UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
WYDZIAŁ ROLNICTWA I LEŚNICTWA

WYDZIAŁ ROLNICTWA I LEŚNICTWA

Dziedzina: Nauki rolnicze

Dyscyplina: Rolnictwo i Ogrodnictwo

mgr inż. Olga Kosewska

Rozprawa doktorska

Wybrane właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego

Selected chemical properties of cereal grains affecting the microbiome structure and metabolic activity of the lesser grain borer and rice weevil

Praca wykonana w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej

Promotor: dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM,
Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej,
Wydział Rolnictwa i Leśnictwa,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Promotor pomocniczy: dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki,
Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej,
Wydział Rolnictwa i Leśnictwa,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2025

Praca finansowana z projektu badawczego NCN: 2021/41/N/NZ9/00364

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Rozprawa doktorska składa się z czterech prac opublikowanych w 2023 i 2024 roku, których tematyka dotyczy zagadnień związanych z wpływem wybranych właściwości chemicznych ziarniaków zbóż na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego oraz roli mikrobiomu w funkcjonowaniu tych owadów.

Publikacja nr 1

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W. i Nietupski, M. (2023). The effect of antibiotics on bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy in grain stores. Applied Sciences, 13(3), 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576

IF_{2023} – 2,500; MEiN[1] – 100 pkt.

Publikacja nr 2

Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254

IF_{2024} – 0,700; MEiN[1] – 100 pkt.

Publikacja nr 3

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). International Agrophysics, 38(2), 165-176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216

IF_{2024} – 2,000; MeiN[1] – 100 pkt.

Publikacja nr 4

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2024). Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis. International Journal of Molecular Sciences; 25(18):10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130

IF_{2024} – 4,900; MeiN[1] – 140 pkt.

Razem:

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 440 pkt.

Szacunkowy sumaryczny IF: 10,1

[1]Liczba punktów wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 5 stycznia 2024 roku.

INFORMACJA O FINANSOWANIU BADAŃ

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 20 (nr 2021/41/N/NZ9/00364). Konkurs ten ma na celu wspieranie osób rozpoczynających karierę naukową, które nie posiadają stopnia doktora. Tytuł projektu: "Właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na rozwój, metabolizm i mikrobiom kapturnika zbożowca (*Rhyzopertha dominica* F.) i wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae* L.)". Pełniona funkcja: kierownik projektu. Okres realizacji: 3 stycznia 2022–2 września 2024. Wartość projektu: 137 943 zł.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

załącznik nr 2 do Załącznika nr 1 do Uchwały Nr 362 Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 roku wprowadzającej procedurę postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Olgi Kosewskiej. pod tytułem „Wybrane właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego" została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Mariusz Nietupski
.....
(podpis promotora)

** niepotrzebne skreślić*

Oświadczenie promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej

załącznik nr 2 do Załącznika nr 1 do Uchwały Nr 362 Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 roku wprowadzającej procedurę postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Olgi Kosewskiej. pod tytułem „Wybrane właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego" została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Przemieniecki Sebastian
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Oświadczenie o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

załącznik nr 3 do Załącznika nr 1 do Uchwały Nr 362 Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 roku wprowadzającej procedurę postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Załącznik nr 3 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

Olga Kosewska
(imię i nazwisko kandydata)

rolnictwo i ogrodnictwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **„Wybrane właściwości chemiczne ziarniaków zbóż wpływające na strukturę mikrobiomu i aktywność metaboliczną kapturnika zbożowca i wołka ryżowego"** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Kosewska Olga
(podpis kandydata)

SPIS TREŚCI

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ 2
INFORMACJA O FINANSOWANIU BADAŃ 4
Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej 5
Oświadczenie promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej 6
Oświadczenie o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej 7
STRESZCZENIE 10
SUMMARY 12
1.WSTĘP 13
Produkcja żywności i szkodliwość szkodników magazynowych 13
Krótka charakterystyka badanych szkodników magazynowych: wołka ryżowego i kapturnika zbożowca 14
Metody zwalczania szkodników magazynowych 16
Rola mikrobiomu w funkcjonowaniu owadzich szkodników magazynowych 17
2. CEL, HIPOTEZY BADAWCZE I ZAKRES BADAŃ 20
3. ORGANIZACJA I METODYKA BADAŃ 22
3.1. Organizacja badań 22
3.2 Materiały 22
3.2.1 Wykorzystane odmiany i gatunki zbóż – charakterystyka odmian 22
3.2.2 Wykorzystane gatunki szkodników magazynowych – hodowle mateczne 25
3.3 Metody 26
3.3.1 Badanie wpływu antybiotyków na mikrobiom kapturnika zbożowca i wołka ryżowego (H1, H2) 26
3.3.2 Analiza składu chemicznego ziaren 28
3.3.3 Badanie parametrów rozwojowych *R. dominica* i *S. oryzae* (H3, H4) 30
3.3.4 Ocena wpływu właściwości chemicznych ziaren badanych zbóż i ich różnych odmian na mikrobiom kapturnika zbożowca i wołka ryżowego (H5, H6, H7) 31
3.3.5 Analiza danych 32
4. OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ 35
Publikacja nr 1 35
Publikacja nr 2 37
Publikacja nr 3 39
Publikacja nr 4 42
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI 45

6. BIBLIOGRAFIA 48
7. SPIS TABEL I FIGUR 54
8. KOPIE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 55
9. OŚWIADCZENIA KANDYDATA ORAZ WSPÓŁAUTORÓW DOTYCZĄCE ICH WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH 125

STRESZCZENIE

Szkody powodowane przez żerowanie szkodników magazynowych, choć często bagatelizowane, są znaczne i sięgają od 10 do nawet 30%. Za dużą część z nich odpowiedzialne są owady. Jednymi z aktualnie najgroźniejszych owadzich szkodników magazynowych są wołek ryżowy (*Sitophilus oryzae* L.) oraz kapturnik zbożowiec (*Rhyzopertha dominica* F.). Wraz z ociepleniem klimatu są one w stanie lepiej rozwijać się w strefie klimatu umiarkowanego, tym samym powodując większe szkody. Istnieje wiele metod zwalczania tych szkodników, jednak aktualnie, w głównej mierze przy ich zwalczaniu korzystamy z metod chemicznych. Zwalczanie chemiczne niesie jednak za sobą szereg skutków ubocznych, m. in. problemy z zapewnieniem bezpieczeństwa żywności. Dodatkowo, długotrwałe stosowanie tych samych substancji aktywnych wiąże się z ryzykiem powstania odporności szkodników na ich działanie i zmniejszeniem skuteczności preparatów. Zgodnie z aktualnym prawodawstwem unijnym oraz ogólną tendencją do zmniejszania ilości stosowanych środków chemicznych, należy poszukiwać nowych, bardziej naturalnych metod zwalczania owadzich szkodników magazynowych. Dużą szansą na zmiany w tym zakresie jest poznanie relacji, jaką tworzy owad z wewnętrznym mikrobiomem. To mikrobiom bardzo często pomaga w trawieniu, detoksykacji czy nabyciu odporności na substancje chemiczne. W związku z tym nowym i obiecującym sposobem walki ze szkodnikami magazynowymi może być zdobycie wiedzy na temat funkcjonowania ich mikrobiomu i aktywności biochemicznej w łańcuchach pokarmowych. Należy poznać behawior i preferencje pokarmowe gatunków szkodników magazynowych oraz ustalić, jakie cechy chemiczne ziarna wpływają na słabszy rozwój mikrobiomu i tym samym ograniczają lub uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie owada. Niniejsza praca miała na celu poznanie mechanizmów odporności zbóż, poprzez zbadanie wpływu składu chemicznego ziarna różnych odmian pszenicy zwyczajnej i jęczmienia na zaburzenia w żerowaniu kapturnika zbożowca (*Rhyzopertha dominica* F.) i wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae* L.) oraz na zmiany w strukturze ich mikrobiomu. Wykonano szereg kompleksowych badań od ekologii populacji owadów po analizy biochemiczne i molekularne, które pozwoliły stwierdzić, że mikrobiom jelitowy *S. oryzae* i *R. dominica* wpływa na rozwój i funkcjonowanie tych szkodników. Wyeliminowanie go, w przypadku *S. oryzae*, skutkowało śmiercią owada. Potwierdzono również, że różny skład chemiczny ziarna wpływa zarówno na rozwój badanych szkodników i rearanżację ich mikrobiomów. Badania te dostarczyły cennych spostrzeżeń, które mogą być pomocne przy opracowaniu nowych praktyk przechowywania i strategii walki ze szkodnikami, poprzez wykorzystanie odmian charakteryzujących się większą naturalną odpornością lub

stosowania nietoksycznych substancji niszczących symbionty, zapobiegając rozwojowi owadów.

Słowa kluczowe: *Sitophilus oryzae, Rhyzopertha dominica,* bakteriobiom, jęczmień, pszenica

SUMMARY

The damage caused by feeding storage pests, although often underestimated, is considerable, ranging from 10 to as much as 30 per cent. Insects are responsible for a large proportion of this. Some of the most dangerous insect pests currently stored are the rice weevil and the lesser grain borer. With the warming of the climate, they are better able to thrive in temperate zones, thus causing more damage. There are several methods for controlling these pests, but we mainly use chemical methods for their control. However, chemical control has several side effects, including food safety problems. In addition, long-term use of the same active substances entails the risk that pests will develop resistance to them and that the effectiveness of the preparations will be reduced. In line with current EU legislation and the general trend to reduce the amount of chemicals used, new, more natural methods of controlling storage insect pests should be sought. A significant opportunity for change in this area is to learn more about the insect's relationship with its internal microbiome. The microbiome very often helps with digestion, detoxification or the acquisition of chemical resistance. Therefore, a new and promising way to combat storage pests may be to learn about their microbiome and biochemical activity in food chains. It is necessary to know the behaviour and food preferences of storage pest species and to determine which chemical characteristics of the grain affect the weaker development of the microbiome and thus limit or prevent the proper functioning of the insect. The present study aimed to understand the mechanisms of resistance in cereals by investigating the effects of the chemical composition of the grain of different cultivars of common wheat and barley on the feeding disorders of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) and on changes in the structure of their microbiome. A series of comprehensive studies from insect population ecology to biochemical and molecular analyses were carried out and concluded that the gut microbiome of *S. oryzae* and *R. dominica* influences the development and function of these pests. In the case of *S. oryzae*, its elimination resulted in the insect's death. It was also confirmed that the different chemical compositions of the grain affected the development of the pests studied and the rearrangement of their microbiomes. These studies have provided valuable insights that can help in the development of new storage practices and pest management strategies through the use of cultivars with greater natural resistance or the use of non-toxic symbiont-destroying substances to prevent insect development.

Keywords: *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, bacteriobiome, barley, wheat

1.WSTĘP

Produkcja żywności i szkodliwość szkodników magazynowych

Ważną częścią społeczeństwa, do którego należymy oraz gospodarki jest system żywnościowy (Béné i in., 2019). Ze względu na obawy dotyczące bezpieczeństwa żywnościowego i zrównoważonego rozwoju, kluczowe znaczenie ma konserwacja i przechowywanie żywności. Dynamiczny wzrost populacji, a także zmiany na poziomie środowiskowym, gospodarczym i społecznym, powodują konieczność zwiększenia poziomu produkowanej żywności. Prognozuje się, że produkcja ta będzie musiała wzrosnąć o 60%, aby wyżywić populację świata szacowaną w 2050 roku na 10,5 miliarda ludzi (Alexandratos i Bruinsma, 2012). Istnieje potrzeba ciągłego doskonalenia wydajności produkcji żywności, dbałości o jej jakość i szeroko rozumiane bezpieczeństwo (Dubey i in., 2008; Smith i Gregory, 2013). Aspekt ten dotyczy ochrony roślin podczas ich wegetacji, ale również przechowywania (Nawrot i Olejarski, 2007). Zboże było głównym źródłem pożywienia dla ludzi od początku istnienia rolnictwa i osiadłych społeczności (Nayak i Daglish, 2018). Stanowi największą część produkowanej żywności, która w 80%, opiera się na roślinach takich jak pszenica, jęczmień, ryż, kukurydza, proso, sorgo oraz rośliny strączkowe (fasola, soja i orzeszki ziemne). Kolejne 10% stanowią maniok, słodkie ziemniaki, kokos i banany, a pozostałe 10% to inne gatunki roślin (Stathas i in., 2023). Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa wskazuje, że 17% światowej produkcji żywności ulega zniszczeniu podczas jego przechowywania, z czego 10% szkód powodowanych jest przez owady, a 7% przez roztocza, gryzonie i choroby (Bouchelos, 2018; D. W. Hagstrum i in., 2012; Stathas i in., 2023). Stanowi to około 13 mln ton zbóż traconych rocznie z powodu działalności owadów i 100 mln ton traconych z powodu nieprawidłowego przechowywania (Ahmad i in., 2022; Klejdysz i in., 2017). Straty te są znacznie większe w krajach rozwijających i sięgają nawet do 30% (Desta i Yeshitila, 2024; Phillips i Throne, 2010).

Owadzie szkodniki magazynowe stanowią poważne zagrożenie dla przechowywanych produktów rolnych, powodując znaczne szkody i straty ekonomiczne oraz zagrażając bezpieczeństwu żywnościowemu na całym świecie. Szkodniki te atakują przechowywane zboża, nasiona, orzechy, suszone owoce i przetworzoną żywność, co prowadzi do psucia się, skażenia i obniżenia jej jakości. Powodują one straty ekonomiczne, związane ze zmniejszeniem ilości plonów, obniżeniem wartości rynkowej produktów oraz koniecznością ponoszenia kosztów związanych z zarządzaniem obecnością szkodników i ich zwalczaniem. Szkodniki, takie jak chrząszcze i motyle, mogą powodować uszkodzenia obiektów magazynowych, w tym

magazynów, silosów i materiałów opakowaniowych, co prowadzi do dodatkowych kosztów napraw i konserwacji. Kolejnym aspektem jest obawa dotycząca bezpieczeństwa żywności. Inwazje owadów mogą zanieczyszczać przechowywane produkty spożywcze odchodami, wydzielinami i mikroorganizmami, stwarzając zagrożenie dla zdrowia i bezpieczeństwa ludzi (Klejdysz i in., 2017; Premalatha i Balaji, 2024).

Krótka charakterystyka badanych szkodników magazynowych: wołka ryżowego i kapturnika zbożowca

Owady stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę organizmów i stanowią kluczowy element ekosystemu. Niektóre owady są szkodliwe dla ludzi, na przykład powodują uszkodzenia w sektorze rolniczym, w tym w magazynach zbożowych, a także w sektorze leśnym oraz niekorzystnie wpływają na ludzkie zdrowie, dlatego owady te są uważane za szkodniki. Owadzie szkodniki magazynowe należą głównie do rzędu Coleoptera i Lepidoptera (Nayak i Daglish, 2018). Około 500 gatunków owadów zostało powiązanych z przechowywanymi produktami zbożowymi, a prawie 100 gatunków owadzich szkodników produktów przechowywanych powoduje straty ekonomiczne (Kumar, 2021). W Polsce i na świecie do najbardziej niebezpiecznych szkodników należą wołek ryżowy (*Sitophilus oryzae* L.) i kapturnik zbożowiec (*Rhyzopertha dominica* F.) (Draz i in., 2021; Edde, 2012; David William Hagstrum i Flinn, 2014; Nietupski i in., 2017; Nowaczyk i in., 2008; Saad i in., 2018; Vianna i in., 2023). Są to szkodniki tzw. pierwotne, które posiadają zdolność do atakowania całych, zdrowych ziaren zbóż (Hagstrum i in., 2012; Rees, 2004). Powodują one często porażenia ukryte nasion i ziarna, co sprawia, że są trudne do wykrycia (Nawrot, 2001).

Wołek ryżowy to chrząszcz (Coleoptera) należący do rodziny ryjkowcowatych (Curculionidae), osiągający długość ciała od 2,5–4,0 mm. Jego ubarwienie jest brązowe z czterema wyróżniającymi się plamkami barwy pomarańczowej na pokrywach skrzydeł. Głowa wyciągnięta jest w charakterystyczny ryjek, zakończony aparatem gębowym (Fot. 1). W porównaniu do wołka zbożowego, wołek ryżowy jest mniejszy i bardziej ruchliwy. Owad ten posiada zdolność do lotu, jednak najczęściej rozprzestrzenia się biernie wraz z porażonymi produktami. Charakteryzuje go duża śmiertelność w przypadku braku pokarmu, jednak, kiedy ma optymalne warunki, to rozwija się bardzo szybko i powoduje znaczne szkody (Klejdysz i Nawrot, 2010a; Nawrot, 2001). Wraz z ociepleniem klimatu owad ten stał się groźnym szkodnikiem w strefie klimatu umiarkowanego w tym w Polsce, stając się jednym z potencjalnie najniebezpieczniejszych owadzich szkodników magazynowych (Klejdysz i Nawrot, 2010b).



Fotografia 1. Chrząszcze wołka ryżowego żerujące na ziarnie jęczmienia (fot. Olga Kosewska)

Drugim z omawianych chrząszczy jest kapturnik zbożowiec (*Rhyzopertha dominica* F.). Gatunek ten należy do rodziny kapturnikowatych (Bostrychidae). Osiąga rozmiary od 2,5 do 3 mm, ciało ma zabarwione na kolor brunatnoczerwony. Jego głowa schowana jest pod przedplecze tworząc charakterystyczny kapturek, czułki są dziesięcioczłonowe, zakończone wyraźną buławką (Fot. 2) (Klejdysz i Nawrot, 2010a; Nawrot, 2001). Owad ten jest zdolny do szybkiej adaptacji do niesprzyjających warunków abiotycznych i znacząco zmienił swoje preferencje siedliskowe, co sprawiło, że doskonale rozwija się również w strefie klimatu umiarkowanego (Klejdysz i Nawrot, 2010b). Jednym z najważniejszych problemów związanych z tym gatunkiem jest uodpornianie na stosowane do jego zwalczania substancje chemiczne (Edde, 2012; Lorini i Galley, 1999). Kolejnym zagrożeniem, jakie stwarza ten owad, jest jego zdolność do migracji. Dzięki zdolności do lotu bez problemu przemieszcza się on pomiędzy kolejnymi magazynami zbożowymi w poszukiwaniu pokarmu (Klejdysz i Nawrot, 2010b; Toews i in., 2006).



Fotografia 2. Chrząszcze kapturnika zbożowca żerujące na ziarnie pszenicy (fot. Olga Kosewska)

Metody zwalczania szkodników magazynowych

Aby ograniczać szkody w magazynach zbożowych stosowanych jest kilka metod zwalczania owadzich szkodników magazynowych. Dużą rolę w higienizacji odgrywają głównie metody niechemiczne i chemiczne (Olejarski P., 2005, 2010). Bardzo często w celu ograniczenia strat związanych z żerowaniem szkodników stosuje się zwalczanie chemiczne, które w przypadku wołka ryżowego i kapturnika zbożowca charakteryzuje się większą skutecznością w porównaniu do zastosowania zabiegów niechemicznych (Klejdysz i in., 2017). Związane jest to jednak z problemami dotyczącymi bezpieczeństwa żywności, w tym głównie pozostałościami środków chemicznych na przechowywanym produkcie, ale także uodparnianiem się owadów na zastosowane substancje aktywne (Dal Bello i in., 2000). Pozostałości substancji chemicznych w produktach mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów, a rosnąca odporność szkodników często prowadzi do konieczności stosowania wyższych dawek insektycydów, co jeszcze bardziej pogłębia problem (Nwosu, 2018). Zdolność owadów do uodporniania się na insektycydy jest bardzo ważnym aspektem, ponieważ wydatki na ochronę chemiczną rocznie wynoszą około czterdziestu miliardów dolarów (Bourguet i

Guillemaud, 2016; Popp, 2011). Badania podkreślają ewolucję mechanizmów oporności u owadzich szkodników, w tym mutacje genetyczne i zmiany epigenetyczne, które pozwalają owadom przetrwać zabiegi chemiczne. Ta oporność jest często wynikiem silnej presji selekcyjnej wynikającej z ciągłego stosowania insektycydów, co prowadzi do zmniejszenia skuteczności w czasie i konieczności opracowania nowych strategii zwalczania szkodników (Mogilicherla i Roy, 2023).

Przykładem owadów, które uodporniły się na stosowane przeciwko nim syntetyczne substancje chemiczne jest wspomniany już wcześniej kapturnik zbożowiec. Owad ten uodpornił się na stosowane przeciwko niemu deltametrynę oraz fosforowodór (Edde, 2012; Lorini i Galley, 1999). Kolejnym gatunkiem, który uodpornił się na stosowane przeciwko niemu substancje chemiczne jest także wołek ryżowy. Badania przeprowadzone na wołku ryżowym wykazały, że jest on odporny m. in. na chloropiryfos metylowy, pirymifos metylowy, permetrynę i spinosad (Khan i in., 2022). Stosowane insektycydy i zmiana klimatu zmieniają rozwój owadów i ich fizjologię, sprawiając tym samym, że obecnie znane i stosowane metody zwalczania owadzich szkodników magazynowych stają się niewystarczające. Dodatkowo rosnąca świadomość społeczna i obawy o bezpieczeństwo żywności i środowiska wymusiły zmianę kierunku badań oraz rozwój alternatywnych strategii zarządzania magazynami, m. in. poprzez postęp odmianowy i stosowanie biologicznych środków ochrony roślin przeciwko owadzim szkodnikom magazynowym (Fikremariam i in., 2009). Obecnie badania naukowe coraz częściej skupiają się na mikrobiomie jelitowym owadów, w tym mikrobiomie owadzich szkodników magazynowych. Mikrobiom odgrywa kluczową rolę w fizjologii owadów, m. in. poprzez dostarczanie składników odżywczych owadom, należy jednak wyjaśnić jak mikrobiom wpływa na zdolność owadów do adaptacji w zmieniających się warunkach środowiskowych, co może mieć istotne znaczenie w opracowaniu nowych metod zwalczania owadzich szkodników magazynowych (Li i in., 2023).

Rola mikrobiomu w funkcjonowaniu owadzich szkodników magazynowych

Rodzaj pokarmu jest kluczowym czynnikiem biotycznym, który wpływa na straty przechowalnicze oraz rozwój owadzich szkodników magazynowych. Spożywany pokarm bezpośrednio wpływa na biologię i fizjologię owadów, w tym na wielkość i ilość składanych jaj oraz dorosłych osobników, a także ich ogólną kondycję. Owady chętniej wybierają ziarniaki o wysokiej wartości odżywczej, podczas gdy ziarniaki o mniejszej wartości odżywczej są dla nich mniej atrakcyjne, co skutkuje jednocześnie mniejszym zakresem ich żerowania. Badania wykazały, że obecność substancji nietolerowanych przez owady w pokarmie skutecznie

ogranicza ich rozwój (Laszczak-Dawid i in., 2011; Perisic i in., 2018; Sönmez, 2022; Stathas i in., 2023). Badania dotyczące wpływu pokarmu na rozwój szkodników i liczebność owadów opierały się w głównej mierze na analizie cech fizycznych i chemicznych ziarna lub warunków przechowywania. Obecny postęp w badaniach naukowych wykazał, że mikrobiom jelitowy owadów odgrywa kluczową rolę, wspomagając trawienie, syntetyzując niezbędne składniki odżywcze, chroniąc przed patogenami i detoksykując szkodliwe substancje, w tym insektycydy. Wpływa więc ona bezpośrednio na rozwój owada (Jaffar i in., 2024). Zarówno w aspekcie ekologii, biotechnologii czy rolnictwa, zainteresowanie owadami, a także mikroorganizmami z nimi współżyjącymi otworzyło nowe ścieżki poznawcze i aplikacyjne. Mirobiom może być zarówno pożyteczny lub wręcz niezbędny do funkcjonowania owada, np. endosymbioza (ElKraly i in., 2023).

Układ pokarmowy owadów to złożone środowisko pełniące funkcje trawienne, hormonalne i immunologiczne. Żyje w nim wiele mikroorganizmów należących zarówno do mikrobiomu pożytecznego, okazjonalnego, jak i patogennego. Przewód pokarmowy owadów podzielony jest na jelito przednie, środkowe i tylne, w których panują skrajnie różne warunki, m.in. różne pH, zasobność w tlen, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, czy potencjał osmotyczny. Warunki te w dużej mierze mogą wpływać na kolonizację przez drobnoustroje. Ze względu na różne funkcje poszczególnych części układu pokarmowego, a tym samym różne środowisko skład jakościowy i ilościowy mikrobiomu jest zróżnicowany (Engel i Moran, 2013). Co więcej w zależności od rzędu owadów skład mikrobiomu może być zupełnie różny, natomiast w przypadku tego samego gatunku o tej różnorodności może zadecydować odmienna dieta, faza rozwojowa oraz region występowania (Xue i in., 2023). Inne fundamentalne różnice między zbiorowiskami mikroorganizmów jelitowych owadów związane są z tym, czy mikroorganizmy są specyficznie przystosowane do życia w owadach i czy są przenoszone bezpośrednio między żywicielami, czy są nabywane w każdym pokoleniu ze środowiska zewnętrznego (Ruby i in., 2004; Wier i in., 2010).

Do przykładów funkcji mikrobiomu pożądanych dla owada należą: wspomaganie trawienia, obrona przed pasożytami i patogenami, rozkład toksyn i ksenobiotyków (np. insektycydów, skażeń chemicznych pochodzenia antropogenicznego) oraz przekazywanie sygnałów pomiędzy mikroorganizmami oraz gospodarzem (Yun i in., 2014). Jedną z ważnych funkcji symbiontów u owadów roślinożernych jest udostępnianie zmagazynowanych substancji odżywczych w warunkach głodu owada. Mikroorganizmy odpowiadają także za rozkład roślinnych biopolimerów oraz dezaktywację systemu odpornościowego roślin, co jest naturalną i konieczną interakcją owad-symbiont. Wyspecjalizowane grupy symbiontów bakteryjnych,

tzw. symbionty obligatoryjne, formują się w specjalnych strukturach wewnątrzkomórkowych zwanych bakteriomami i są z łatwością transferowane wertykalnie następnym generacjom danego gatunku owada. Oprócz symbiontów obligatoryjnych występują też symbionty fakultatywne, które są transmitowane zarówno wertykalnie jak i horyzontalnie. Od ich składu zależy m.in. płodność owadów. Mają one również znaczny udział w udostępnianiu składników odżywczych i odporności przed czynnikami abiotycznymi i biotycznymi gospodarza (Sudakaran i in., 2017).

Dodatkową grupą symbiontów są symbionty jelitowe. Są one odpowiedzialne za udostępnianie i redystrybucję składników odżywczych oraz cykle pierwiastków, głównie azotu, w obrębie układu pokarmowego. Biorą również kluczowy udział w procesach detoksyfikacyjnych i pokonywaniu systemu odpornościowego roślin. Dlatego też od tej grupy mikrobiomu uzależniony jest zakres roślin, którymi może żywić się dany gatunek owadów. Ich transfer na inne osobniki jest również zarówno wertykalny jak i horyzontalny, ale wskutek wydalania i koprofagii przypadkowy transfer wertykalny jest bardziej powszechny (Sudakaran i in., 2017; Xia i in., 2017). Istnieje jeszcze jedna grupa symbiontów żyjących poza ciałem owadów, np. na pożywieniu. Ich zadanie polega na wstępnym rozkładzie tkanki roślinnej, udostępnianiu prostych substratów oraz zwiększeniu zasobów przyswajalnego azotu.

Skład i aktywność mikrobiomu mogą znacząco wpływać na zdolność owadów do trawienia pokarmu, a także na ich odporność na toksyny i patogeny. Dlatego analiza aktywności, funkcji i składu mikrobiomu układu pokarmowego owadów może być metodą bioindykacyjną, która pozwali na precyzyjne określenie oddziaływania wprowadzonego czynnika do środowiska lub hodowli (Brandon i in., 2018; Jung i in., 2021; Przemieniecki i in., 2020).

Wiedza na temat funkcji na poziomie mikrobiomu i aktywności biochemicznej w łańcuchach pokarmowych owadów jest obiecującym środkiem do rozwiązania problemu ze szkodnikami magazynowymi. Przesłanki te wskazują na konieczność prowadzenia badań, w których poznawany jest behawior i preferencje pokarmowe najważniejszych gatunków szkodników magazynowych oraz ustalenie m.in. cech chemicznych ziarna, które mogą determinować ich żerowanie (Jood i in., 1996; Park i in., 2008). Ustalenie czynników wpływających na zwiększoną, naturalną odporność ziarna na żerowanie szkodników magazynowych może pozwolić na ograniczenie stosowania insektycydów w procesie jego przechowywania (Piasecka-Kwiatkowska D i Warchalewski J.R., 2000).

2. CEL, HIPOTEZY BADAWCZE I ZAKRES BADAŃ

Szkody ponoszone podczas magazynowania produktów rolniczych są znaczące, stąd konieczna jest ciągła walka ze szkodnikami magazynowymi. Powszechnym sposobem ograniczania strat związanych z ich żerowaniem jest stosowanie zwalczania chemicznego. Rozwiązanie to jest proste i relatywnie tanie, jednak zawiera pewne mankamenty związane z pozostałościami środków ochrony roślin w ziarnie oraz kwestią uodporniania się szkodników na stosowane preparaty chemiczne. Dodatkowo zgodnie z prawodawstwem unijnym powinniśmy dążyć do zmniejszenia ilości stosowanych środków chemicznych. Przesłanki te wskazują na konieczność prowadzenia badań, które będą ostatecznie dążyć do stworzenia nowych bardziej skutecznych metod zwalczania szkodników magazynowych, co ma przyczynić się do ograniczenia stosowania insektycydów w procesie przechowywania ziarna. Doświadczenia z użyciem różnych gatunków zbóż i różnych ich odmian mogą wskazać na konkretne powiązanie określonej cechy zboża z mechanizmem działania układu pokarmowego, a także umożliwi określenie jaką rolę w tym procesie pełni mikrobiom tych owadów, co umożliwi tworzenie odmian bardziej odpornych na żerowanie szkodników magazynowych.

Celem nadrzędnym niniejszej pracy było poznanie mechanizmów odporności zbóż, poprzez zbadanie wpływu składu chemicznego różnych odmian pszenicy zwyczajnej i jęczmienia na zaburzenia w żerowaniu kapturnika zbożowca i wołka ryżowego oraz na zmiany w strukturze ich mikrobiomu. Ponadto, celem było również zbadanie zależności między mikrobiomem tych owadów, a ich rozwojem i żerowaniem. Celem pośrednim tych badań było natomiast podniesienie bezpieczeństwa żywności w przechowalnictwie zbóż, w kontekście integrowanych metod ochrony roślin.

W celu określenia wpływu składu chemicznego ziarna pszenicy i jęczmienia na rozwój *R. dominica* i *S. oryzae* oraz strukturę ich mikrobiomów, postawiono następujące hipotezy badawcze:

H1: Mikrobiom *R. dominica* i *S. oryzae* odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu tych szkodników magazynowych.

H2: Sterylizacja mikrobiomu wewnętrznego *R. dominica* i *S. oryzae* wpływa na rozwój i przeżywalność tych owadów.

H3: Specyficzny skład chemiczny ziarna, który obejmuje między innymi różną zawartość białka, lipidów lub węglowodanów, odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu odporności przechowywanych produktów na ataki szkodników.

H4: Różnice w profilach chemicznych ziarna wpływają na zachowania żywieniowe, rozmnażanie i przeżywalność *R. dominica* i *S. oryzae*.

H5: Parametry chemiczne ziarniaków oddziałują na strukturę i aktywność mikrobiomu symbiotycznego owada *R. dominica* i *S. oryzae*.

H6: Parametry chemiczne ziarniaków modyfikują procesy trawienia u owada.

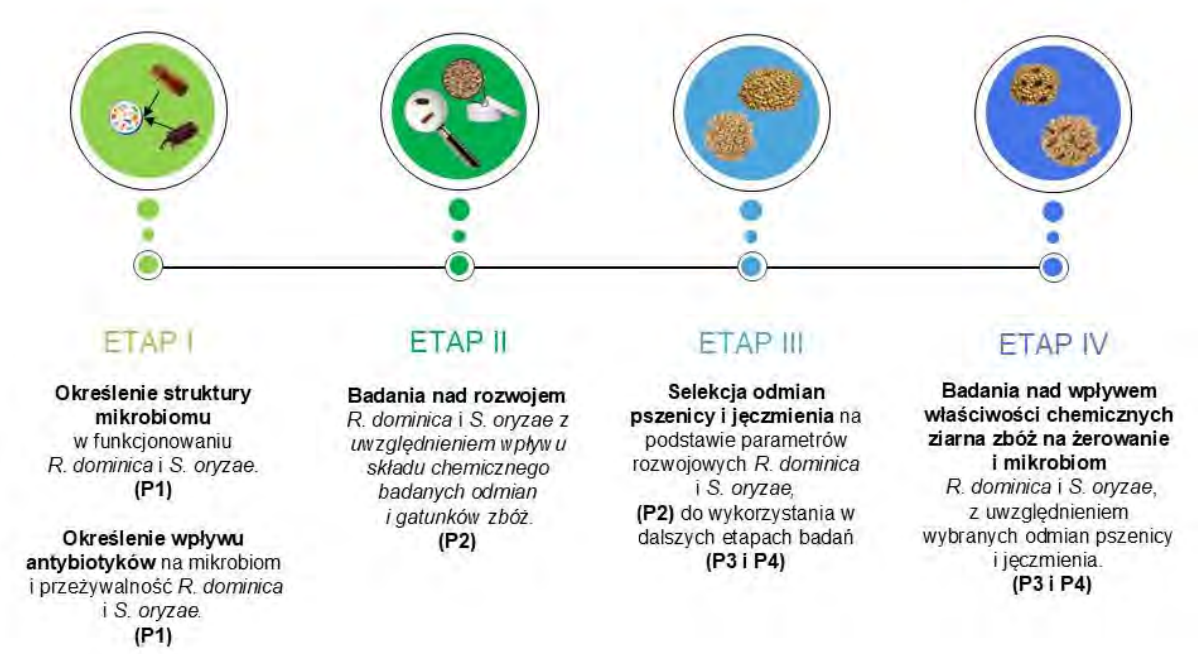
H7: Trawienie pokarmu u owadów jest uzależnione od mikrobiomu symbiotycznego i aktywności enzymatycznej przewodu pokarmowego.

Weryfikację przedstawionych hipotez zaplanowano poprzez zadania badawcze, które obejmowały badania nad ustaleniem czynników chemicznych warunkujących naturalną odporność ziarna różnych odmian pszenicy i jęczmienia na żerowanie dwóch gatunków szkodników magazynowych: kapturnika zbożowca i wołka ryżowego. Dodatkowo, poprzez kompleksowe badania, od ekologii populacji owadów po analizy biochemiczne i molekularne, zaplanowano precyzyjne określenie mechanizmów odpowiedzialnych za trawienie pokarmu przez szkodniki i kierunkowe zaburzenia tego procesu.

3. ORGANIZACJA I METODYKA BADAŃ

3.1. Organizacja badań

Badania zaplanowane w niniejszej rozprawie doktorskiej podzielono na 4 etapy badawcze przedstawione na schemacie 1.



Schemat 1. Etapy badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej z uwzględnieniem publikacji wchodzących w jej skład (opracowanie własne)

3.2 Materiały

3.2.1 Wykorzystane odmiany i gatunki zbóż – charakterystyka odmian

W II etapie badań zostało wybranych 10 odmian pszenicy: Rotax, Kilimanjaro, Impresja, Lawina, Tybalt, Rusałka, Feeling, Varius, Telimena i Mandaryna oraz 10 odmian jęczmienia: Radek, Ismena, Avatar, Flair, Trofeum, RGT Planet, Accordine, Amidala, KWS Dante i RGT Baltic, z ogólnie dostępnych odmian zarejestrowanych na terenie Polski (COBORU-a). Badane odmiany pochodziły ze Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian we Wrócikowie i zostały wybrane ze względu na powszechność uprawy w północnej Polsce, a także szczególne cechy agronomiczne lub jakościowe, które czynią je atrakcyjnymi do badań. Badane odmiany podzielono na typy użytkowe: jęczmień pastewny i browarny oraz formy użytkowe: pszenica jara i ozima. Podział odmian wraz z ich krótką charakterystyką został przedstawiony w Tabeli 1 **(P2)**.

Tabela 1

Podział odmian jęczmienia i pszenicy na typy i formy użytkowe wraz z krótką charakterystyką poszczególnych odmian (COBORU- b; COBORU- a)

Pszenica			
Lp.	**odmiana**	forma użytkowa	charakterystyka
1	**Rotax**	pszenica ozima	Odmiana została zarejestrowana w 2014 roku i jest rekomendowana do uprawy w województwie warmińsko-mazurskim. Należy do odmian chlebowych (grupa B). Zawartość białka w ziarnie wynosi 4 w skali dziewięciostopniowej, a masa 1 000 ziaren wynosi 42,3 g. Hodowcą tej odmiany jest Strube Research GmbH i Co. KG. Wyróżnia się wysokim potencjałem plonowania i dobrą odpornością na choroby oraz zimotrwałością.
2	**Kilimanjaro**	pszenica ozima	Odmiana została zarejestrowana w 2014 roku. Należy do odmian jakościowych chlebowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 6/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 45,1 g. Hodowcą tej odmiany jest RAGT 2n. Odmiana jest rekomendowana do uprawy m. in.: w województwie warmińsko-mazurskim.
3	**Impresja**	pszenica ozima	Odmiana została zarejestrowana w 2020 roku. Należy do odmian jakościowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 6/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 46,0 g. Hodowcą tej odmiany jest Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR. Odmiana cechuje się dobrą jakością ziarna i jest dobrze przystosowana do polskich warunków uprawy.
4	**Lawina**	pszenica ozima	Odmiana została zarejestrowana w 2019 roku. Należy do odmian pastewnych (grupa C). Zawartość białka w ziarnie wynosi 3/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 41,4 g. Hodowcą tej odmiany jest DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. Odmiana wykazuje umiarkowaną odporność na choroby.
5	**Tybalt**	pszenica jara	Odmiana została zarejestrowana w 2005 roku. Należy do odmian jakościowych chlebowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 7/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 43,0 g. Hodowcą tej odmiany jest Euro Grass B.V., Wiersum Plantbreeding B.V. Odmiana wykazuje umiarkowaną odporność na choroby.
6	**Rusałka**	pszenica jara	Odmiana została zarejestrowana w 2016 roku. Należy do odmian jakościowych chlebowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 7/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 41,0 g. Hodowcą tej odmiany jest Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR. Odmiana wykazuje umiarkowaną odporność na choroby.
7	**Feeling**	pszenica jara	Odmiana została zarejestrowana w 2015 roku. Należy do odmian jakościowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 6/9. Hodowcą tej odmiany jest Lemaire Deffontaines. Odmiana wykazuje umiarkowaną odporność na choroby.
8	**Varius**	pszenica jara	Odmiana została zarejestrowana w 2016 roku. Należy do odmian jakościowych chlebowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 7/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 38,3 g. Hodowcą tej odmiany jest Strube Research GmbH i Co. KG. Odmiana wykazuje dobrą odporność na choroby.
9	**Telimena**	pszenica jara	Odmiana została zgłoszona przez DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. w Choryniu. Odmiana ta była badana w sezonach 2014-2015 w ramach badań OWT i WGO. Telimena jest jakościową odmianą chlebową. Zawartość białka 5/9. Została wpisana do Księgi Ochrony Wyłącznego Prawa do Odmiany (KO) 21 czerwca 2017 roku, z ochroną trwającą do 21 czerwca 2042 roku. Jednak jej wpis do Krajowego Rejestru (KR) został odrzucony 2 marca 2016 roku.

10	**Mandaryna**	pszenica jara	Odmiana została zarejestrowana w 2014 roku. Należy do odmian jakościowych chlebowych (grupa A). Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9, a masa 1 000 ziaren wynosi 35,2 g. Hodowcą tej odmiany jest DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. Odmiana wykazuje dobrą odporność na choroby.
Jęczmień			
Lp.	**odmiana**	typ użytkowy	charakterystyka
1	**Radek**	jęczmień jary typ pastewny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2015 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 46,8 g. Odmiana ta charakteryzuje się dobrą odpornością na choroby i jest rekomendowana do uprawy m. in.: w województwie warmińsko-mazurskim.
2	**Ismena**	jęczmień jary typ pastewny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2018 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Nordsaat Saatzucht GmbH Saatzucht Langenstein. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 47,2 g.
3	**Avatar**	jęczmień jary typ pastewny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2019 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Poznańska Hodowla Roślin sp. z o.o. Zawartość białka w ziarnie wynosi 6/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 46,4 g.
4	**Flair**	jęczmień jary typ pastewny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2020 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Sejet Planteforaedling I/S. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 44,4 g.
5	**Trofeum**	jęczmień jary typ pastewny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2021 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR. Zawartość białka w ziarnie wynosi 6/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 46,2 g.
6	**RGT Planet**	jęczmień jary typ browarny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2016 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest RAGT 2n. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 46,1 g. Odmiana jest rekomendowana do uprawy m. in.: w województwie warmińsko-mazurskim.
7	**Accordine**	jęczmień jary typ browarny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2017 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Ackermann Saatzucht GmbH i Co. KG. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9 Odmiana ta charakteryzuje się dobrą odpornością na choroby oraz wysoką wartością browarną.
8	**Amidala**	jęczmień jary typ browarny	Odmiana wpisana do krajowego rejestru w 2020 roku, posiada kłos dwurzędowy (2rz). Hodowcą jest Nordsaat Saatzucht GmbH Saatzucht Langenstein. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9. Masa 1 000 ziaren wynosi 50,5 g.
9	**KWS Dante**	jęczmień jary typ browarny	Odmiana jęczmienia jarego KWS Dante, o hodowlanej nazwie KWS 10/206, została wpisana do krajowego rejestru w 2014 roku W 2021 roku została skreślona z KR. Jest to odmiana typu browarnego z kłosem dwurzędowym. Zgłaszającym, zachowującym i hodowcą tej odmiany jest KWS Lochow GmbH. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9.
10	**RGT Baltic**	jęczmień jary typ browarny	Odmiana jęczmienia jarego RGT Baltic, o hodowlanej nazwie LSB 0794.3180, została wpisana do krajowego rejestru w 2016 roku.1 lutego 2024 roku została skreślona z KR. Jest to odmiana typu browarnego z kłosem dwurzędowym. Zgłaszającym i zachowującym odmianę jest RAGT 2n. Zawartość białka w ziarnie wynosi 5/9.

