven, S., Oonincx, D. G. A. B., Van Huis, A., et al. (2015). Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(3), 131–139. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0023>
- Van Huis, A. (2015). Edible insects contributing to food security?. *Agriculture and Food Security*, 4(1), 20. <http://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>
- Van Huis, A. (2020). Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: A review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1), 27–44. <https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0017>
- Van Huis, A. (2021). Insects as food and feed: From production to consumption. *Annual Review of Entomology*, 66, 455–472. <https://research.wur.nl/en/publications/insects-as-food-and-feed-from-production-to-consumption>
- Van Huis, A. (2021). Prospects of insects as food and feed. *Organic Agriculture*, 11(2), 301–308. <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00290-7>
- Van Knegsel, A. T. M., Remmelink, G. J., Jorjong, S., et al. (2014). Effect of dry period length and dietary energy source on energy balance, milk yield, and milk composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1499–1512. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7391>
- Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., et al. (2017). Metagenetic analysis of the bacterial communities of edible insects from diverse production cycles at industrial rearing companies. *International Journal Of Food Microbiology*, 261, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.018>

- Vargas Jerez, A., José Vivero, R., Uribe, S., et al. (2012). Interacción de microbiotas bacterianas e insectos. Boletín del Museo Entomológico, 4(3), 13–21. <https://doi.org/10.6018/analesvet.535101>
- Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., et al. (2019). Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in physiology*, 10, 138. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00138>
- Wang, Y. and Zhang, Y. (2015). Investigation of Gut-Associated Bacteria in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) Larvae Using Culture-Dependent and DGGE Methods. *Annals of the Entomological Society of America*, 108 (5), 941–949. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav079>
- Wei, L., Yue, F., Xing, L., et al. (2020). Constant Light Exposure Alters Gut Microbiota and Promotes the Progression of Steatohepatitis in High Fat Diet Rats. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01975>
- Wilson, E. O. (1988). The current state of biological diversity. *Biodiversity*, 521(1), 3–18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219273/>
- Worku, M., De Meulenaer, B., Duchateau, L., et al. (2018). Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method. *Food Research International*, 105, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.016>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97. <https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>
- Wynants, E., Crauwels, S., Lievens, B et al. (2017). Effect of post-harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 42, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>
- Xu, P., Choo, Y. M., Pelletier, J., et al. (2013). Silent, generic and plant kairomone sensitive odorant receptors from the Southern house mosquito. *Journal of insect physiology*, 59(9), 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.07.004>
- Yang, L. H., and Gratton, C. (2014). Insects as drivers of ecosystem processes. *Current Opinion in Insect Science*, 2, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.06.004>
- Yonehara, Y. O. S. H. I. N. A. R. I., Konuma, J. U. N. J. I., and Klingenberg, C. P. (2011). The use of geometric morphometrics in a study of shape diversity of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). In *The Second International Symposium of Biological Shape Analysis*. Okinawa, Japan (pp. 1–15). https://www.biol.tsukuba.ac.jp/cbs/kokusaikouryu/report/YOSHINARI_YONEHARA.pdf
- Yoon, T. J., Park, H. C., Kang, J. H., et al. (2017). Genetic divergence between the South Korean and Mongolian populations of the dung beetle, *Gymnopleurus mopsus* (Coleoptera: Scarabaeidae) based on mitochondrial cytochrome c oxidase

subunit I (COI) gene sequences. *Entomological Research*, 47(6), 366-372.
<https://doi.org/10.1111/1748-5967.12232>

- Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., et al. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zaalberg R. M., Nielsen H. M., Noer N. K., et al. (2024). A bio-economic model for estimating economic values of important production traits in the black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(aop), 1-11.
<https://doi.org/10.1163/23524588-00001126>
- Zhang, W., Zhang, X., Su, Q., et al. (2022). Genomic features underlying the evolutionary transitions of *Apibacter* to honey bee gut symbionts. *Insect Science*, 29(1), 259-275.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12912>
- Zhang, Z. Q. (2011). *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. Magnolia press.