Etap III obejmował wykonanie selekcji odmian na podstawie analizy wyników statystycznych (liczebność pokolenia potomnego) uzyskanych w Publikacji 2 (**P2**), które następnie zostały wykorzystane w IV etapie badań. Dla każdego gatunku badanego szkodnika magazynowego wybrano trzy odmiany jęczmienia oraz trzy odmiany pszenicy. Były to odmiany wykazujące największą naturalną odporność na żerowanie *R. dominica* lub *S. oryzae*, najmniejszą naturalną odporność na żerowanie *R. dominica* lub *S. oryzae* lub odporność pośrednią na żerowanie *R. dominica* lub *S. oryzae*. Naturalną odporność ziarna definiowano jako zdolność do ograniczania liczebności pokolenia potomnego szkodnika, przyjmując założenie, że im liczniejsze pokolenie potomne rozwijało się na ziarnie danej odmiany, tym była ona mniej odporna. Wybrane odmiany zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2

Odmiany jęczmienia oraz pszenicy wybrane do analiz w IV etapie badawczym

Gatunek	Odporność na żerowanie szkodnika		
	Wysoka	Średnia	Niska
	S. oryzae		
Pszenica	Telimena	Impresja	Rusałka
Jęczmień	Dante	Ismena	Radek
	R. dominica		
Pszenica	Rusałka	Varius	Impresja
Jęczmień	Radek	Ismena	Trofeum

3.2.2 Wykorzystane gatunki szkodników magazynowych – hodowle mateczne

W doświadczeniach zostały wykorzystane dwa gatunki szkodników magazynowych kapturnik zbożowiec (*Rhyzopertha dominica* F.) oraz wołek ryżowy (*Sitophilus oryzae* L.). Owady pochodziły z hodowli masowej prowadzonej w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, gdzie stale monitorowany jest rozwój owadów, a wielkość kolonii jest regulowana. Część chrząszczy na potrzebę badań wykonywanych w ramach pracy doktorskiej została oddzielona, a chrząszcze były namnażane. Hodowla była prowadzona w kontrolowanych warunkach temperatury (30°C) i wilgotności (70%) w komorze hodowlanej (Sanyo MLR-350H), a wartości tych parametrów były skorelowane z najlepszym siedliskiem dla rozwoju tych chrząszczy (Gołębiowska i in., 1976).

Rozwój chrząszczy przebiegał na 500 g próbkach ziarna pszenicy, umieszczonych w plastikowych pojemnikach, o pojemności jednego litra. W celu zapewnienia dostępu powietrza w pokrywkach wykonano otwory wentylacyjne. Do dalszych doświadczeń wykorzystane zostały młode (1–2-dniowe) dorosłe chrząszcze. Ich pozyskiwanie przebiegało według schematu:

- po 40 osobników *R. dominica* lub *S. oryzae* zostało przeniesionych na 500 g próbkę ziarna pszenicy;
- hodowle obu gatunków chrząszczy były prowadzone oddzielnie, każda w 10 powtórzeniach;
- po upływie 20 dni osobniki dorosłe, wcześniej naniesione, zostały usunięte z pojemników;
- wylęgające się młode osobniki (1–2-dniowe) zostały użyte w dalszych etapach eksperymentu.

3.3 Metody

3.3.1 Badanie wpływu antybiotyków na mikrobiom kapturnika zbożowca i wołka ryżowego (H1, H2)

Rodzaje zastosowanych antybiotyków, metody aplikacji oraz ocena przeżywalności chrząszczy

W doświadczeniu 1 zbadano rozwój *S. oryzae* i *R. dominica* skarmianych krążkami waflowymi, wykonanych z mąki pszennej z dodatkiem gentamycyny (Sigma Aldrich/MERCK, Niemcy) w różnych stężeniach: 50 $mg \cdot g^{-1}$, 40 $mg \cdot g^{-1}$, 30 $mg \cdot g^{-1}$, 20 $mg \cdot g^{-1}$ i 10 $mg \cdot g^{-1}$. Wybór gentamycyny oraz dawki oparto na wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na Coleoptera, dotyczących wewnętrznych symbiotycznych mikrobiomów (Yang i in., 2015). Na 100 mg krążek wafla pszennego nakrapiano 100 µL antybiotyku w określonym stężeniu. Jako kontrola zastosowano wafel pszenny z dodatkiem 100 µL sterylnej wody demineralizowanej. Tak przygotowane wafle umieszczono na płytkach Petriego. Następnie na każdą płytkę Petriego naniesiono 10 świeżo wylęgłych osobników dorosłych *S. oryzae* lub *R. dominica*. Owady karmiono przez okres siedmiu dni, monitorując w 1, 3, 5 i 7 dniu doświadczenia ich przeżywalność. Podczas każdego pomiaru pobierano również owady do dalszych analiz. Każdy wariant wykonano w czterech powtórzeniach **(P1).**

Analiza mikrobiologiczna, analiza biochemiczna oraz analiza mikrobiomu:

Przygotowanie próbek do analiz

Posługując się mikroskopem stereoskopowym, w warunkach sterylnych, zapewnionych przez pracę pod komorą laminarną, pobrano wnętrzności wraz z przewodem pokarmowym *S. oryzae* i *R. dominica*. Każda zhomogenizowana próbka składała się z trzech osobników z każdego wariantu. Chrząszcze hibernowano w temperaturze –80°C przez 5 minut, następnie powierzchnię ciała wysterylizowano 70% etanolem i dokładnie przepłukano sterylnym roztworem soli fizjologicznej (NaCl) o stężeniu 0,85% lub wodą demineralizowaną

w przypadku izolacji DNA. W warunkach ograniczających zanieczyszczenie, usunięto chitynowe części owada oraz głowę. Sterylne próbki zhomogenizowano poprzez zmielenie z dodatkiem korundu (Średnica ziaren (φ) < 0,1 mm) w 1,5 ml probówce Eppendorf. Podczas przygotowania zhomogenizowanych próbek do izolacji DNA dodano także 0,1 ml buforu zawiesinowego składającego się z Tween 80 (0,005%) i soli fizjologicznej (0,85% NaCl) **(P1).**

Analiza mikrobiologiczna

W celu określenia liczby bakterii, zhomogenizowany materiał dziesięciokrotnie rozcieńczono w sterylnym roztworze soli fizjologicznej (NaCl 0,85%) i naniesiono na szalki Petriego z podłożem TSA (Trypticase Soy Agar MERCK, Niemcy). Następnie przeprowadzono inkubację przez 48 godzin w temperaturze 28°C, po czym policzono jednostki tworzące kolonie (CFU) **(P1).**

Analiza biochemiczna

W celu wykonania analiz biochemicznych uzyskany zhomogenizowany materiał rozcieńczono w 1 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej (NaCl 0,85%). Przed wykonaniem testów biochemicznych, część przygotowanej zawiesiny przeniesiono do wody peptonowej zmieszanej z 1% TSB (Tryptic soy broth, Merck, Niemcy) i inkubowano przez noc w temperaturze 28°C (Przemieniecki i in., 2020, 2022). Po całonocnej inkubacji, prekultury rozcieńczono do odpowiedniej gęstości optycznej dla zastosowanych zestawów testowych API NE i API ZYM. Testy następnie przeprowadzono zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta (Biomerieux, Francja). Zestawy testowe inkubowano w temperaturze 28°C przez 24 h w przypadku API 20 NE i przez 4 h w przypadku API ZYM. Po okresie inkubacji zostały odczytane wyniki, poprzez porównanie uzyskanych natężeń kolorów poszczególnych reakcji z referencjami **(P1).**

Izolacja DNA

W celu wykonania izolacji DNA zhomogenizowane próbki przeniesiono do 2 ml probówek Eppendorf zawierających kulki i bufor lizy, a następnie zhomogenizowano w homogenizatorze TissueLyser LT (Qiagen, Niemcy). Lizę prowadzono przez 5 min przy maksymalnej prędkości (50 oscylacji na sekundę). Dalsze etapy analizy przeprowadzono zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu do izolacji. Po homogenizacji DNA wyizolowano z zebranego materiału przy użyciu zestawu QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Niemcy), a stężenia w każdej próbce określono ilościowo metodą fluorometryczną przy użyciu fluorometru Quantus™ Fluorometer (Promega, Niemcy) **(P1).**

Przygotowanie biblioteki nanoporowej, sekwencjonowanie oraz basecalling

Sekwencjonowanie przeprowadzono na podstawie zestawu „16S Barcoding Kit 1–24 (SQK-16S024)" (Oxford Nanopore Technologies, 2019). Całkowite DNA wyizolowane z owadów poddano reakcji PCR z czterema różnymi kodami kreskowymi połączonymi z primerami obejmującymi cały region 16S rRNA bakterii wchodzących w skład zestawu 16S Barcoding Kit 1–24 (SQK-16S024, Oxford Nanopore). Uzyskane amplikony oczyszczono przy użyciu Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). W celu standaryzacji biblioteki przeprowadzono pulowanie, aby uzyskać mieszaninę próbek zawierającej 20 fmol amplikonów o wielkości ~1500 pb w 10 µl. Następnie do 5 µl biblioteki dodano 0,5 µl adaptera do szybkiego sekwencjonowania. Do sekwencjonowania użyto komory przepływowej Flongle. Sekwencjonowanie i basecalling przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MinKnow. Uzyskane dane (~60 000 odczytów) zostały przeanalizowane na platformie EPI2ME (Metrichor™ Ltd.) przy użyciu WIMP (What's In My Pot) **(P1).**

3.3.2 Analiza składu chemicznego ziaren

Analiza składu chemicznego ziarna **(P2-P4)** została wykonana w Katedrze Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, gdzie zostało oznaczone białko ogólne, węglowodany rozpuszczalne w wodzie, włókno surowe, sucha masa, popiół surowy, tłuszcz surowy i zawartość kwasów tłuszczowych w 20 badanych odmianach pszenicy i jęczmienia. Wszystkie analizy zostały wykonane zgodnie z metodykami AOAC – Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2016). W Katedrze Chemii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie został oznaczony potencjał antyoksydacyjny badanych odmian pszenicy i jęczmienia.

Białko ogólne

Zawartość białka ogólnego w badanych próbach określono na podstawie zawartości azotu ogólnego (N) przy zastosowaniu metody Kjeldahla. Następnie przeliczono zawartość azotu na zawartość białka ogólnego poprzez przemnożenie uzyskanej wartości przez stałą wartość 6,25.

WSC (węglowodany rozpuszczalne w wodzie)

Oznaczanie zawartości cukrów dokonano metodą antronową (Thomas, 1977), przy użyciu spektrofotometru EPoll 20 BIO (Poll Limited Sp. z o.o., Warszawa, Polska).

Włókno surowe

Włókno surowe zostało oznaczone za pomocą klasycznej metody Henneberga-Stohmanna, oznaczania zawartości włókna surowego paszy – metoda z pośrednią filtracją.

Sucha masa

Sucha masa została oznaczona metodą suszarkową, polegającą na wysuszeniu wcześniej rozdrobnionej próby, w temperaturze 105°C, przez 5–8 godzin do uzyskania stałej masy. Brak zmiany masy próbki, przechowywanej w eksykatorze do uzyskania temperatury otoczenia został potwierdzony przez trzykrotne jej zważenie. Dla każdego powtórzenia odważka stanowiła 5 g.

Popiół surowy

Oznaczenie zawartości popiołu surowego polegało na spaleniu powietrznie suchej próbki w piecu muflowym w temperaturze 500–550°C przez 5–6 godzin. Dla każdego powtórzenia odważka stanowiła 5 g. Masa próbki była oznaczana przed i po spopieleniu.

Tłuszcz surowy

Oznaczenie tłuszczu surowego wykonano przy pomocy metody ekstrakcyjnej przy wykorzystaniu aparatu Soxhleta.

Kwasy tłuszczowe

Pierwszym krokiem w oznaczeniu zawartości kwasów tłuszczowych była ekstrakcja tłuszczu z badanych próbek metodą Soxhleta. Następnie przygotowano estry metylowe kwasów tłuszczowych, według zmodyfikowanej metody Peiskera (stosując mieszaninę metanolu, chloroformu i stężonego kwasu siarkowego w proporcji 100:100:1 v/v) (Żegarska i in., 1991), które użyto do oznaczania składu kwasów tłuszczowych. Rozdział i oznaczanie kwasów tłuszczowych przeprowadzono techniką chromatografii gazowej, korzystając z chromatografu gazowego Varian CP–3800 wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), kolumnę kapilarną o długości 50 m (średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm) i dozownik (split 50:1). Wielkość nanoszonej próbki wynosiła 1 μl. Temperatura detektora wynosiła 250˚C, dozownika 225˚C, a kolumny 200˚C. Gazem nośnym był hel o przepływie 1,2 $ml \cdot min^{-1}$. Identyfikację kwasów tłuszczowych przeprowadzono poprzez porównanie czasów retencji pojedynczych wzorców estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Sigma-Aldrich) z pikami w badanej próbce. Względną zawartość kwasów tłuszczowych wyrażono jako procent całkowitej powierzchni wszystkich kwasów tłuszczowych zawartych w próbce.

Zdolność antyoksydacyjna

Zdolność antyoksydacyjną próbek określono metodą Benziego i Strain z pewnymi modyfikacjami (Benzie i Strain, 1996). Odczynnik FRAP przygotowano przez zmieszanie 25 ml 0,3 M buforu octanowego, 2,5 ml 10 mM roztworu TPTZ (2,4,6-trirydylo-s-tiazyny) i 2,5 ml 20 mM $FeCl_3 \cdot$Roztwór $6H_2O$. Następnie przed użyciem, mieszaninę inkubowano przez 10 minut w ciemnym miejscu. Kwas askorbinowy został zastosowany jako wzorzec i woda

destylowana jako ślepa próba. Odpowiednio rozcieńczoną próbkę lub wzorzec (0,1 ml) dodano do 4,0 ml odczynnika FRAP w celu utworzenia mieszaniny. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w ciemności, a absorbancję mierzono przy 593 nm w stosunku do ślepej próby przygotowanej przy użyciu wody destylowanej. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej wykorzystano wzorce kwasu askorbinowego w zakresie od 0,01 do 0,2 $mg \cdot ml^{-1}$.

3.3.3 Badanie parametrów rozwojowych *R. dominica* i *S. oryzae* (H3, H4)

Opis eksperymentu

W doświadczeniu 2 **(P2)** analizowano rozwój kapturnika zbożowca i wołka ryżowego na ziarnie 10 odmian pszenicy i 10 odmian jęczmienia. Ziarno przed rozpoczęciem doświadczenia było kondycjonowane w komorze hodowlanej (Sanyo MLR-350H) przez 7 dni w temperaturze 30°C i RH 80%, a następnie przesiane przez sito o oczkach 1 mm, w celu odsiania pyłu. W winidurowych pojemnikach (z otworem wentylacyjnym) o średnicy 8 cm i wysokości 3 cm umieszczono 20 g próbki ziarna każdej z odmian. Na każda próbkę naniesiono 20 osobników wołka ryżowego lub kapturnika zbożowca w stosunku płci 1: 1. Po 2 tygodniach osobniki dorosłe zostały usunięte z pojemników i rozpoczęto monitoring na obecność wylegających się młodych, potomnych osobników chrząszcza. Doświadczenie zostało zakończone w momencie, gdy na materiale nie odnotowano pojawu chrząszczy w przeciągu 10 dni. Doświadczenie było prowadzone w komorze klimatyzacyjnej Sanyo MLR-350H w warunkach optymalnych dla badanych gatunków, tj. 30°C, RH 80% (Gołębiowska i in., 1976). Badania prowadzono w 10 powtórzeniach.

W doświadczeniu 3 i 4 **(P3 i P4)** analizowano rozwój kapturnika zbożowca i wołka ryżowego na 3 odmianach pszenicy i 3 odmianach jęczmienia sklasyfikowanych jako odmiany odporne, nieodporne i o pośredniej odporności na żerowanie *R. dominica* lub *S. oryzae*. Odmiany wybrane do tego doświadczenia zostały przedstawione w podrozdziale 3.2.1. Dwadzieścia 1–2-dniowych dorosłych chrząszczy *R. dominica* lub *S. oryzae* w stosunku płci 1:1 umieszczono na 500 g próbkach ziarna w szklanych pojemnikach o pojemności 1 litra. Siatka szyfonowa zabezpieczała otwory pojemników, umożliwiając dostęp powietrza i zapewniając wentylację. Badania prowadzono w 3 powtórzeniach na wariant.

Parametry monitorowane w trakcie eksperymentu

Po zakończeniu głównej części doświadczenia 2, 3 i 4 (opisanych w podrozdziale 3.3.3: Badanie parametrów rozwojowych *R. dominica* i *S. oryzae* – Opis eksperymentu), wykonano pomiary masy pyłu powstałego po żerowaniu chrząszczy oraz zważono ziarno po żerowaniu chrząszczy przy użyciu wagi laboratoryjnej WPS 220/C/2. Następnie określono ubytek masy

ziarna (konsumpcję) poprzez odjęcie od masy początkowej ziarna (20 g) masę ziarna po żerowaniu chrząszczy. Określono również sumę wylęgłych imagines dla każdej z badanych próbek poprzez zsumowanie wyjętych owadów podczas trwania monitoringu na obecność wylegających się młodych, potomnych osobników *R. dominica* i *S. oryzae*. W przypadku doświadczenia 3 i 4 wykonano również pomiar masy wylęgłych owadów przy użyciu wagi laboratoryjnej (Radwag model AS 110.X2.).

3.3.4 Ocena wpływu właściwości chemicznych ziaren badanych zbóż i ich różnych odmian na mikrobiom kapturnika zbożowca i wołka ryżowego (H5, H6, H7)

Ocena wpływu właściwości chemicznych ziaren badanych zbóż i ich różnych odmian na mikrobiom kapturnika zbożowca i wołka ryżowego **(P3 i P4)** została przeprowadzona w oparciu o analizy właściwości chemicznych badanych ziarniaków zbóż (opis wykorzystanych metod został przedstawiony w podrozdziale 3.3.2 Analiza składu chemicznego ziaren), analizę biochemiczną i analizę mikrobiomu.

Przygotowanie próbek do analiz

Przygotowanie próbek do analiz zostało przeprowadzona zgodnie w opisem przedstawionym w podrozdziale 3.3.1, z drobną zmianą. Zhomogenizowana próbka składała się z 10 osobników z każdego wariantu.

Analiza biochemiczna

Aktywność biochemiczna i wykorzystanie źródeł węgla w przewodzie pokarmowym *S. oryzae* i *R. dominica* oceniano za pomocą testów API ZYM i API 20 NE (Biomerieux, Francja), zgodnie z metodyką przedstawioną w podrozdziale 3.3.1 (analiza biochemiczna) (**P3** i **P4**).

Analiza mikrobiomu

Materiał genetyczny został wyizolowany przy użyciu zestawu Soil Purification Kit (EURx), a sekwencjonowanie przeprowadzono przy użyciu „16S Barcoding Kit 1–24 (SQK-16S024)". Do amplifikacji 16S rRNA bakterii wykorzystano 24 startery barkodowe i polimerazę HiFi ToughMix repliQa (Quantabio USA, MA). Procedury tworzenia i łączenia bibliotek były zgodne z wytycznymi dostawcy polimerazy (Rapid 16S Metagenomic Library Preparation for Oxford Nanopore Technologies (ONT)® Platform). Sekwencjonowanie odbyło się na komorze przepływowej typu flongle z wykorzystaniem oprogramowania MinKnow. Uzyskane dane, obejmujące około 62 000 odczytów, poddano analizie przy użyciu platformy EPI2ME (Metrichor™ Ltd.) z wykorzystaniem przepływów pracy WIMP (What's In My Pot).

Postprocessing i generowanie tabeli OTU (Operational Taxonomic Unit) przeprowadzono przy użyciu platformy bioinformatycznej BugSeq (www.Bugseq.com) **(P3 i P4)**.

3.3.5 Analiza danych

Analiza wskaźników bioróżnorodności

Różnorodność taksonomiczną analizowanych OTU określono za pomocą wskaźników: dominacji Simpsona (λ), różnorodności Shannona (H') i parzystości Pielou (J'). Wskaźniki różnorodności i krzywe rozrzedzenia uzyskano za pomocą programu PAST 4.13 (Hammer i in., 2001). Klasy dominacji zostały określone zgodnie z wcześniejszymi pracami (Przemieniecki i in., 2021) **(P1 i P4).**

Analiza statystyczna

Dane z analiz mikrobiologicznych i przeżywalności owadów skarmianych antybiotykiem przetestowano najpierw pod kątem normalności rozkładu (test Shapiro–Wilka) i jednorodności wariancji (test Levene'a), a następnie różnice między wynikami określono testem Kruskala–Wallisa (na poziomie istotności określonym testem Dunna z poprawką Bonferroniego). Wyniki przedstawiono jako wykresy boxplot podzielone na kwartyle z medianą i średnią. Obliczenia statystyczne danych z testu przeżywalności przy różnych dawkach antybiotyku wykonano w oparciu o test Kaplana–Meyera. Zależności między obserwacjami określono na podstawie macierzy korelacji Pearsona oraz aglomeracyjnego grupowania hierarchicznego (AHC) opartego na metodzie Warda. Mapy cieplne właściwości biochemicznych sporządzono w oparciu o scentralizowany i zredukowany zestaw danych. Obliczenia statystyczne i ich interpretację graficzną wykonano przy użyciu programu X-lstat i XLSTAT-R (Lumivero, 2023)**(P1)**.

Wyniki, opisujące skład chemiczny badanych odmian jęczmienia i pszenicy, a także parametry związane z rozwojem chrząszczy (liczebność potomstwa, masa wytworzonego pyłu oraz ubytek masy ziarna), poddano ocenie rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dane, które nie miały rozkładu normalnego (przeciwutleniacze, sucha masa, popiół, białko, włókno) poddano transformacji logarytmicznej (ln x+1). Do oceny istotności różnic w badanych zmiennych pomiędzy kombinacjami użytych odmian zbóż zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Grupy o statystycznie nieróżniących się średnich wartościach badanych parametrów związanych z rozwojem szkodników oznaczono tym samym indeksem literowym: a, b, c.... (test HSD Tukeya). Różnice pomiędzy badanymi gatunkami i formami ziarniaków, w zależności od ich składu chemicznego, przedstawiono za pomocą niemetrycznego skalowania wielowymiarowego (NMDS), wykorzystując miarę podobieństwa

Braya-Curtisa. Do statystycznej oceny różnic zastosowano nieparametryczny test ANOSIM (Clarke 1993). Graficzna ocena zależności między składem chemicznym ziarna a liczebnością potomstwa szkodnika przeprowadzono przy użyciu technik porządkowania – RDA (Braak i Šmilauer 1998). Obliczenia statystyczne i ich interpretację graficzną wykonano przy użyciu programów Statistica 13.1, Canoco 4.51 i Past 2.01 **(P2)**.

Uzyskane dane z biometrii *S. oryzae* i składu ziarna po żerowaniu chrząszczy na wybranych odmianach pszenicy i jęczmienia przetestowano najpierw pod kątem normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka). Następnie określono różnice między wariantami metodą Kruskala-Wallisa (test Dunna). W przypadku biometrii, składu chemicznego ziarna, parametrów biochemicznych kwasów tłuszczowych i bakteriobiomów przeprowadzono analizę odmienności w oparciu o macierz Braya-Curtisa, a następnie utworzono dendrogramy metodą Warda. Różnice między bakteriobiomami określono za pomocą PERMANOVA (Adonis ANOVA). W celu określenia zależności pomiędzy wszystkimi parametrami uzyskanymi w badaniu przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) w oparciu o macierz korelacji Pearsona. Cechy, które osiągnęły niskie wartości przynależności do ordynacyjnej F1 lub F2 zostały usunięte na wykresie w celu ułatwienia interpretacji wyników. Analizy statystyczne przeprowadzono w programie XLSTAT i module XLSTAT-R (Lumivero, 2023) **(P3)**.

Właściwości chemiczne ziarna i cechy rozwojowe *R. dominica* żerujących na wybranych odmianach pszenicy i jęczmienia, zostały przetestowane pod kątem rozkładu normalnego i jednorodności wariancji. Różnice między wynikami określono za pomocą ANOVA (test Tukeya) lub Kruskala-Wallisa (test Dunna). Dodatkowo przeprowadzono NMDS w obrębie gatunków w oparciu o macierz różnorodności Braya-Curtisa. W celu określenia zróżnicowania między biomami bakteryjnymi i wpływu czynników na różnorodność zastosowano testy PERMANOVA i ANOSIM (XLSTAT-R vegan). Aglomeracyjna hierarchiczna analiza skupień (AHC) podobieństwa mikrobiomów została obliczona w oparciu o metodę Braya-Curtisa, a dendrogramy zostały skonstruowane w oparciu o metodę Warda. Przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) w oparciu o macierz korelacji Pearsona, uwzględniając dane mikrobiomu (OTU> 1%), aktywność metaboliczną i przewidywane właściwości fizjologiczne drobnoustrojów oraz parametry chemiczne ziarna. Skonstruowano również mapy cieplne dla przewidywanych funkcji metabolicznych i właściwości aktywności metabolicznej w oparciu o dane znormalizowane do N. Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu XLSTAT (Lumivero, 2023) **(P4)**.

Analiza bioinformatyczna

Baza danych MACADAM (Le Boulch i in., 2019) została wykorzystana do zbadania przewidywanych funkcji społeczności drobnoustrojów, a FAPROTAX do funkcji metabolicznych (Louca i in., 2016). Modelowanie ścieżek metodą najmniejszych kwadratów (PLS-PM) przeprowadzono przy użyciu znormalizowanych danych wagowych dla zmiennych jawnych, z centroidem jako oszacowaniem wewnętrznym i 95% przedziałami ufności (bootstrap: 100 prób). Analizę sieci przeprowadzono przy użyciu algorytmu AxisForce 2 w trybie LinLog (Jacomy i in., 2014) opartym na macierzy korelacji Spearmana dla krawędzi i średniej każdej zmiennej dla węzłów (Bastian i in., 2009) **(P4)**.

4. OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Publikacja nr 1

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W. i Nietupski, M. (2023). **The effect of antibiotics on bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy in grain stores.** Applied Sciences, 13(3), 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576 **(P1) [ETAP I]**

Geneza

Geneza pierwszej pracy naukowej wynikła ze współpracy z wcześniejszym zespołem naukowym, badającym zdolność biotransformacji polimerów syntetycznych i naturalnych przez mącznika młynarka (Przemieniecki i in. 2020, Przemieniecki i in. 2022). Dzięki pracy z zespołem z UWM i korespondencji zespołu ze światowej klasy specjalistą Weimin Wu z Stanford University, USA w przypadku wołka ryżowego i kapturnika zbożowca udało się zastosować antybiotyk bezpieczny dla owadów, który skutecznie eliminuje bakteriobiom wewnętrzny u owadów.

Cele szczegółowe

Celem przedstawionych badań była identyfikacja i charakterystyka mikrobiomu, a w szczególności bakteriobomu, dwóch gatunków szkodników magazynowych, wołka ryżowego i kapturnika zbożowca, przy użyciu sekwencjonowania nanoporowego. Dodatkowo wykonano sterylizację wewnętrznego mikrobiomu tych owadów, w celu określenia śmiertelnych skutków różnych dawek antybiotyków, opisanie wynikających z tego zmian metabolicznych u owadów, a także zdefiniowanie roli pełnionej przez mikrobiom na funkcjonowanie badanych szkodników.

Na podstawie postawionych celów oraz hipotez zostało przeprowadzone doświadczenie. Z powszechnej wiedzy literaturowej wiadomo, że chrząszcze *Sitophilus* spp. do swojego rozwoju potrzebują symbiontów m.in. bakterię *Sodalis pierantonius*. Bakterie te produkują prekursory DOPA, które powodują stabilizację egzoszkieletu u młodych osobników dorosłych. Na początku tej fazy rozwoju owada *S. pierantonius* staje się dominantem, podczas gdy przez resztę rozwoju znajduje się w bakteriobiomie w formie utajonej. W przypadku *Rhyzopertha* spp. społeczność bakterii jest bardziej elastyczna, złożona z bakteriobiomu wchodzącego w symbiozę o charakterze fakultatywnym. Te nieobligatoryjne różne taksony bakterii odpowiadają zarówno za biosyntezę niektórych prekursorów substancji wykorzystywanych przez *R. dominca*, ale też stymulują układ immunologiczny owada.

Omówienie uzyskanych wyników

Aby móc sprostać odpowiedzi na postawione cele, w pierwszej kolejności wykonano sekwencjonowanie metabarkodingowe 16S rRNA dzięki czemu udało się ustalić, że tak jak zostało to założone, gatunek *S. pierantonius*, jako jedyny, znalazł się w klasie dominantów w bakteriobiomie *S. oryzae*. Potwierdził to też bardzo wysoki współczynnik dominacji Simpsona. Określono też skład bakteriobiomu *R. dominica*. Typowymi symbiontami fakultatywnymi były *Ca Sulcia, Ca Walczuchella, Ruminococcus, Blattabacterium* oraz rzadziej spotykany *Cellulosilyticum* sp. Należy zwrócić uwagę, że *Sulcia* również należała do klasy eudominantów, niemniej jednak jej udział w zbiorowości bakterii był prawie trzykrotnie niższy niż *Sodali*s spp. (Fig. 1, Tab. 1; **P1**). Po tym kroku przystąpiono do eksperymentu właściwego.

Przeprowadzenie doświadczenia z różnymi dawkami gentamycyny w pokarmie, wraz z zastosowaniem testu przeżywalności Kaplana-Meyera pozwoliło na otrzymanie przejrzystych wyników. W przypadku wołka ryżowego zaobserwowano, że już średnia dawka antybiotyku (30 mg g^{-1}) wywiera istotnie letalny efekt na dorosłe osobniki tego gatunku. Kapturnik zbożowiec, który żerował na tym samym pokarmie wykazywał odporność na sterylizację wewnętrznego bakteriobiomu (Fig. 3; **P1**). Ważną obserwacją było także powiązanie aktywności α-chymotrypsyny oraz esteraz i lipaz przewodu pokarmowego z przeżywalnością owadów (Fig. 6; **P1**).

Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań świadczą o tym, że w aspekcie krótkoterminowym *S. oryzae* umiera bez symbiontów bakteryjnych, natomiast *R. dominica* wykazuje możliwość przeżycia krótkiego okresu w przypadku braku pożytecznych mikroorganizmów bakteriobiomu. Świadczy to o tym, że przeżycie owadów jest zależne od symbiontów obligatoryjnych. Usunięcie symbiotycznego bakteriobiomu powoduje poważne zmiany w potencjale biochemicznym owada. Potwierdzenie, że niektóre owady wchodzą w interakcje symbiotyczne z bakteriobiomem, sugeruje potrzebę szeroko zakrojonych badań podatności szkodnika na utratę symbiotycznego mikrobiomu, co może otworzyć nową ścieżkę w strategiach zwalczania szkodników w magazynach.

Pod względem praktycznego zastosowanie niniejszych wyników badań potencjalnie jesteśmy w stanie wyselekcjonować substancje bakteriostatyczne pochodzenia naturalnego lub będące wynikiem postępu odmianowego hodowli roślin, które mogą oddziaływać na bakteriobiom owadów, co w rezultacie doprowadzi do śmierci szkodnika. Takie podejście pozwoli ograniczyć stosowanie syntetycznych środków owadobójczych. Należy zwrócić uwagę, że zaburzenia w funkcjonowaniu niektórych enzymów odpowiedzialnych za

metabolizm białek oraz kwasów tłuszczowych mogą mieć wpływ na sukces żerowania owadzich szkodników magazynowych.

Publikacja nr 2

Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). **The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.).** Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254 **(P2) [ETAP II]**

Geneza

Ze względu na odmienną przeżywalność kapturnika zbożowca i wołka ryżowego uwarunkowaną zarówno fizjologią owada, jak i relacją z symbiontami w kolejnych zadaniach podjęto aspekt postępu odmianowego w ograniczaniu występowania szkodników magazynowych. Ideą tego podejścia było sprawdzenie, czy w polskiej bazie odmian pszenicy i jęczmienia istnieją odmiany, które ze względu na swój zestaw cech są w stanie przeciwdziałać lub ograniczyć straty powodowane przez owadzie szkodniki magazynowe [ETAP II]. Z puli dostępnych odmian wyselekcjonowano te o skrajnie różnych cechach chemicznych [ETAP III], które posłużyły jako materiał do określenia relacji pomiędzy rozwojem owadów, a ich mikrobiomem [ETAP IV], opisanych w dalszej części dysertacji.

Cele szczegółowe

Koncentrując się na szczegółowym badaniu wpływu poszczególnych składników chemicznych ziarna na rozwój dwóch gatunków szkodników magazynowych: wołka ryżowego i kapturnika zbożowca, celem tych badań było głębsze zrozumienie mechanizmów odporności zbóż. Badania miały być początkiem do opracowania nowych odmian o naturalnie zwiększonej odporności na szkodniki. W badaniach skupiono się także na zaproponowaniu alternatywy dla stosowania pestycydów, co wpisuje się w szeroko pojętą ideę rozwoju zrównoważonego rolnictwa.

Omówienie uzyskanych wyników

Na podstawie analizy wyników stwierdzono, że na ziarnie jęczmienia kapturnik zbożowiec osiągnął dwa razy większą liczebność osobników potomnych niż na ziarnie pszenicy. Odwrotne relacje zaobserwowano w przypadku wołka ryżowego. Na podstawie szczegółowych wyników zaobserwowano istotny wpływ odmian pszenicy na rozwój kapturnika zbożowca, gdzie wyodrębniono pięć grup jednorodnych ($p<0.05$). Największą liczbą osobników potomnych charakteryzowała się odmiana Impresja (średnio 104 osobniki),

a najniższą Rusałka (średnio 9 osobników). W przypadku wołka ryżowego nie zaobserwowano zróżnicowania rozrodczości w zależności od odmian pszenicy (Tab. 1; **P2**).

Rozwój owadów na odmianach jęczmienia był istotnie zróżnicowany u obu gatunków. U kapturnika zbożowca wyodrębniono cztery grupy jednorodne, a u wołka ryżowego pięć grup. Najwyższą liczbę osobników potomnych *R. dominica* zaobserwowano na odmianie Trofeum (średnio 165 osobników), a najniższą na odmianie Radek (średnio 17 osobników), natomiast *S. oryzae* charakteryzował się najwyższą rozrodczością na odmianie Radek (średnio 217 osobników), a najniższą na odmianie KWS Dante (średnio 65 osobników) (Tab. 1; **P2**).

Analizując wartości wybranych parametrów fizykochemicznych ziaren pszenicy i jęczmienia stwierdzono, że jęczmień charakteryzował się wyższą średnią zawartością popiołu surowego, tłuszczu surowego, włókna surowego, WSC i antyoksydantów. Pszenica natomiast charakteryzowała się wyższą zawartością białka i suchej masy. Odmiany w obrębie gatunków charakteryzowały się istotną zmiennością w obrębie wszystkich analizowanych cech chemicznych (Tab. 1, Fig. 1; **P2**).

Na podstawie analizy RDA stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy liczebnością pokolenia potomnego wołka ryżowego, a zawartością kwasów tłuszczowych w ziarnie jęczmienia i ujemną korelację z zawartością WSC. Wysoka zawartość białka w ziarnie jęczmienia skorelowana była natomiast ze wzrostem liczebności pokolenia potomnego kapturnika zbożowca (Fig. 2A; **P2**). Analizując badane odmiany pszenicy liczebność pokolenia potomnego kapturnika zbożowca była dodatnio skorelowana z zawartością włókna surowego. Wzrastająca liczebność pokolenia potomnego *S. oryzae* natomiast była umiarkowanie skorelowana z ogólną zawartością antyoksydantów (Fig. 2B; **P2**).

Podsumowanie

R. dominica i *S. oryzae* są niebezpiecznymi owadzimi szkodnikami magazynowym. Ich szkodliwość jest szczególnie duża, gdy posiadają one dogodne warunki rozwoju. Rozwój *R. dominica* i *S. oryzae* na analizowanym ziarnie 10 odmian pszenicy i 10 odmian jęczmienia był wyraźnie zróżnicowany. *R. dominica* znacznie lepiej rozwijał się na badanych odmianach jęczmienia, natomiast *S. oryzae* na badanych odmianach pszenicy.

Dodatkowo badania te potwierdzają, że skład chemiczny pożywienia, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości fenoli, kwasów tłuszczowych i białka, może odgrywać kluczową rolę w regulacji cyklu życiowego wołka ryżowego i kapturnika zbożowca. Odmiany zbóż o wysokiej zawartości białka i tłuszczu są bardziej atrakcyjne dla *R. dominica* i *S. oryzae*, a przeciwutleniacze zawarte w ziarnie stanowią naturalną barierę przed szkodnikami. Praca ta wnosi istotny wkład w zrozumienie złożonych interakcji między składem chemicznym

pożywienia, a aspektami biologicznymi *S. oryzae* i *R. dominica*, co może znaleźć zastosowanie w strategiach kontroli tych owadzich szkodników magazynowych.

Publikacja nr 3

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). **Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.).** International Agrophysics, 38(2), 165–176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216 **(P3) [ETAP III i IV]**

Geneza

Na podstawie literatury wiadomo, że kwasy tłuszczowe mają istotny udział w rozwoju szkodników owadzich. Jednak na podstawie P1, możemy stwierdzić, że prawdopodobnie ich metabolizm ściśle związany jest także z mikrobiomem. Bazując na tym założeniu oprócz podstawowych cech chemicznych ziarna analizowano też wpływ profilu kwasów tłuszczowych i innych parametrów chemicznych ziarna na rozwój, jak i na zmiany społeczności bakterii u owadów. W niniejszej publikacji podjęto próbę skorelowania uzyskanych wyników badań oraz powiązaniu ich zmienności z rozwojem wołka ryżowego, rearanżacjami struktury bakteriobiomu i zmiennością cech fizjologicznych przewodu pokarmowego.

Cele szczegółowe

Celem przeprowadzonych analiz było zbadanie wpływu zróżnicowanych właściwości chemicznych ziarna różnych odmian pszenicy i jęczmienia, na zaburzenia w procesie żerowania owadów oraz zmiany w strukturze mikrobiomu wołka ryżowego. W badaniach podjęto próbę identyfikacji chemicznych cech zbóż, które mogą korelować z ich wyższą naturalną odpornością na żerowanie *S. oryzae,* skupiając się jednocześnie na analizie wpływu właściwości chemicznych zbóż na metabolizm oraz mikrobiom *S. oryzae*, co pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za naturalną odporność badanych zbóż na szkodniki magazynowe.

Omówienie uzyskanych wyników

Na podstawie wyników analizy wariancji (Tab. 1; **P3**) zaobserwowano, że w przypadku jęczmienia odmiana Ismena była najchętniej zjadana przez wołka ryżowego (4,145 g), odmianą pośrednią była odmiana Radek (3,218 g), natomiast owad najmniej chętnie żerował na odmianie Dante (2,342 g). W przypadku pszenicy największa konsumpcja została zaobserwowana dla odmiany Telimena (2,791 g) i Impresja (2,316 g), a najmniejsza dla odmiany Rusałka (1,845 g).

Na podstawie tabeli przedstawiającej skład chemiczny badanych odmian ziarna jęczmienia i pszenicy można zauważyć, że jest on różny w zależności od gatunku i odmiany. Odmiany jęczmienia charakteryzowały się niższą zawartością białka oraz cukrów rozpuszczalnych w wodzie w porównaniu do odmian pszenicy. Natomiast zawartość popiołu była wyższa w ziarnie badanych odmian jęczmienia – najwyższą wartość stwierdzono u odmiany Ismena, 2,25%. Dla pszenicy, wartości te były bardziej zbliżone do siebie (około 1,75%). Podobne zależności stwierdzono w przypadku zawartości tłuszczu surowego. Jęczmień miał nieco wyższą zawartość tego składnika, z najwyższą wartością odnotowaną w ziarnie odmiany Ismena (2,2%), natomiast ziarno pszenicy charakteryzowało się niższymi wartościami, ale zbliżonymi do siebie (1,35%–1,75%). Również w odniesieniu do zawartości włókna oraz antyoksydantów, większe wartości odnotowano dla badanych odmian jęczmienia (Tab. 1; **P3**).

Analizując wyniki struktury społeczności bakteriobiomu zaobserwowano, że niezależnie od zastosowanego gatunku i odmiany pszenicy i jęczmienia zawsze dominantem były bakterie rodzaju *Sodalis.* W pierwszym pokoleniu zaobserwowano wysoki udział bakterii z rodzaju *Staphylococcus,* który w drugim pokoleniu został zastąpiony przez *Escherichia* i *Klebsiella*, co było lepiej widoczne w pszenicy (Tab. 2 i Tab. 3; **P3**). W przypadku ziarna odmiany, na której wołek ryżowy żerował najlepiej, tj. odmiana Telimena, zaobserwowano powiązanie z wysokimi wartościami C16:0 i C12:0, włókna surowego, popiołu i esterazy. Ziarno odmiany Impresja, które było mniej chętnie zjadane przez wołka ryżowego charakteryzowało się wyższą zawartością siedmiu kwasów tłuszczowych tj. C17:1, C20:0, C17:0, C15:0, C18:0, C18:1, C20:1. W przypadku ziarna odmiany Rusałka, o istotnie niższej podatności na żerowanie przez badanego owada, stwierdzono zwiększenie udziału bakterii rodzajów *Pseudomonas* i *Sporolactobacillus* w drugim pokoleniu potomnym wołka ryżowego. Rozwój tych dwóch rodzajów bakterii był skorelowany z potencjałem wykorzystania D-mannitolu i D-mannozy oraz cukrów rozpuszczalnych w wodzie. Dla wyżej wymienionej odmiany zaobserwowano również zmniejszenie wykorzystania kwasu jabłkowego, dekanowego, D-maltozy oraz zdolności redukcji azotanów, aktywności α-chymotrypsyny i α-glukozydazy (Fig. 3; **P3**). W przypadku ziarna jęczmienia odmianą podatną na żerowanie wołka ryżowego była odmiana Ismena, co przejawiło się największym ubytkiem masy ziarna. Spośród badanych cech dla tego wariantu zaobserwowano najwyższe wartości dla masy imago, zawartości popiołu surowego, tłuszczu surowego, antyoksydantów i kwasu tłuszczowego C17:1, aktywności α-fukozydazy, fosfatazy alkalicznej, proteazy, esterazy (C8) oraz udziału bakterii rodzaju *Edwardsiella, Escherichia, Klebsiella* w pierwszym pokoleniu wołka ryżowego. Ponadto mikrobiom był

zdolny do wykorzystania 9 analizowanych źródeł węgla. Zaobserwowano również, że w odmianie tej występowała najniższa zawartość włókna surowego. Dla odmiany Radek, charakteryzującej się średnim ubytkiem masy ziarna, zaobserwowano wysoką zawartość czterech kwasów tłuszczowych, tj. C15:0, C12:0, C16:1, C18:0 i białka ogólnego oraz wysoką aktywność α-chymotrypsyny. Odmiana Dante, na której zaobserwowano najsłabsze żerowanie chrząszczy, charakteryzowała się wysoką zawartością węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie, pięciu kwasów tłuszczowych, tj. C16:0, C18:1, C20:1, C14:0, C20:0 oraz wysoką aktywnością arylamidazy walinowej, arylamidazy cystyny, N-acetylo-ß-glukozaminidazy i wykorzystania cytrynianu trisodu. Zaobserwowano również, że w odmianie tej występowała najwyższa zawartość antyoksydantów (Tab. 1, Fig. 4; **P3**).

Podsumowanie publikacji

W przypadku pszenicy nie zaobserwowano wyraźnych powiązań pomiędzy badanymi parametrami ziarna pszenicy a ubytkiem masy ziarna. Mniejszy poziom konsumpcji dla ziarna odmiany Rusałka był związany z zaburzeniem aktywności cech ważnych dla rozwoju zarówno *Sodalis* sp., jak i bezpośredniego funkcjonowania owada. W porównaniu do ziarna innych odmian pszenicy odmiana ta spowodowała zaburzenie aktywności cech fizjologicznych, takich jak aktywność proteolityczna, denitryfikacja i aktywność *α*-glukozydazy w przewodzie pokarmowym *S. oryzae*. Wynika z tego, że istnieje inny czynnik nieuwzględniony w badaniach, wpływający na behawior wołka ryżowego, co w rezultacie przekłada się na zmniejszenie podatności pszenicy na żerowanie szkodnika.

W przypadku jęczmienia zaobserwowano, że zarówno zawartość białka, tłuszczu i cukrów oraz profil kwasów tłuszczowych ma wpływ na żerowanie wołka ryżowego. Wysoka zawartość włókna surowego, niska zawartość popiołu, antyoksydantów oraz odmienny profil kwasów tłuszczowych, co prawda nie wpływają na zaburzenia struktury mikrobiomu, ale oddziałują na zaburzenie funkcjonowania mikrobiomu i tym samym zburzenie rozwoju szkodnika. W przypadku odmiany najmniej podatnej zaobserwowano wysoką aktywność N-acetylo-ß-glukozaminidazy w przewodzie pokarmowym wołka. Enzym ten jest ściśle związany ze stanem zapalnym nabłonka i świadczy o silnym zaburzeniu funkcjonowania owada. Indywidualne cechy odmiany mało podatnej na żerowanie wołka ryżowego prawdopodobnie wpływają bezpośrednio na zaburzenia fizjologiczne trawienia. Niemniej jednak wysoka aktywność enzymów proteolitycznych i wąski zakres wykorzystania źródeł węgla może świadczyć o zmianie profilu metabolizmu bakterii *Enterobacteriaceae* na patogeniczny.

Publikacja nr 4

Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2024). **Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis**. International Journal of Molecular Sciences; 25(18):10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130 **(P4) [ETAP III i IV]**

Geneza

Bazując na założeniach publikacji P2 oraz podejściu do interpretacji wyników w publikacji P3 postanowiono użyć narzędzi analitycznych tłumaczących i skuteczniej wyjaśniających zależności przyczynowo-skutkowe, obejmujące wpływ właściwości chemicznych ziarna badanych odmian i gatunków zbóż na strukturę i funkcjonowanie mikrobiomu *Rhyzopertha dominica*, co w konsekwencji może wpływać na metabolizm u owadów, zdolność do trawienia pokarmu, intensywność żerowania, ich rozwój, a także adaptację do środowiska magazynowego. Ze względu na większe zróżnicowanie bakteriobiomu kapturnika zbożowca w porównaniu do wołka ryżowego oraz dużą liczbę analizowanych zmiennych i ilość uzyskanych wyników zastosowano analizę połączeń (network analysis) oraz modelowanie równań strukturalnych metodą najmniejszych kwadratów (PLS-PM). W celu dogłębnego zrozumienia oddziaływania zastosowanych czynników posłużono się bazą funkcji metabolicznych dla uzyskanych bakteriobiomów.

Cele szczegółowe

Celem niniejszych badań było zbadanie zależności pomiędzy mikrobiomem kapturnika zbożowca a jego rozwojem i żerowaniem. Poświęcono szczególną uwagę wpływowi diety na skład bakteriobiomu oraz na fizjologię owada oraz sprawdzeniu jak różne właściwości chemiczne różnych odmian ziaren pszenicy zwyczajnej i jęczmienia, powodują zaburzenia żerowania *R. dominica* i zmiany w strukturze bakteriobiomu tego szkodnika. Badanie to miało na celu dostarczenie nowych informacji, które mogą być wykorzystane do opracowania skuteczniejszych metod kontroli populacji kapturnika zbożowca oraz minimalizowania strat w magazynach zbożowych.

Omówienie uzyskanych wyników

W przypadku pszenicy zaobserwowano, że największym ubytkiem masy ziarna charakteryzowała się odmiana Varius, pośrednim Rusałka, a najniższym Impresja (Fig. 1 **P4**). W przypadku odmian jęczmienia nie zaobserwowano istotnie różnych zmian w żerowaniu kapturnika zbożowca. Niemniej jednak najniższą średnią wartość wykazano dla odmiany

Trofeum (Fig. 2 **P4**). Analizując wyniki parametrów chemicznych dla badanych odmian pszenicy zaobserwowano istotne różnice dla wszystkich analizowanych zmiennych (Fig. 1 **P4**). Istotne różnice dla badanych odmian jęczmienia zaobserwowano dla cech takich jak zawartość białka, tłuszczu surowego oraz cukrów rozpuszczalnych w wodzie (Fig. 2 **P4**).

Na podstawie tabeli udziału poszczególnych OTUs oraz dendrogramu utworzonego na podstawie macierzy Bray-Curtisa zaobserwowano, że do najważniejszych taksonów bakterii w bakteriomie *R. dominica* należą *Pantoea, Acinetobacter, Serratia, Xanthomonas, Stenotrophomonas, Massilia, Ralstonia* i *Pseudomonas* (Tab. 1, Fig. 3B **P4**). Wykazano również, że na zmienność struktury mikrobiomu istotnie wpływa pokolenie potomne szkodnika i odmiana na jakiej żeruje, natomiast nie wpływa gatunek rośliny (Fig. 3A **P4**). Największą różnorodność mikrobiologiczną, zaobserwowano w bakteriobiomie *R. dominica* osobników z pierwszego pokolenia, które żywione były ziarnem pszenicy odmiany Impresja oraz ziarnem jęczmienia odmiany Ismena. Natomiast największą różnorodność mikrobiologiczną bakteriobiomu, w drugim pokoleniu potomnym badanych szkodników, zaobserwowano w przypadku żywienia owadów ziarnem pszenicy odmiany Impresja oraz jęczmienia odmiany Radek (Tab. 1, **P4**).

Wyniki analizy heatmap dla metabolizmu przewodu pokarmowego wykazały, że w przypadku pszenicy, odmiana Varius charakteryzowała się wysoką lub bardzo wysoką aktywnością 23 z 29 badanych cech (Fig. 4; **P4**). Do enzymów o najwyższej aktywności należały *α*-galaktozydaza, arylamidaza cystyny, *α*-fukozydaza, ß-glukozydaza. Odmiana charakteryzowała się także wysokim potencjałem wykorzystania siedmiu źródeł węgla. Bakteriobiom tej odmiany cechował się najwyższym potencjałem nitryfikacji, fermentacji oraz szeregu cech charakterystycznych dla autotrofów. Odmiana Rusałka wykazywała wysoką aktywność dla enzymu arylamidaza cystyny i wykorzystaniem kwasu fenylooctowego. Bakteriobiom wykazywał największą zdolność do chemoheterotrofii, fermentacji, patogeniczności, autotrofii, przemian azotu w tym amonifikacji, w porównaniu do pozostałych bakteriobiomów. Odmiana Impresja jako jedyna charakteryzowała się niską aktywnością metabolizowania tryptofanu. Wykazywała wysoką lub bardzo wysoką aktywność 17 z 29 cech, a największą aktywność stwierdzono w stosunku do fosfohydrolazy naftylo-AS-BI, ß- galaktozydazy, aktywności ureazy oraz wykorzystania kwasu dekanowego, L-arabionzy i D- glukozy. Bakteriobiom wyróżniał się największym potencjałem do rozkładu chityny, wykorzystaniem azotu w oddychaniu, patogenicznością dla roślin i fototrofią. W przypadku odmian jęczmienia, odmiana Trofeum o najniższej konsumpcji charakteryzowała się analogicznym zestawem cech jak Rusałka. Bakteriobiom najlepiej radził sobie natomiast z

wiązaniem azotu i procesami fototroficznymi. Odmiana Trofeum odróżnia się od pozostałych odmian jęczmienia i nie wykazuje aktywności związanej z chemoheterotrofią tlenową, rozkładem ksylanu, denitryfikacją, utlenianiem związków siarki (Fig. 4; **P4**).

Globalna analiza powiązań pomiędzy badanymi cechami wykonana za pomocą metody modelowania równań strukturalnych metodą najmniejszych kwadratów (PLS-PM) dla pszenicy i jęczmienia łącznie, wykazała, że wszystkie grupy zmiennych istotnie wpływają na rozwój kapturnika zbożowca. Analiza wykazała dodatnią korelację pomiędzy zawartością białka i cukrów rozpuszczalnych w wodzie, zawartością kwasu linolowego (C18:2) z rozwojem owadów. Struktura bakteriobiomu wpływała istotnie, ale wykazano słabą korelację, a jego metabolizm był umiarkowanie skorelowany z rozwojem owadów (r=0.566) (Fig. 5; **P4**). Analiza modeli dla poszczególnych badanych gatunków wykazała, że wyniki były istotne zarówno dla ziarna pszenicy jak i jęczmienia. Wpływ właściwości ziarna i zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz ścieżki związane z bakteriobiomem różniły się w zależności od gatunku. Chemiczne cechy ziarna były ujemnie skorelowane z rozwojem owadów dla pszenicy, a dodatnio skorelowane dla jęczmienia. Jedyną podobną ścieżką w obu gatunkach była "Grain properties → Bacteriobiome traits → Insect development", ale korelacje były silne u pszenicy i słabe u jęczmienia. Właściwości chemiczne badanego ziarna pszenicy i metabolizm bakteriobiomu *R. dominica* były ujemnie skorelowane, natomiast w przypadku badanego ziarna jęczmienia zaobserwowano korelację dodatnią (Fig. S1, Fig. S2; **P4**). Warto podkreślić, że również analiza sieci (ang. network analysis) wykazała, że cechy chemiczne ziarna, takie jak TP, WSC, C18:2, oraz niektóre OTUs bakteryjne i cechy metabolizmu, są silnie skorelowane z liczbą i masą imago (Fig. 6B; **P4)**.

Podsumowanie publikacji

W świetle przedstawionych wyników można zauważyć, że ziarna zbóż o wyższej zawartości białka ogólnego i cukrów rozpuszczalnych w wodzie są bardziej atrakcyjne dla kapturnika zbożowca, podczas gdy odmiany o niższej zawartości tych składników stają się siedliskiem, na którym szkodnik tworzy mniej liczne pokolenie potomne. Zawartość kwasu linolowego (C18:2) w ziarnach wpływa na rearanżację mikrobiomu *R. dominica*, co może obniżać skuteczność ich żerowania. Wpływ właściwości ziarna na bakteriobiom i jego metabolizm różnił się w zależności od gatunku zboża, co miało istotne znaczenie dla rozwoju *R. dominica.* Bakterie z rodzajów *Pantoea*, *Ralstonia, Stenotrophomonas* i *Acinetobacter* odgrywają kluczową rolę w metabolizmie *R. dominica*, wspomagając jego adaptację do różnych warunków żywieniowych.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, składające się z serii czterech powiązanych tematycznie prac, są kompleksowym opracowaniem badającym wpływ właściwości chemicznych badanych ziaren zbóż na rozwój wołka ryżowego i kapturnika zbożowca oraz ich mikrobiom jelitowy. Uzyskane wyniki badań umożliwiły weryfikację postawionych hipotez oraz sformułowanie następujących wniosków:

1. Mikrobiom jelitowy *S. oryzae* i *R. dominica* wpływa na rozwój i funkcjonowanie *S. oryzae* i *R. dominica* **(H1)**, a sterylizacja wewnętrznego bakteriobiomu owadów wywołuje odmienny wpływ na przeżywalność *S. oryzae* i *R. dominica. S. oryzae* wykazuje wyższy poziom uzależnienia od symbiotycznych bakterii, co objawia się większymi zakłóceniami metabolicznymi i strukturalnymi po zastosowaniu sterylizacji wewnętrznego mikrobiomu i w konsekwencji mniejszą przeżywalnością. Natomiast u osobników *R. dominica* po zastosowaniu sterylizacji mikrobiomu zachowuje się stabilność metaboliczna, a przeżywalność chrząszcza nie zmienia się **(H2)**.
2. Skład chemiczny ziarna badanych odmian jęczmienia i pszenicy, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości fenoli, kwasów tłuszczowych i białka odgrywa kluczową rolę w regulacji cyklu życiowego *S. oryzae* i *R. dominica*, tym samym wpływając na ich naturalną odporność na żerowanie szkodników. *R. dominica* rozwija się znacznie lepiej na badanych odmianach jęczmienia, natomiast *S. oryzae* na badanych odmianach pszenicy **(H3 i H4)**.
3. Największą naturalną odpornością na rozwój i żerowanie *R. dominica* okazało się ziarno jęczmienia odmiany Radek oraz ziarno pszenicy odmiany Rusałka. Najmniej odpornym ziarnem na żerowanie *R. dominica* w przypadku pszenicy okazało się ziarno odmiany Impresja, a w przypadku jęczmienia odmiany Trofeum. W przypadku *S. oryzae* najbardziej odpornym ziarnem było ziarno jęczmienia odmiany KWS Dante, a pszenicy ziarno odmiany Telimena. Natomiast najmniej odporne na żerowanie *S. oryzae* było ziarno pszenicy odmiany Rusałka i ziarno jęczmienia odmiany Radek **(H3 i H4)**.
4. Wzrost liczby osobników potomnych *S. oryzae* był skorelowany ze wzrostem zawartości białka w badanych odmianach pszenicy, wzrostem zawartości kwasów tłuszczowych w badanych odmianach jęczmienia oraz ujemnie skorelowany z zawartością przeciwutleniaczy w badanych odmianach pszenicy i jęczmienia. Wzrost liczby osobników potomnych *R. dominica* był skorelowany ze wzrostem zawartości włókna w

badanych odmianach pszenicy i wzrostem zawartości białka w badanych odmianach jęczmienia **(H4).**

5. Zróżnicowane właściwości chemiczne ziarna wybranych odmian różnych gatunków zbóż ma istotny wpływ na skład mikrobiomu *S. oryzae* i *R. dominica* **(H5)**, co może przekładać się na ich zdolności trawienne **(H6)**. Pomimo udowodnienia hipotezy badawczej i obserwowania zmian w bakteriobiomie *S. oryzae*, endosymbionty rodzaju *Sodalis* były odporne na działanie zastosowanych czynników, niemal zawsze dominowały i nie zaobserwowano korelacji pomiędzy badanymi gatunkami i odmianami zbóż, a ich liczebnością. Zaobserwowano również, że szczególnie profil kwasów tłuszczowych oddziałuje na mikrobiom *S. oryzae* i może przyczynić się do zmian w nim. Wyższą zmienność mikrobiomu *S. oryzae* zaobserwowano w pierwszym pokoleniu potomnym badanego szkodnika, W drugim pokoleniu zaobserwowano natomiast uodpornienie się wołka na czynniki, które prawdopodobnie powodowały obniżenie efektywności żerowania **(H5)**. Ziarno różnych odmian badanych gatunków zbóż wywołują specyficzne zmiany również w składzie mikrobiomu *R. dominica*. Zawartość kwasu linolowego (C18:2) w ziarnach może wpływać na rearanżację mikrobiomu *R. dominica*, co z kolei może obniżać ich skuteczność żerowania i trawienia pokarmu. Bakterie z rodzajów *Pantoea* i *Ralstonia* dominowały w pierwszym pokoleniu potomnym *R. dominica*, podczas gdy w kolejnym pokoleniu obserwowano większą różnorodność mikrobiologiczną, w tym obecność bakterii *Stenotrophomonas* i *Acinetobacter* **(H5)**.
6. Ziarno badanych odmian i gatunków zbóż, charakteryzujące się odmiennym składem chemicznym, znacząco wpływało na proces jego trawienia przez *S. oryzae* i *R. dominica* oraz na ich metabolizm. W przypadku ziarna niektórych odmian, scharakteryzowanych przez nas jako odmiany ze zwiększoną, naturalną odpornością, prowadziło to do pogorszenia homeostazy, ograniczenia żerowania, prawdopodobnego upośledzenia działania układu immunologicznego oraz wzrostu udziału potencjalnych entomopatogenów **(H6)**.
7. Wykazano istotny związek między mikrobiomem a procesami trawiennymi. Mikroflora jelitowa zarówno *S. oryzae* i *R. dominica* wspomaga trawienie składników odżywczych, takich jak cukry i białka, oraz wpływa na aktywność enzymatyczną owadów **(H7)**.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań miały charakter poznawczy i dostarczyły nowych informacji dotyczących mechanizmów odporności zbóż na żerowanie kapturnika zbożowca i wołka ryżowego. Udowodniono przez nie, że bardzo ważną rolę w

procesie ogólnego funkcjonowania owadów i trawienia pokarmów odgrywa mikrobiom jelitowy owadów.

Potwierdzenie, że niektóre owady wchodzą w interakcje symbiotyczne z mikrobiomem, sugeruje potrzebę szeroko zakrojonych badań podatności owadów na jego utratę, co może otworzyć nowe ścieżki w strategiach zwalczania szkodników magazynowych. Zamiast stosowania silnych insektycydów w magazynach i środkach transportu, można by stosować substancje naturalne w celu zniszczenia symbiontu, co utrudniłoby rozwój szkodnika. Inną strategią może być postęp odmianowy, prowadzący do tworzenia odmian posiadających zdolność do naturalnej produkcji substancji bakteriostatycznych przeciwko bakteriom znajdującym się w przewodzie pokarmowym szkodnika, a tym samym negatywnie oddziałujących na niego. Uzyskane wyniki są ważne dla zrozumienia mechanizmów odporności roślin i opracowania skutecznych strategii zwalczania szkodników i mogą być pomocne w kontekście wprowadzania odmian hodowlanych o zwiększonej naturalnej odporności.

Zarówno podejście pierwsze, jak i drugie może być pomocne w rozwiązaniu globalnego problemu związanego z ponoszonymi stratami w magazynach zbóż spowodowanych przez owadzie szkodniki magazynowe, a także zmniejszyć ilość stosowanych środków chemicznych, co jest szczególnie istotne w kontekście ochrony środowiska i zapewnienia odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa żywności.

6. BIBLIOGRAFIA

Ahmad, R., Hassan, S., Dar, S. A., Nighat, S., Devi, Y. K., Javeed, K., Usmani, S., Ansari, M. J., Erturk, S., Alkan, M., Hussain, B. (2022). Stored Grain Pests and Current Advances for Their Management. In M. Ahiduzzaman (Ed.), *Postharvest Technology - Recent Advances, New Perspectives and Applications* (Vol. 3, pp. 45–90). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.95208

Alexandratos, N., Bruinsma, J. (2012). *World Agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. www.fao.org/economic/esa

AOAC. (2016). Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th Ed., AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.*

Bastian, M., Heymann, S., Jacomy, M. (2009). Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media*, *3*(1), 361–362. https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937

Béné, C., Oosterveer, P., Lamotte, L., Brouwer, I. D., de Haan, S., Prager, S. D., Talsma, E. F., Khoury, C. K. (2019). When food systems meet sustainability – Current narratives and implications for actions. In *World Development* (Vol. 113). https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2018.08.011

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Bouchelos, K. T. (2018). *Insects of Warehouses and Food* (Embryo Publications, pp. 92–102). Embryo Publications.

Bourguet, D., Guillemaud, T. (2016). The Hidden and External Costs of Pesticide Use. In E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews: Volume 19* (pp. 35–120). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_2

Brandon, A. M., Gao, S. H., Tian, R., Ning, D., Yang, S. S., Zhou, J., Wu, W. M., Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science and Technology*, *52*(11). https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301

Dal Bello, G., Padin, S., López Lastra, C., Fabrizio, M. (2000). Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *Journal of Stored Products Research*, *37*(1), 77–84. https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00009-6

Desta, A. G., Yeshitila, B. H. (2024). The distribution of insect pests and the associated loss of stored sorghum in the Kena district of Konso Zone, South-Western Ethiopia. *PLOS ONE*, *19*(1), e0295833. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295833

Draz, K. A., Mohamed, M. I., Tabikha, R. M., Darwish, A. A., Abo-Bakr, M. A. (2021). Assessment of some physical measures as safe and environmentally friendly alternative control agents for some common coleopteran insects in stored wheat products. *Journal of Plant Protection Research*, *61*(2), 156–169. https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137025

Dubey, N. K., Srivastava, B., Kumar, A. (2008). Current Status of Plant Products as Botanical Pesticides in storage pest management. *Journal of Biopesticides*, *1*(2), 182–186.

Edde, P. A. (2012). A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *Journal of Stored Products Research*, *48*, 1–18. https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2011.08.007

ElKraly, O. A., Awad, M., El-Saadany, H. M., Hassanein, S. E., Elrahman, T. A., Elnagdy, S. M. (2023). Impact of gut microbiota composition on black cutworm, *Agrotis ipsilon* (hufnagel) metabolic indices and pesticide degradation. *Animal Microbiome*, *5*(1), 44. https://doi.org/10.1186/s42523-023-00264-6

Engel, P., 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

Fikremariam, A., Tadele, T., Stephen, M., Yoseph, B., Stefan, V. (2009). Resistance of maize varieties to the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae). *African Journal of Biotechnology*, *8*(21), 5937–5943. https://doi.org/10.5897/AJB09.821

Gołębiowska, Z., Nawrot, J., Prądzyńska, A. (1976). Studia nad szkodliwością kilku gatunków chrząszczy żerujących w ziarnie zbóż. *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin*, *18*(2), 49–87.

Hagstrum, D. W., Phillips, T. W., Cuperus, G. (2012). *Stored product protection*. Kansas State University.

Hagstrum, David William, Flinn, P. W. (2014). Modern stored-product insect pest management. *Journal of Plant Protection Research*, *54*(3).

Hammer, D. A. T., Ryan, P. D., Hammer, Ø., Harper, D. A. T. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. In *Palaeontologia Electronica* (Vol. 4, Number 1). http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Jacomy, M., Venturini, T., Heymann, S., Bastian, M. (2014). ForceAtlas2, a Continuous Graph Layout Algorithm for Handy Network Visualization Designed for the Gephi Software. *PLoS ONE*, *9*(6), e98679. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098679

Jaffar, S., Yasin, M., mazahir, M., Hussain, Aj., Khan, A. A., Su, H., Zeng, T. (2024). Insect Gut Microbiota and Pesticide Degradation in Response to Innate Metabolites- a Review. *Indian Journal of Entomology*, 1–12. https://doi.org/10.55446/IJE.2024.856

Jood, S., Kapoor, A. C., Singh, R. (1996). Effect of Insect Infestation and Storage on Lipids of Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(6), 1502–1506. https://doi.org/10.1021/jf950270e

Jung, C. M., Carr, M., Fleischman, E., Roesch, C. J. (2021). Response of the green June beetle and its gut microbiome to RDX and phenanthrene. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *18*(7). https://doi.org/10.1007/s13762-020-02960-1

Khan, T., Haider, M. S., Khan, H. A. A. (2022). Resistance to grain protectants and synergism in Pakistani strains of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Scientific Reports*, *12*(1), 12401. https://doi.org/10.1038/s41598-022-16412-y

Klejdysz, T., Ignatowicz, S., Kubasik, W., Gorzała, G., Olejarski, P., Horoszkiewicz, J., Jajor, E., Korbas, M., Pruszyński, G., Pruszyński, S., Goliński, P., Waśkiewicz, A., Zamojska, J., Węgorek, P., Dworzańska, D. (2017). *Metodyka integrowanej ochrony magazynów zbożowych dla doradców: opracowanie zbiorowe*. Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy.

Klejdysz, Tomasz, Nawrot, J. (2010a). *Atlas owadów szkodników żywności [Atlas of Insect Pests of Food]*.

Klejdysz, Tomasz, Nawrot, J. (2010b). First record of outdoor occurrence of stored-product coleopterans in arable landscape in poland. *Journal of Plant Protection Research*, *50*(4), 551–553. https://doi.org/10.2478/v10045-010-0091-4

Kumar, A. (2021). Insect Pests of Stored Grain. *Agriculture Food: E-Newsletter*, *2*(6), 31–35.

Laszczak-Dawid, A., Ciepielewska, D., Damszel, M. (2011). Technological quality of grain of some wheat cultivars versus the development of the lesser grain borer (*Rhizopertha dominica* F.). *Progress in Plant Protection*, *51*(3), 1125–1129.

Le Boulch, M., Déhais, P., Combes, S., Pascal, G. (2019). The MACADAM database: A MetAboliC pAthways DAtabase for Microbial taxonomic groups for mining potential metabolic capacities of archaeal and bacterial taxonomic groups. *Database*, *2019*. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/database/baz049

Li, Y., Chang, L., Xu, K., Zhang, S., Gao, F., Fan, Y. (2023). Research Progresses on the Function and Detection Methods of Insect Gut Microbes. *Microorganisms*, *11*(5), 1208. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051208

Lorini, I., Galley, D. J. (1999). Deltamethrin resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. *Journal of Stored Products Research*, *35*(1), 37–45. https://doi.org/10.1016/S0022-474X(98)00028-9

Louca, S., Parfrey, L. W., Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, *353*(6305), 1272–1277. https://doi.org/10.1126/science.aaf4507

Mogilicherla, K., Roy, A. (2023). Epigenetic regulations as drivers of insecticide resistance and resilience to climate change in arthropod pests. *Frontiers in Genetics*, *13*, 1044980. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1044980

Nawrot, J. (2001). *Owady – szkodniki magazynowe*. Themar Import-Eksport.

Nawrot, J., Olejarski, P. (2007). Alternatywne metody zwalczania owadzich szkodników magazynowych. *Fragmenta Agronomica, 24*(4), 32–40.

Nayak, M. K., Daglish, G. J. (2018). Importance of Stored Product Insects. In C. G. Athanassiou F. H. Arthur (Eds.), *Recent Advances in Stored Product Protection* (pp. 1–17). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56125-6_1

Nietupski, M., Kwiatkowski, J., Kosewska, A. (2017). Physicochemical properties of achenes of buckwheat cultivars affecting the development of grain weevil (*Sitophilus granarius* L.) and lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.). *Zemdirbyste-Agriculture*, *104*(4), 311–320. https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.040

Nowaczyk, K., Obrępalska-Stęplowska, A., Gawlak, M., Olejarski, P., Nawrot, J. (2008). The rapd analysis of genetic variability in the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) Populations. *Journal of Plant Protection Research*, *48*(4).

Nwosu, L. C. (2018). Maize and the maize weevil: Advances and innovations in postharvest control of the pest. In *Food Quality and Safety* (Vol. 2, Number 3, pp. 145–152). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy011

Olejarski P. (2005). Zwalczanie szkodników w zmagazynowanych zbożach. *Ochrona Roślin*, *50*(11), 15–19.

Olejarski P. (2010). Rozwój i doskonalenie fizycznych metod wykrywania owadów – szkodników przechowywanych zbóż. *Postępy Nauk Rolniczych*, *62*(1), 123–136.

Park, S. H., Arthur, F. H., Bean, S. R., Schober, T. J. (2008). Impact of differing population levels of *Rhyzopertha dominica* (F.) on milling and physicochemical properties of sorghum kernel and flour. *Journal of Stored Products Research*, *44*(4), 322–327. https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2008.02.008

Perisic, V., Perisic, V., Vukajlović, F. N., Pesic, S. B. (2018). Feeding preferences and progeny production of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) in small grains. *9*(1), 55–61. https://doi.org/10.5281/zenodo.1470852

Phillips, T. W., Throne, J. E. (2010). Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. *Annual Review of Entomology*, *55*(1), 375–397. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090451

Piasecka-Kwiatkowska D, Warchalewski J.R. (2000). Zbożowe białkowe inhibitory enzymów hydrolitycznych i ich znaczenie. Część I. Białkowe inhibitory alfa-amylaz. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, *7*(2), 110–119.

Popp, J. (2011). Cost-benefit analysis of crop protection measures. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, *6*(1), 105–112. https://doi.org/10.1007/s00003-011-0677-4

Premalatha, K., Balaji, B. N. (2024). Insect Pests of Stored and Processed Vegetables. In *Insect and pest management of stored grains* (pp. 92–102). Elite Publishing House.

Przemieniecki, S. W., Damszel, M., Ciesielski, S., Kubiak, K., Mastalerz, J., Sierota, Z., Gorczyca, A. (2021). Bacterial microbiome in *Armillaria ostoyae* rhizomorphs inhabiting the root zone during progressively dying Scots pine. *Applied Soil Ecology*, *164*. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103929

Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Ciesielski, S., Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, *256*. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113265

Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Kosewska, O., Purwin, C., Lipiński, K., Ciesielski, S. (2022). Polyethylene, polystyrene and lignocellulose wastes as mealworm (*Tenebrio molitor* L.) diets and their impact on the breeding condition, biometric parameters, metabolism, and digestive microbiome. *Science of the Total Environment*, *832*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154758

Rees, D. (2004). *Insects of Stored Products*. CSIRO Publishing. https://doi.org/10.1071/9780643101128

Ruby, E., Henderson, B., McFall-Ngai, M. (2004). We Get By with a Little Help from Our (Little) Friends. *Science*, *303*(5662), 1305–1307. https://doi.org/10.1126/science.1094662

Saad, A. S. A., Tayeb, E. H. M., El-Shazli, M. M., Baheeg, S. A. (2018). Susceptibility of certain Egyptian and imported wheat cultivars to infestation by *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *51*(1–2), 14–29. https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1438779

Smith, P., Gregory, P. J. (2013). Climate change and sustainable food production. *Proceedings of the Nutrition Society*, *72*(1), 21–28. https://doi.org/10.1017/S0029665112002832

Sönmez, E. (2022). The Effect of Temperature and Nutrient on Developmental Biology and Physiology of Stored-Product Species of Coleoptera. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *7*(1), 81–101. https://doi.org/10.33484/sinopfbd.1054223

Stathas, I. G., Sakellaridis, A. C., Papadelli, M., Kapolos, J., Papadimitriou, K., Stathas, G. J. (2023). The Effects of Insect Infestation on Stored Agricultural Products and the Quality of Food. *Foods*, *12*(10), 2046. https://doi.org/10.3390/foods12102046

Sudakaran, S., Kost, C., Kaltenpoth, M. (2017). Symbiont Acquisition and Replacement as a Source of Ecological Innovation. *Trends in Microbiology*, *25*(5), 375–390. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014

Thomas, A. (1977). An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*(7), 639–642. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280711

Toews, M. D., Campbell, J. F., Arthur, F. H., Ramaswamy, S. B. (2006). Outdoor flight activity and immigration of *Rhyzopertha dominica* into seed wheat warehouses. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *121*(1), 73–85. https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00462.x

Vianna, F., Russo, L., Troncozo, I., Ferreri, N., de Abajo, J. M., Scorsetti, A. C., Pelizza, S. (2023). Susceptibility of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) to the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) *Vuillemin s.* l. (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, *55*(2), 1853. https://doi.org/https://doi.org/10.48162/rev.39.110

Wier, A. M., Nyholm, S. V., Mandel, M. J., Massengo-Tiassé, R. P., Schaefer, A. L., Koroleva, I., Splinter-BonDurant, S., Brown, B., Manzella, L., Snir, E., Almabrazi, H., Scheetz, T. E., Bonaldo, M. de F., Casavant, T. L., Soares, M. B., Cronan, J. E., Reed, J. L., Ruby, E. G., McFall-Ngai, M. J. (2010). Transcriptional patterns in both host and bacterium underlie a

daily rhythm of anatomical and metabolic change in a beneficial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2259–2264. https://doi.org/10.1073/pnas.0909712107

Xia, X., Gurr, G. M., Vasseur, L., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Lin, J., Wang, Y., Song, F., Li, Y., Lin, H., You, M. (2017). Metagenomic Sequencing of Diamondback Moth Gut Microbiome Unveils Key Holobiont Adaptations for Herbivory. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00663

Xue, D., Chen, T., Li, Q., Yang, Y., Wu, Y. (2023). Microbiota composition of allopatric laboratory and wild populations of *Rhyzopertha dominica*. *Journal of Stored Products Research*, *104*, 102202. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2023.102202

Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L. (2015). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environmental Science and Technology*, *49*(20). https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663

Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., Kim, J.-Y., Shin, N.-R., Kim, S.-H., Lee, W.-J., Bae, J.-W. (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

Żegarska, Z., Jaworski, J., Borejszo, Z. (1991). Ocena zmodyfikowanej metody Peiskera otrzymania estrów metylowych kwasów tłuszczowych. *Acta Academiae Agriculturae Ac Technicae Olstenensis. Technologia Alimentorum*, *24*.

Strony internetowe:

COBORU. (b.d.-a). Charakterystyka Odmiany. Pobrano 20 sierpnia 2024, z https://coboru.gov.pl/PDO/charaktodmiany

COBORU. (b.d.-b). Research Centre for Cultivar Testing. Cultivars data. Pobrano 13 lipca 2024, z https://www.coboru.gov.pl/en/search

Bugseq. (b.d.). Pobrano: 1 sierpnia 2024, z https://bugseq.com/

Lumivero. (2023). XLSTAT basic solutions. Pobrano 20 sierpnia 2024, z https://www.xlstat.com/en/solutions/basic

Oxford Nanopore Technologies., 2019. 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) Version:16S_9086_v1_revT_14Aug2019 Pobrano 3 marca 2021, z https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/16S-barcoding-1-24/v/16s_9086_v1_revt_14aug2019.

Rapid 16S Metagenomic Library Preparation for Oxford Nanopore Technologies (ONT)® Platform. (b.d.). Pobrano 20 sierpnia 2024, z www.quantabio.com/product/repliqa-hifi-toughmix/

7. SPIS TABEL I FIGUR

Tabele:

Tabela 1. Podział odmian jęczmienia i pszenicy na typy i formy użytkowe wraz z krótką charakterystyką poszczególnych odmian

Tabela 2. Odmiany jęczmienia oraz pszenicy wybrane do analiz w IV etapie badawczym

Fotografie:

Fotografia 1. Chrząszcze wołka ryżowego żerujące na ziarnie jęczmienia (fot. Olga Kosewska)

Fotografia 2. Chrząszcze kapturnika zbożowca żerujące na ziarnie pszenicy (fot. Olga Kosewska)

Schemat:

Schemat 1. Etapy badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej z uwzględnieniem publikacji wchodzących w jej skład (opracowanie własne)

8. KOPIE PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PUBLIKACJA 1

applied sciences

MDPI

Article

The Effect of Antibiotics on Bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a Factor Determining the Success of Foraging: A Chance for Antibiotic Therapy in Grain Stores

Olga Kosewska, Sebastian Wojciech Przemieniecki * and Mariusz Nietupski

Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn, Poland
* Correspondence: sebastian.przemieniecki@uwm.edu.pl

Featured Application: The sterilization of the internal microbiome of insects only causes the death of *S. oryzae*, and has no impact on *R. dominica*. The removal of the symbiotic microbiota causes a severe shift in the biochemical potential of the insect. Confirmation that certain insects enter into symbiotic interactions with the microbiota suggests the need for extensive testing of the pest's susceptibility to the loss of symbiotic microbiota, which could open a new path in warehouse pest control strategies.

Abstract: Rice weevil (*Sitophilus oryzae*) and the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) are very important warehouse pests and, therefore, their control is crucial. At a key moment in the life of adult *Sitophilus* spp., the obligatory symbiotic nature of the *Sodalis pierantonius* bacterium opens up a new perspective for natural antibiotics and bactericides. In this study, we used nanopore sequencing for 16S rRNA barcoding to evaluate the internal bacteriome of *S. oryzae* and *R. dominica* and sterilized the insects' internal microbiome with gentamicin. The treatment of the interior of *S. oryzae* with gentamicin (30 $mg \cdot g^{-1}$) hampered insect functioning (supposed lack of DOPA (4-dihydroxyphenylalanine) synthesis, stabilizing the exoskeleton by *Sodalis pierantonius* symbiont) and elicited a lethal effect in the first stages of this pest's adult life. In addition, we identified biochemical biomarkers (enzymatic activity and substrate utilization) active in living individuals, but inactive in dead individuals (e.g., C8 esterase/lipase and α-chymotrypsin).

Keywords: symbiotic microbiome; storage pests; nanopore sequencing; biochemical activities

check for updates

Citation: Kosewska, O.; Przemieniecki, S.W.; Nietupski, M. The Effect of Antibiotics on Bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a Factor Determining the Success of Foraging: A Chance for Antibiotic Therapy in Grain Stores. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576

Academic Editors: Anthony William Coleman and Leonel Pereira

Received: 28 November 2022
Revised: 20 January 2023
Accepted: 21 January 2023
Published: 26 January 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The food system is an important part of the world economy and society [1]. The annual grain harvest in the European Union is 300 million tons. Unfortunately, cereal grains are prone to infestation and contamination by warehouse pests during transport, storage and post-harvest processing in food and feed processing plants [2]. Grain losses in a storage account for up to 20% of stored products as a result of damage caused by insects [3,4], i.e., about 420 million tons of grain worldwide [5]. These losses vary greatly and depend mainly on the climate and species grown in a given region. With the increase in the average temperature, at which the pest development is much faster, the losses are greater, boosting to as much as 30% [6]. Traditional methods for controlling warehouse pests most often rely on the use of synthetic plant protection products. These control strategies pose the risk of food contamination with pesticide residues and the development of pest resistance to insecticides [7]. Feeding insects pose a particularly severe problem in the storage of cereals, as they lead to grain quality deterioration or grain damage [8]. The lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) are particularly difficult to control. In recent years, the first of the mentioned insects turned out to be a species capable of quick adaptation to unfavorable abiotic conditions and

significantly changed its habitat preferences in the conditions of our climatic zone [9]. An insect that prefers a warm climate, i.e., rice weevil, presents a growing threat due to global warming, and its occurrence and requirements are not sufficiently known and described in the temperate climate zone. In recent years, the progress of research on metagenomics has shown the symbiotic microbiome of insects to be closely related to the development of insects, metabolic changes in the body, resistance to unfavorable chemical factors and pathogens, and, to a large extent, to food digestion [10,11]. Therefore, the analysis of the composition, activity, and functions of the insect microbiome is a bioindicative method that allows for the precise determination of the impact of a factor introduced in the environment or breeding under laboratory conditions [10,12,13].

Bacterial endosymbionts of the insects' microbiome colonize the tissues of their hosts. They are common in the world of insects, and the relationship of the bacteria with the host may take the form of commensalism, mutualism, or parasitism. Parasitic bacteria manipulate the host to optimize the fulfillment of their own needs, whereas mutualistic bacteria provide metabolites or optimize the host's metabolic pathways (e.g., they participate in nitrogen circulation and can provide amino acids or vitamins), which is helpful or necessary in the life of the insect. Commensal microorganisms use the host periodically as a vector for migration purposes (e.g., to a plant to which it is a phytopathogen). The relationship between the bacterium and the host is variable and depends on the length of intercourse in the history of evolution, which is manifested by various intensities of interdependence and different coexistence strategies. Moreover, when microorganisms lose the benefit of symbiosis (or commensalism), they can become degraded or become pathogens to their host. There is a clear variability of conditions in the digestive tract of insects, i.e., the pH range, oxygen level, redox potential, availability of nutrients, and the functioning of the immune system. In its first section, the food-dependent microbiota is transferred and developed, which is largely dependent on the insect's developmental phase and environmental conditions. The middle section (lumen) of the digestive tract is colonized by symbiotic microbiota with specific functions influencing digestion and the immune system. The last section of the digestive tract consists of microorganisms that adhere to digesta and the epithelium. This group of microorganisms, largely composed of symbionts inhabiting previous sections of the digestive tract, can be transferred to eggs or exhibit coprophagic and trophallactic properties [14–19].

One of the important functions of symbionts in herbivorous insects is to provide the stored nutrients in conditions of starvation, as well as to break down plant biopolymers and inactivate the plant immune system, which seems to be a natural and necessary insect-symbiont interaction. Specialized groups of bacterial symbionts (obligatory symbionts) form in special intracellular structures called bacteriomes and are easily transferred vertically to the next generation of an insect species. Bacterial symbionts are transmitted both vertically and horizontally. Their composition determines, among others, insect reproduction potential, the redistribution of nutrients, and the stimulation of immunity against abiotic and biotic factors of the host [20]. Intestinal symbionts are an additional group of symbionts. They are responsible for the sharing and redistribution of nutrients and the cycles of elements, mainly nitrogen, across the digestive system; however, they also play a key role in detoxification processes and in overcoming the plant's immune system. Therefore, the range of plants that a given species of insects is able to feed on depends on this group of microbiota. Their transfer to other individuals is also vertical (e.g., coprotrophy) and horizontal [20,21]. The last group of microbiota that interact with insects lives outside the body, e.g., on food. Their task is to pre-break down plant tissue, provide simple substrates, and increase the amount of assimilable nitrogen. Of each of the mentioned groups, the most important ones, i.e., intracellular and gut microbiota, differ in the strategy of eliciting beneficial effects on the host. Unlike the gut microbiome, intracellular microbiota has strict functions with low flexibility, and their community shows a low gene pool due to evolutionary gene loss [20].

Typical examples of hosts associated with intercellular symbionts are the weevil species *Sitophilus* spp. Their gamma-protobacterium symbiont, *Sodalis pierantonius*, is able to provide rice weevil with essential vitamins such as pantothenic acid, riboflavin, and biotin. During the development of the larvae, bacteria are extensively regulated by the secretion system III genes and flagella to infect insect stem cells [22,23]. Moreover, the absence of these symbionts impairs the insect's immune system and its protection against pathogenic microorganisms [24].

However, it should be noted that a large part of the adverse impact of the environment on a pest does not have to be related to the insect microbiome. The disturbance in the functioning of the pest development may be direct, related to a direct dysfunction of the digestive system. The impairment of digestion was observed in Lepidoptera representatives due to the unfavorable parameters of wheat grain. Additional results were obtained by examining the life course and digestive activity of *Angoumois corn* moth α-amylase, *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae). The researchers fed the pest with six wheat cultivars under controlled conditions and proved that one cultivar significantly impaired its development before reaching the imago stage. Moreover, significant differences were observed in the survival of immature insects, fertility, and body weight. The authors observed that the wheat cultivar with the highest 1000-grain weight had the best effect on the development and biometry of the larvae, and the highest amylolytic activity was observed in insects after feeding with this cultivar. In this work, the authors showed a strong correlation between the plant's ability to inhibit α-amylase activity and the impairment of insect pests (Lepidoptera) [25]. On the other hand, a clear connection was found between changes in the structure of the Lepidopteran intestinal microbiome and the body weight of the larvae and the development of the insects [26]. Research on understanding the function of the microbiome by sterilizing the insect microbiome is widespread in the case of mealworms [27–29], where insects treated with gentamicin, an antibiotic relatively safe for insects, lose their ability to digest feed.

So far, a huge number of bacterial taxa colonizing the gastrointestinal tract have been tentatively identified and their putative roles in the host organism have been described [30]. The aims of this study were to identify and characterize the microbiome of warehouse pests using the nanopore sequencing technique, sterilize the internal microbiome of warehouse pests and determine the lethal effect of different doses of the antibiotic, and describe the metabolic changes of the insects.

2. Materials and Methods

2.1. Mass Breeding

Adult species of the lesser grain borer (*R. dominica*) and rice weevil (*S. oryzae*) used in the experiment came from mass breeding conducted at the Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland. The breeding was carried out under controlled conditions of temperature (30 °C) and humidity (70%) in a growth chamber (Sanyo MLR-350 H, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan), with insect development, monitored and insect population regulated. Specimens of 1–2-day-old beetles were used in the experiment, which, after hatching in mass breeding, were intended for further experiments.

2.2. Experiment of Insect Exposure to an Antibiotic

The experiment investigated the development of rice weevil fed wheat wafer with the addition of gentamicin (Sigma Aldrich/MERCK, Germany) at various concentrations: 50 $mg \cdot g^{-1}$, 40 $mg \cdot g^{-1}$, 30 $mg \cdot g^{-1}$, 20 $mg \cdot g^{-1}$, and 10 $mg \cdot g^{-1}$ per wafer. An antibiotic dose of a specific concentration (100 µL) was applied to 100 mg wheat wafer. The antibiotic was selected based on previous research on internal symbiotic microbiomes conducted on Coleoptera [27]. A wheat wafer supplemented with sterile demineralized water was used as a control. The wheat wafers prepared in this way were applied onto a Petri dish and 10 freshly hatched adults were used in this experiment. Each variant was made in four

series. The individuals were fed for seven days. In order to determine the survivability of the tested insects, the dead ones were counted after 0, 3, 5, and 7 days. After each counting, the insects were taken for further analysis.

2.3. Preparation of Insect Bacteriome

The internal body mass of *S. oryzae* and *R. dominica* was collected under a binocular in sterile conditions. Each subject was anesthetized at –80 °C for 5 min, after which the body surface was sterilized with 70% ethanol and rinsed thoroughly with sterile physiological saline (0.85% NaCl; demineralized water in the case of DNA isolation). Then, under contamination-limiting conditions, the chitinous (exoskeleton) parts of the insect and the head were removed. The prepared sterile samples were homogenized by grinding. Each homogenized sample consisted of three individuals from each treatment for microbiological analysis and biochemical test and total DNA isolation.

2.4. Microbiological Analysis

To determine the number of bacteria, the homogenized material was ten-fold diluted in sterile saline (NaCl 0.85%) and plated on TSA (tryptic soy agar, MERCK, Germany) medium. Incubation was performed at 28 °C for 48 h. Afterwards, the colony-forming units (CFU) were counted.

2.5. Biochemical Analysis

In order to determine the metabolic and enzymatic potential of the microbiome of the studied insects, three individuals were collected and the interior of each insect was dissected under sterile conditions, removing the exoskeleton. Prior to preparation, surface sterilization in 70% ethanol was performed, followed by three-fold rinsing in sterile demineralized water. The prepared samples were homogenized by grinding in sterile corundum (grain diameter < 0.1 mm) and then the homogenate was diluted in 1 mL of sterile physiological saline (NaCl 0.85%). Before the biochemical tests, a part of the prepared suspension was transferred to peptone water mixed with 1% TSB (Tryptic soy broth, Merck, Germany) and incubated overnight at 28 °C [10,11]. After overnight incubation, the pre-cultures were diluted to the appropriate optical density, depending on the test, and applied to the API NE and API ZYM test kits according to the instructions provided by the producer (Biomerieux, France). The assay kits were incubated at 28 °C for 24 h in the case of API 20 NE and 4 h in the case of API ZYM.

2.6. Isolation of DNA

Before starting the analysis, the insects were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube containing 20 mg of corundum, approximately 0.2 mm in diameter, and 0.1 mL of a suspension buffer consisting of Tween 80 (0.005%) and saline (0.85% NaCl), and ground with a sterile micropestle. After pre-grinding, the obtained material of each sample was transferred to a 2 mL tube containing beads and a lysis buffer and homogenized in a TissueLyser LT homogenizer (Qiagen, Germany). Lysis was carried out for 5 min at the maximum speed (50 oscillations per sec). Further steps of the analysis were carried out following the instructions included with the isolation kit. After homogenization, the DNA was isolated from the collected material with a QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen, Germany) and concentrations for each sample were quantified by fluorometric quantitation using a Quantus ™ Fluorometer (Promega, Germany).

2.7. Nanopore Library Preparation, Sequencing, and Base-Calling

Sequencing was performed based on the "16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)" [31]. The total DNA isolated from the insects was subjected to PCR with four different barcodes linked to primers covering the entire 16S rRNA region of bacteria included in the 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024, Oxford Nanopore). The obtained amplicons were purified using Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). For library standardization, pooling was

performed to obtain a sample mixture containing 20 fmol of ~1500 bp amplicons in 10 µL. Then, 0.5 µL of a rapid sequencing adapter was added to 5 µL of the library. The Flongle flow cell was used for sequencing. Sequencing and base-calling were performed using the MinKnow software. The obtained data (~60,000 reads) were analyzed by the EPI2ME platform (Metrichor™ Ltd.) using WIMP (What's In My Pot) workflows.

2.8. Statistical Analysis

The number and species composition of the bacteria were analyzed. The species diversity of the analyzed bacteria was determined with the use of Simpson dominance (λ), Shannon diversity index (H'), and Pielou's evenness index (J'). The domination classes were determined according to previous work [32], where Eudominant accounts for more than 10%, Dominant, 5.01–10%, Subdominant, 2.01–5%, Rare, 1.1–2.0%, and Occasional, less than 1%, respectively.

The data from the microbiological analyses and survivability of the insects were tested firstly for normality of distribution (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test), and then the differences between the results were determined by the Kruskal–Wallis test (at a significance level determined by Dunn's test with Bonferroni's correction). The results were presented as boxplots divided into quartiles with the median and mean. Statistical calculations of data from the test of survivability with different doses of the antibiotic were made based on the Kaplan–Meyer test. The relationships between observations were determined based on Pearson's correlation matrix, and agglomerative hierarchical clustering (AHC) based on the Ward's method. Heat maps of the biochemical properties were plotted based on a centralized and reduced data set.

3. Results

The analysis of α-diversity coefficients demonstrated that *S. oryzae* (Figure 1a) had a three-fold higher value of the dominance index, as well as greater diversity and uniformity, which was due to a much larger number of occasional taxa compared to *R. dominica* (Figure 1b). Based on the barcoding analysis of the full 16S rRNA region, six types of bacteria colonizing the microbiome of *S. oryzae* were determined with their proportion in the bacterial community of at least 0.5%.

On analyzing the general structure of the identified microbiota of the adult rice weevil form, the presence of two phyla with their proportion in the bacterial community at >0.5%, Proteobacteria 97.9% and Firmicutes 1.3%, was observed. Proteobacteria were almost completely dominated by the Pectobacteriaceae family with the participation of Enterobacteriaceae, while the Firmicutes structure included many species of Staphylococcus with a very low abundance. The results of the predicted species colonizing the insect bacteria demonstrated the complete predominance of *Sodalis pierantonius* and the relatively clear influence of *Escherichia coli* and the presence of *Sodalis praecaptivus*. It is surprising that it is *E. coli* bacteria that are eight times more numerous than *Enterobacter* spp., which form the typical insect gut microbiota (Figure 1a, Table 1).

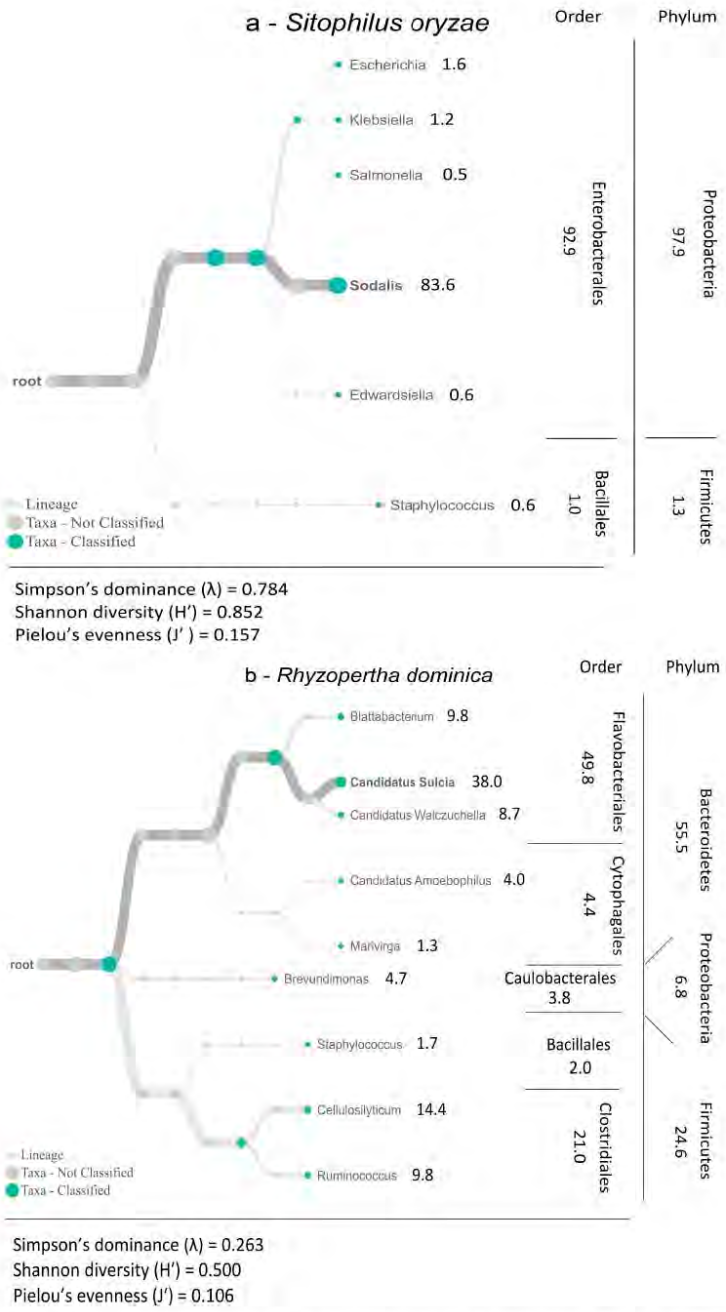


Figure 1. Results of nanopore 16S rRNA sequencing for the bacterial microbiome inhabiting the digestive system of (**a**) *S. oryzae* and (**b**) *R. dominica*.

Table 1. Taxonomic characteristics of the bacterial microbiome inhabiting the digestive system of *S. oryzae* and *R. dominica*.

Pest	Species	Family	Proportion in Community (%)	Domination Class
Sitophilus oryzae	*Sodalis pierantonius*	Pectobacteriaceae	81.9	eudomination
	Escherichia coli	Enterobacteriaceae	1.6	rare
	Sodalis praecaptivus	Pectobacteriaceae	0.7	rare
	Klebsiella pneumoniae	Enterobacteriaceae	0.6	rare
	Edwardsiella ictaluri	Hafniaceae	0.6	rare
	Salmonella enterica	Enterobacteriaceae	0.5	rare
	Proteus mirabilis	Morganellaceae	0.2	occasionally
	Enterobacter hormaechei	Enterobacteriaceae	0.2	occasionally
	Pectobacterium carotovorum	Pectobacteriaceae	0.2	occasionally
	Dickeya dianthicola	Pectobacteriaceae	0.2	occasionally
	Providencia rettgeri	Morganellaceae	0.2	occasionally
Rhyzopherta dominica	*Sulcia muelleri*	incertae sedis	30.7	eudomination
	Ruminococcus sp. JE7A12	Ruminococcaceae	7.3	dominantion
	Walczuchella monophlebidarum	incertae sedis	7.0	dominanton
	Brevundimonas sp. Bb-A	Caulobacteraceae	3.8	subdomination
	Amoebophilus asiaticus	Amoebophilaceae	3.2	subdomination
	Blattabacterium punctulatus	Blattabacteriaceae	1.9	rare
	Blattabacterium cuenoti	Blattabacteriaceae	1.4	rare
	Marivirga tractuosa	Marivirgaceae	1.1	rare
	Chloracidobacterium thermophilum	incertae sedis	0.9	occasionally
	Staphylococcus pseudintermedius	Staphylococcaceae	0.8	occasionally
	Staphylococcus aureus	Staphylococcaceae	0.5	occasionally
	Weeksella virosa	Weeksellaceae	0.5	occasionally
	Clostridioides difficile	Peptostreptococcaceae	0.4	occasionally

The results of the nanopore sequencing analysis for *R. dominica* showed a much lower dominance of bacteriome taxa than in the case of *S. oryzae*. The phylum with a high proportion in the bacterial community includes Bacteroidetes, which is more than half of the bacteriome of the Flavobacteriales order (~50% of the bacteriome) consisting mainly of *Sulcia* sp. (38%), *Blattabacterium* sp., and *Walczuchella* sp. and the order Cytophagales with a small number of bacterial genera, represented most frequently by the genus *Amoebophilus* (4.0%). The phylum Firmicutes was also abundant with the proportion in the bacterial community of about 25%, almost completely dominated by Clostridiales with the *Cellulosiliticum* (~15%) and *Ruminococcus* (~10%) genera, and the order Bacillales (2.0%) represented mainly by bacteria of the genus *Staphylococcus*. The phylum Proteobacteria accounted for almost 7% of the bacterial community and was represented by *Brevundimonas* sp. (4.7%) and many less abundant taxa. The structure of the dominance classes of *R. dominica* differed from those of *S. oryzae*. *R. dominica* had eudominant species *Sulcia muelleri*; however, also dominant were representatives of *Ruminococcus* sp. and *Walczuchella monophlebidarum*, as well as two subdominants and three rare species, two of which belonged to *Blattabacterium* sp. (Table 1, Figure 1b).

The results of the microbiological analysis conducted for individuals feeding on feed with antibiotics showed a similar reduction in the number of bacteria in both species of insects. On the other hand, administered feed with antibiotics showed the stability of the microbiome structure and abundance of *R. dominica*, while the degeneration of the microbial community structure in the case of *S. oryzae* occurred in part of the variant. A significant reduction in the abundance of microorganisms was observed on the third feeding day at a dose of 30 $mg \cdot g^{-1}$ and higher (Figure 2).

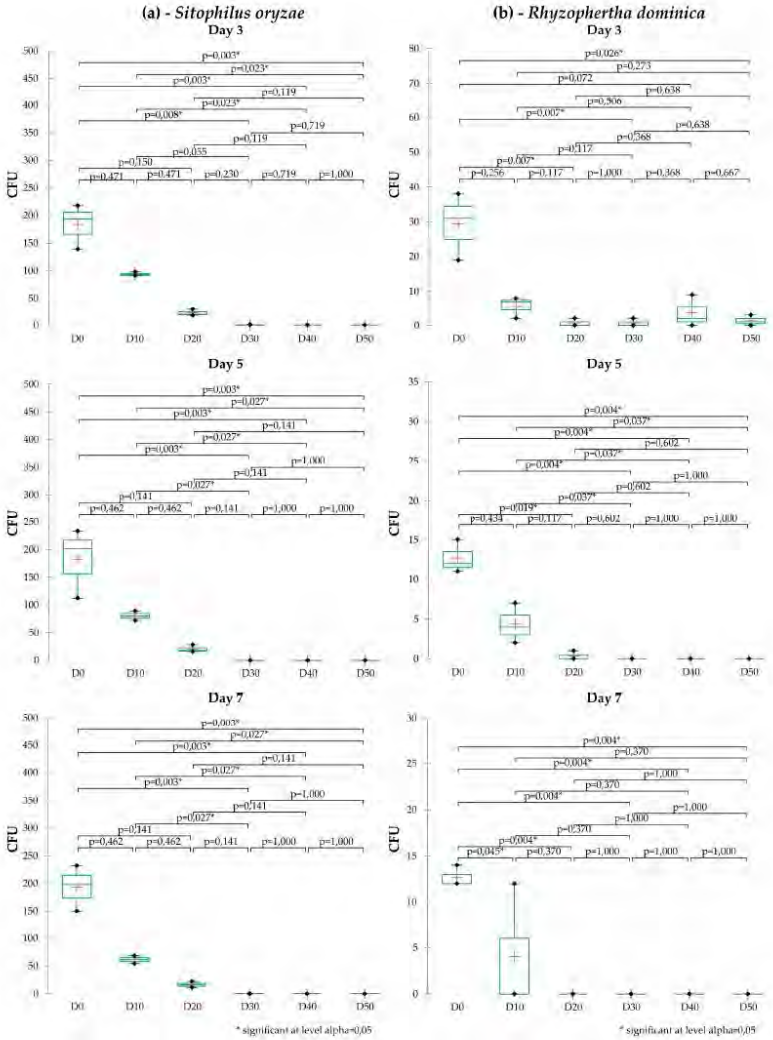


Figure 2. Boxplot showing changes in the number of bacteria (colony-forming units (CFU) in the consecutive days of culture on food contaminated with antibiotics (the initial number of bacteria for *S. oryzae* was 201 CFU and for *R. dominica* 40 CFU); D0: no antibiotic in the diet, D10 to D50: doses from 10 to 50 mg·g^{-1} of the antibiotic in the feed.

Based on the Kaplan–Meyer test results, significant differences in the *S. oryzae* survival rate ($p < 0.05$) occurred in the starving insects (background) (survival rate 1.6 after seven days of culture) compared to the control, antibiotic doses of 10, 20, 30, and 40 mg·g^{-1}, and antibiotic doses of 0, 10, and 20 mg·g^{-1} (survival rate ~0.94) versus 30, 40, and 50 mg·g^{-1} (survival rate 0.19–0.46). It was observed that the survivability of the insects at an antibiotic dose of 30 mg·g^{-1} did not differ from that observed at 40 mg·g^{-1}, but was significantly lower than the survival rate determined at a gentamicin dose of 50 mg·g^{-1} (Figure 3a).

The survival rate of *R. dominica* after seven days of cultivation was ~0.83; nevertheless, no significant differences were shown in the Kaplan–Meyer test (Figure 3b).

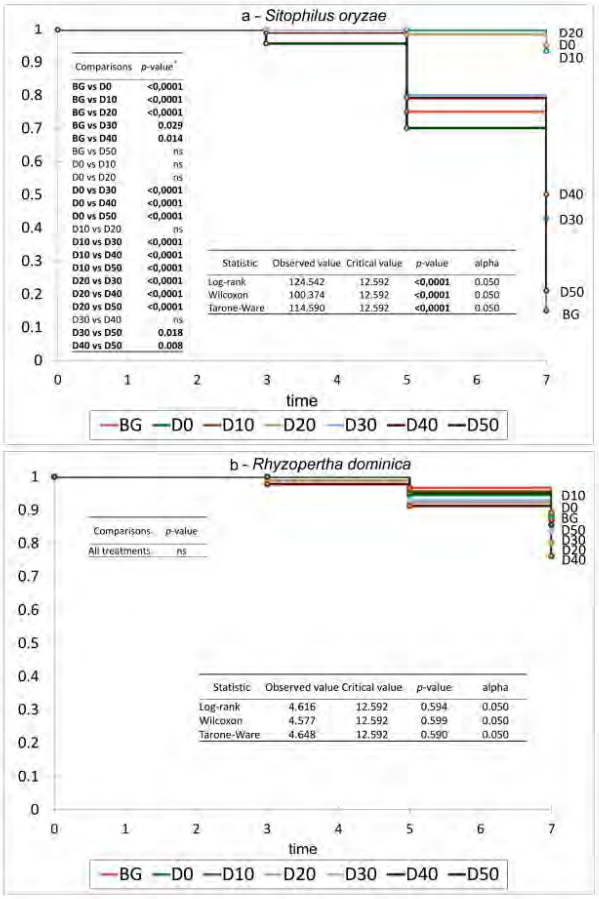


Figure 3. Kaplan–Meyer survival curve and *p*-value for a diet containing various doses of antibiotic and starving insects; BG: background (starving insects), D0: no antibiotic in the diet, D10 to D50: doses from 10 to 50 mg·g^{-1} of the antibiotic in the feed.

The segregation of treatments (variables) on the AHC dendrogram for *S. oryzae* allowed two groups of very high dissimilarity to be distinguished. The first group consisted of the insects treated with the antibiotic doses from 0 to 20 mg·g^{-1} with an almost low level of dissimilarity. The second group consisted of those treated with antibiotic doses from 30 to 50 mg·g^{-1} with low within-group homogeneity. BG (background—starving insects) samples were included in the group of samples with a higher concentration of the antibiotic, which proves its similar effect on insect mortality (Figure 4a). In the case of *R. dominica*, a division into two groups was made for the lethal dose effect. The explicit segregation of results obtained in particular experimental series proved unsuccessful. Only the three samples of the variant with antibiotic does of 50 mg·g^{-1} were categorized in group 2. Due to the extremely low dissimilarity for this dendrogram (~0.16), it should be assumed that there is no significant differentiation between the analyzed samples (Figure 4b).

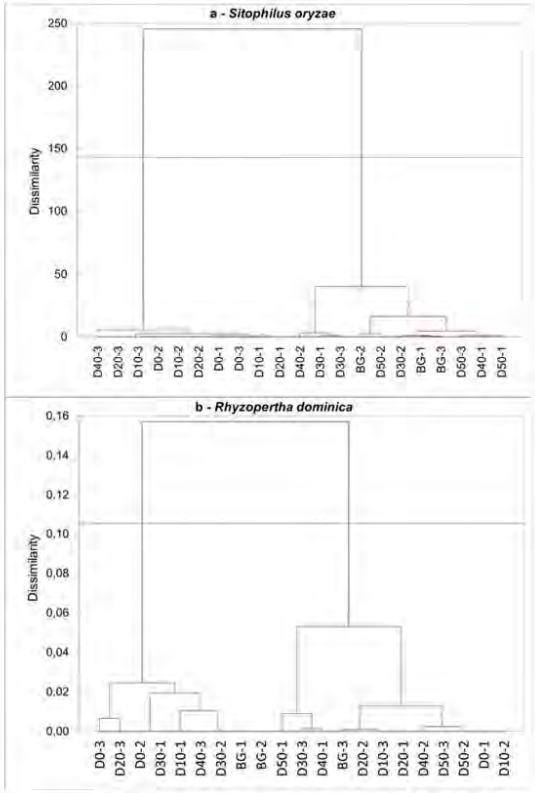


Figure 4. Agglomerative hierarchical clustering (AHC) dendrogram showing dissimilarity between samples based on lethal test values (**a**): *S. oryzae*, (**b**): *R. dominica*.

The results of the Pearson correlation test for *S. oryzae* showed that there were two nearly homogeneous groups of samples with a clear negative correlation. The first group consisted of each of the three replications for antibiotic doses from 0 to 20 mg·g^{-1}. The remaining high antibiotic doses (from 30 to 50 mg·g^{-1}) showed a negative correlation (<−0.6) with the aforementioned antibiotic doses that was found statistically significant in about half of the cases ($p > 0.05$; Figure 5a). The analysis of sterilization of the interior of *R. dominica* was also successful and at the antibiotic dose of 20 mg·g^{-1}, no bacteria were found on the media after five days of feeding on the contaminated feed. The sterile lesser grain borer showed a much better survival rate than the rice weevil (Figure 5b). Nevertheless, the individuals showed slightly weaker mobility, similar to the starving individuals (personal communication).

The grouping of the obtained biochemical profiles (left dendrogram) made it possible to distinguish two groups of variability. On the other hand, grouping the biochemical activity profiles of individual insects (treatments) allowed three separate groups to be distinguished (Figure 6). The first group (left clade on the dendrogram) consisted of live *S. oryzae* from the background and control groups. These lysates were characterized by high activity of α-fucosidase, β-glucosidase, and β-galactosidase as well as the utilization of D-maltose, L-arabinose, N-acetyl-glucosamine, potassium gluconate, malic acid, D-mannitol, trisodium citrate, 4-nitrophenyl-βD-galactopyroside, D-mannose, and reduction of nitrate to nitrite. Another group consisted of dissected guts from the dead background

S. oryzae, and live and dead *S. oryzae* fed on feed supplemented with the antibiotic. This group reduced in number and lost the activity or the ability to utilize substrates in at least 10 cases compared to the controls. The dead background specimens were characterized by high activity of α-fucosidase, β-galactosidase, 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, lipase, β-glucuronidase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. A drastic reduction in the activity against the controls was observed in the case of esterase/lipase (C8), leucine arylamidase, β-glucosidase, and in the assimilation of potassium nitrate, D-mannitol, and D-glucose. Live insects receiving the feed with the antibiotic showed high activity of α-chymotrypsin and assimilation of D-mannitol and adipic acid. Seventeen traits did not change from the control, while about half of the observed traits showed a decline or loss of activity. In the case of dead individuals receiving the feed containing the antibiotic, only an increase in the utilization capacity of phenylacetic acid was observed compared to the control. The activity of the twenty traits did not change. An increase in the L-arginine utilization capacity was observed. Nevertheless, a decrease in enzymatic activity and the ability to utilize substrates was observed for: phosphatase alkaline, esterase/lipase (C8), esterase (C4), valine arylamidase, 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, β-galactosidase, acid phosphatase, D-mannose, D-mannitol, malic acid, potassium gluconate, N-acetyl-glucosamine, L-arabinose, β-glucosidase, D-maltose, and the reduction of nitrate to nitrite (Figure 6).

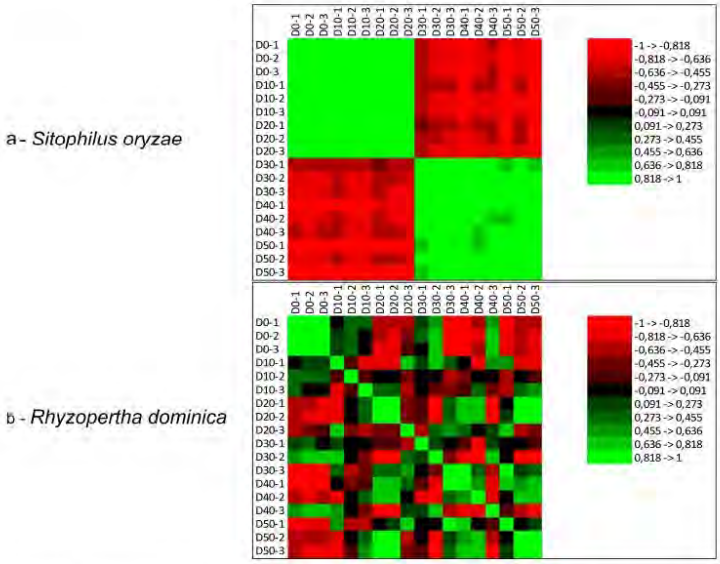


Figure 5. Heatmap based on cumulative correlation matrix (Pearson) of lethal test and bacteria CFU values ((**a**): *S. oryzae*, (**b**): *R. dominica*).

The last group consisted of all representatives of *R. dominica* included in this analysis. Regardless of the variants, all samples were characterized by the high activity of trypsin, cystine arylamidase, valine arylamidase, and protease, and the low activity of α-fucosidase, β-galactosidase, and β-glucuronidase. Guts prepared from control insects were only characterized by the lack of urease activity, while they had a high activity of traits common to this group mentioned above and α-glucosidase, α-chymotrypsin, esterase/lipase (C8), alkaline phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, and adipic acid utilization. The activity of the remaining traits was at an average level. In the background individuals, only lipase activity (C14) increased compared to the controls. Twenty traits did not change,

while suppressed activity was observed for 17 traits. The greatest decrease was observed in chymotrypsin, esculin hydrolysis, acid phosphatase, and α-glucosidase activity, D-glucose fermentation, and adipic acid, phenylacetic acid, D-mannose, malic acid, potassium gluconate, N-acetyl-glucosamine, L-arabinose, and D-maltose utilization. In the variant with food containing the antibiotic, an increase in the activity against the control was observed in the case of leucine arylamidase, 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, urease, and in the utilization of D-mannose, malic acid, L-arginine, and a reduction of nitrate to nitrite. No activity changes were observed for 25 traits, while suppressed activity was observed for naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, alkaline phosphatase, esterase/lipase (C8), esterase (C4), α-glucosidase, and adipic acid utilization (Figure 6).

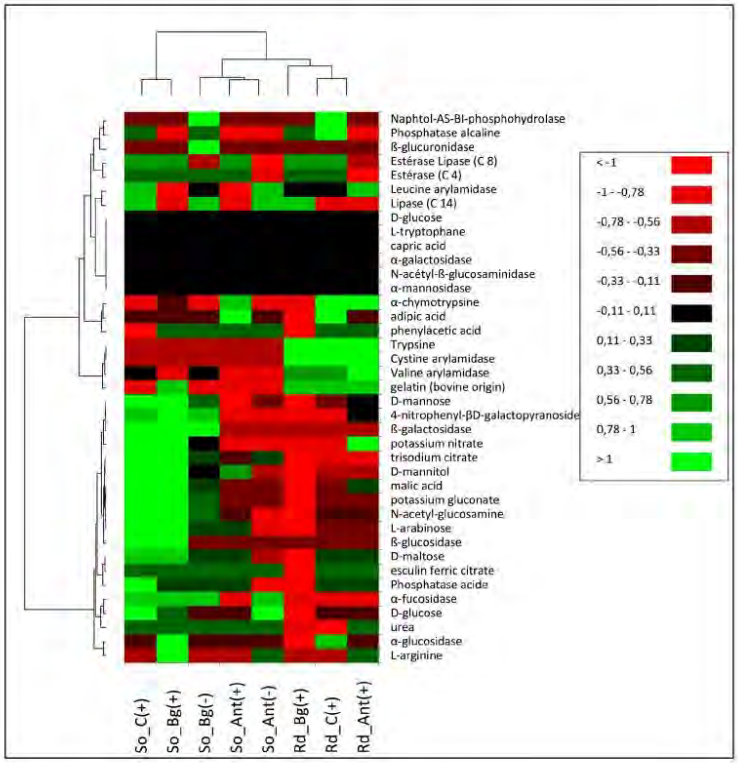


Figure 6. Heatmap showing the parameters of metabolism and enzymatic activity of the rice weevil microbiota and the lesser grain borer; So: *S. oryzae*, Rd: *R. dominica*, C: control, Bg: background, Ant: antibiotic, +: alive, –: dead.

4. Discussion

In this study, we confirmed that the loss of the symbiotic microbiota of the rice weevil caused a lethal effect, while the lesser grain borer, devoid of microbiota, showed a stable survival rate. It has also been proven that the lack of obligatory symbionts in the world of insects may cause, apart from the impaired utilization of nutrients, developmental impairment leading to death. Most of the research related to the role of the symbiotic microbiota concerns the gut microbiota and its important role in insect nutrition and immunology. A group of scientists [33] described the role of bacteria in the feeding of Asian long-horned beetle (*Anoplophora glabripennis*), which is an insect that feeds on the wood

of deciduous trees. This insect is incapable of degrading lignin and efficiently releasing bioavailable sugars. Nevertheless, the microbiome in the insect's intestine facilitates this process by allowing the insect to eat the sugars it has released. This group of scientists sequenced the microbiome of the digestive system of *A. glabripennis* and thus identified the genes of the microorganisms involved in the degradation of wood, including lignin. This group includes lactases, peroxidases, and β-esterases, as well as 36 families of glycosidic hydrolases, i.e., cellulases and xylanases, along with genes responsible for the bioavailability and increase in nutrient assimilation and their detoxification.

In addition to the function of the microbiota, it is also important to pay attention to the taxonomic groups of symbiotic bacteria associated with insects. Huang et al. [34] analyzed the intestinal microbiome of *Holotrichia parallela* larvae, whose larvae feed in the soil and cause severe crop yield losses. Based on 16S rRNA, ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) and biochemical tests, a cellulolytic bacterial community was identified (Proteobacteria (70.05%), followed by Actinobacteria (24.15%), Firmicutes (4.35%) and Bacteroidetes (1.45%), which included the following genera: *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Cellulosimicrobium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Dyadobacter*, *Siphonobacter*, *Paracoccus*, *Kaistia*, *Devosia*, *Labrys*, *Ensifer*, *Variovorax*, *Shinella*, *Citrobacter* and *Stenotrophomonas*). Like in the present study, it was observed that the Proteobacteria-order bacteria were the prevailing symbiotic microorganisms, regardless of their function.

Sodalis pierantnius was the eudominant species colonizing the digestive tract of the rice weevils. Among the microbiota considered to be rare, but having a significant share in the intestinal community, the following were also classified: *E. coli*, *Sodalis praecaptivus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Salmonella enterica*. The group of occasional species with a relatively high abundance included *Proteus mirabilis*, *Enterobacter hormaechei*, *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya dianthicola*, and *Providencia rettgeri*. These results clearly show that *Sodalis pierantonius* colonized the gastrointestinal tract as the eudominant bacterium. The remaining taxa were small in number and belonged to Enterobacteriaceae, typical representatives of the intestinal microbiota and, interestingly, other representatives of Pectobacteriaceae and *Proteus* sp., whose importance in the digestive system is unknown.

In turn, the *Sodalis* spp. genus bacteria have been identified as free-living bacteria, and a large group of species and strains were classified as insect symbionts. There was considerable genetic variation at the genomic level between free-living and symbiotic *Sodalis*. It was shown that symbionts had characteristic features such as a smaller genome size or a large number of pseudogenes. Nevertheless, the genome degeneration was not as great as for other symbionts. The abovementioned properties and the deletion-prone replication system indicate a recent period of symbiosis between these organisms and a potentially faster adaptation to the new host environment through adaptive mutations [35,36].

The research results obtained in this study suggest that the *Sodalis–Sitophilus* adaptive symbiotic system is most likely two-sided. This means that both the symbiotic bacterium and the host have abandoned some genome features useful for free-living organisms in promoting the dynamic adaptation and optimization of the mutual benefits of symbiosis. If *S. oryzae* did not lost its ability to function without becoming symbiotic, it is likely that the loss of the symbiont would significantly hinder its functioning; hence, it may be speculated that certain mechanisms responsible for nutrition, protection against pathogens, and/or survival in adverse environmental conditions would be impaired.

As indicated in the research by Tang et al. [37], *Nilaparvata lugens* bacterial symbionts are involved in the detoxification processes of this insect. The authors observed that high proportions of Wolbachia (including *Sodalis* spp.), *Arsenophonus*, *Acinetobacter*, and *Staphylococcus* bacteria were positively correlated with the activity of xenobiotic detoxification genes. In subsequent studies, a group of scientists [38] proved that bacteria of the genus *Acinetobacter* determine the detoxification of tea saponins in *Curculio chinensis*. In our research, next to eudominant *S. pierantonius*, we confirmed the presence of eudominant *S. praecaptivus* and *Staphylococcus* sp., which may be involved in detoxification processes and counteract negative environmental conditions. Survival tests showed that a weekly

fasting and feeding of the insects with food containing an antibiotic in a dose sterilizing the digestive system produced a comparable lethal effect of over 80%, with the highest mortality rate noted for the fasting individuals and the highest doses of gentamicin. On the other hand, the mortality rate of the individuals receiving the feed without the antibiotic did not exceed 10%.

Due to the subtle strategies of the host immune system in maintaining symbiosis with *S. pierantonius*, it appears that the lethal effect of fasting could entail a lack of nutrients for *S. oryzae*. The lack of symbionts could lead to dysfunction of the immune system, or, more surely, the transition of symbionts or other bacterial groups into parasitism or pathogenicity. The exact relationship of the immune system of the cereal weevil and Tsetse fly vs. *S. pierantonius* is described in Zaidman-Rémy et al. [39].

The lethal effect was also closely related to gastrointestinal sterilization. These observations prove that the lack of these bacteria impairs insect functions to a comparable extent to fasting. The most important function of the symbionts of the genus *Sodalis* is the production of cofactors, vitamins, and amino acids (tyrosine and phenylalanine). As shown by the scientific research of other authors, the lack of symbionts in the weevil leads to several distinct development anomalies [40–43].

Based on the results of nanopore sequencing analysis and the data in the KEGG database, we observed that *R. dominica* had bacteria serving different functions, the most important of which were carbon metabolism and the production of a large number of amino acids. Nevertheless, the presence of additional, unidentified symbionts raises questions about their function and prompts future metagenomic studies to take into account entire bacterial genomes. The above studies clearly show that *S. oryzae* has an obligatory symbiont and a very poor microbiome in terms of functional microorganisms, while a much larger number of dominant bacteria in *R. dominica* and the lack of their direct participation in the functioning of this pest may be the result of a much greater survival rate despite the sterilization of the bacteriome.

In this study, bacteria of the enphosymbiotic genera, such as *Sulcia* sp., *Cellulosilyticum* sp., *Walczuchella* sp., *Ruminococcus* sp., and *Blattabacterium* sp., were identified in the *R. dominica* bacteriome. In the study by Okude et al. [44], addressing the *R. dominica* bacteriome, the authors demonstrated that the main symbionts were pleomorphic and belong to Bacteroides. In addition, they included the following bacterial groups present in sucking-insect insects to this bacteriome: *Uzinaria*, *Brownia*, and *Walczuchella*, characteristic of scale insect, *Sulcia* sp., characteristic of a wider group of bugs, and *Blattabacterium* in omnivorous insects and xylophages, e.g., cockroaches [45]. The use of antibiotics in *Diaphorina citri* eliminated the insect symbionts *Candidatus* Profftella armature and *Wolbachia*, which suppressed the physiological process and metabolism of the insects [46].

In our research, we did not identify *Uzinaria* sp. or *Brownia* sp. Unfortunately, the pleomorphic symbiont *R. dominica* LC310894 [44] has not been identified due to the insufficient number of studies to date.

Another very important and confirmed discovery in these studies is the role of the key endosymbiotic bacteria in representatives of *Sitophilus* spp. As proven in the work of Vigneron et al. [47], until some point in adulthood, the amino acids phenylalanine and tyrosine, produced by the endosymbiotic *S. pierantonius*, are the precursors for the insect's production of DOPA (4-dihydroxyphenylalanine). This organic substance is necessary for the insect to stabilize and strengthen the structure of its exoskeleton.

As in previous studies involving pests [10,11], the symbiotic microbiome of insects partially determines the biochemical activity of the insect's body. Functional impairment, indirectly affecting the increasing mortality, was observed by increasing the depletion of the biochemical activity of *S. oryzae*. Owing to this, it was possible to identify features that constitute biomarkers of insects' functioning impairment. Based on the results presented on the heatmap, it can be seen that the activity of α-chymotrypsin and esterase/lipase (C8) was lost in the dead individuals, and the ability to utilize mainly D-mannitol decreased. On the other hand, as it was observed, animals fed with the antibiotic, both still alive and dead,

lost a significant part of the features determining enzymatic activity, which resulted in their death in the following days of the experiment. In the case of *R. dominica*, it was shown that the most drastic effect on biochemical activity was triggered by starvation, while the antibiotic had a much weaker effect. This suggests that the microbiome of this pest plays a less significant functional (physiological and nutritional) role than that of *S. oryzae*. Therefore, individuals devoid of the microbiome were able to survive with a sterile digestive system. The starvation of *S. oryzae* at a key stage of exoskeleton development affects the lack of supply of amino acids of exogenous (feed) and semi-homogeneous (microbiome) origin, which indicates the high sensitivity of individuals to microbiome disorders, which indirectly contributes to their death.

5. Conclusions

Many countries are moving towards implementing sustainable solutions in plant protection. The initiatives in Europe include the "European Green Deal" or "Farm to Fork". They are aimed at drastically reducing the use of synthetic chemicals in agriculture, which have a strong environmental impact. The rice weevil and lesser grain borer are very important warehouse pests, and their reduction is strategic. Nevertheless, it will be difficult after the withdrawal of typical pesticides. The obligatory symbiotic nature of the *Sodalis pierantonius* bacterium at a key moment in the life of adult *Sitophilus* spp. opens up a new perspective for natural antibiotics and bactericides. Confirmation that certain insects enter into symbiotic interactions with the microbiota suggests the need for extensive testing of the pest's susceptibility to the loss of gut microbiota, which could open a new path in storage pest control strategies. Instead of using strong insecticides in storage and means of transport, non-synthetic substances could be applied to destroy the symbiont, which would hamper the development of the weevil caused, among others, by the lack of essential amino acids delivered by symbionts for the development of the host. Another strategy may be biological advances in new cereal varieties, leading to the natural production of bacteriostatic substances against *S. pierantonius*, which could help address the global problem of cereal storage losses caused by *Sitophilus* spp.

Author Contributions: Conceptualization, O.K., S.W.P. and M.N.; methodology, O.K. and S.W.P.; software, S.W.P. and O.K.; validation, O.K., S.W.P. and M.N.; formal analysis, O.K., S.W.P. and M.N.; investigation, O.K. and S.W.P.; resources, O.K. and S.W.P.; data curation, O.K. and S.W.P.; writing—original draft preparation, O.K., S.W.P. and M.N.; writing—review and editing, O.K., M.N. and S.W.P.; visualization, O.K., M.N. and S.W.P.; supervision, M.N. and S.W.P.; project administration, O.K.; funding acquisition, O.K., M.N. and S.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The results presented in this paper were obtained as a part of comprehensive study financed by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics. This work was supported by a research project of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (no. 30.610.010-110 and 30.610.011-110). The study was supported by the Polish National Science Centre under the project no. UMO-2021/41/N/NZ9/00364.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Metabarcoding data are available on the website (https://epi2me.nanoporetech.com/report-366053, accessed on 20 November 2022).

Acknowledgments: We would like to thank Bożena Kordan for her support in carrying out the research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Béné, C.; Oosterveer, P.; Lamotte, L.; Brouwer, I.D.; de Haan, S.; Prager, S.D.; Talsma, E.F.; Khoury, C.K. When Food Systems Meet Sustainability—Current Narratives and Implications for Actions. *World Dev.* **2019**, *113*, 116–130. [CrossRef]
2. Stejskal, V.; Hubert, J.; Aulicky, R.; Kucerova, Z. Overview of Present and Past and Pest-Associated Risks in Stored Food and Feed Products: European Perspective. *J. Stored Prod. Res.* **2015**, *64*, 122–132. [CrossRef]
3. Phillips, T.W.; Throne, J.E. Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 375–397. [CrossRef] [PubMed]
4. Srivastava, S.; Mishra, H.N. Ecofriendly Nonchemical/Nonthermal Methods for Disinfestation and Control ofPest/Fungal Infestation during Storage of Major Important Cereal Grains: A Review. *Food Front.* **2021**, *2*, 93–105. [CrossRef]
5. Mesterházy, Á.; Oláh, J.; Popp, J. Losses in the Grain Supply Chain: Causes and Solutions. *Sustainability* **2020**, *12*, 2342. [CrossRef]
6. Warchalewski, J.; Gralik, J.; Nawrot, J. Possibilities of Reducing Losses of Stored Cereal Grain Caused by Insect Pests. *Prog. Agric. Sci.* **2000**, *47*, 85–86.
7. Opit, G.; Collins, P.J.; Daglish, G.J. Resistance Management. In *Stored Product Protection*; Hagstrum, D.W., Phillips, T.W., Cuperus, G., Eds.; Kansas State University: Manhattan, KS, USA, 2012; pp. 143–155.
8. Nietupski, M.; Ludwiczak, E.; Cabaj, R.; Purwin, C.; Kordan, B. Fatty Acids Present in Wheat Kernels Influence the Development of the Grain Weevil (*Sitophilus granarius* L.). *Insects* **2021**, *12*, 806. [CrossRef]
9. Klejdysz, T.; Nawrot, J. First Record of Outdoor Occurrence of Stored-Product Coleopterans in Arable Landscape in Poland. *J. Plant Prot. Res.* **2010**, *50*, 551–553. [CrossRef]
10. Przemieniecki, S.W.; Kosewska, A.; Ciesielski, S.; Kosewska, O. Changes in the Gut Microbiome and Enzymatic Profile of Tenebrio Molitor Larvae Biodegrading Cellulose, Polyethylene and Polystyrene Waste. *Environ. Pollut.* **2020**, *256*, 113265. [CrossRef]
11. Przemieniecki, S.W.; Kosewska, A.; Kosewska, O.; Purwin, C.; Lipiński, K.; Ciesielski, S. Polyethylene, Polystyrene and Lignocellulose Wastes as Mealworm (Tenebrio Molitor L.) Diets and Their Impact on the Breeding Condition, Biometric Parameters, Metabolism, and Digestive Microbiome. *Sci. Total Environ.* **2022**, *832*, 154758. [CrossRef]
12. Brandon, A.M.; Gao, S.H.; Tian, R.; Ning, D.; Yang, S.S.; Zhou, J.; Wu, W.M.; Criddle, C.S. Biodegrada tion of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of Tenebrio Molitor) and Effects on the Gut Microbiome. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 6526–6533. [CrossRef] [PubMed]
13. Jung, C.M.; Carr, M.; Fleischman, E.; Roesch, C.J. Response of the Green June Beetle and Its Gut Microbiome to RDX and Phenanthrene. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2021**, *18*, 1785–1792. [CrossRef]
14. Perlmutter, J.I.; Bordenstein, S.R. Microorganisms in the Reproductive Tissues of Arthropods. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 97–111. [CrossRef] [PubMed]
15. Akman, L.; Yamashita, A.; Watanabe, H.; Oshima, K.; Shiba, T.; Hattori, M.; Aksoy, S. Genome Sequence of the Endocellular Obligate Symbiont of Tsetse Flies, Wigglesworthia Glossinidia. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 402–407. [CrossRef]
16. Behar, A.; Yuval, B.; Jurkevitch, E. Enterobacteria-Mediated Nitrogen Fixation in Natural Populations of the Fruit Fly Ceratitis Capitata. *Mol. Ecol.* **2005**, *14*, 2637–2643. [CrossRef]
17. Sabree, Z.L.; Kambhampati, S.; Moran, N.A. Nitrogen Recycling and Nutritional Provisioning by Blattabacterium, the Cockroach Endosymbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19521–19526. [CrossRef]
18. Nadarasah, G.; Stavrinides, J. Insects as Alternative Hosts for Phytopathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 555–575. [CrossRef]
19. Toh, H.; Weiss, B.L.; Perkin, S.A.H.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Hattori, M.; Aksoy, S. Massive Genome Erosion and Functional Adaptations Provide Insights into the Symbiotic Lifestyle of Sodalis Glossinidius in the Tsetse Host. *Genome Res.* **2006**, *16*, 149–156. [CrossRef]
20. Sudakaran, S.; Kost, C.; Kaltenpoth, M. Symbiont Acquisition and Replacement as a Source of Ecological Innovation. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 375–390. [CrossRef]
21. Xia, X.; Gurr, G.M.; Vasseur, L.; Zheng, D.; Zhong, H.; Qin, B.; Lin, J.; Wang, Y.; Song, F.; Li, Y.; et al. Metagenomic Sequencing of Diamondback Moth Gut Microbiome Unveils Key Holobiont Adaptations for Herbivory. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 663. [CrossRef]
22. Heddi, A.; Grenier, A.M.; Khatchadourian, C.; Charles, H.; Nardon, P. Four Intracellular Genomes Direct Weevil Biology: Nuclear, Mitochondrial, Principal Endosymbiont, and Wolbachia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6814–6819. [CrossRef] [PubMed]
23. Maire, J.; Parisot, N.; Ferrarini, M.G.; Vallier, A.; Gillet, B.; Hughes, S.; Balmand, S.; Vincent-Monégat, C.; Zaidman-Rémy, A.; Heddi, A. Spatial and Morphological Reorganization of Endosymbiosis during Metamorphosis Accommodates Adult Metabolic Requirements in a Weevil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 19347–19358. [CrossRef]
24. Maire, J.; Vincent-Monégat, C.; Masson, F.; Zaidman-Rémy, A.; Heddi, A. An IMD-like Pathway Mediates Both Endosymbiont Control and Host Immunity in the Cereal Weevil *Sitophilus* Spp. *Microbiome* **2018**, *6*, 158. [CrossRef] [PubMed]
25. Borzoui, E.; Naseri, B. Wheat Cultivars Affecting Life History and Digestive Amylolytic Activity of Sitotroga Cerealella Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bull. Entomol. Res.* **2016**, *106*, 464–473. [CrossRef] [PubMed]
26. Lü, D.; Dong, Y.; Yan, Z.; Liu, X.; Zhang, Y.; Yang, D.; He, K.; Wang, Z.; Wang, P.; Yuan, X.; et al. Dynamics of gut microflora across the life cycle of *Spodoptera frugiperda* and its effects on the feeding and growth of larvae. *Pest Manag. Sci.* **2022**, *79*, 173–182. [CrossRef]
27. Yang, Y.; Yang, J.; Wu, W.-M.; Zhao, J.; Song, Y.; Gao, L.; Yang, R.; Jiang, L. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 12087–12093. [CrossRef]

28. Yang, Y.; Yang, J.; Wu, W.-M.; Zhao, J.; Song, Y.; Gao, L.; Yang, R.; Jiang, L. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 12080–12086. [CrossRef]
29. Yang, J.; Yang, Y.; Wu, W.-M.; Zhao, J.; Jiang, L. Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 13776–13784. [CrossRef]
30. Engel, P.; Moran, N.A. The Gut Microbiota of Insects—Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 699–735. [CrossRef]
31. Oxford Nanopore Technologies. 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) Version:16S_9086_v1_revT_14Aug2019. 2019. Available online: https://Community.Nanoporetech.Com/Docs/Prepare/Library_prep_protocols/16S-Barcoding-1-24/v/16s_9086_v1_revt_14aug2019 (accessed on 5 July 2022).
32. Przemieniecki, S.W.; Damszel, M.; Ciesielski, S.; Kubiak, K.; Mastalerz, J.; Sierota, Z.; Gorczyca, A. Bacterial microbiome in Armillaria ostoyae rhizomorphs inhabiting the root zone during progressively dying Scots pine. *Appl. Soil Ecol.* **2021**, *164*, 103929. [CrossRef]
33. Scully, E.D.; Geib, S.M.; Hoover, K.; Tien, M.; Tringe, S.G.; Barry, K.W.; Glavina del Rio, T.; Chovatia, M.; Herr, J.R.; Carlson, J.E. Metagenomic Profiling Reveals Lignocellulose Degrading System in a Microbial Community Associated with a Wood-Feeding Beetle. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73827. [CrossRef] [PubMed]
34. Huang, S.; Sheng, P.; Zhang, H. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Holotrichia Parallela Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2563–2577. [CrossRef]
35. Clayton, A.L.; Jackson, D.G.; Weiss, R.B.; Dale, C. Adaptation by Deletogenic Replication Slippage in a Nascent Symbiont. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1957–1966. [CrossRef] [PubMed]
36. Tláskal, V.; Pylro, V.S.; Žifčáková, L.; Baldrian, P. Ecological Divergence Within the Enterobacterial Genus Sodalis: From Insect Symbionts to Inhabitants of Decomposing Deadwood. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 699699. [CrossRef] [PubMed]
37. Tang, T.; Zhang, Y.; Cai, T.; Deng, X.; Liu, C.; Li, J.; He, S.; Li, J.; Wan, H. Antibiotics increased host insecticide susceptibility via collapsed bacterial symbionts reducing detoxification metabolism in the brown planthopper, Nilaparvata lugens. *J. Pest Sci.* **2020**, *94*, 757–767. [CrossRef]
38. Zhang, S.; Li, Z.; Shu, J.; Xue, H.; Guo, K.; Zhou, X. Soil-Derived Bacteria Endow Camellia Weevil with More Ability to Resist Plant Chemical Defense. *Microbiome* **2022**, *10*, 97. [CrossRef]
39. Zaidman-Rémy, A.; Vigneron, A.; Weiss, B.L.; Heddi, A. What can a weevil teach a fly, and reciprocally? Interaction of host immune systems with endosymbionts in Glossina and Sitophilus. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 279–292. [CrossRef]
40. Wicker, C.; Nardon, P. Development Responses of Symbiotic and Aposymbiotic Weevils *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae) to a Diet Supplemented with Aromatic Amino Acids. *J. Insect Physiol.* **1982**, *28*, 1021–1024. [CrossRef]
41. Wicker, C. Differential Vitamin and Choline Requirements of Symbiotic and Aposymbiotic s. Oryzae (Coleoptera: Curculionidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* **1983**, *76*, 177–182. [CrossRef]
42. Gasnier-Fauchet, F.; Gharib, A.; Nardon, P. Comparison of methionine metabolism in symbiotic and aposymbiotic larvae of Sitophilus oryzae L. (Coleoptera: Curculionidae)—I. Evidence for a glycine N-methyltransferase-like activity in the aposymbiotic larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1986**, *85*, 245–250. [CrossRef]
43. Gasnier-Fauchet, F.; Nardon, P. Comparison of sarcosine and methionine sulfoxide levels in symbiotic and aposymbiotic larvae of two sibling species, Sitophilus oryzae L. and S. zeamais mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem.* **1987**, *17*, 17–20. [CrossRef]
44. Okude, G.; Koga, R.; Hayashi, T.; Nishide, Y.; Meng, X.-Y.; Nikoh, N.; Miyanoshita, A.; Fukatsu, T. Novel bacteriocyte-associated pleomorphic symbiont of the grain pest beetle Rhyzopertha dominica (Coleoptera: Bostrichidae). *Zoöl. Lett.* **2017**, *3*, 13. [CrossRef] [PubMed]
45. Hunter, M.S.; Zchori-Fein, E. Inherited Bacteroidetes Symbionts in Arthropods. In *Insect Symbiosis*; Bourtzis, K., Miller, T.A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; Volume 2, pp. 39–56.
46. Ashraf, H.J.; Ramos Aguila, L.C.; Akutse, K.S.; Ilyas, M.; Abbasi, A.; Li, X.; Wang, L. Comparative Microbiome Analysis of Diaphorina Citri and Its Associated Parasitoids Tamarixia Radiata and Diaphorencyrtus Aligarhensis Reveals Wolbachia as a Dominant Endosymbiont. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24*, 1638–1652. [CrossRef] [PubMed]
47. Vigneron, A.; Masson, F.; Vallier, A.; Balmand, S.; Rey, M.; Vincent-Monégat, C.; Aksoy, E.; Aubailly-Giraud, E.; Zaidman-Rémy, A.; Heddi, A. Insects Recycle Endosymbionts When the Benefit Is Over. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, 2267–2273. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PUBLIKACJA 2

Journal of Plant Protection Research eISSN 1899-007X

ORIGINAL ARTICLE

The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.)

Olga Kosewska*, Mariusz Nietupski, Stanisława Koronkiewicz, Sebastian Wojciech Przemieniecki

Faculty of Agriculture and Forestry, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland

DOI: 10.24425/jppr.2024.150254

Received: February 16, 2024
Accepted: April 16, 2024
Online publication: July 02, 2024

*Corresponding address:
olga.kosewska@uwm.edu.pl

Responsible Editor:
Magdalena Karbowska-Dzięgielewska

Abstract

The lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) are stored grain pests that cause significant economic losses in grain storage. This study aimed to analyze the impact of the chemical composition of wheat and barley grain (e.g., protein, fatty acids and total antioxidant capacity) on the development of two species of storage pests and to determine the relationship between the analyzed variables. The study involved the evaluation of 10 wheat cultivars and 10 barley cultivars under laboratory conditions. The observations included assessing the beetles' progeny abundance, dust mass produced after feeding, and grain mass loss. The chemical composition of the tested wheat and barley cultivars was also determined, and the influence of different chemical compositions on insect development was investigated. The results of the experiment revealed diversity of resistance among cultivars to pest feeding. Larger populations of the lesser grain borer were observed on barley grains, while rice weevil populations were higher on wheat. Cultivars with higher protein and fat content were more susceptible to pest attacks. A connection between the amount of dust, grain mass loss, and the type of pest was also identified, indicating differences in feeding mechanisms and selective food preferences of these insects. The grain chemistry of wheat cultivars, including the content of fatty acids and antioxidants, significantly influenced the progeny abundance of *S. oryzae*, suggesting the potential of these components as natural barriers against storage pests. This study provides valuable insights for developing breeding strategies to enhance the natural resistance of new grain cultivars to these pests, contributing to the reduction of pesticide use. Statistical analyses confirmed the significance of differences in grain composition in varied resistance to the studied pests. The conclusions drawn from this work may help establish new storage and breeding practices, promoting sustainable agriculture and protecting natural resources.

Keywords: barley, food security, storage pests, *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, wheat

Introduction

Due to the significant risk caused by storage pests, stored products should be effectively protected against their destructive impact. This is especially important because as the average temperature increases, the development of pests is much faster, and the losses are more significant (Warchalewski *et al.* 2000). According to FAO data, global grain losses amount to approximately 10%. Feeding of storage insect pests on grain may lead to weight loss, fungal growth and loss of quality associated with an increase in the content of free fatty acids (Trematerra 2009).

In Poland and around the world, the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) and the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) are among the most harmful

primary pests (Nowaczyk *et al.* 2008; Edde 2012; Hagstrum and Flinn 2014; Nietupski *et. al* 2017; Saad *et al.* 2018; Draz *et al.* 2021; Vianna *et al.* 2023). Significant differences in grain colonization mechanisms are observed between the species mentioned above, especially in the context of oviposition processes and food intake by larvae. Female weevils bite a small hole in the kernel, where they deposit eggs, and then secure this place, the so-called "cork" – a sticky substance that they mix with the grain's starch. However, female lesser grain borers lay eggs on the surface of the grain, and the hatching larvae penetrate its structure, continuing their development there. In the primary larval stages, *R. dominica* can feed on dust generated by adults. The larvae then bite into the grain, taking advantage of existing damage caused by adults or natural cracks and damage to the grain structure (Gołębiowska 1969; Nietupski 2020).

Non-chemical methods cannot provide sufficient protection against the feeding of storage pests, and it is necessary to use chemical agents. Unfortunately, this approach is contrary to consumer expectations and the assumptions of the European Green Deal, which strive to maintain food security with minimal impact on the natural environment (Dal Bello *et al.* 2000; Derbalah and Ahmed 2011; Klejdysz and Mrówczyński 2017). From this perspective, a strategic approach is to reduce pest populations by developing plant genetic resistance. It is worth noting, however, that so far most breeding programs have focused mainly on improving seed yield and quality without increasing plant resistance to storage pests (Keneni *et al.* 2011; Kordan *et al.* 2023).

The type of food stored is significant, and certain factors determine the vulnerability of specific cereal varieties to foraging by storage pests. The physical qualities of kernels, such as grain hardness, glassiness, and thickness of the seed cover, as well as biochemical factors, play crucial roles. Grains with lower nutritional value are less attractive, which reduce egg laying and feeding range (Nawrot *et al.* 2010). Insects prefer grains with higher protein content and are free of substances that limit their development (Perisic *et al.* 2018). The development of storage pests, such as the rice weevil, may be influenced by the variety and amount of sugars contained in the product (Chippendale 1972). According to research conducted by Majd-Marani *et al.* (2023), the content of phenols and lipids in their food also significantly impacts the development of these pests. The analysis of the influence of the content of fatty acids in grain on the development of insects suggests that the presence of fats in cereal plants also plays a crucial role in shaping the storage stability of cereal products and may influence the feeding behavior of storage pests (Liu 2011).

This research aimed to gain a deeper understanding of the mechanisms of cereal resistance, focusing on a detailed study of the effects of individual grain chemical components on the development of storage pests: *R. dominica* and *S. oryzae*. It also aimed to develop innovative preventive methods against pest feeding in cereal stores, which are based on knowledge of the chemical composition of the grain. The study results can be used to develop new cereal cultivars with naturally enhanced pest resistance. Focusing on the ecological aspects of pest control, this study proposed alternatives to the use of pesticides, contributing to the development of sustainable agriculture. Additionally, it sought to investigate the impact of changes in farming and storage practices on reducing pest losses, which is important for agricultural efficiency and economics. With the objective of determining the influence of the chemical composition of wheat and barley grain on the development of the *R. dominica* and *S. oryzae*, specific research hypotheses were set:

- The specific biochemical composition of the grains, which includes, among other things, different protein, lipid, or carbohydrate contents, plays a crucial role in shaping the resistance of these grains to pest attacks. This hypothesis suggests that identifying specific biochemical components that enhance grain resistance or susceptibility will enable a deeper understanding of resistance mechanisms.
- Differences in grain chemical profiles affect feeding behavior, reproduction, and pest survival. Certain components may act as natural repellents, reducing pest foraging or attracting pests, increasing their abundance. This opens up the prospect of exploring the relationship between specific chemical components of grains and insect feeding preferences and survival strategies.

Materials and Methods

Materials

Entomological observations were conducted on grains of 10 wheat cultivars: Rotax, Kilimanjaro, Impresja, Lawina, Tybalt, Rusałka, Feeling, Varius, Telimena, and Mandaryna, as well as 10 barley cultivars: Radek, Ismena, Avatar, Flair, Trofeum, RGT Planet, Accordine, Amidala, KWS Dante, and RGT Baltic. The studied cultivars were categorized into functional types of grain, such as fodder and malting barley, and utility forms, such as spring and winter wheat. The examined grains originated from the Experimental Variety Assessment Station in Wrócikowo, Poland. These cultivars were chosen because they are commonly grown

in northern Poland and have particular agronomic or quality characteristics that make them attractive to research. Individuals of the studied beetle species (*R. dominica* and *S. oryzae*) used in the experiment were obtained from mass breeding conducted in the Department of Entomology, Phytopathology, and Molecular Diagnostics at UWM in Olsztyn, where insect development is monitored, and the colony size is regulated. Young (1–2 days old) adult beetles were used for further experiments.

Experiment with different feed variants

In the experiment, the development of the lesser grain borer and the rice weevil on grains of selected cereal species was analyzed. The grains were conditioned in a breeding chamber for 7 days at 30°C and 80% RH and then sieved through a 1 mm mesh to separate the dust. In containers (with a ventilation hole) measuring 8 cm in diameter and 3 cm in height, 20 g of grain samples from each variety were placed. For each sample, 20 individuals of rice weevil or lesser grain borer were introduced at a sex ratio of 1:1. After 2 weeks, adult individuals were removed from the containers, and monitoring for the presence of emerging young progeny of beetle individuals began. The experiment concluded when no beetles were observed on the material within 10 days. Subsequently, measurements were taken for the mass of dust produced after beetle feeding, and the loss of grain mass was determined (using a WPS 220/C/2 laboratory scale). The experiment was conducted in a Sanyo MLR-350H climatic chamber under optimal conditions for the studied species, i.e., 30°C, 80% RH (Gołębiowska *et al.* 1976). The study was conducted in 10 repetitions.

Chemical analyses of grain

Dry mass was determined using the drying method. Crude ash was determined by burning an air-dry sample. The Kjeldahl method determined the total protein content, following standard PN-ISO 5983.2000. Crude fat was extracted using a Soxhlet extractor, following standard PN-ISO 6492: 2005 procedures. The crude fiber was determined by the classic Henneberg-Stohmann method for determining the raw fiber content of feed following the PN–EN ISO 6865.2002 standard. The anthrone method determined water-soluble sugars – WSC (Thomas 1977). The antioxidant capacity of samples was determined according to the Benzie and Strain method (1996) with some modifications. Ascorbic acid was used as the standard, and distilled water was used as the blank control. An adequately diluted sample or standard (0.1 ml) was added to a mixture of 4.0 mL of FRAP reagent. The mixture was incubated for 10 min in the dark, and the absorbance was measured at 593 nm against a blank prepared using distilled water. To prepare the calibration curve, the standards of ascorbic acid were used in the range from 0.01 to 0.2 mg · ml^{-1}.

Statistical analysis

The results, describing the chemical composition of the examined barley and wheat cultivars, as well as parameters related to beetle development (the abundance of the progeny, the mass of produced dust, and the loss of grain mass), were subjected to a distribution assessment using the Shapiro-Wilk test. Data that did not follow a normal distribution (antioxidants, dry mass, ash, protein, fiber) underwent logarithmic transformation ($ln\ x+1$). To assess the significance of differences in the examined variables across combinations of used grain cultivars, a one-way analysis of variance (ANOVA) was applied. Groups with statistically non-differentiating average values of examined parameters related to pest development were labelled with the same letter index: a, b, c... (Tukey's HSD test). Depending on their chemical composition, differences between the studied species and forms of grains were presented using non-metric multidimensional scaling (NMDS), using Bray-Curtis's measure of similarity. A non-parametric ANOSIM test (Clarke 1993) was applied for statistical assessment of differences. Graphical evaluation of the relationship between the chemical composition of grain and the abundance of the pest's progeny was conducted using ordination techniques – RDA (Braak and Šmilauer 1998). Statistical calculations and their graphical interpretation were performed using Statistica 13.1, Canoco 4.51, and Past 2.01.

Results

Data on the number of progeny generation, the weight of dust produced and grain weight loss, and the chemical properties of the grains tested are shown in Table 1.

Based on the analysis of variance (ANOVA) results, significant differences in the development of *R. dominica* and *S. oryzae* were observed, which were related to various factors such as species, grain type, and cultivar. Significant differences were observed in the number of progeny individuals, grain mass loss and dust mass in the case of the studied species and varieties. Factors such as the type of barley grain for both tested pest species and wheat variety for *S. oryzae* and some chemical properties did not differ statistically (Table 2).

The highest number of progeny individuals of *R. dominica* was observed on barley grains (mean 99.92). Significantly fewer *R. dominica* individuals were recorded on wheat grains (mean 42.39). Analyzing the

Table 1. Comparison of development parameters of *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* developing on selected cultivars of wheat and barley and grain composition characteristics of the cultivars used in the experiment

Combination		Progeny of beetles [pcs.]		Mass of dust [g]		Loss of grain mass [g]		Dry matter	Crude Ash	Total Protein	Crude fat	Crude fiber	WSC	Antioxidants*
		Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Wheat		42.39 a**	262.05 b	0.44 a	0.26 b	0.71 a	10.26 b	89.08 b	1.75 a	12.57 b	1.61 a	2.72 a	3.13	0.0217 a
Barley		99.92 b	132.06 a	1.03 b	0.21 a	1.74 b	5.83 a	88.94 a	2.16 b	11.79 a	1.79 b	4.63 b	3.33	0.1276 b
Wheat:	spring	28.70 a	259.87	0.32 a	0.24	0.55 a	12.16 b	89.05	1.78	13.26 b	1.66	2.75	3.38 b	0.0240 a
	winter	62.93 b	265.33	0.63 b	0.27	0.96 b	7.41 a	89.14	1.70	11.54 a	1.53	2.68	2.76 a	0.0183 a
Barley:	brewery	91.32	137.50	0.94	0.22	1.59	5.86	88.91	2.14	11.96	1.80	4.52	3.71 b	0.1190 a
	fodder	108.52	126.62	1.12	0.19	1.88	5.81	88.97	2.18	11.61	1.78	4.74	2.94 a	0.1362 b
Cultivar of wheat	Feeling	14.80 ab	226.50 a	0.16 ab	0.19 a	0.26 ab	12.47 b	89.22 f	1.75 bc	13.80 e	1.90 e	2.75 b	2.89 ab	0.0158 a
	Impresja	104.20 e	268.70 a	0.88 d	0.23 ab	1.43 d	3.23 a	89.35 g	1.75 bc	12.00 c	1.75 de	2.65 ab	2.59 a	0.0211 ab
	Kilimanjaro	48.40 d	255.20 a	0.67 cd	0.33 b	0.87 c	11.88 b	88.81 b	1.60 a	11.15 b	1.55 c	2.80 b	2.67 a	0.0136 a
	Lawina	65.60 de	236.70 a	0.60 cd	0.26 ab	1.00 c	3.06 a	89.37 g	1.75 bc	10.65 a	1.50 c	2.70 ab	2.87 ab	0.0199 a
	Mandaryna	22.60 ab	253.70 a	0.30 b	0.24 ab	0.82 c	12.22 b	89.19 f	1.70 b	12.45 d	1.50 c	2.55 a	3.09 b	0.0241 ab
	Rotax	33.50 b	300.70 a	0.36 b	0.27 ab	0.54 b	11.46 b	89.04 d	1.70 b	12.35 cd	1.30 a	2.55 a	2.90 ab	0.0185 a
	Rusałka	9.40 a	293.30 a	0.10 a	0.27 ab	0.21 a	11.72 b	89.09 de	1.75 bc	13.15 a	1.35 b	2.65 ab	4.51 d	0.0319 b
	Telimena	34.20 c	231.50 a	0.44 c	0.25 ab	0.65 b	12.44 b	89.11 e	1.85 c	14.95 f	1.75 de	2.75 b	3.10 b	0.0236 ab
	Tybalt	36.00 c	275.50 a	0.38 b	0.29 ab	0.56 b	11.77 b	88.97 c	1.60 a	11.15 b	1.70 d	2.65 ab	3.37 c	0.0169 a
	Varius	55.20 de	278.70 a	0.52 c	0.22 ab	0.80 bc	12.35 b	88.71 a	2.00 d	14.05 e	1.75 de	3.15 c	3.35 c	0.0317 b
Cultivar of barley	Accordine	50.70 bc	193.10 de	0.55 ab	0.34 d	0.95 ab	12.26 d	88.43 a	2.20 bc	12.30 cd	1.95 d	4.60 cd	3.71 d	0.0748 a
	Amidala	112.80 d	105.10 bc	1.21 bc	0.19 b	2.05 bc	1.70 bc	89.06 d	2.20 bc	12.20 c	1.75 c	5.15 f	3.68 d	0.1283 bc
	Avatar	114.60 d	96.30 b	1.24 bc	0.14 ab	2.11 c	1.56 bc	89.05 d	1.95 a	12.55 d	1.45 a	4.35 c	3.24 c	0.1077 ab
	Flair	140.40 d	82.30 ab	1.44 c	0.13 ab	2.55 c	1.31 b	89.05 d	2.30 d	12.25 cd	1.60 b	4.95 ef	3.67 d	0.1189 b
	Ismena	105.50 c	154.60 d	1.19 b	0.28 cd	1.86 b	12.70 d	89.09 d	2.25 c	10.30 a	2.20 e	4.55 cd	2.74 b	0.1658 c
	KWS Dante	126.50 d	64.80 a	1.47 c	0.09 a	2.38 c	0.96 a	89.14 e	2.15 b	10.30 a	1.80 cd	5.00 ef	3.62 d	0.1395 bc
	Radek	16.80 a	216.50 e	0.28 a	0.25 c	0.43 a	12.19 d	88.83 c	2.20 bc	10.60 b	1.90 d	4.85 d	2.30 a	0.1473 bc
	RGT Baltic	147.00 d	137.90 c	1.21 bc	0.19 b	2.16 c	2.00 c	89.36 f	2.20 bc	12.50 cd	1.85 cd	3.80 a	3.92 d	0.1416 bc
	RGT Planet	19.60 b	186.60 de	0.27 a	0.30 d	0.43 a	12.36 d	88.55 b	1.95 a	12.50 cd	1.65 b	4.05 b	3.61 d	0.1109 ab
	Trofeum	165.30 d	83.40 ab	1.45 c	0.14 ab	2.47 c	1.27 ab	88.85 c	2.20 bc	12.35 cd	1.75 c	5.00 ef	2.78 b	0.1413 bc

So – Sitophilus oryzae, Rd – Rhyzopertha dominica, * – concentration of antioxidants in ascorbic acid equivalents, ** – means in columns followed by the same letter do not differ (Tukey's HSD test)

Table 2. Results of statistical analysis (ANOVA) for *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* development parameters and selected chemical properties of the tested grains

	df		ANOVA F Value		p^*	
	Development parameters of *R. dominica* and *S. oryze* on species of grain: wheat and barley					
	Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*
Progeny of beetles	1	1	31.04	165.14	0.00	0.00
Loss of grain mass	1	1	57.48	60.61	0.00	0.00
Mass of dust	1	1	49.16	13.50	0.00	0.00
	Developmental parameters of *R. dominica* and *S. oryze* on wheat grain type					
	Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*
Progeny of beetles	1	1	21.55	0.07	0.00	0.79
Loss of grain mass	1	1	16.33	61.52	0.00	0.00
Mass of dust	1	1	20.39	2.83	0.00	0.10
	Developmental parameters of *R. dominica* and *S. oryze* on barley grain type					
	Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*
Progeny of beetles	1	1	0.49	0.47	0.49	0.50
Loss of grain mass	1	1	1.26	0.03	0.26	0.87
Mass of dust	1	1	1.33	2.19	0.25	0.14
	Developmental parameters of *R. dominica* and *S. oryze* on cultivars of wheat					
	Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*
Progeny of beetles	9	9	9.78	1.19	0.00	0.31
Loss of grain mass	9	9	7.64	197.47	0.00	0.00
Mass of dust	9	9	6.19	1.81	0.00	0.08
	Developmental parameters of *R. dominica* and *S. oryze* on cultivars of barley					
	Rd	*So*	*Rd*	*So*	*Rd*	*So*
Progeny of beetles	9	9	17.65	19.06	0.00	0.00
Loss of grain mass	9	9	11.78	329.09	0.00	0.00
Mass of dust	9	9	8.59	14.46	0.00	0.00
	Differences in selected chemical properties between species of grain					
Dry matter	1		5.42		0.02	
Crude ash	1		189.1		0.00	
Total Protein	1		6.31		0.02	
Crude fat	1		12.98		0.00	
Crude fibre	1		600.23		0.00	
WSC	1		1.95		0.17	
Antioxidants	1		539.90		0.00	
	Differences in selected chemical properties between cultivars of grain					
	wheat	barley	wheat	barley	wheat	barley
Dry matter	9	9	290.06	345.71	0.00	0.00
Crude ash	9	9	32.17	40.58	0.00	0.00
Total Protein	9	9	314.08	242.15	0.00	0.00
Crude fat	9	9	35.10	51.20	0.00	0.00
Crude fibre	9	9	20.30	81.54	0.00	0.00
WSC	9	9	52.36	61.64	0.00	0.00
Antioxidants	9	9	7.57	8.52	0.00	0.00

Table 2. Results of statistical analysis (ANOVA) for *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* development parameters and selected chemical properties of the tested grains – *continuation*

	df		ANOVA F Value		*p**	
	Differences in selected chemical properties among types of cereal grains					
	wheat	barley	wheat	barley	wheat	barley
Dry matter	3	3	1.53	0.46	0.23	0.51
Crude ash	3	3	3.16	0.81	0.09	0.38
Total Protein	3	3	18.45	1.03	0.00	0.32
Crude fat	3	3	3.72	0.07	0.06	0.79
Crude fibre	3	3	1.29	2.21	0.27	0.15
WSC	3	3	14.37	32.75	0.00	0.00
Antioxidants	3		196.33		0.00	

*the value of the test probability *p*, So – *Sitophilus oryzae*, *Rd* – *Rhyzopertha dominica*

individual types and utility forms of the studied grains, fodder type barley exhibited the highest average abundance of *R. dominica* beetles (mean 108.52), while the lowest was found in spring wheat (mean 108.52). Examining individual cultivars, the wheat cv. Impresja proved to be the most favorable for the development of *R. dominica* progeny (mean 104.20) and for barley, the cv. Trofeum (mean 165.30) showed the highest average abundance. The cultivars were among those where the lesser grain borer produced the least numerous progeny, belonged cv. Rusałka wheat (mean 9.40) and cv. Radek barley (mean 16.80). Similarly, the mass of produced dust by feeding *R. dominica* beetles followed a similar pattern. The cultivars of barley, KWS Dante (1.47 g), Flair (1.44 g), and Trofeum (1.45 g), and the wheat cultivar Impresja (0.88 g) were among those where the pest generated the highest amounts of dust. In combination with wheat cultivars, significantly less dust was recorded. The lowest values among the tested variants were observed in the wheat cv. Rusałka (0.10 g) and Feeling (0.16 g). In the barley cultivars, the lowest amount of dust was noted for cv. RGT Planet (0.27 g). Similarly, results were obtained concerning the loss of grain mass; cultivars characterized by higher amounts of produced dust also showed a greater loss in grain mass (Table 1).

More rice weevil progeny individuals were observed on wheat grains (mean 262.05) than on barley grains (mean 132.06). Analyzing the individual types and utility forms of the studied grains, winter wheat exhibited the highest average abundance of *S. oryzae* beetles (mean 265.33), while the lowest was found in fodder-type barley (mean 126.62). The most numerous progeny among the studied wheat cultivars were recorded in Rotax cv. (mean 300.70), and the least numerous in Feeling cv. (mean 226.50). However, the studied wheat cultivars exhibited a similar abundance of *S. oryzae* progeny (the same homogeneous group). The pest formed fewer progeny on the examined barley cultivars, and the cultivar factor differentiated this development. The cultivar where *S. oryzae* formed the fewest progeny was the KWS Dante cv. (mean 64.80), and the most numerous was the Radek cv. (mean 216.50). Among the barley cultivars, cv. Accordine (0.34 g) and RGT Planet (0.30 g), along with the wheat cv. Kilimanjaro (0.33 g) the pest generated the greatest amount of dust. Minor dust, produced by all tested grain cultivars, was observed in the barley cv. KWS Dante (0.09 g), and in wheat, the Feeling cv. (0.19 g). Grain mass loss was higher for the studied wheat cultivars, as was the case with the abundance of the progeny (Table 1).

Analyzing the values of selected physicochemical parameters of wheat and barley grains, it was observed that a higher average content of crude ash, crude fat, crude fiber, WSC' and antioxidants characterized barley. Wheat, on the other hand, had higher protein and dry matter contents. Among all the tested varieties, the Telimena wheat cv. was characterized by the highest protein content (14.95%), the KWS Dante barley cv. had the highest crude fat content (2.20%), and the Amidala barley cv. had the highest crude fiber content (5.15%) (Table 1).

To confirm the similarity of selected wheat cultivars in terms of utility forms, fat content, and antioxidants, non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis was employed. The NMDS plot (Fig. 1A) illustrates the graphical division of wheat and barley cultivars into four groups, separated from each other on the ordination plot, reflecting their diversity in terms of the investigated chemical traits of the grain. In the context of the analysis of fatty acid and antioxidant contents, clear differences were observed in their concentrations among the examined grains. The antioxidant

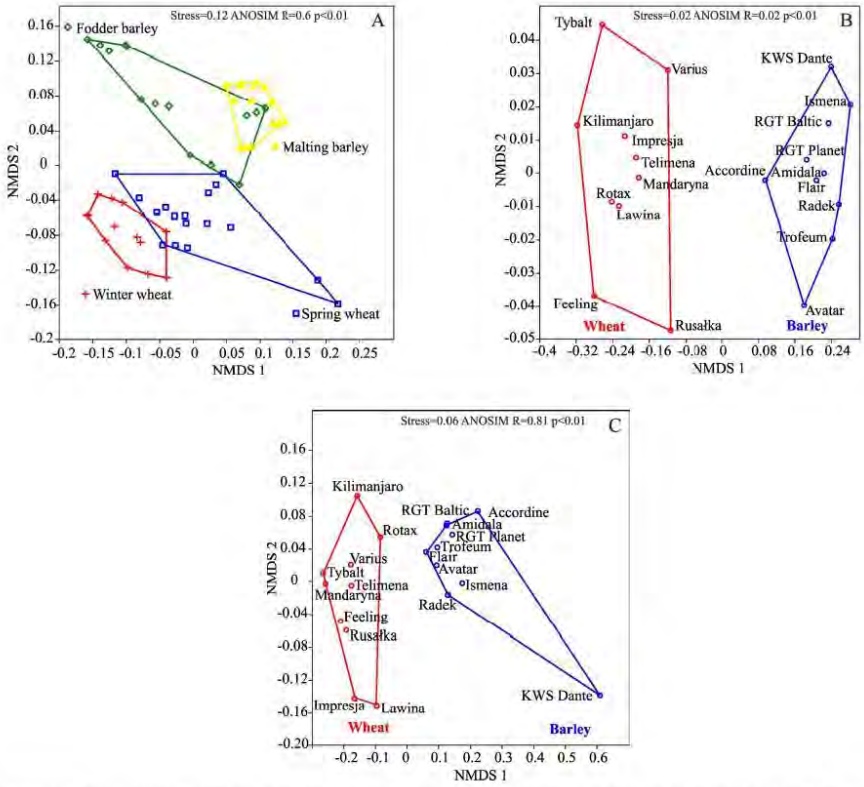


Fig. 1. NMDS diagram describing the similarity of the tested barley and wheat cultivars in terms of forms and types of grain (A), fatty acid content (B), antioxidant content (C)

content in wheat and barley cultivars was significantly different, as graphically presented in the NMDS plot (Fig. 1B). Similarly, the fat content analysis in wheat and barley cultivars was significantly different, as graphically depicted in the NMDS plot (Fig. 1C).

The grains of wheat and barley, on which the studied species of storage pests developed, were also subjected to an assessment of the fatty acid (FA) content. A total of 13 substances with different carbon chain lengths was found. The isolated fatty acids belonged to the group of saturated fatty acids (SFA) – 7 acids and unsaturated fatty acids (UFA) – 6 acids. The latter group included monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). The most abundant fatty acids were C 18 : 2, C 16 : 0 and C 18 : 1. Their high content was found in KWS Dante cv. barley (C 16 : 0, C 18 : 1) and Mandaryna cv. and Tybalt cv. wheat (C 18 : 2). The grains with the the lowest fatty acid content belonged to the groups C 12 : 0 and C 17 : 1. The largest amounts of C 12 : 0 and C17:1 were found in the grain of wheat cultivars Feeling, Varius, Telimena (C 12 : 0) and barley cultivar Ismena (C 17 : 1). The remaining cultivars were characterized by a content lower than 0.06 for C 12 : 0 and 0.28 for C 17 : 1 (Table 3).

To accurately determine the correlation between the chemical composition of the examined grains and the development of *R. dominica* and *S. oryzae*, redundancy analysis (RDA) was used. Based on the redundancy analysis results (Fig. 2A), a strong correlation was observed between the variables, namely the abundance of *S. oryzae* progeny and the first ordination axis. This factor was positively correlated with the fatty acid content in the grains while negatively correlated with the soluble carbohydrate content (WSC). On the other hand, high protein content correlated with the vector describing the progeny of *R. dominica*. For wheat varieties (Fig. 2B), the first ordination axis was correlated with the abundance of *R. dominica* progeny, a parameter also correlated with high fiber content. The second ordination axis was, however, correlated with the progeny abundance of *S. oryzae*

Table 3. The mean content of fatty acids in tested grain cultivars (in % of the sum of fatty acids)

Species and utility type	Cultivar	Fatty Acid												
		lauric acid	myristic acid	pentadeca-noic acid	palmitic acid	palmitoleic acid	margaric acid	margaroleic acid	stearic acid	oleic acid	inoleic acid	α-linoleic acid	araquinic acid	godoleic acid
		C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1 c9	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
Winter wheat	Rotax	0.02	0.18	0.15	21.25	0.16	0.12	0.14	1.97	12.95	57.24	4.84	0.22	0.77
	Kilimanjaro	0.01	0.20	0.27	19.75	0.15	0.20	0.18	4.06	12.41	57.62	4.23	0.23	0.70
	Impresja	0.03	0,19	0.19	18.79	0.16	0.19	0.16	2.59	17.35	56.10	3.31	0.22	0.71
	Lawina	0.02	0.22	0.26	18.78	0.21	0.21	0.19	4.28	15.44	55.27	3.76	0.29	1.07
	Tybalt	0.02	0.15	0.13	17.34	0.16	0.13	0.14	1.67	14.66	60.27	4.50	0.17	0.67
Spring wheat	Rusałka	0.01	0.16	0.14	18.79	0.16	0.12	0.09	1.97	15.71	58.07	3.90	0.18	0.68
	Feeling	0.07	0,19	0.13	18.73	0.16	0.12	0,09	1.76	15.42	58.64	3.84	0.16	0.69
	Varius	0.06	0.18	0.18	18.55	0.16	0.14	0.10	2.24	13.57	58.96	4.96	0.19	0.71
	Telimena	0.06	0.18	0.13	19.72	0.14	0.13	0.11	1.81	14.29	58.58	4.01	0.19	0.65
	Mandaryna	0.02	0.13	0.12	17.95	0.17	0.11	0.09	1.54	14.56	60.30	4.17	0.14	0.68
Fodder spring barley	Radek	0.03	0.29	0.20	23.23	0.22	0.13	0.13	3.13	13.94	51.80	5.71	0.27	0.91
	Ismena	0.02	0.34	0.17	24.24	0.14	0.12	0.29	2.52	14.31	50.69	5.93	0.27	0.96
	Avatar	0.03	0.33	0.14	23.89	0.12	0.13	0.12	2.52	14.26	52.69	4.59	0.31	0.87
	Flair	0.02	0.42	0.18	23.38	0.12	0.12	0.11	2.11	13.64	53.83	4.77	0.33	0.95
	Trofeum	0.02	0.32	0.15	23.95	0.11	0.12	0.08	2.39	13.48	53.05	5.08	0.30	0.95
	RGT Planet	0.03	0.36	0.18	24.63	0.12	0.12	0,09	2.73	12.77	52.21	5.54	0.28	0.94
Brewery spring barley	Accordine	0.03	0.38	0.18	26.66	0.13	0.10	0.11	2.68	13.27	50.14	4.99	0.31	1.04
	Amidala	0.02	0.33	0.15	24.89	0.11	0.10	0.09	2.36	13.05	52.68	4.96	0.31	0.95
	KWS Dante	0.02	0.47	0.17	32.32	0.15	0.10	0.11	2.63	16.77	42.56	3.19	0.39	1.14
	RGT Baltic	0.01	0.33	0.13	25.00	0.12	0.10	0.08	2.11	13.29	52.63	5.01	0.29	0.92

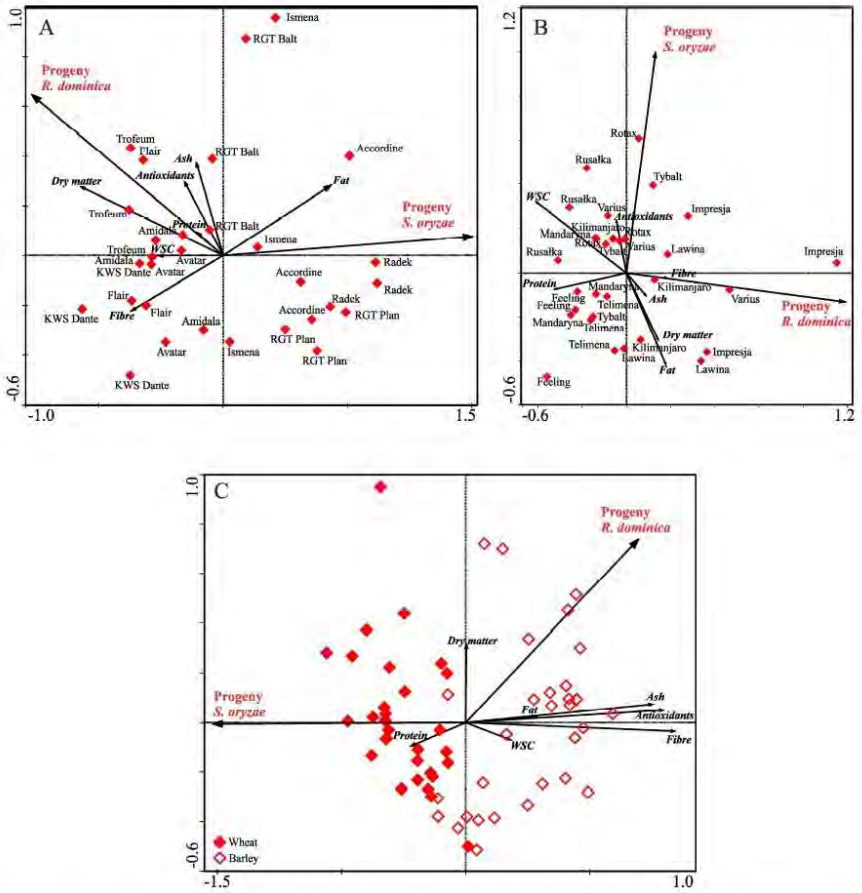


Fig. 2. RDA diagram presenting the relationship between the tested parameters related to the development of *R. dominica* and *S. oryzae* and the content of chemical components in the used varieties of barley grain (A), wheat (B) or both tested grain species (C) (the red rhomboids in Figure A indicate the barley cultivars tested and in Figure B, the wheat)

(Fig. 2B). The chemical composition of barley and wheat was also assessed according to factors describing the intensity of the development of the studied species of storage pests (Fig. 2C). The progeny abundance of *R. dominica* was strongly correlated with barley grain. In contrast to *R. dominica*, progeny of *S. oryzae* was correlated with wheat grain. An increase in the progeny abundance of *S. oryzae* was correlated with the rising protein content in the examined wheat cultivars.

Discussion

Rhyzopertha dominica and *S. oryzae* exhibited significant variability in their reproductive and feeding habits (Howe 1952; Baker 1988; Kłyś 2006; Edde 2012). In this study, we collected data that confirmed the better growth of *R. dominica* on barley cultivars, while *S. oryzae* showed better development on the wheat-tested cultivars (Fig. 2C). Food is a crucial biotic factor influencing the development of storage insect pests. The chemical composition of the tested wheat and barley grains differed (Table 1), which may be a factor in luring and repelling insects (Kordan *et al.* 2023). The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences in the development of *R. dominica* and *S. oryzae* (Table 2). In the case of progeny development, the observed significant differences between the examined species and varieties of wheat and barley grains emphasize the influence of biological factors on the development of storage pests. The loss of grain mass and the amount of dust produced also differed significantly, which indicates the comprehensive impact

of the factors studied on the harmful effects of feeding by storage insects. In the analysis of the chemical properties of grains, significant differences were found between cereal species and cultivars, the exception being the WSC content between the tested cereal species. This highlights chemical diversity as an important factor influencing interactions between storage pests and their environment.

The results of the study by Nietupski *et al.* (2021) suggest that the intensity of development in *S. granarius* is significantly correlated with a higher content of both saturated and unsaturated fatty acids in the grain. In a study conducted by Duarte *et al.* (2021) on *Tribolium castaneum*, it was shown that the fatty acid composition of the different developmental stages of this insect shows significant differences, which may indicate the complex influence of these components on their life cycle. It was also shown that saturated and unsaturated fatty acids play a significant role in developing cereal storage pests such as *R. dominica* and *S. oryzae*. Kerbel *et al.* (2024) showed that olive pomace oils, rich in various fatty acids, have activity against these pests. This indicates that the fatty acid composition of the diet of these beetles may directly affect their development. Xue *et al.* (2024), in a study on *R. dominica*, highlight the importance of regulating fatty acid synthase expression in pest adaptation to different temperature conditions. The implication is that biochemical mechanisms involved in fatty acid metabolism are important for pest survival in a changing environment. This research suggests that saturated and unsaturated fatty acids can influence various aspects of pest life, including their ability to adapt to their environment, their feeding preferences and even their resistance to control methods. As part of the research conducted by Kordan *et al.* (2019), it was noted that the content of fatty acids affects the basic life functions of *S. granarius*. It was shown that the survival of this insect was influenced by fatty acids such as C 18 : 1 and C 18 : 2. Similar relationships were observed during our experiment in the case of *S. oryzae*, which developed much better on wheat cultivars that were characterized by a higher content of C 18 : 2 fatty acid (Table 1, 3). The assessment of the relationship between the content of fatty acids and parameters describing the development of *S. oryzae* on barley grain was carried out based on RDA. This analysis showed a relationship between parameters describing the development of *S. oryzae* and the total content of fatty acids in the grain. In the case of *R. dominica*, the number of progeny individuals was strongly correlated with the protein content (Fig. 1A). The protein content in individual cultivars could significantly impact the development of the lesser grain borer. Protein is an important nutrient for insects, providing them with essential amino acids for growth. Gourgouta *et al.* (2024) indicate that a high protein content in the food can accelerate the development of insect larvae, with direct consequences for the rate of development of pest populations in cereal stores. Similarly, Bendjedid *et al.* (2024) noted that pest colonization of flour could significantly reduce its protein content, which affects the quality of the final product. Similar results to those in this study were obtained by Mariey *et al.* (2023), who investigated the effect of phenol addition on the development of *R. dominica* feeding on different barley cultivars. In the mentioned study, the authors observed that the feeding intensity of *R. dominica* was correlated with the total protein and carbohydrate content. Moreover, they also showed that the addition of phenol at a concentration of 0.4 g ai · kg^{-1} grains ("ai" indicates active ingredient) was toxic to *R. dominica*.

In research conducted by Majd-Marani *et al.* (2023), it was observed that the chemical composition of food plays an important role in shaping the development of insects, especially in the context of the content of phenols and lipids. Lipids in grains can affect their nutritional properties and the plants' defense mechanisms against biotic and abiotic stresses, influencing their flavor and aroma (Rahman *et al.* 2023). Analysis of the life cycle of the rice weevil showed significant relationships between the developmental time, longevity, fecundity of insects and the amount of phenols in the consumed diet. An important observation in this study is the lower number of progeny individuals of *S. oryzae* on cereal cultivars characterized by higher antioxidant activity (Majd-Marani *et al.* 2023). Moreover, we confirmed that the lower number of *S. oryzae* progeny was caused by higher antioxidant activity (Table 1). The research of Sahu *et al.* (2021) provides information on the content and antioxidant activity of phenols in wheat, which is relevant in the context of our study. We can infer that the higher phenolic content of the wheat grains studied by Sahu *et al.* (2021) could potentially affect the development and population of storage pests, such as *S. oryzae*, through mechanisms similar to those described by Majd-Marani *et al.* (2023).

In the context of our research on the effects of grain chemistry on storage pests, the results of Lee *et al.* (2023), who described changes in phenolic metabolites in wheat at different growth stages, are relevant. These data complement our understanding of grain resistance mechanisms, which is crucial for pest management strategies. Phenols, which are important secondary metabolites in grains, can include a wide range of compounds, such as ferulic acid, p-coumaric acid and various flavonoids and tannins, which play a role in protecting plants from pests and diseases and in attracting insects (Al-Khayri *et al.* 2023).

In the case of the lesser grain borer, it was shown that the development of progeny on grains of various

wheat cultivars is correlated with the fiber content (Fig. 1B), which may suggest that higher food hardness is not a problem for this insect. This may be because the original food source for this species was most likely wood and dried fruit (Jia *et al.* 2008). However, high hardness was a significant barrier to the development of *S. oryzae*, thus protecting the grain from significant infection by this insect. This is confirmed by the fact that the hardness and size of grains have a key impact on resistance to feeding by insect storage pests (Thakkar and Parikh *et al.* 2020; Bergvinson 2014).

Similar conclusions were reached by Nietupski *et al.* (2017), who, in their research on the influence of physicochemical properties of achenes of buckwheat cultivars on the development of *S. granarius* and *R. dominica*, found that increased fiber content may adversely affect the development of *S. granarius*. However, it showed a positive correlation (r = 0.89) with the number of progeny individuals of *R. dominica*. Also, Singh and Sharma (2021), in their study on the susceptibility of different wheat cultivars to *R. dominica* feeding, showed that the pest invasion of all cultivars had a positive correlation with the crude fiber content.

Conclusions

Rhyzopertha dominica and *S. oryzae* showed different development on the tested cereal varieties. The highest resistance to *R. dominica* feeding among the tested barley cultivars was shown by the Radek cultivar, while among the wheat cultivars, the highest resistance to *S. oryzae* feeding was shown by the Rusalka cultivar. It was seen that the tested wheat and barley cultivars differed chemically. These differences were related to the content of antioxidants, fatty acids and proteins, which may influence the intensity of pest development. The increase in the number of *S. oryzae* progeny was correlated with the increasing protein content in the tested wheat cultivars and the increasing content of fatty acids in the tested barley cultivars. The increase in the number of progeny of *R. dominica* was correlated with the increasing fiber content in the tested wheat cultivars and the increasing protein content in the tested barley cultivars. These results are important for understanding plant resistance mechanisms and developing effective pest control strategies in the context of breeding cultivars with increased natural resistance.

Funding

The results presented in this paper were obtained from a comprehensive study financed by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics. This work was supported by the University of Warmia and Mazury research project in Olsztyn (no. 30.610.010-110 and 30.610.011-110). The study was supported by the Polish National Science Centre under project no. UMO-2021/41/N/NZ9/00364.

References

Al-Khayri J.M. Rashmi R. Toppo V. Chole P.B. Banadka A. Sudheer W.N., Nagella P., Shehata W.F., Al-Mssallem M.Q., Alessa F.M., Almaghasla M. I., Rezk A. AS.. 2023. Plant secondary metabolites: the weapons for biotic stress management. Metabolites 13 (6): 716. DOI: https://doi.org/10.3390/metabo13060716

Baker J.E. 1988. Development of four strains of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on barley, corn (maize), rice, and wheat. Journal of Stored Products Research 24 (4): 193–198. DOI: https://doi.org/10.1016/0022-474X(88)90018-5

Bendjedid H., Yezli-Touiker S., Taffar A., Yezli A., Souileh N. 2024. Impact of infestation of flour by stored food pest insects *Ephestia Kuehniella* on quality flour: physico-chemical analyses. Journal of Bioresource Management 11 (1): 30–41.

Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry 239 (1): 70–76. DOI: https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292

Bergvinson D.J. 2014. Phytochemical and nutraceutical changes during recurrent selection for storage pest resistance in tropical maize. Crop Science 54 (6): 2423–2432. DOI: https://doi.org/10.2135/cropsci2014.03.0223

Braak C.J.F., Šmilauer P. 1998. CANOCO reference manual and user's guide to canoco for windows: software for canonical community ordination (version 4). Ithaca: Microcomputer Power. Wageningen: Centre for Biometry, 351 pp.

Chippendale G.M., 1972. Dietary carbohydrates: role in survival of the adult rice weevil, *Sitophilus oryzae*. Journal Insect Physiology 18: 949–957.

Clarke K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Australian Journal of Ecology 18 (1): 117–143. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x

Dal Bello G., Padin S., López Lastra C., Fabrizio M. 2000. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. Journal of Stored Products Research 37 (1): 77–84. DOI: https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00009-6

Derbalah A., Ahmed I. 2011. Oil and powder of spearmint as an alternative to *Sitophilus oryzae* chemical control of wheat grains. Journal of Plant Protection Research 51 (2): 145–150. DOI: 10.2478/v10045-011-0025-9

Draz K.A., Mohamed M.I., Tabikha R.M., Darwish A.A., Abo-Bakr M.A. 2021. Assessment of some physical measures as safe and environmentally friendly alternative control agents for some common coleopteran insects in stored wheat products. Journal of Plant Protection Research. 61 (2): 156–169. DOI: https://doi.org/10.24425/jppr.2021.137025

Duarte S., Limão J., Barros G., Bandarra N.M., Roseiro L.C., Gonçalves H., Martins L.L., Mourato M.P., Carvalho M.O. 2021. Nutritional and chemical composition of different life stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research 93: 101826. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101826

Edde P.A. 2012. A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. Journal of Stored Products Research 48: 1–18. DOI: https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2011.08.007

Golebiowska Z. 1969. *Rhyzopertha dominica* (F.) in wheat grain. Journal Stored Products Research 5: 143–155.

Gołębiowska Z., Nawrot J., Prądzyńska A. 1976. Studies on the harmfulness of several species of beetles feeding on cereal grains. Scientific works of the Institute of Plant Protection 18 (2): 49–87.

Gourgouta M., Andreadis S.S., Koutsogeorgiou E.I., Rumbos .I., Grigoriadou K., Giannenas I., Bonos E., Skoufos I., Athanassiou C.G. 2024. Larval performance of *Zophobas morio* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae) on various diets enriched with post-distillation residues and essential oils of aromatic and medicinal plants. Environmental Science and Pollution Research. 31: 28847–28855. DOI: https://doi.org/10.1007/s11356-024-32603-8

Hagstrum D.W., Flinn P.W. 2014. Modern stored-product insect pest management. Journal of Plant Protection Research 54 (3): 205–210. DOI: https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0031

Howe R.W. 1952. The biology of the rice weevil, *Calandra oryzae* (L.). Annals of Applied Biology 39 (2): 168–180. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00895.x

Jia F., Toews M.D., Campbell J.F., Ramaswamy S.B. 2008. Survival and reproduction of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) on flora associated with native habitats in Kansas. Journal of Stored Products Research 44 (4): 366–372. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.06.001

Keneni G., Bekele E., Getu E., Imtiaz M., Damte T., Mulatu B., Dagne K. 2011. Breeding food legumes for resistance to storage insect pests: potential and limitations. Sustainability 3 (9): 1399–1415. DOI: https://doi.org/10.3390/su3091399

Kerbel S., Azzi H., Kadi H., Fellag H., Debras J.-F., Kellouche A. 2024. Insecticidal activity of crude olive pomace oils from Kabylia (Algeria) against the infestation of *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.) in stored wheat grains. African Entomology 32: 1–9. DOI: https://doi.org/10.17159/2254-8854/2023/a13585

Klejdysz T., Mrówczyński M. 2017. Methodology of integrated protection of grain warehouses for advisors: collective study. Plant Protection Institute - National Research Institute, 228 pp.

Kłyś M. 2006. Nutritional preferences of the lesser grain borer *Rhizopertha dominica* F. (Coleoptera, Bostrichidae) under conditions of free choice of food. Journal of Plant Protection Research 46 (4): 359–367.

Kordan B., Nietupski M., Ludwiczak E., Gabryś B., Cabaj R. 2023. Selected cultivar-specific parameters of wheat grain as factors influencing intensity of development of grain weevil *Sitophilus granarius* (L.). Agriculture 13 (8): 1942. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture13081492

Kordan B., Skrajda-Brdak M., Tańska M., Konopka I., Cabaj R., Załuski D. 2019. Phenolic and lipophilic compounds of wheat grain as factors affecting susceptibility to infestation by granary weevil (*Sitophilus granarius* L.). Journal of Applied Botany and Food Quality 92: 64–72. DOI: https://doi.org/10.5073/JABFQ.2019.092.009

Lee H.G., Yeong Yang J., Eun Ra J., Ahn H.J., Ja Lee M., Young Kim H., Song S.Y., Hyun Kim D., Hwan Lee J., Duck Seo W. 2023. Elucidation of phenolic metabolites in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) by NMR and HPLC-Q-Orbitrap-MS/MS: Changes in isolated phenolics and antioxidant effects through diverse growth times. Food Chemistry: X. 17: 100557. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100557

Liu K.S. 2011. Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species. Journal of Food Science 76 (2): C334–C342. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02038.x

Majd-Marani S., Naseri B., Hassanpour M., Razmjou J., Jalaeian M. 2023. Life history and population growth parameters of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) fed on 10 rice cultivars and lines. 13 February 2023, preprint (Version 1) available at Research Square. DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2565845/v1

Mariey S.A., Mohamed E.N.M., Nasr G.M., Ahmed K.R., Elsamahy B.E. 2023. Comparative efficacy of phenol concentration against *Rhyzopertha dominica* (F.) in some hulled barley cultivars productivity and grain quality. Journal of Global Ecology and Environment 18 (1): 1–13. DOI: https://doi.org/10.56557/jogee/2023/v18i18246

Nawrot J., Gawlak M., Szafranek J., Szafranek B., Synak E., Warchalewski J.R., Piasecka-Kwiatkowska D., Błaszczak W., Jeliński T., Fornal J. 2010. The effect of wheat grain composition, cuticular lipids and kernel surface microstructure on feeding, egg-laying, and the development of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). Journal of Stored Products Research 46 (2): 133–141. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jspr.2010.02.001

Nietupski M. 2020. Competition or cooperation? – the concurrent development of grain weevil (*Sitophilus granarius* L.) and lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) on barley grain. Progress in Plant Protection. 60 (2): 149–156. DOI: https://doi.org/10.14199/ppp-2020-017

Nietupski M., Kwiatkowski J., Kosewska A. 2017. Physicochemical properties of achenes of buckwheat cultivars affecting the development of grain weevil (*Sitophilus granarius* L.) and lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.). Zemdirbyste-Agriculture 104 (4): 311–320. DOI: https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.040

Nietupski M., Ludwiczak E., Cabaj R., Purwin C., Kordan B. 2021. Fatty acids present in wheat kernels influence the development of the grain weevil (*Sitophilus granarius* L.). Insects 12 (9): 806. DOI: https://doi.org/10.3390/insects12090806

Nowaczyk K., Obrępalska-Stęplowska A., Gawlak M., Olejarski P., Nawrot J. 2008. The RAPD analysis of genetic variability in the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) populations. Journal of Plant Protection Research 48 (4): 429–435. DOI: 10.2478/v10045-008-0052-3

Perisic V., Perisic V., Vukajlović F.N., Pesic S.B. 2018. Feeding preferences and progeny production of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) in small grains. Biologica Nyssana 9 (1): 55–61. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.1470852

Rahman A., Albadrani G.M., Ahmad Waraich E., Hussain Awan T., Yavaş I., Hussain S. 2023. Plant secondary metabolites and abiotic stress tolerance: overview and implications. In: "Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance Mechanisms" IntechOpen. DOI: https://doi.org/10.5772/intechopen.111696

Saad A.S.A., Tayeb E.H.M., El-Shazli M.M., Baheeg S.A. 2018. Susceptibility of certain Egyptian and imported wheat cultivars to infestation by *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 51 (1–2): 14–29. DOI: https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1438779

Sahu R., Kundu P., Sethi A. 2021. *In vitro* antioxidant activity and enzyme inhibition properties of wheat whole grain, bran and flour defatted with hexane and supercritical fluid extraction. LWT 146: 111376. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111376

Singh S., Sharma D.K. 2021. Screening of wheat varieties against lesser grain borer *Rhyzopertha Dominica*. Indian Journal of Entomology 83 (4): 602–605. DOI: https://doi.org/10.5958/0974-8172.2021.00034.1

Thakkar B., Parikh P. 2020. Investigating the effects of host grains on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). p. 147–161. In: "Recent Research Advances in Biology Vol. 2" (Borek Dr.S., ed.). Book Publisher International (a part of SCI-

ENCEDOMAIN International), India, 161 pp. DOI: https://doi.org/10.9734/bpi/rrab/v2

Thomas T.A., 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. Journal of The Science of Food and Agriculture 28: 639–642.

Trematerra P. 2009. Preferences of *Sitophilus zeamais* to different types of Italian commercial rice and cereal pasta. Bulletin of Insectology 62 (1): 103–106.

Vianna F., Russo L., Troncozo I., Ferreri N., de Abajo J.M., Scorsetti A.C., Pelizza S. 2023. Susceptibility of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) to the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin s.l. (Hypocreales: Clavicipitaceae). Universidad Nacional de Cuyo 55 (2): 76–84.

Warchalewski J., Gralik J., Nawrot J. 2000. Possibilities of reducing losses of stored cereal grain caused by insect pests. Advances in Agricultural Sciences 47 (6): 85–96.

Xue D., Yang Y., Fang L., Wang S., Wu Y. 2024. Trehalose 6-phosphate synthase gene rdtps1 contributes to thermal acclimation in *Rhyzopertha dominica*. BMC Genomics 25 (1): 172. DOI: https://doi.org/10.1186/s12864-024-10028-4

PUBLIKACJA 3

INTERNATIONAL
Agrophysics
www.international-agrophysics.org

Int. Agrophys., 2024, 38, 165-176
doi: 10.31545/intagr/185216

Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.)**

*Olga Kosewska**, *Sebastian W. Przemieniecki*, *Stanisława Koronkiewicz*, *and Mariusz Nietupski*

Faculty of Agriculture and Forestry, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn, Poland

Received October 30, 2023; accepted February 22, 2024

Abstract. Due to global warming, the rice weevil is an increasing threat. Various species of weevils coexist with endosymbiotic *Sodalis pierantonius*. This study aimed to check whether different chemical properties of different cultivars of common wheat and barley grain cause disturbances in insect feeding and rearrangements of the rice weevil microbiome. It has been observed that foraging increases in the case of cultivars with low protein content, high steric acid content, and low antioxidant activity. Cultivars with higher antioxidant activity, a tendency was observed to increase the number of adult insects and the intensity of feeding. However, the correlation of number of offspring generations and antioxidants was different depending on species of cereals (R^2=0.9 for barley, R^2<0.1 for wheat). Changes of dominance classes of selected Enterobacteriaceae partially shifted the microbiomes of insects feeding on different barley varieties. In contrast, in some wheat cultivars, displacement of the dominant genus *Sodalis* by genera *Staphylococcus* or *Mammaliicoccus* was observed, severely reducing the rice weevil's foraging ability. Nevertheless, *Sodalis* sp. almost always dominated (from 16.7 to 90.07% for wheat and from 63.4 to 90.9% for barley), and no correlation was observed between species and variety factors of cereals and their abundance.

Keywords: storage pests, *Sodalis* sp., grain properties, symbiotic bacteria, *Sitophilus oryzae*

1. INTRODUCTION

Grain storage is one of the elements of the plant production system in which the food product passes from the field to the consumer's table. It plays a key role, and many studies indicate that the most tremendous losses occur during this stage (Majumder *et al*., 2016). The damage caused during the storage of agricultural products is significant and may be caused by various factors, including insect feeding. It is assumed that storage pests may be responsible for losses of 30-40% (Abass *et al*., 2014; Kumar and Kalita, 2017). These are quantitative and qualitative losses related to grain mass loss or excrement and dead insects appearing in the stored product due to insect feeding (Nietupski *et al*., 2021). The occurrence of insect storage pests contributes to an increase in the temperature and humidity of grain, as a result of which unfavourable biochemical processes occur. Those may contribute to reducing nutrients in stored products and even create toxic substances such as mycotoxins (Padín *et al*., 2002).

One of the insects that is becoming an increasing threat to stored cereal products is the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). It is a beetle from the weevil family (*Curculionidae*) with a 2.5 to 4.0 mm body length. It is brown with four orange spots on the cover and a head extended into a distinct snout (Longstaff and Evans, 1983; Rita Devi *et al*., 2017). A dozen or so years ago, it did not pose a threat due to too low air temperature, which prevented the increased development of this species. Due to global warming, this species has increasingly better conditions for development in the temperate climate zone and is becoming one of the potentially most dangerous insect storage pests (Kosewska *et al*., 2023).

The threat caused by insect storage pests is significant. Therefore, there is a constant need to protect stored products against destruction, which is particularly important in the increasing demand for food caused by the growth of the world's population (Dubey *et al*., 2008; Smith and Gregory, 2013). Because non-chemical methods do not guarantee

*Corresponding author e-mail: olga.kosewska@uwm.edu.pl
**This work was supported by a research project of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (no. 30.610.010-110 and 30.610.011-110). The study was supported by the Polish National Science Centre under the project no. UMO-2021/41/N/NZ9/00364 (2022-2024).

© 2024 Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences

complete protection of stored products against the feeding of storage pests, it is necessary to use chemical protection. This is contrary to consumers' feelings and the assumptions of the European Green Deal regarding food safety and its undesirable impact on the natural environment (Dal Bello *et al.*, 2000; Klejdysz *et al.*, 2017). Therefore, a strategic solution is to reduce pests' harmfulness through advancing plant cultivars and improving their genetic resistance.

Nevertheless, most of the breeding programs implemented so far have focused more on improving seed yield and quality than improving resistance to storage pests (Keneni *et al.*, 2011; Kordan *et al.*, 2023). The type of food has a significant impact on storage losses. It is one of the most essential biotic factors influencing the development of insects. In grains with lower nutritional value, insects want to avoid laying eggs and feeding on them to a lesser extent. Insects prefer grain with a higher protein content, which does not contain substances they cannot tolerate (Perisic *et al.*, 2018). Unfortunately, in the case of storage pests, we cannot determine the characteristics of cereal grains that adversely affect these insects (Keneni *et al.*, 2011; Caron *et al.*, 2018). Recent achievements in metagenomic research have revealed that the microbiome inhabiting the digestive tract of insects is closely related to insect development, metabolic changes in the body, resistance to undesirable chemicals and pathogens, and is intensely involved in food digestion. Therefore, analysing the composition, activity and functions of the insect digestive tract microbiome is a bioindication method that can precisely determine the impact of factors. Therefore, the food's characteristics influence the development of insects and their intestinal microbiome (Jung *et al.*, 2021; Brandon *et al.*, 2018; Przemieniecki *et al.*, 2020).

This study aimed to check whether different chemical properties of different cultivars of common wheat and barley grain, including antioxidant activity, cause insect feeding disorders and rearrangements in the structure of the rice weevil microbiome. The research has proposed some hypotheses regarding the natural resistance of cereal species and cultivars to *S. oryzae* feeding. According to the hypotheses, grains of diverse cereal species and cultivars have different natural resistance to *S. oryzae* feeding, which is connected to variations in their chemical composition. The chemical parameters of grains also impact the insect symbiotic microbiome composition and its activity and can modify the insect's digestive processes. The digestion of food in insects relies on enzymatic activity and symbiotic microbiome. With the hypotheses in mind, this study attempts to answer the following questions:

• What are the differences in the development of *S. oryzae* on selected wheat and barley cultivars?

• What are the differences in the susceptibility of cereal grain cultivars to degradation during storage pests?

• Which chemical features of wheat and barley grain correlate with their higher natural resistance to feeding *S. oryzae* and reduce storage losses?

• How do the chemical characteristics of cereals affect the population, metabolism, and microbiome of *S. oryzae*?

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experiment with different feed variants

The specimen of the studied beetle species (*S. oryzae*) used in the experiment came from mass breeding conducted at the Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics at UWM in Olsztyn. Twenty specimens of 1-2 days old young adult beetles of *S. oryzae* were placed on 500 g of grain in 1 l glass containers. For the experiment were used cultivars of wheat and barley. Three cultivars of wheat: Rusałka, Telimena and Impresja, all belonging to the technological group of cereals A, representing high-quality bread cultivars, and three cultivars of barley: Radek, Dante, classified as a fodder type (p) and Ismena, classified as brewing type (b) (COBORU). The selection of cultivars was based on preliminary research, which included ten wheat and ten barley cultivars, which are the subject of a separate study. Based on this study, which analysed the survival data of the rice weevil on the tested cultivars, we classified the Dante barley cultivar as resistant, the Ismena cultivar as having intermediate resistance, and the Radek cultivar as low-resistant. Regarding wheat cultivars, the Telimena cultivar exhibited the highest level of resistance, the Impresja cultivar displayed moderate resistance, and the Rusałka cultivar was low-resistant (personal communication). Insects without feed were a background. Each treatment was performed in three replications. The cultivation was carried out under controlled conditions of temperature (30°C) and humidity (70%) in a breeding chamber (Sanyo MLR – 350 H – Sanyo Electric Co., Ltd., Japan). The incubation parameters were correlated with the best habitat for developing these beetles (Golebiowska, 1969). The inlet was covered with a chiffon mesh for air access and ventilation. The sex of young *S. oryzae* beetles was determined by the proportion of the rostrum (Halstead, 1963). After 20 (first generation; –I) and 40 (second generation; –II), days of breading and starving adult insects were taken for further analysis. Preparation of digestive systems (10 pieces) will take place under the laminar chamber with the use of binoculars and sterile instruments. The collected insects were anaesthetised for 5 min at –80°C, and then surface sterilisation and homogenisation were performed according to the methodology described in the previous work (Kosewska *et al.*, 2023).

2.2. Biochemical properties of insects

The biochemical activity and carbon source utilisation in imago digestive tracts were assessed through API ZYM and API 20 NE tests (Biomerieux, France). Approximately 100 mg samples were procured from each variant and then homogenised within vials containing glass beads and 1 ml of peptone water. These samples underwent homogenisation

in a TissueLyser LT bead homogeniser (Qiagen, Germany) with 30 oscillations for a duration of 5 minutes. The resultant suspension was subsequently diluted at a 1:10 ratio in peptone water enriched with 1% TSB (Triptic soy broth, Merck, Germany) and then incubated at 30°C for 4 h before being employed in the API tests, following the manufacturer's guidelines. The biochemical and carbon source tests were further incubated at 30°C for 24 h (Przemieniecki *et al*., 2022).

2.3. DNA isolation and molecular analyses

Genetic material was isolated using commercial isolation kits Soil Purification Kit (EURx). Sequencing was performed based on the "16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)". Bacterial 16S rRNA amplification was performed using 24 barcoding primers and HiFi ToughMix repliQa polymerase (Quantabio USA, MA). The library construction and pooling steps were performed according to the instructions provided by the polymerase supplier ("Rapid 16S Metagenomic Library Preparation for Oxford Nanopore Technologies (ONT)® Platform"; www.quantabio.com/product/repliqa-hifi-toughmix/). Sequencing was performed on a flongle flow cell using MinKnown software. The obtained data (~62,000 reads) were analysed by the EPI2ME platform (Metrichor™ Ltd.) using WIMP (What's In My Pot) workflows.

2.4. Chemical analyses of grain

Dry mass was determined using the drying method. It involves drying a crushed 5 g sample at 105°C for 5-8 h until a constant mass is obtained. Then, the lack of change in the mass of the sample, stored in the desiccator until reaching ambient temperature, was confirmed three times. Raw ash was determined by burning an air-dry sample, 5 g weighed, in a muffle furnace at a temperature of 500-550°C for 5-6 h. The total protein content was determined based on the total nitrogen (N) determined by the Kjeldahl method and then on its conversion into total protein (N×6.25), following the Standard: PN-ISO 5983.2000. Crude fat was extracted using a Soxhlet extractor, following standard PN-ISO 6492: 2005 procedures. A 1 g portion of air-dried and homogenised whole

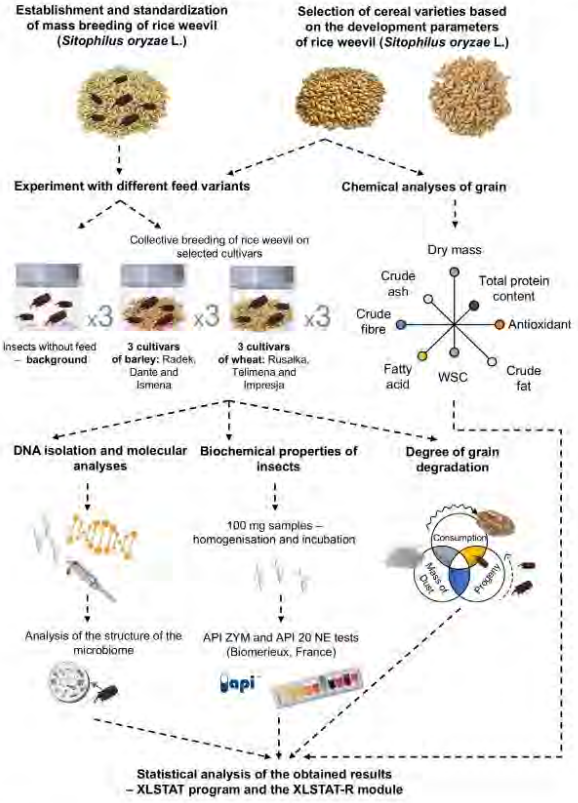


Fig. 1. Scheme of the experiment.

grain samples underwent extraction with petroleum ether in a Soxhlet extractor for 6-8 hours until all fat was removed. The ether was then evaporated from the extract in the same apparatus, and the resulting crude fat residue (ether extract) was dried in an oven and weighed. To determine the fatty acid composition, fatty acid methyl esters were prepared using a modified Peisker method (methanol: chloroform: concentrated sulfuric acid in a 100:100:1, v/v ratio) (Żegarska *et al*., 1991). Gas chromatography, utilising a Varian CP-3800 gas chromatograph with a flame ionisation detector (FID), a 50 m long capillary column (internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm), and a 50:1 split dispenser, was employed for the separation and determination of fatty acids. A 1 µl sample was used, with the following operational conditions: detector temperature at 250°C, injector temperature at 225°C, column temperature at 200°C, and helium as the carrier gas (1.2 ml min^{-1} flow). The study utilised individual standards of fatty acid methyl esters (Sigma-Aldrich). The relative content of fatty acids was expressed as a percentage of the total area of all fatty acid peaks in the sample. The anthrone method determined water-soluble sugars – WSC (Thomas, 1977). The crude fibre was determined by the classic Henneberg-Stohmann method for determining the raw fibre content of feed following the PN–EN ISO 6865.2002 standard**.** The antioxidant capacity of samples was determined according to the Benzie and Strain method with some modifications (Benzie and Strain, 1996). The FRAP reagent was prepared by mixing 25 ml of 0.3 M acetate buffer, 2.5 ml of 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-tiazine) solution and 2.5 ml of 20 mM $FeCl_3$ $6H_2O$ solution. Then, the mixture was incubated for 10 min in a dark place before use. Ascorbic acid was used as the standard, and distilled water was used as the blank control. A properly diluted sample or standard (0.1 ml) was added to a mixture of 4.0 ml of FRAP reagent. The mixture was incubated for 10 min in the dark, and the absorbance was measured at 593 nm against a blank prepared using distilled water. To prepare the calibration curve, the standards of ascorbic acid were used in the range from 0.01 to 0.2 mg ml^{-1}.

2.5. Statistical calculations

Obtained data from insect biometrics and grain composition after insect feeding were tested firstly for normality of distribution (Shapiro-Wilk test). Then, differences between treatments were determined using Kruskal-Walli's method (Dunn's test). For biometrics, grain chemistry, fatty acids biochemical parameters and bacteriobiomes, dissimilarity analysis was performed based on the Bray-Curtis matrix, and then dendrograms were created using the Ward method. The bacterial community was shown as a percentage abundance. The domination classes were determined according to previous work (Przemieniecki *et al*. 2021), where for more than 10% – Eudominant, 5.01-10% – Dominant, 2.01-5% – Subdominant, 1.1-2.0% – Rare, and less than 1% – Occasional, respectively. The differences between bacteriobiomes were determined using PERMANOVA (Adonis ANOVA). Principal component analysis (PCA) based on the Pearson correlation matrix was performed to determine the relationships between all parameters obtained in the study. Features whose vectors reached the maximum value for precepts other than F1 or F2 were removed from the biplots. Statistical analyses were performed in the XLSTAT program and the XLSTAT-R module (Lumivero, 2023). A detailed diagram of the experiment is presented on Fig. 1.

3. RESULTS

Based on the results of the analysis of variance (Table 1), it was observed that in the case of barley, the Ismena cultivar was more willingly consumed by the rice weevil and was characterised by a significantly higher content of crude ash, crude fat and antioxidants compared to the Dante cultivar. The Radek cultivar had substantially higher total protein content. However, in most cases, it was characterised by an intermediate value of the tested features, which did not differ from the other two cultivars. In the wheat case, the grain's chemical parameters differed significantly. The most significant difference was observed in the case of WSC, which was twice as high in the Rusałka cultivar compared to Impresja.

Table 1. Insect biometric results and grain composition characteristics of the cultivars used in the experiment

Species	Cultivar	Con (g)	MD (g)	NOG	MI (g)	DW (%)	CA (%)	TP (%)	CFa (%)	CFi (%)	WSC (%)	AO*
Barley	Ismena	4.145 a	0.445	228	0.376 a	89.08 ab	2.25 a	10.30 b	2.2 a	4.55 b	2.74 ab	0.177 a
	Radek	3.218 ab	1.115	198	0.295 ab	88.83 b	2.20 ab	10.60 a	1.9 ab	4.85 ab	2.29 b	0.139 b
	Dante	2.342 b	0.220	163	0.233 b	89.14 a	2.15 b	10.30 b	1.8 b	5.00 a	3.62 a	0.126 b
	p-value	0.035	0.369	0.497	0.007	0.004	0.004	0.036	0.003	0.003	0.004	0.002
Wheat	Telimena	2.791 a	0.207	232	0.289	89.11 ab	1.85 a	14.95 a	1.75 a	2.75 a	3.10 ab	0.024
	Impresja	2.316 a	0.199	211	0.285	89.35 a	1.75 b	12.00 b	1.75 a	2.65 b	2.59 b	0.020
	Rusałka	1.845 b	0.146	152	0.195	89.09 b	1.75 b	13.15 ab	1.35 b	2.65 b	4.50 a	0.023
	p-value	0.048	0.686	0.620	0.632	0.004	0.034	0.004	0.035	0.035	0.004	0.102

Con – Consumption, MD – Mass of Dust, NOG – number of offspring generations, MI – Mass of Imago, DW – dry weight, CA – crude ash, TP – total protein, CFa – crude fat, CFi – crude fibres, WSC – water-soluble carbohydrates, AO – antioxidants, *– concentration of antioxidants in ascorbic acid equivalents.

The Telimena and Impresja cultivars had the highest insect consumption, a significantly higher imago number, and crude fat content than the Rusałka cultivar.

Analysing dendrograms showing the general diversity of the examined cereal varieties depending on the groups of tested characteristics (Fig. 2), two different groups were observed for biometric traits. The first one included the Rusałka and Dante cultivars. The second group was formed by Telimena, Ismena, Impresja and Radek cultivars. In terms of chemical characteristics of the grain, two groups were formed: the first included the barley cultivars: Dante, Radek and Ismena. The second group included the Telimena, Rusałka and Impresja wheat cultivars. The tested cultivars were also characterised by three different fatty acid profile groups: the first group included the Impresja, Rusałka, and Telimena cultivars, and the second group included the Radek and Ismena cultivars, while the Dante cultivar has an intermediate profile between the two previously mentioned groups. The first group, in terms of biochemical characteristics of microorganisms inhabiting the digestive system of insects, was formed by the Ismena, Rusałka and Dante cultivars. The second group included the Telimena and Impresja cultivars, while in the Radek cultivar, the biochemical potential differed from each.

The PCA ordination charts (Figs 3 and 4) present the results of the correlation between parameters describing the development of *S. oryzae* and selected factors related to the chemical composition of wheat and barley grains, the microbiome of the beetle's digestive tract and its enzymatic activity. In the case of wheat, a large variability of the characteristics of the tested cultivars was observed in the experiment. The cultivar resistant to feeding by *S. oryzae* – Telimena was placed on the PCA plot in the upper right quadrant of the plot (Fig. 3). The high resistance of this cultivar (low number of the progeny of *S. oryzae*)

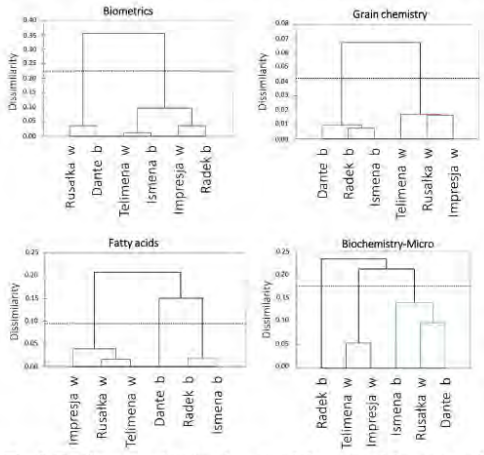


Fig. 2. Dendrograms showing the general diversity of the examined cereal cultivars depending on the groups of examined characteristics; the results were prepared based on the Bray-Curtis dissimilarity matrix (abbreviations: w – wheat, b – barley).

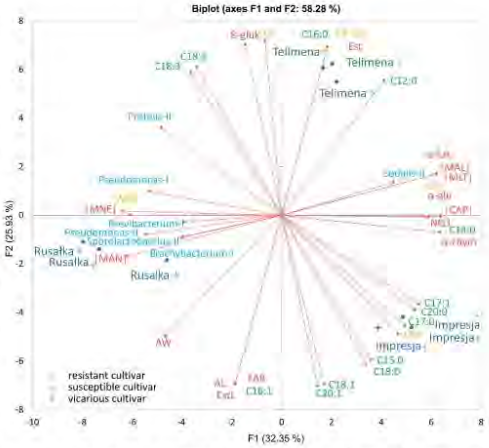


Fig. 3. Relationships between diet (different cultivars of wheat) and enzyme activity in the gastrointestinal tract, grain chemistry and bacterial community determined in PCA (abbreviations: β-gluc – β-glucosidase, AW – valine arylamidase, MNE – D-mannose utilization, MAN – utilization D-mannitol, AL – Leucine arylamidase, EstL – Esterase Lipase (C 8), FAB – Naphthyl-AS-BI phosphohydrolase, α-chym – α-chymotrypsin, NO_3 – nitrate reduction, CAP – decanoic acid utilization, α-glu – α-glucosidase, MLT – malate utilization, MAL – D-maltose utilization, α-fuk – α-fucosidase, Est – esterase, TP – total protein, CA – crude ash, CFa – crude fat, CFi – crude fibres, DW – dry weight, WSC – water-soluble carbohydrates).

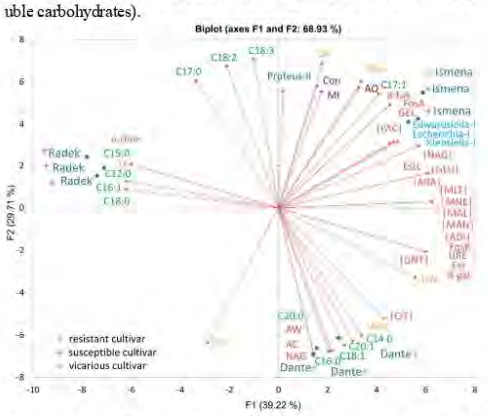


Fig. 4. Relationships between diet (different cultivars of barley) and enzyme activity in the gastrointestinal tract, grain chemistry and bacterial community determined in PCA (abbreviations: α-fuc – α-fucosidase, FosA – Alkaline phosphatase, GEL – protease hydrolysis, |PAC| – utilization phenylacetic acid, |NAG| – N-acetyl-glucosamine utilization, EstL – Esterase Lipase (C 8), |GLU| – D-glucose utilization, |ARA| – L-arabionza utilization, |MLT| – malate utilization, |MNE | – utilization of D-mannose, |MAL| – utilization of D-maltose, |MAN| – utilization of D-mannitol, |ADI| – utilization of adipic acid, FosK – Acid phosphatase, URE – urease activity, Est – Esterase (C 4), β-gal – ß-galactosidase, |GNT| – potassium gluconate utilization, |CIT| – trisodium citrate utilization, α-chym – α-chymotrypsin, NAG – N-acetyl-ß-glucosaminidase, AW – Valine arylamidase, AC – Cystine arylamidase, WSC – water-soluble carbohydrates, DW – dry weight, CA – crude ash, CFa – crude fat, CFi – crude fibres, TP – total protein, Con – consumption, MI – mass of imago).

is associated with a high content of fatty acids (C16:0, C12:0) and higher values of traits describing the content of fibre, crude ash and esterase. The Impresja cultivar was characterised by high contents of seven fatty acids C17:1, C20:0, C17:0, C15:0, C18:0, C18:1, C20:1. For the Rusałka cultivar, characterised by low natural resistance to *S. oryzae* feeding, high abundances of *Pseudomonas*-II, *Sporolactobacillus*-II, *Brachybacterium*-I, D-mannitol utilization, D-mannose utilization and soluble sugars were found. It should be noted that other carbon sources (malate utilization, D-maltose utilization, decanoic acid utilization), nitrate reduction capacity, α-chymotrypsin and α-glucosidase were correlated with a higher proportion of *Sodalis*-II and were characteristic of the Telimena and Impresja cultivars, but not for a change, Rusałka. In the case of barley, a significant difference in the characteristics of the examined cultivars was also observed in the experiment (Fig. 4). The least resistant cultivar, Radek, was characterised by high contents of four fatty acids: C15:0, C12:0, C16:1, C18:0, total protein, and α-chymotrypsin. The Ismena cultivar, as a variety with intermediate resistance, had high values of traits, *i.e.*, raw ash, Imago mass, loss of grain mass, crude fat, antioxidant content, C17:1 fatty acid, α-fucosidase, alkaline phosphatase, protease, *Edwardsiella*-I, *Escherichia*-I, *Klebsiella*-I, esterases (C8) and the ability to utilise 9 out of 14 analysed carbon sources (Fig. 4, Table 1). The Dante cultivar (resistant cultivar) was characterised by high trait values, *i.e.*, water-soluble carbohydrates, five fatty acids C16:0, C18:1, C20:1, C14:0, C20:0, valine arylamidase, cystine arylamidase, N-acetyl-*β* -glucosaminidase, trisodium citrate utilization.

Analysing the percentage of individual types of bacteria identified in the digestive tract of the rice weevil feeding on various wheat varieties (Table 2), the genus *Sodalis* dominated almost all samples. The exception was Rusałka I-2, where the genera *Staphylococcus* and *Brevibacterium* dominated. In the first generation, co-dominance of *Sodalis* sp. with the genus *Staphylococcus* in the Telimena variant and *Mammaliicoccus* in the Impresja-3 sample was observed. In the second generation, the disappearance of both co-dominant taxa and increased share of the genera *Escherichia* and *Klebsiella* were observed. In the case of barley (Table 3), all variants were dominated by *Sodalis* sp. Only in the case of Ismena-3 co-dominance with *Staphylococcus* sp. was observed in the first generation. This genus disappeared in the second descendant generation of the insect. Apart from Radek of the first generation, a high proportion of *Klebsiella* sp. was also observed in all samples.

Three distinct groups were observed in the dendrogram showing the diversity between the microbiomes of individual samples (Fig. 5). The first group was created from similar wheat-I microbiomes, *i.e.*, two batches of the Telimena and Rusałka cultivars and three batches of the Impresja cultivar. The second group was formed by the cultivars on which the offspring generation of the rice weevil fed, *i.e.*, wheat cultivars Telimena, Impresja 3 batches, Rusałka 1 batch and barley cultivars Ismena 2 batches, Dante 2 batches, Radek 1 batch. The third group was formed by the cultivars on which the parent generation of the rice weevil fed, *i.e.*, wheat cultivars Rusałka 1 batch, Telimena 1 batch, Ismena 3 batches, and Radek 1 batch. Of the cultivars on which

Table 2. Percentage of bacterial genera identified in the digestive tract of a rice weevil feeding on different wheat cultivars

Generation	I									II								
Cultivars	Rusałka			Telimena			Impresja			Rusałka			Telimena			Impresja		
genus / batch	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sodalis	90.07	2.35	86.62	16.74	68.75	86.99	93.07	90.18	31.60	86.32	83.87	73.36	88.01	87.76	87.07	87.55	86.65	87.32
Staphylococcus	3.52	66.56	5.81	77.38	24.64	2.23	1.41	4.18	5.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.11	0.03
Mammaliicoccus	0.62	6.19	0.24	0.46	0.18	0.19	0.08	0.19	60.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Escherichia	1.20	0.03	1.09	0.19	0.80	1.20	1.14	1.10	0.44	3.38	2.34	4.25	2.26	2.40	2.61	2.81	2.21	2.85
Klebsiella	0.51	0.06	0.44	0.07	0.39	0.55	0.54	0.52	0.18	1.32	1.53	2.70	1.85	1.82	1.92	1.79	2.15	2.15
Brevibacterium	0.39	10.39	0.64	0.86	0.79	0.26	0.16	0.36	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Salmonella	0.28	0.02	0.26	0.03	0.29	0.44	0.38	0.36	0.17	0.88	0.97	1.54	0.55	0.66	1.09	1.08	0.84	0.83
Edwardsiella	0.28	0.01	0.19	0.04	0.19	0.24	0.25	0.28	0.09	1.03	0.65	0.39	0.34	0.77	0.54	0.82	0.63	0.69
Enterobacter	0.34	0.03	0.21	0.04	0.19	0.49	0.35	0.24	0.11	0.29	0.81	1.16	0.07	0.61	0.69	0.47	0.63	0.52
Vibrio	0.10	0.02	0.19	0.03	0.18	0.36	0.10	0.12	0.04	0.29	0.65	1.16	0.48	0.52	0.51	0.53	0.58	0.90
Kocuria	0.02	5.97	0.34	0.81	0.66	0.12	0.06	0.20	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Bacillus	0.15	1.95	0.13	1.00	0.40	0.03	0.02	0.13	0.31	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Brachybacterium	0.15	1.09	0.02	0.01	0.02	0.03	0.03	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Saliniradius	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sporolactobacillus	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Eudominant			Dominant			Subdominant			Occasional			Casual					
	>10.01			5.1-10.0%			2.1 – 5.0%			1.1-2.0%			<1.0 %					

Table 3. Percentage of bacterial genera identified in the digestive tract of a rice weevil feeding on different barley cultivars

Generation	I									II								
Cultivars	Radek			Dante			Ismena			Radek			Dante			Ismena		
genus / batch	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sodalis	90.90	87.40	82.60	90.50	84.20	87.40	84.40	76.10	63.40	86.20	87.30	87.00	87.70	88.10	87.40	88.20	86.70	87.60
Staphylococcus	3.39	5.82	1.71	4.00	8.09	0.72	1.50	1.51	18.7	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mammaliicoccus	0.35	0.57	3.83	0.17	0.56	0.18	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Escherichia	1.09	1.01	1.22	1.21	1.14	1.73	1.96	2.52	1.63	2.78	2.73	2.73	2.34	2.26	3.37	2.5	2.69	1.67
Klebsiella	0.48	0.45	0.49	0.48	0.42	1.73	2.19	1.76	2.44	2.10	1.57	1.77	2.13	1.75	1.76	1.71	1.75	2.38
Brevibacterium	0.36	0.61	3.83	0.31	1.33	0.07	0.81	1.51	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Salmonella	0.37	0.30	0.24	0.28	0.37	0.90	0.92	0.50	0.00	0.91	0.65	0.99	0.95	0.80	0.50	0.73	0.72	1.19
Edwardsiella	0.25	0.26	0.24	0.16	0.25	0.79	1.15	0.76	0.81	1.00	0.78	0.67	0.76	0.54	0.77	0.70	0.98	0.24
Enterobacter	0.23	0.29	0.33	0.33	0.43	0.58	0.69	0.00	0.00	0.65	0.83	0.46	0.54	0.80	0.69	0.46	0.67	1.19
Proteus	0.19	0.18	0.16	0.20	0.10	0.25	0.23	1.26	0.81	0.54	0.65	0.57	0.51	0.40	0.34	0.73	0.54	0.71
Dickeya	0.08	0.09	0.00	0.06	0.07	0.43	0.58	1.26	0.00	0.11	0.31	0.50	0.35	0.29	0.23	0.37	0.13	0.00
Pseudomonas	0.03	0.03	0.08	0.03	0.03	0.18	0.00	0.50	3.25	0.07	0.07	0.07	0.06	0.03	0.04	0.09	0.13	0.00
Brachybacterium	0.05	0.11	1.79	0.04	0.24	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Latilactobacillus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Eudominant			Dominant			Subdominant			Occasional			Casual					
	>10.01			5.1-10.0%			2.1 – 5.0%			1.1-2.0%			<1.0 %					

insects from the second generation fed, this group included the cultivar Rusałka 2 batches and 1 batch of the Ismena cultivar. There was also some background in this group.

4. DISCUSSION

The development of storage pests, including the number of offspring generation, is influenced by many biotic and abiotic factors (Perisic *et al*., 2018). Breeding insects in laboratory conditions allows for control of some of these factors, for example, by regulating temperature, air humidity and the number of individuals. Limiting the influence of environmental factors is crucial in studying insect feeding mechanisms.

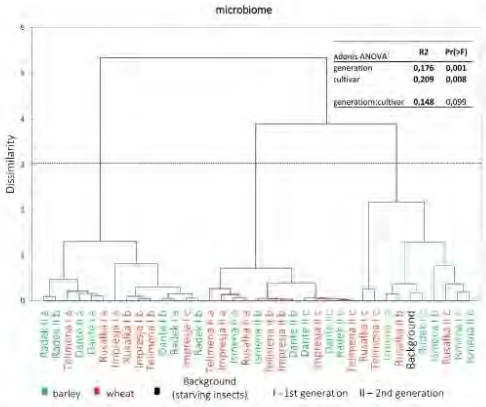


Fig. 5. Dendrogram showing the diversity between the microbiomes of individual samples; the results were prepared based on the Bray-Curtis difference matrix, Adonis ANOVA performed using the R package (Vegan).

Food is an important biotic factor that influences the development of storage insect pests. Boniecki *et al*. (2020) found that the development dynamics of *Sitophilus granarius* L. depend mainly on temperature, seed moisture and type of food. The chemical composition of individual cereal species and even varieties may differ significantly, resulting in increased attraction or deterrence of storage pests (Nawrot *et al*., 2006; Mebarkia *et al*., 2010). In the study by Laszczak-Dawid *et al*. (2011), it was found that in the case of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.), adults are more likely to feed on grain without covers, which is softer and more prominent in size. This results in easier access for the larvae of this species to food. Other researchers have reached the same conclusions, confirming that the hardness and size of grains have a crucial impact on resistance to feeding by insect storage pests (Bergvinson, 2014; Ahmed *et al*., 2020). As documented in the study of Greffeuille *et al*. (2006), grain hardness depends mainly on genetic factors. However, it may change due to agricultural practices and the variability of climatic conditions. It is particularly important that nitrogen fertilisation significantly impacts wheat's hardness, in accordance with the findings of Dziamba *et al*. (2001). The water content in the grain also plays an essential role in determining hardness. Increasing grain moisture leads to significant changes in its mechanical properties, including a decrease in hardness. Moreover, repeated moistening and drying of grains in field conditions may lead to

numerous transverse cracks in the endosperm, decreasing grain hardness (Dziki *et al*., 2011). This factor may significantly increase the susceptibility of the raw material to feeding by storage insect pests. The insect is more willing to eat partially mechanically damaged food (Kavallieratos *et al*., 2012). Some researchers suggest a correlation between grain hardness and its protein content. However, there is evidence that grain hardness depends on the amount of protein and its composition and distribution in the grains (Mikulíková, 2007). This information can be translated into the results we obtained in our research. Insects were more likely to feed on barley cultivars with a lower total protein content than on the tested wheat cultivars and caused a more significant loss of grain weight. Accordingly, the grain weight loss in the Ismena cultivar was 4.145 g, in the Radek cultivar, 3.218 g, and in the Dante cultivar, 2.342 g. In the wheat cultivar variants, the loss was for cv. Telimena 2,791, for cv. Impression 2.316 g, and for cv. Rusałka 1.845 g.

The sugar content and type may influence the development of storage pests, including the rice weevil. Chippendale (1972), in his research examining the effect of carbohydrates in the weevil's diet on its survival, found that the rice weevil developed properly on a diet enriched with starch, dextrins, amylopectin and glycogen while eating food containing amylose, cellulose, inulin, glucose and maltose disappeared. Further research showed that dietary carbohydrates that enabled proper development were nutritional stimulants, while those that caused premature death acted as deterrents to feeding or did not provide adequate physical substrates for feeding. Our research on wheat and barley revealed significant differences in the chemical composition of grain between the varieties tested. Of particular interest is the difference in water-soluble carbohydrates (WSC). In the case of wheat varieties, we observed a significantly higher WSC content than barley varieties, which may affect the availability of sugars for storage pests. The WSC content in wheat and barley may be related to the amylose content. In the case of barley, which often has a higher amylose content than wheat (Li *et al*., 2021; Javid Iqbal *et al*., 2022), differences in WSC content may be due to differences in starch composition, including the ratio of amylose to amylopectin. WSC content may influence the availability of sugars in grains and potentially affect the attractiveness of grains as food for storage pests. Therefore, research on the relationship between WSC content and the amylose to amylopectin ratio in both cereal species may provide important information regarding the preferences and development of these pests.

Mebarkia *et al*. (2010) indicate that the main factor influencing the grain weevil's choice of food is the wheat grain's protein content. According to the observations of Kordan *et al*. (2023), the analysis of the relationship between the intensity of weevil development and the total protein content in the grain of ten selected varieties showed a negative correlation. According to these authors, cultivars considered more resistant to feeding by *S. granarius* are characterised by a higher total protein content. Our research also shows that the rice weevil develops much worse on wheat varieties, especially the resistant Telimena cultivar, with a higher protein content. The situation was different in the case of barley cultivars, where the least resistant cultivar, Radek, was characterised by high contents of four fatty acids, total protein, and an increase of activity of α-chymotrypsin in the insect's gut. This may suggest that the qualitative composition of protein, *i.e*., the content of individual protein fractions, is as important as its overall quantity (Nietupski *et al*., 2006). In research on the relationship between the diverse chemical composition of proteins in cereal grains and the development of storage pests, Nietupski *et al*. (2006) showed a correlation between the content of individual protein fractions and the feeding of *S. granarius*. Additionally, they found that specific protein fractions, such as albumins, globulins and glutenins, may hinder the development of the grain weevil.

According to Majd-Marani *et al*. (2023), the content of phenols and lipids in the food eaten by insects may also significantly impact development. Significant relationships between the development time, longevity, and fecundity of *S. oryzae* and the content of phenols in the tested grains reveal this factor's important role in the rice weevil's life cycle. During our research, we noticed that the feeding activity of *S. oryzae* tends to increase in plant cultivars with low levels of antioxidant activity. Concerning cereal cultivars showing higher antioxidant activity, we observed fewer adult insects. However, this did not result in a decrease in feeding intensity. It is worth noting, however, that the correlation between these parameters and the level of antioxidant activity did not show a significant correlation.

Based on the results of previous scientific studies, it appears that the impact of the content of fatty acids in grains on the development of insects, available information suggests that the fat content in most cereal plants plays an important role in shaping the storage stability of cereal products and may influence the feeding behaviour of *S. granarius* (Liu, 2011). The research of Majd-Marani *et al*. (2023) correlation analysis showed that the content of glycogen and lipids in *S. oryzae* pupae has significant relationships with development time, fecundity, and longevity of adults. In research conducted by Nietupski *et al*. (2021), no significant relationships were revealed between the level of individual fatty acids in grains of various wheat varieties and parameters related to the development of the grain weevil. However, a positive correlation was observed between the total content of these substances in grains and the number of grain weevil offspring. This indicates the possible influence of fatty acids present in plants on the reproduction process of these insects. Nevertheless, it is possible to find information on the impact of individual fatty acids on storage pests and their development. Research by Kordan *et al*. (2019) indicate that godoleic acid (C 20:1) strongly

attracts *S. granarius*. A similar relationship was observed in our studies, where a high C 20:1 content was correlated with wheat cultivars less resistant to rice weevil feeding, *i.e.*, Impresja and Rusałka cultivars (Fig. 3). It should therefore be noted that examining the quantitative and qualitative composition of fatty acids with data on the development of the rice weevil may indicate cereal varieties characterised by more excellent resistance to rice weevil feeding.

Regarding the influence of cereal cultivar characteristics on the microbiome, it was observed that both the variety and the species significantly determined ($p<0.01$) the microbiota structure within a generation. Nevertheless, the determination index was low ($R^2<0.5$) regardless of the factor, which indicates a significant influence of factors other than those used in the experiment and natural randomness resulting from the competition of individual taxa for participation in the bacteriome.

In this study, we observed that cultivars and generation influence the rearrangement of microbiomes. Despite this, random factors and factors not included in this study influenced changes in the taxonomic structure of the bacteriome, as indicated by the low R^2 value.

An important observation is changes in the abundance of certain types. The *Sodalis* genus consistently dominated the insect bacteriomes, regardless of the factor. This symbiont is essential for the development of adult individuals (Heddi *et al*., 1998). Attempting to compete for the bacteriomes, especially in wheat, the *Staphylococcus* genus is responsible for insect infections. Nevertheless, the insect's immune system, including antimicrobial peptides (AMP) and phagocytosis, allows for the decrease of the pathogenicity of undesirable microbiota (El Shazely *et al*., 2019). The results indicate that despite the high presence of *Staphylococcus* and likely breaking of resistance in some insects in the first generation, individuals of the second generation are almost entirely free of this type of microorganism.

In the case of the *Escherichia* and *Klebsiella* genera, their presence is confirmed regardless of the generation, which is natural for insects (Heddi and Ardon, 2005; Wang and Rozen, 2018). However, their presence and stability increase are noticeable in the second generation. It should be noted that the samples of the Ismena cultivar were most readily colonised, characterised by the best development of insects and the broadest spectrum of biochemical activity in the gut, correlated with the raw ash forming the base of mineral substances and raw fat. The activity of *Enterobacteriaceae* bacteria tends to be directed towards facultative symbiosis, fermentative processes resulting in, for example, vitamin production in the digestive system (Gupta and Nair, 2020; Serrato-Salas and Gendrin, 2023).

In our study, it was also observed that all batches associated with the Telimena and Impresja cultivars, which served as the diet for the parental generation of insects, exhibited the formation of distinct microbiomes compared to those of the starving individuals, *i.e.*, those living in the most adverse conditions for their development. The second group primarily comprised samples from insects of the second generation, characterised by a substantial similarity in their microbiome composition. This observation suggests the stabilisation and development of a specialised bacteriome structure. However, it is essential to note that the absence of microbiome clustering based on varieties (sample groups in different categories) indicates a significant influence of randomness, suggesting similar ecological conditions (Fig. 5).

Due to the significant impact of grain characteristics on microbiome rearrangement, unfortunately, symbiotic bacteria of the *Sodalis* genus proved to be resistant. This study has demonstrated that the traits determining the feeding habits of stored grain pests can vary considerably depending on the grain species. The gut microbiome underwent rearrangements depending on grain traits, indicating competition for an ecological niche within the bacteriome. Unfortunately, in the case of *Sodalis* sp., a symbiont essential for the development of the rice weevil, alternative methods that disrupt the functioning of symbionts need to be employed. Future research should focus on the development of antibiotic biopesticides, and the most promising direction for future studies could involve natural volatile organic compounds (VOCs) for fumigating storage facilities (Sidorova *et al*., 2022; Zhou and Jander, 2022).

5. CONCLUSIONS

The general chemical composition of cereal grains plays a crucial role in developing storage pests. The availability of various nutrients can affect the attractiveness of grains as food and the ability of insects to thrive. Understanding these relationships is important in the context of strategies to control storage pests in cereal crops.

Our research shows that the fatty acid profile plays an important role in varietal susceptibility. An important fatty acid that stimulates *S. oryzae* to feed is 20:1 (godoleic acid). However, the content of this fatty acid was negatively correlated with the development of the rice weevil on barley. This observation confirms that the cereal species' different features determine their susceptibility to rice weevil feeding. The role of antioxidants in the development of varietal resistance is of little importance and was observed only in the case of barley.

The structure of the *S. oryzae* microbiome is significantly influenced by both the species and the cultivar of grain on which the species feeds. However, depending on the grain type, other factors influence the structure of the microbiome. It should be noted that the differences between species were much more significant than between cultivars within a cereal species. Higher variability of the rice weevil between microbiome structures was observed in the first generation. The dominant genus in the gastrointestinal tract was *Sodalis* spp., with a high share of *Staphylococcus* spp. It was also observed that the fatty acid profile affects the microbiome and may contribute to its changes. In the

second generation, bacteria of the *Staphylococcus* genus were displaced from the microbiome structure. The position of bacteria of the *Escherichia* and *Klebsiella* species strengthened, and at the same time, the weevil became more resistant to factors unfavourable for feeding. The obligate symbiont included in the *S. oryze* bacteriome, *i.e.*, *Sodalis* sp., almost always dominated, and no correlation was observed between species and variety factors of cereals and their abundance. A co-dominance of bacteria of the *Staphylococcus* genus was observed, which may contribute to the death of individuals. However, the functions of *Escherichia* and *Klebsiella* bacteria are not entirely clear; they may be natural intestinal microbiota, but their transmission to the next generation may occur from dead insects, on which these bacteria develop intensively.

In conclusion, the recommendations for integrated methods for protecting stored cereal grains indicate the need to reduce broad-spectrum pesticide use significantly. The use of insecticides raises some food safety concerns. Control of the rice weevil is strategically important as it is a dangerous storage pest. Once pesticide use is restricted, this will be a difficult task. Evidence of symbiotic interactions with microflora among some insects points to the need for significant research into the susceptibility of pests to gut microbial loss. This may lead to new perspectives in storage pest control strategies. Instead of non-selective insecticides in storage and transport facilities, non-toxic substances can be used to destroy the symbiont, preventing insect development. Biological advances in new cereal cultivars may lead to the natural production of bacteriostatic substances against *S. pierantonius*, moderating the problem of cereal storage losses caused by *S. oryzae*.

Conflicts of Interest: The Authors declare they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our heartfelt thanks to Katarzyna Smołka from Fluentbe for her invaluable assistance in proofreading and linguistic correction of this manuscript.

FUNDING

The results presented in this paper were obtained from a comprehensive study financed by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics.

6. REFERENCES

Abass A.B., Ndunguru G., Mamiro P., Alenkhe B., Mlingi N., and Bekunda M., 2014. Post-harvest food losses in a maise-based farming system of semi-arid savannah area of Tanzania. J. Stored Prod. Res., 57, 49-57, https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2013.12.004

Ahmed A.G., Ali M.H.M., Saad O.S., Mahmoud Z.N., Nasr D.H., Elamin S.M., Altaf-Ul-Amin M.d., Afendi F.M., Kanaya S., Idris I., *et al.*, 2020. Recent Research Advances in Biology Vol. 2. (Ed. S. Borek). Book Publisher International, https://doi.org/10.9734/bpi/rrab/v2

Benzie I.F.F. and Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal. Biochem., 239(1), 70-76, https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

Bergvinson D.J., 2014. Phytochemical and nutraceutical changes during recurrent selection for storage pest resistance in tropical maise. Crop Sci., 54(6), 2423-2432, https://doi.org/10.2135/cropsci2014.03.0223

Boniecki P., Koszela K., Świerczyński K., Skwarcz J., Zaborowicz M., and Przybył J., 2020. Neural visual detection of grain weevil (*Sitophilus granarius* L.). Agriculture, 10(1), 25, https://doi.org/10.3390/agriculture10010025

Brandon A.M., Gao S.H., Tian R., Ning D., Yang S.S., Zhou J., Wu W.M., and Criddle CS., 2018. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. Environ. Sci. Technol., 52(11), 6526-6533, https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301

Caron P., Ferrero y de Loma-Osorio G., Nabarro D., Hainzelin E., Guillou M., Andersen I., Arnold T., Astralaga M., Beukeboom M., Bickersteth S., *et al.*, 2018. Food systems for sustainable development: proposals for a profound four-part transformation. Agron. Sustain. Dev., 38(4), https://doi.org/10.1007/s13593-018-0519-1

Chippendale G.M., 1972. Dietary carbohydrates: Role in survival of the adult rice weevil, *Sitophilus oryzae*. J. Insect Physiol., 18(5), 949-957, https://doi.org/10.1016/0022-1910(72)90032-7

COBORU. Research Centre for Cultivar Testing. Cultivars data. Online: https://www.coboru.gov.pl/en/search, 25.10.2023

Dal Bello G., Padin S., López Lastra C., and Fabrizio M., 2000. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. J. Stored Prodm. Res., 37(1), 77-84, https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00009-6

Dubey N.K., Srivastava B., and Kumar A., 2008. Current status of plant products as botanical pesticides in storage pest management. J. Biopest., 1(2), 182-186.

Dziamba J., Dziki D., and Laskowski J., 2001. The influence of nitrogen fertilisation on selected properties of wheat grain. Eng. Agri., 10(30), 121-127.

Dziki D., Różyło R., and Laskowski J., 2011. Wheat grinding and the effect of grain hardness on this process. Acta Agrophys., 18(1), 33-43.

Golebiowska Z., 1969. The feeding and fecundity of *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in wheat grain. J. Stored Prod. Res., 5(2), 143-155, https://doi.org/10.1016/0022-474X(69)90056-3

Greffeuille V., Abecassis J., Rousset M., Oury F.X., Faye A., L'Helgouac'h C.B., and Lullien-Pellerin V., 2006. Grain characterisation and milling behaviour of near-isogenic lines differing by hardness. Theor. Appl. Genet., 114(1), 1-12, https://doi.org/10.1007/s00122-006-0403-2

Gupta A. and Nair S., 2020. Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont. Front. Microbiol., 11, https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357

Halstead D.G.H., 1963. External sex differences in stored-products Coleoptera. Bull. Entomol. Res., 54(1), 119-134, https://doi.org/10.1017/S0007485300048665

Heddi A. and Ardon P.N., 2005. *Sitophilus oryzae* L.: A model for intracellular symbiosis in the Dryophthoridae weevils (Coleoptera). Symbiosis, 39, 1-11.

Heddi A., Charles H., Khatchadourian C., Bonnot G., and Nardon P., 1998. Molecular characterisation of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: A peculiar G+C content of an endocytobiotic DNA. J. Mol. Evol., 47, 52-61, https://doi.org/10.1007/PL00006362

Javid Iqbal M., Shams N., and Fatima K., 2022. Nutritional quality of wheat. Wheat. IntechOpen, https://doi.org/10.5772/intechopen.104659

Jung C.M., Carr M., Fleischman E., and Roesch C.J., 2021. Response of the green June beetle and its gut microbiome to RDX and phenanthrene. Int. J. Environ. Sci. Technol., 18, 1785-1792, https://doi.org/10.1007/s13762-020-02960-1

Kavallieratos N.G., Athanassiou C.G., Arthur F.H., and Throne J.E., 2012. Lesser grain borers, *Rhyzopertha dominica*, select rough rice kernels with cracked hulls for reproduction. J. Insect Sci., 12(1), 38, https://doi.org/10.1673/031.012.3801

Keneni G., Bekele E., Getu E., Imtiaz M., Damte T., Mulatu B., and Dagne K., 2011. Breeding food legumes for resistance to storage insect pests: Potential and limitations. Sustainability, 3(9), 1399-1415, https://doi.org/10.3390/su3091399

Klejdysz T. and Mrówczyński M., 2017. Methodology of integrated protection of grain warehouses for advisors: collective study. IOR - National Research Institute.

Kordan B., Nietupski M., Ludwiczak E., Gabryś B., and Cabaj R., 2023. Selected cultivar-specific parameters of wheat grain as factors influencing intensity of development of grain weevil *Sitophilus granarius* (L.). Agriculture, 13(8), 1492, https://doi.org/10.3390/agriculture13081492

Kordan B., Skrajda-Brdak M., Tańska M., Konopka I., Cabaj R., and Załuski D., 2019. Phenolic and lipophilic compounds of wheat grain as factors affecting susceptibility to infestation by granary weevil (*Sitophilus granarius* L.). J. Appl. Bot. Food Qual., 92, 64-72, https://doi.org/10.5073/JABFQ.2019.092.009

Kosewska O., Przemieniecki S.W., and Nietupski M., 2023. The effect of antibiotics on bacteriome of sitophilus oryzae and rhyzopertha dominica as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy in grain stores. App. Sci., 13(3), 1576, https://doi.org/10.3390/app13031576

Kumar D. and Kalita P., 2017. Reducing postharvest losses during storage of grain crops to strengthen food security in developing countries. Foods, 6(1), 1-22, https://doi.org/10.3390/foods6010008

Laszczak-Dawid A., Ciepielewska D., and Damszel M., 2011. Technological quality of grain of some wheat cultivars versus the development of the lesser grain borer (*Rhizopertha dominica* F.). Prog. Plant Prot., 51(3), 1125-1129.

Li M., Geng L., Xie S., Wu D., Ye L., and Zhang G., 2021. Genome-wide association study on total starch, amylose and amylopectin in barley grain reveals novel putative alleles. Int. J. Mol. Sci., 22(2), 553, https://doi.org/10.3390/ijms22020553

Liu K.S., 2011. Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species. J. Food Sci., 76(2), C334-C342, https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02038.x

Longstaff B.C. and Evans D.E., 1983. The demography of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), submodels of age-specific survivorship and fecundity. Bull. Entomol. Res., 73(2), 333-334, https://doi.org/10.1017/S0007485300008920

Lumivero., 2023. XLSTAT basic solutions. Available online: https://www.xlstat.com/en/solutions/basic, 20.06.2023

Majd-Marani S., Naseri B., Hassanpour M., Razmjou J., and Jalaeian M., 2023. Life history and population growth parameters of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) fed on 10 rice cultivars and lines. Research Square, https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2565845/v1

Majumder S., Bala B.K., Arshad F.M., Haque M.A., and Hossain M.A., 2016. Food security through increasing technical efficiency and reducing postharvest losses of rice production systems in Bangladesh. Food Secur., 8(2), 361-374, https://doi.org/10.1007/s12571-016-0558-x

Mebarkia A., Rahbé Y., Guechi A., Bouras A., and Makhlouf M., 2010. Susceptibility of twelve soft wheat varieties (*Triticum aestivum*) to *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Agric. Biol. J. N. Am., 1(4), 571-578.

Mikuliková D., 2007. The effect of friabilin on wheat grain hardness. Czech J. Genet. Plant Breed., 43(2), 35-43, https://doi.org/10.17221/1911-CJGPB

Nawrot J., Warchalewski J.R., Piasecka-Kwiatkowska D., Niewiada A., Gawlak M., Grundas S.T., and Fornal J., 2006. The effect of some biochemical and technological properties of wheat grain on granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) (Coleoptera: Curculionidae) development. In: Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection. São Paulo, Brazil, 400-407.

Nietupski M., Ciepielewska D., and Fornal L., 2006. Effect of the chemical protein diversity of selected wheat grain cultivars on the development of storage pests. Prog. Plant Prot., 46(2), 420-423.

Nietupski M., Ludwiczak E., Cabaj R., Purwin C., and Kordan B., 2021. Fatty acids present in wheat kernels influence the development of the grain weevil (*Sitophilus granarius* L.). Insects, 12(9), https://doi.org/10.3390/insects12090806

Padin S., Dal Bello G., and Fabrizio M., 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. J. Stored Prod. Res., 38(1), 69-74, https://doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00046-1

Perisic V., Perisic V., Vukajlović F.N., and Pesic S.B., 2018. Feeding preferences and progeny production of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) in small grains. Biol. Nyssana, 9(1), https://doi.org/10.5281/zenodo.1470852

Przemieniecki S.W., Damszel M., Ciesielski S., Kubiak K., Mastalerz J., Sierota Z., and Gorczyca A., 2021. Bacterial microbiome in *Armillaria ostoyae* rhizomorphs inhabiting the root zone during progressively dying Scots pine. Agric., Ecosyst., 164, https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103929

Przemieniecki S.W., Kosewska A., Ciesielski S., and Kosewska O., 2020. Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. Env. Poll., 256, 113265, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113265

Przemieniecki S.W., Kosewska A., Kosewska O., Purwin C., Lipiński K., and Ciesielski S., 2022. Polyethylene, polystyrene and lignocellulose wastes as mealworm (*Tenebrio molitor* L.) diets and their impact on the breeding condition, biometric parameters, metabolism, and digestive microbiome. Stoten, 832, 154758, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154758

Rita Devi S., Thomas A., Rebijith K.B., and Ramamurthy V.V., 2017. Biology, morphology and molecular characterisation of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). J. Stored Prod. Res., 73, 135-141, https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.08.004

Serrato-Salas J. and Gendrin M., 2023. Involvement of microbiota in insect physiology: Focus on B vitamins. mBio., 14(1), e02225-22, https://doi.org/10.1128/mbio.02225-22

Shazely B.E., Urbański A., Johnston P.R., and Rolff J., 2019. In vivo exposure of insect AMP resistant *Staphylococcus aureus* to an insect immune system. Insect Biochem. Mol. Biol., 110, 60-68, https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.017

Sidorova D.E., Plyuta V.A., Padiy D.A., Kupriyanova E.V., Roshina N.V., Koksharova O.A., and Khmel I.A., 2022. The effect of volatile organic compounds on different organisms: Agrobacteria, plants and insects. Microorganisms, 10(1), 69, https://doi.org/10.3390/microorganisms10010069

Smith P. and Gregory P.J., 2013. Climate change and sustainable food production. Proc. Nutr. Soc., 72(1), 21-28, https://doi.org/10.1017/S0029665112002832

Thomas T.A., 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. J. Sci. Food Agric., 28(7), 639-642, https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280711

Wang Y. and Rozen D.E., 2018. Gut microbiota in the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*, provide colonisation resistance against larval bacterial pathogens. Ecol. Evol., 8(3), 1646-1654, https://doi.org/10.1002/ece3.3589

Żegarska Z., Jaworski J., and Borejszo Z., 1991. Evaluation of the modified Peisker method for obtaining fatty acid methyl esters. Acta Acad. Agricult. Techn. Olst., 24, 25-33.

Zhou S. and Jander G., 2022. Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. J. Exp. Bot., 73(2), 449-462, https://doi.org/10.1093/jxb/erab413

PUBLIKACJA 4

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis

Olga Kosewska *, Sebastian Wojciech Przemieniecki * and Mariusz Nietupski

Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn, Poland; mariusz.nietupski@uwm.edu.pl
* Correspondence: olga.kosewska@uwm.edu.pl (O.K.); sebastian.przemieniecki@uwm.edu.pl (S.W.P.)

Abstract: *Rhyzopertha dominica* causes significant economic losses in stored cereals. Insects' digestive tract microbiome is crucial for their development, metabolism, resistance, and digestion. This work aimed to test whether the different chemical properties of different wheat and barley grain cultivars cause disturbances in insect foraging and rearrangements of the structure of the *R. dominica* microbiome. The results indicated that grain cultivars significantly influence the microbiome, metabolism, and insect foraging. Most observed traits and microbiome structures were not correlated at the species level, as confirmed by ANOSIM (p = 0.441). However, the PLS-PM analysis revealed significant patterns within barley cultivars. The study found associations between C18:2 fatty acids, entomopathogenic bacteria, an impaired nitrogen cycle, lysine production of bacterial origin, and insect feeding. The antioxidant effects also showed trends towards impacting the microbiome and insect development. The findings suggest that manipulating grain chemical properties (increasing C18:2 and antioxidant levels) can influence the *R. dominica* microbiome, disrupting their foraging behaviours and adaptation to storage environments. This research supports the potential for breeding resistant cereals, offering an effective pest control strategy and reducing pesticide use in food production.

Keywords: storage pests; *Rhyzopertha dominica*; microbiome; food chemistry; wheat; barley

check for updates

Citation: Kosewska, O.; Przemieniecki, S.W.; Nietupski, M. Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130

Academic Editors: Inna P. Solyanikova and Tatiana Abashina

Received: 1 August 2024
Revised: 3 September 2024
Accepted: 5 September 2024
Published: 20 September 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The species *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), also known as the lesser grain borer, was first recorded under the bark of *Quercus suber* (cork oak) and *Cytisus spinosus* (spiny broom) as early as 1849. It is believed that *R. dominica* is native to India, and most early reports are from this location.Today, this insect has a cosmopolitan range and has adapted to a diet consisting of cereal grains and other stored products [1]. Thus, *R. dominica* has become one of the most dangerous storage pests worldwide. It occupies a leading position among insects, causing damage to grain storage areas, and its presence can lead to significant economic losses in agriculture and the food industry [2]. Grain losses during storage due to insect feeding account for 10 to 30% in developing countries, while in developed countries, they are 5–10% [3,4]. Assuming that, on average, these losses are 20% of the stored grain worldwide, approximately 420 million tonnes of grain are lost annually during storage [5]. *R. dominica* causes a large proportion of these losses. This insect is particularly threatening in countries with warm climates, such as Australia, India, and Ethiopia [4–6]. In recent years, however, it has been observed that this species can adapt rapidly to unfavourable abiotic conditions and has significantly changed its habitat preferences, making it thrive in temperate climate zones [7,8].

This pest attacks a wide range of cereals, including wheat, barley, rice, and maize, seriously threatening food security [9]. Its life cycle is short, and females lay large numbers

of eggs, contributing to rapid population growth. Its high fecundity and ability to survive in a wide range of temperatures and humidities make *R. dominica* an extremely difficult-to-control storage pest [10]. A key factor influencing the development and foraging of *R. dominica* is its microbiome, which is the collection of microorganisms inhabiting the insect's body. The microbiome plays an important role in insect function, influencing digestion, resistance to pathogens, and reproductive capacity [11,12]. It is increasingly recognised that interactions between a host and its microbiome can shape host fitness and evolutionary potential [13,14], increasing tolerance to abiotic stress, enabling food digestion, or providing protection against pathogens [15,16]. For example, a reduction in the diversity of the microbiome in the gut of tadpoles can reduce host fitness and tolerance to thermal stress in a matter of days [17], and the acquisition of pesticide-degrading bacteria can immediately confer pesticide resistance to bugs [18]. Symbiotic bacteria found in the digestive tract of insects can help, among other things, to digest difficult-to-digest nutrients such as cellulose [19]. These microorganisms can protect insects from pathogens and produce essential vitamins and amino acids [20]. Studies show that the diet is one of the factors directly influencing the microbiome's composition, which can affect the insect's health and development [21]. A change in the diet can lead to a change in the composition of the microbiome and affect the metabolic functions of the bacteria inhabiting the digestive tract of insects, as has been observed in *Bombus terrestris* (ground bumblebee), among others [22]. Similarly, studies by Montagna et al. [20] on the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) showed differences in bacterial composition depending on whether the insects were fed on palm tissues or an apple-based substrate.

Studies of the diet of the *R. dominica* show that different types of food can affect the development and health of this insect [23]. A protein-rich diet can accelerate larval development and increase larval survival [24]. Also, other chemical components of the food, such as carbohydrates, antioxidants, or the fat content, can affect the development of storage pests [25], including *R. dominica*. The importance of the microbiome for the health and development of *R. dominica* is increasingly appreciated. Understanding the interactions between the diet, microbiome, and physiology of *R. dominica* may contribute to developing new control strategies for this pest. However, there are few scientific articles on the *R. dominica* microbiome [21] and how it changes with different diets. Evidence of symbiotic interactions with the microbiota among some insects indicates the need for significant research on the susceptibility of the pest to a loss of the gut microbiota. This may lead to new perspectives on control strategies for *R. dominica* in grain storage facilities. In particular, one of the most important problems related to the control of *R. dominica* is that it becomes resistant to the active substances used for its control, that is, deltamethrin and phosphate hydrogen [26,27]. Therefore, a strategic solution is to reduce agrophages through plant varietal advances [7]. Current research is increasingly focusing on exploiting the natural resistance of different plant species, which can significantly reduce the need for synthetic pesticides and improve productivity, profitability, and environmental compliance in crop production [9]. This study aimed to investigate the relationship between the microbiome of *R. dominica* and its development and foraging. Particular attention was paid to the effects of the diet on the composition of the microbiome and the physiology of the insect and to test how the different chemical properties of different cultivars of common wheat and barley grains cause disturbances in the foraging of *R. dominica* and changes in the structure of the microbiome of this pest. This study aimed to provide new information that can be used to develop more effective methods to control *R. dominica* populations and minimise losses in grain stores.

The study assessed the natural resistance of different wheat and barley species to *R. dominica* feeding. The hypothesis adopted is that the grains of the cereal species and cultivars studied show different levels of natural resistance to *R. dominica* attack related to their different chemical compositions. The verification of the adopted research hypothesis was carried out by confirming the influence of the chemical properties of the tested wheat and barley cultivars on the composition and activity of the symbiotic microbiome of

R. dominica and confirming the close correlation between the process of food digestion by *R. dominica* and the enzymatic activity and interaction with the symbiotic microbiome of this insect. The chemical properties of the grains also affect the composition and activity of the insect's symbiotic microbiome, which may modify the digestive processes of these organisms. It was assumed that the food digestion process in *R. dominica* is based on enzymatic activity and an interaction with the symbiotic microbiome of this insect.

2. Results

2.1. Relationship between the Development of R. dominica and Chemical Parameters of Cereal Grains

Significant differences between the wheat cultivars tested were observed for traits such as consumption, number of imago, and dry matter (SM), ash (Ash), total protein (TP), crude fibre (CFibre) and water-soluble sugar (WSC) contents. The consumption intensity differed between the Varius cultivar, where the highest grain weight loss was recorded (4.6 g), and the Impresja cultivar, which had the lowest weight loss (0.41 g). Analogous results were observed for the number of imago. All cultivars tested differed highly ($p < 0.001$) in the dry matter content. The highest dry matter content was observed in the grain of the Impresja cultivar, a medium content in the Rusałka cultivar, and the lowest content in the grain of the Varius cultivar. For the ash (Ash) and crude fibre (CFibre) contents, the Varius cultivar had significantly higher contents than the other cultivars. Each variant differed highly significantly in the total protein (TP) content. The highest TP content characterised the Varius cultivar, the Rusałka cultivar had an average content, and the Impresja cultivar had the lowest content. The Rusałka cultivar differed significantly and had a lower crude fat content than the other variants (CFat). The content of water-soluble sugars differed highly significantly between each variant. The highest WSC content was characterised by the grains of the Rusałka cultivar and the lowest by the Impresja cultivar. The antioxidant content did not differ significantly among cultivars; however, the Varius cultivar had the highest antioxidant potential and the Impresja cultivar had the lowest, with a p-value of 0.98 (trend). The NMDS graph showed that the Impresja and Rusałka variant samples had low dissimilarity (Figure 1).

No significant difference was observed in insect foraging for the barley cultivars tested. The grain mass loss measurements were as follows: 2.56 g for cultivar Ismena, 2.0 g for cultivar Radek, and 1.41 g for cultivar Trofeum. However, grain chemical parameters differed significantly in total protein (TP), crude fat (CFat) and water-soluble sugar (WSC) contents. The protein content was significantly higher in the grain of the Trofeum cultivar than in the other variants. On the other hand, the crude fat content was significantly higher in the grain of the Ismena cultivar, with the lowest fat content observed in the Trofeum cultivar. The WSC content was significantly lower in the grain of the Radek cultivar than in the other variants. No significant differences were observed regarding antioxidant activity, only a trend ($p = 0.086$) between the Ismena cultivar with the highest antioxidant activity and the Trofeum cultivar with the lowest antioxidant activity. Based on the NMDS results, partial dissimilarity was observed between the Trofeum and Radek cultivars. For the Ismena cultivar, unclear relationships were observed due to the high dissimilarity within this variant (Figure 2).

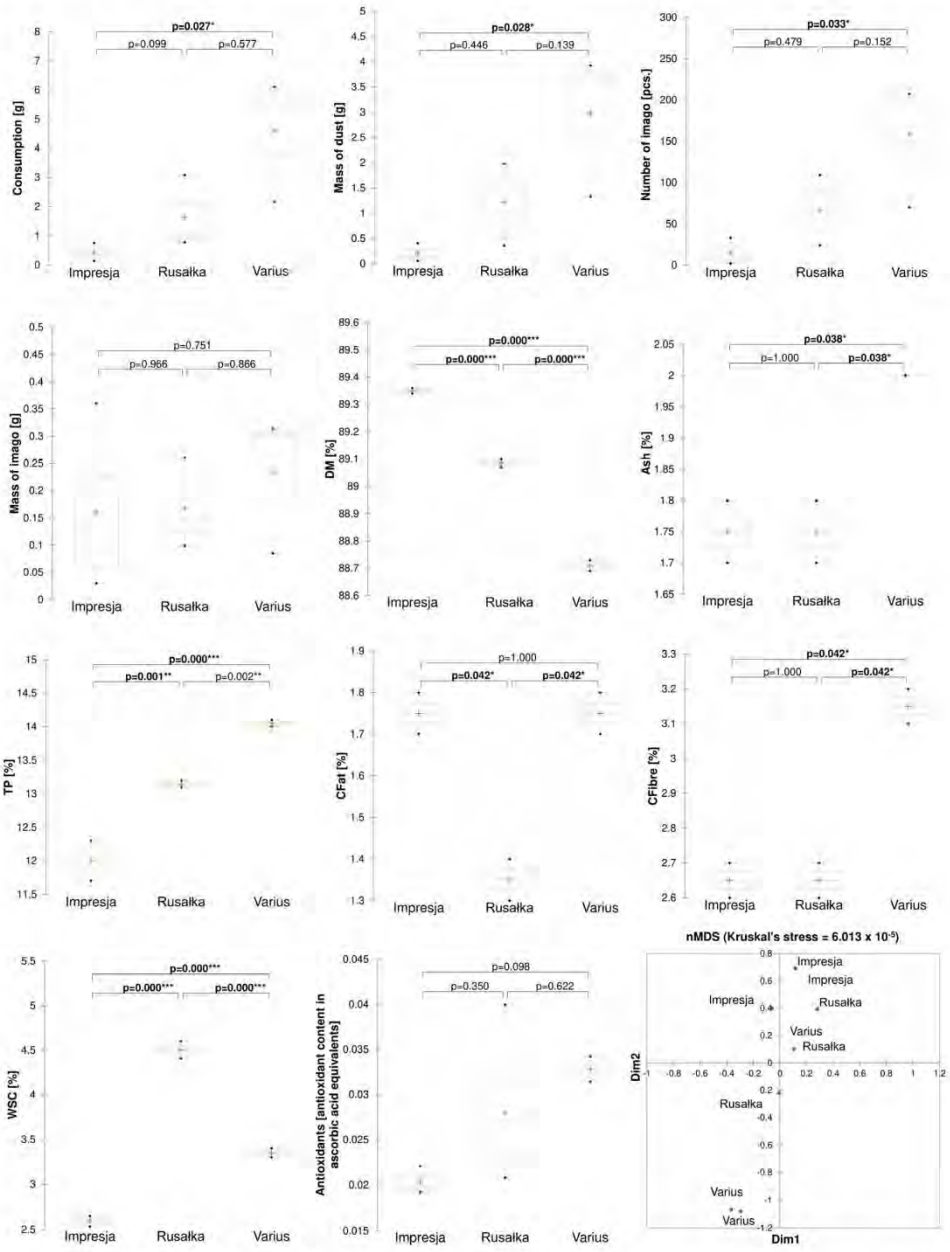


Figure 1. Boxplots of *R. dominica* developmental and wheat chemical parameters, depending on the cultivar used, and Bray–Curtis hierarchical clustering and NMDS show dissimilarity between treatments. Significance levels are denoted by asterisks as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Abbreviations: DM—dry matter, Ash—crude ash, TP—total protein, CFat—crude fat, CFibre—crude fibre, WSC—water-soluble carbohydrate.

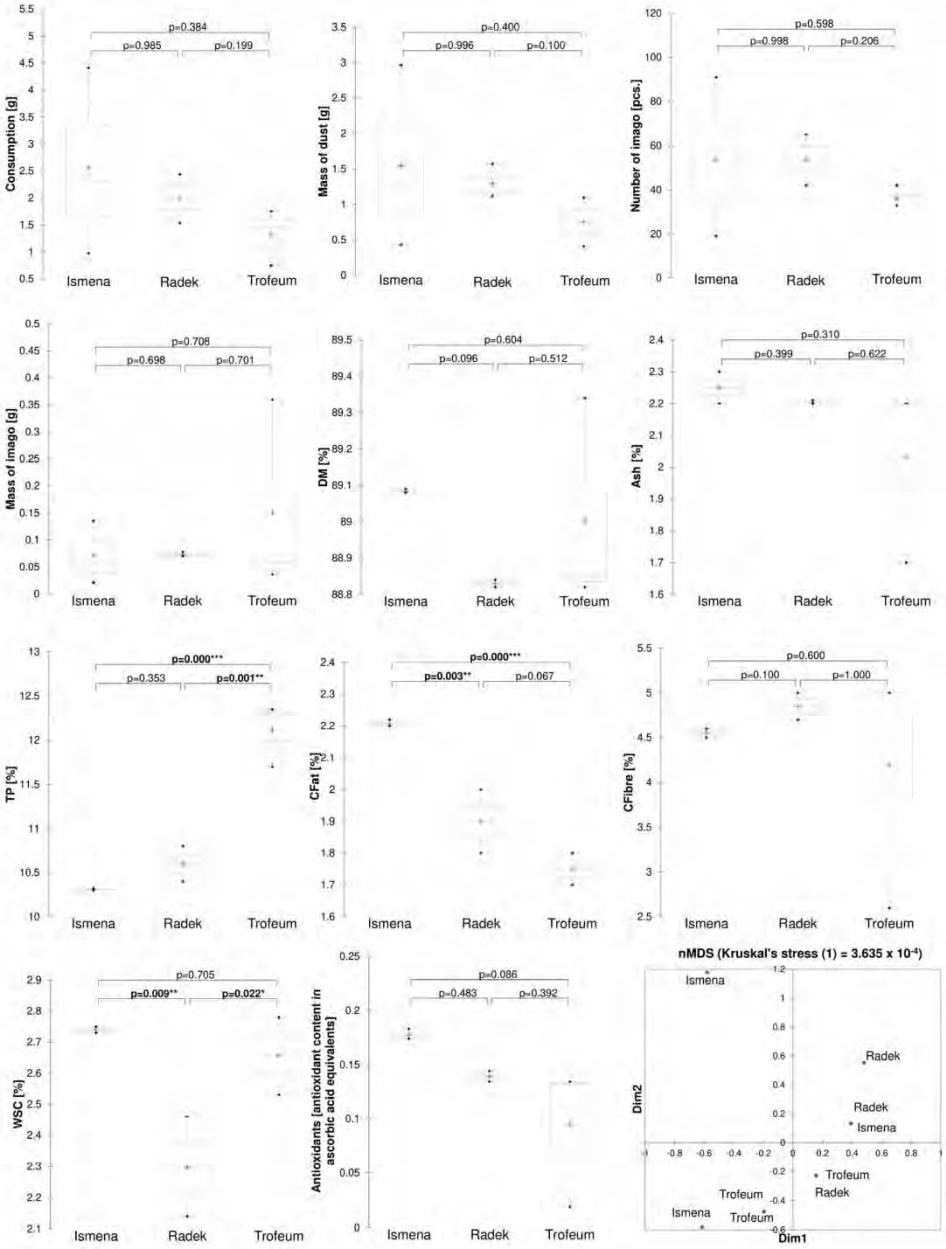


Figure 2. Boxplots of *R. dominica* developmental parameters and barley chemical parameters, depending on the cultivar used, and Bray–Curtis hierarchical clustering and NMDS show dissimilarity between treatments. Significance levels are denoted by asterisks as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Abbreviations: DM—dry matter, Ash—crude ash, TP—total protein, CFat—crude fat, CFibre—crude fibre, WSC—water-soluble carbohydrate.

2.2. *Analysis of the Bacteriobiome of R. dominica*

By analysing the percentages of the different bacterial genera identified in the digestive tract of the *R. dominica* feeding on different wheat and barley cultivars (Table 1), we noted significant microbial diversity, which depends on both the type of grain and the generation of the insect.

Table 1. Structure of the *R. dominica* bacteriome and indicators of microflora diversity identified (percentage of bacterial genera identified in the digestive system of *R. dominica* feeding on different wheat and barley cultivars). Values sharing the same letters (a, ab, b) are not significantly different from each other according to Tukey's test.

Generation		Generation I						Generation II					
Species of the		Wheat				Barley		Wheat				Barley	
Cultivar	Background without Feed	Impresja	Rusałka	Varius	Trofeum	Radek	Ismena	Impresja	Rusałka	Varius	Trofeum	Radek	Ismena
g__Pantoea	23.3	19.0	18.8	24.3	20.1	12.8	12.9	19.7	38.1	16.0	28.0	11.8	10.7
g__Ralstonia	21.6	14.1	11.4	7.5	8.9	6.9	7.8	19.9	3.3	11.0	19.2	5.1	15.6
g__Staphylococcus	6.0	20.3	8.7	0.0	11.5	54.9	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	7.8	0.4
g__Pseudomonas	9.3	17.1	9.3	13.0	10.1	6.4	13.2	6.3	5.4	8.8	10.6	5.5	23.6
g__Stenotrophomonas	10.8	6.4	7.9	11.4	0.9	5.7	25.9	23.3	4.7	6.1	1.2	1.8	5.4
g__Massilia	7.6	5.3	4.8	19.4	8.5	2.2	7.4	9.5	5.2	13.4	9.9	1.6	8.1
g__Acinetobacter	0.0	0.3	0.5	0.6	12.6	0.8	1.4	1.4	21.1	7.4	7.1	4.0	13.8
g__Serratia	0.0	0.4	0.7	1.7	6.4	0.6	0.0	10.5	15.7	9.1	14.1	0.7	14.4
g__Xanthomonas	0.0	3.2	8.8	6.5	0.7	4.9	7.2	2.3	0.0	2.3	1.8	34.3	0.0
g__Sphingomonas	6.6	4.1	2.5	3.0	1.2	1.1	2.2	3.2	2.2	2.0	3.1	1.2	1.2
g__Candidatus_Sulcia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	19.6	6.4
g__Sphingobium	4.4	2.5	0.6	0.6	0.4	1.3	1.0	1.4	1.1	1.2	0.7	0.4	0.9
o__Enterobacterales	7.9	2.2	4.5	0.3	0.0	0.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Caulobacter	0.0	1.8	0.3	1.4	0.5	0.7	0.7	0.5	0.7	1.3	0.9	0.0	0.4
g__Paenibacillus	0.0	0.5	0.3	0.8	0.7	0.0	1.1	0.8	1.0	1.0	1.1	0.0	0.7
g__Brevibacterium	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Bosea	0.0	0.7	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.6
g__Rhizobium	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.7	0.6	0.0	0.5	0.3	0.5	0.0	0.3
g__Variovorax	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.7	0.2	0.8	0.0	0.9
g__Burkholderia	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	1.0	0.2	0.5	0.0	0.0	0.4
g__Bacillus	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.9
g__Cupriavidus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Methylobacterium	0.0	0.4	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Afipia	0.0	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Escherichia-Shigella	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0
g__Corynebacterium	0.0	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
g__Brevundimonas	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0
g__Alcaligenes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0
g__Sporosarcina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0
f__Comamonadaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
g__Conchiformibius	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0
g__Ancylobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Aureimonas	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0
g__Lysobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
f__Xanthobacteraceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
g__Microvirga	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0
g__Pseudarthrobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0
g__Candidatus_Berkiella	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0
g__Moraxella	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0
g__Kocuria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Predominant			Dominant			Subdominant			Occasional		Casual
		>10.01%			5.1–10.0%			2.1–5.0%			1.1–2.0%		<1.0%
Dominance_D		0.1832 ab	0.2185 ab	0.2104 ab	0.2398 a	0.6804 a	0.2033 ab	0.1595 ab	0.2579 a	0.1986 ab	0.2256 ab	0.2341 ab	0.1322 b
Shannon_H		2.0590 ab	1.7480 b	1.8110 b	1.8460 b	0.7871 b	1.8510 b	2.0770 ab	1.7390 b	2.0090 ab	1.7700 ab	1.9490 ab	2.2490 a
Evenness_e^H/S		0.5848 ab	0.5223 ab	0.5982 ab	0.5278 b	0.2632 b	0.5292 ab	0.6445 a	0.4831 b	0.4973 ab	0.5703 ab	0.5866 ab	0.4989 ab

An analysis of the bacterial diversity in the digestive tract of the *R. dominica* feeding on different wheat and barley cultivars showed an apparent dominance of *Pantoea* and *Ralstonia* bacteria in most cultivars and generations. In the first generation, the wheat cultivar Impresja and the barley cultivar Ismena resulted in the highest microbial diversity. In contrast, in the second generation, the wheat cultivar Impresja and the barley cultivar Radek resulted in the highest microbial diversity. In generation one, the wheat cultivar Impresja was dominated by *Pantoea* (18.9%) and *Staphylococcus* (20.3%), with *Ralstonia* (14.3%) also making a significant contribution. The wheat cultivar Rusałka showed a high proportion of bacteria from the genera *Staphylococcus* (28.7%), *Pantoea* (18.6%) and *Ralstonia* (11.4%). The Varius cultivar was also dominated by bacteria of the genera *Pantoea* (24.2%), *Ralstonia* (27.7%) and *Stenotrophomonas* (11.1%). For barley, the following bacterial genera dominated in generation one of the *R. dominica* fed the Ismena cultivar: *Stenotrophomonas* (25.3%), *Ralstonia* (22.8%), and *Pantoea* (12.3%). The insects fed the Trofeum cultivar showed a high presence of bacteria of the genera *Pantoea* (29.2%), *Staphylococcus* (14.5%) and *Acinetobacter* (12.8%), while the insects fed the Radek cultivar were characterised by a significant dominance of bacteria of the genus *Staphylococcus* (54.9%). In the second insect generation, in the variant fed wheat of the Impresja cultivar, bacteria of the genera *Stenotrophomonas* (22.3%), *Pantoea* (19.7%) and *Ralstonia* (19.9%) were most prevalent. In the variant fed the Rusałka P II cultivar, there were increases in the proportions of bacteria of the genera *Pantoea* (35.3%), *Acinetobacter* (21.1%), and Serratia (17.7%). The insects fed the cultivar Varius were characterised by a dominance of *Pantoea* (36.0%), *Massilia* (12.4%), and *Ralstonia* (11.0%). For barley-fed insects in generation two, the insects fed the Radek cultivar variant were characterised by a significant presence of *Candidatus Sulcia* (19.6%), *Xanthomonas* (14.3%), and *Pantoea* (10.8%). The insects fed the Ismena cultivar showed a dominance of bacteria of the genera *Pseudomonas* (22.6%) and *Ralstonia* (15.6%), while those fed the Trofeum cultivar showed a high proportion of bacteria of the genera *Pantoea* (28.0%) and *Ralstonia* (19.2%).

The analysis of diversity indices for both generations showed significant differences in dominance, diversity, and evenness between insects fed wheat and barley cultivars (Table 1). Based on the diversity results, it was observed that in terms of Simpson's dominance, generation one insects fed barley cultivars Trofeum and Radek presented higher dominance than other variants from generation one. The Shannon diversity index showed that almost all cultivars used to feed generation one were not different from each other, while they were significantly different from the wheat cultivar Impresja (2.0590ab). The Pielou equality index, on the other hand, was significantly lower in the barley cultivar variants Trofeum and Radek for generation one and higher in the cultivar variants Impresja, Rusałka, Varius and Ismena for generation one. In the second generation, it was observed that in terms of Simpson's dominance, the wheat cultivar Rusałka had the highest value of the index (0.2579a). In contrast, the barley cultivar Ismena showed the lowest dominance (0.1322b). The Shannon diversity index for the second generation showed that the barley cultivar Ismena had the highest value (2.2490a). The index values for the other cultivars in the second generation were similar and fluctuated between 1.7 and 2.0. The Pielou equality index was highest for the wheat cultivar Impresja (0.6445a). The lowest value of the equality index was recorded for the wheat cultivar Rusałka (0.4831b).

Based on the PERMANOVA results (Figure 3A), the generation and cultivar were found to have highly significant ($p < 0.01$) effects on rearrangements of the structure of the *R. dominica*. The coefficient of determination, R^2, results were relatively low for these factors and amounted to 0.078 for the generation and 0.193 for cultivars. The R^2 value for residuals was high, at 0.563.

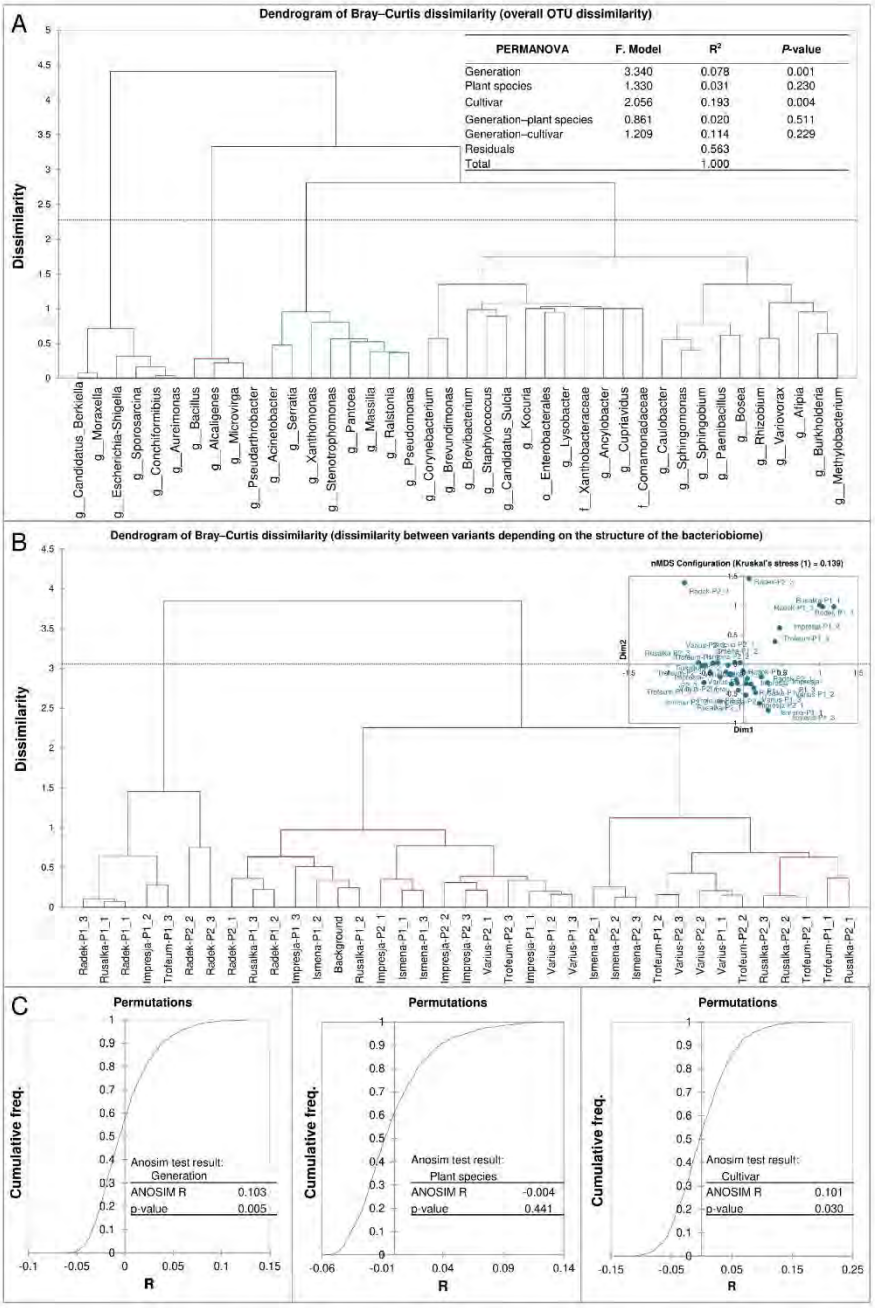


Figure 3. Variation of the bacteriome structure depending on the factors applied. (**A**) Grouping of bacterial genera based on the overall dissimilarity of OTUs. (**B**) Dissimilarity between the different

variants of cultivars and generations applied depending on the structure of the *R. dominica* bacteriome, including an NMDS plot visualising the dissimilarity between variants. (**C**) ANOSIM test results showing the effects of the generation, plant species, and cultivar on the bacterial community structure of *R. dominica*.

The Bray–Curtis dissimilarity results for the bacterial OTUs (Figure 3A) revealed the formation of four distinct dissimilarity groups. The first group includes *Berkiella*, *Moraxella*, *Escherishia-Shigella*, *Sporosaricina*, *Conchiformibius*, and *Aureimonas*. The second group includes *Bacillus*, *Alcaligenes*, and *Microvirga*. The third group includes *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Ralstonia*, and *Pseudomonas*. The fourth group includes *Corynebacterium*, *Brevundimonas*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Sulcia*, *Kocuria*, *Enterobacterales*, *Lysobacter*, *Xanthobacteraceae*, *Ancylobacter*, *Cupriavidus*, *Comamonadaceae*, *Caulobacter*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Paenibacillus*, *Bodea*, *Rhizobium*, *Variovorax*, *Afipia*, *Burkholderia*, and *Methylobacterium*.

Bacteriobiome structural diversity data obtained from Bray–Curtis dissimilarity results for cultivars and generations (Figure 3B) allowed two distinct groups to be distinguished. The first group was formed from seven samples. It included two samples, each of Radek from generations one and two, and one sample each for generation one of the Rusałka, Impresja, and Trofeum cultivars. The microbiomes for the remaining samples were included in the second group in two subgroups. The first subgroup comprised 17 samples, that is, one sample each of the Radek cultivar for generations one and two, two samples each of Rusałka and Impresja for generation one, all samples of Ismena for generation one and Impresja for generation two, two samples of Varius for generation one and one for generation two, and the background and one sample of Trofeum for generation two. The second subgroup of this clade was formed from 13 samples comprising all Ismena and Rusałka samples for generation two, two samples each of Trofeum for generation one and two for generation two, Varius for generation two and one sample of Varius for generation one. The visualisation of dissimilarity in the NMDS plot indicated outlier samples, including the Radek cultivars for generations one and two, one sample of Rusałka for generation one, and Impression and Trofeum for generation one.

Based on the ANOSIM results (Figure 3C), it was observed that for the generation factor, there was moderate variation between the bacteriobiomes. Nevertheless, this differentiating group of OTUs significantly distinguished the bacteriobiomes from each other ($p < 0.01$). Similar results were observed for cultivars. However, the p-value was smaller ($p < 0.05$).

2.3. Metabolism of the R. dominica Bacteriobiome

The heatmap analysis results for the microbiome metabolism (Figure 4, left side) showed that the bacteriobiome of the Radek cultivar was the most different from the other bacteriobiomes and had the lowest metabolic activity.

Only β-gal parameters and GNT utilisation were highly active. The cultivar Ismena was an intermediate cultivar between Radek and the other cultivars. This cultivar was characterised by high activity of α-chym, N-ace-β-gluko, and α-gal, and the utilisation of MAL, NAG, and ADI. The microbiome of the Impresja cultivar was characterised as the only one with poor tryptophan metabolism. It showed high or very high activity for 17 of 29 traits, and the highest activity was found for phospho_n-AS-BI, URE and β-gal, and the utilisation of CAP, ARA, and GLU. The Varius cultivar had high or very high activity for 23 of the 29 traits tested, and the most active traits were α-gal, aryl cys, α-fuk, β-glu and CAP, ARA, GLU, ADI, CIT, PAC, and MLT utilisation. The Rusałka and Trofeum cultivars had a high similarity, with 14 traits with high activity in common, and aryl cys and PAC had the strongest activities. The bacteriobiomes for these cultivars differed in fos_n-AS-BI, α-gal, FOS, and N-ace-ß-glu activities, and the utilisation of ARA, MAL, and MAN.



Figure 4. Heatmap illustrating the differentiation of bacteriobiome metabolic traits (**left** side) and potential bacteriome traits (multitraits; **right** side), depending on the cultivar (abbreviations: B—barley, W—wheat, Fosfo_n-AS-BI—naphthyl-AS-BI phosphohydrolase, |CAP|—decanoic acid utilisation,

|ARA|—L-arabinose utilisation, |GLU|—D-glucose utilisation, URE—urease activity, Ary wal—valine arylamidase, Ary leu—leucine arylamidase, |MNE|—D-mannose utilisation, NO3—nitrate reduction, |MAN|—D-mannitol utilisation, α-glu—α-glucosidase, Est Lip (C8)—esterase lipase (C8), FosK—acid phosphatase, |MAL|—utilisation of D-maltose, |NAG|—N-acetyl-glucosamine utilisation, |ADI|—utilisation of adipic acid, α-gal—α-galactosidase, |CIT|—trisodium citrate utilisation, Tryp—trypsin, Aryl cys—cystine arylamidase, |PAC|—utilisation of phenylacetic acid, α-fuk—α-fucosidase, β-gluk—β-glucosidase, |MLT|—malate utilisation, β-gal—β-galactosidase, FOS—alkaline phosphatase, |GNT|—potassium gluconate utilisation, N-ace- β-gluko—N-acetyl-β-glucosaminidase, α-chym—α-chymotrypsin).

Based on the analysis of the predicted multitraits of bacteriobiomes (Figure 4, right side), an analogous grouping of cultivars was observed for the metabolic activity traits. The most different cultivar from the other cultivars was the Radek cultivar. The bacteriobiomes for this cultivar showed high activity for 21 of the 68 traits analysed. These traits included electron-harvesting metabolism involving minerals, the detoxification and utilisation of arsenic, and bacteria inhabiting the digestive tract or human food pathogens. For the bacteriobiomes characteristic of the Ismena cultivar, high activity of traits related to the utilisation of nitrogen compounds for respiration, a trait complex for the degradation of organic compounds, nitrate reduction, mammalian pathogenicity, oxidation of methanol, manganese compounds and dark oxidation of sulphur compounds, methylotrophy, denitrification, degradation of cellulose, urea, xylanose lignin, and invertebrate pathogens were observed. The bacteriobiomes for the Varius cultivar were characterised by N-fixation, chemoheterotrophy, mammalian and plant pathogenic trait complex, sulphur and hydrogen oxidation in the dark, fermentation, utilisation of arsenic and iron compounds, knallgas bacteria, photoautotrophy, and nitrification. The bacteriobiomes for the Rusałka cultivar were characterised by fermentation potential, sulfuretted hydrogen oxidation in the dark, ammonification, the presence of predatory or exoparasitic and mammalian pathogens, nitrate reduction, chitin breakdown, nitrogen fixation, and chemoheterotrophy. The bacteriobiome for the Impresja cultivar was characterised by the possession of traits such as organic matter decomposition, urea decomposition, chitin decomposition, respiration involving nitrogen and its compounds, chemoheterotrophy, the presence of predatory or exoparasitic and mammalian and plant pathogens, nitrogen fixation, chemoheterotrophy, and aerobic anoxygenic phototrophy. The bacteriobiomes for the Trofeum cultivar had characteristics similar to those of Impresja. The differences were the low activity of chitin degradation and respiration with nitrogen and its compounds, and the possession of traits such as human pathogens (pneumonia), nitrite respiration, hydrocarbon degradation, invertebrate parasites, oil bioremediation, fermentation, and ammonification.

2.4. Global Analysis of the Relationships between the Tested Parameters

Based on the PLS-PM analysis (Figure 5), including the combined results for wheat and barley, all groups of observed variables were observed to affect insect development significantly. The grain property group was moderately correlated (r = 0.640) with insect development. After analysing the effects of individual observed characteristics (manifest variables) in the grain property group, TP and WSC contents were observed to be negatively correlated with ash, fat, CF, and antioxidant contents. Grain fatty acid contents were also significantly correlated, but moderately, with insect development.

Within this group, negative correlations were observed between C18:2 and C14:0, C15:0, C16:0, C18:3, C20:0, and C20:1. The structure of the bacteriobiome was influenced significantly, but a weak correlation was shown. For bacteriobiome metabolism, a moderate but significant correlation was shown, and multiple bacteriobiome traits were moderately negatively correlated with insect development. A very high correlation was observed between the structure of the bacteriobiome and its metabolism, while it was highly negatively correlated with mulitraits. Nevertheless, the significance between the three groups describing the bacteriobiome showed a trend (p-values between 0.1 and 0.05). The results of the PLS-PM analysis constructed for each cereal species (Figures S1 and S2) were significant

for both wheat and barley. When comparing the graphs, weak correlation coverage was observed between the graphs. The direct effects of grain properties, grain fatty acids and the pathways of the bacteriobiome or its metabolism and traits were different depending on the cereal species. Among the main results, a negative correlation was observed for grain chemical traits in wheat, but a positive correlation of these traits was observed for barley in relation to insect development. For intermediate pathways, the only pathway similarly correlated was grain properties—bacteriobiome traits—insect development, but correlations were high for wheat and low for barley. A large proportion of the OTU variables did not overlap, corresponding to the ANOSIM score for the species. Variables such as dry matter, total protein, and crude fibre contents were correlated within grain properties in both models. For fatty acids, similar within-group correlations were observed for C15:0, C18:0, C18:1c9, and C18:2 in both models. An important observation is that the grain species affected the bacteriobiomes quite differently, but in both cases, the changes were completely correlated with changes in metabolism. Furthermore, the direct effect of grain properties on bacteriobiome metabolism was almost completely negatively correlated in wheat, while it was positively correlated in barley.

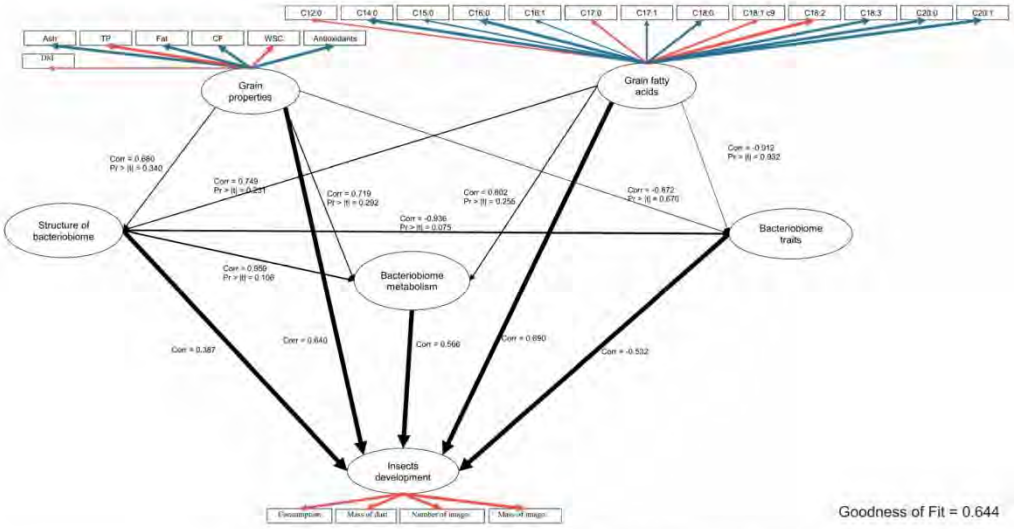


Figure 5. Partial Least Squares Path Modelling (PLS-PM) showing the mutual influences of groups of variables (all results included). For grain properties, grain fatty acid contents and insect development, internal correlations between individual variables manifested in a given group are indicated. The thickness of the arrow indicates the p-value: thick, $p < 0.05$; mean, $p = 0.1$ (trend); thin, $p < 0.1$. Red arrow colour—positive correlation; blue arrow colour—negative correlation. Abbreviations: Ash—crude ash, TP—total protein, Fat—crude fat, CF—crude fibre, WSC—water-soluble carbohydrate, DM—dry matter.

As the development parameters were lower for each barley cultivar than the wheat cultivars, it was impossible to establish unequivocally traits negatively correlated with development parameters. Nevertheless, despite the lack of significant differences, in general terms, both Ismena and Radek cultivars tended to result in a lower imago weight and number. As previously observed, these are related to the low TP and C18:2 contents but also to a weaker fermentation potential, metabolism of compounds without light, and a weaker potential to utilise different carbon sources (Figure 6).

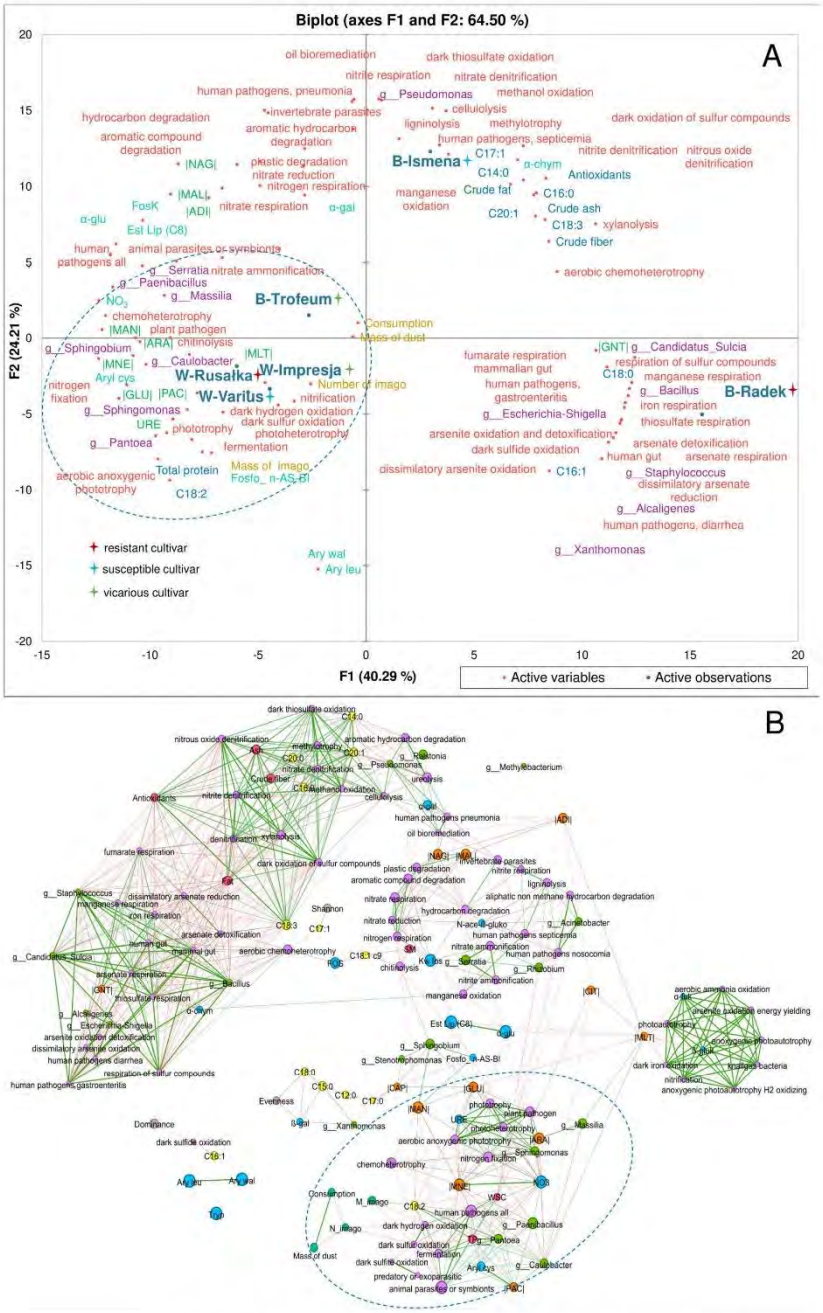


Figure 6. PCA (principal component analysis) (**A**) showing relationships between substitutes and variants, and a co-occurrence network analysis (**B**) showing correlations between all characteristics

included in the study ($r < 0.75$). Abbreviations: NO3—nitrate reduction, URE—urease activity, |GLU|—D-glucose utilisation, |ARA|—L-arabinose utilisation, |MNE|—utilisation of D-mannose, |MAN|—utilisation of D-mannitol, |NAG|—N-acetyl-glucosamine utilisation, |MAL|—utilisation of D-maltose, |GNT|—potassium gluconate utilisation, |ADI|—utilisation of adipic acid, |MLT|—malate utilisation, |PAC|—utilisation of phenylacetic acid, Est Lip (C8)—esterase lipase (C 8), Ary leu—leucine arylamidase, Ary val—valine arylamidase, Aryl cys—cystine arylamidase, α-chym—α-chymotrypsin, FosK—acid phosphatase, Fosfo_ n-AS-BI—naphthyl-AS-BI phosphohydrolase, α-gal—α-galactosidase, α-glu—α-glucosidase.

In the network analysis, the traits most correlated with the imago number and weight were determined, which largely coincided with the data obtained using PCA. Grain chemical traits strongly correlated with changes in imago number and imago weight, but also indirectly with consumption and the mass of dust, including the TP, WSC and fatty acid 18:2 contents. Bacterial OTUs included *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Sphingomonas* and *Massilla*. Among the metabolic traits correlated were urease, NOB, and aryl cys activities, and the utilisation of MNE, GLU, MAN, ARA, and PAC. Of the predicted traits, bacteriobiome traits were observed to be correlated with dark hydrogen oxidation, dark sulfur/sulfite oxidation, fermentation, predatory or exoparasitic, animal parasites or symbionts, human pathogens, chemoheterotrophy, aerobic anoxygenic phototrophy, photoheterotrophy, plant pathogens, and phototrophy. Note that a direct correlation between the mass of imago and the number of imago was only observed with traits such as C18:2 levels, a human pathogen, dark hydrogen oxidation, dark sulphur oxidation, and fermentation (Figure 6).

3. Discussion

The microbiome of *R. dominica* still needs to be understood, especially in terms of its role in the development and function of the insect. The bacteria present in the body of *R. dominica* were first described in 1934 [28]. In 2017, Okude et al. [29] identified a unique endosymbiont in *R. dominica*. In 2023, Xue et al. [21] analysed the microbiota composition of *R. dominica* populations from different geographical locations, both wild and laboratory-reared, to understand the influence of the geographical origin on the microbial diversity of these insects.

The results show significant relationships between selected chemical parameters and insect feeding intensity and development (Figure 5). The chemical compositions of the tested wheat and barley grains differ (Figures 1 and 2), and these differences can be both attractant and repellent factors for insects [30]. Our study showed that total protein and water-soluble sugar contents were key parameters affecting insect development and foraging (Figures 5 and 6). Our results suggest a positive correlation between a higher total protein content, increased foraging intensity, and the development of *R. dominica*. The wheat cultivar Varius, with the highest total protein content, also had the highest number and weight of imago, suggesting that a high protein content may favour their development. In contrast, the wheat cultivar Impresja, with the lowest protein content among the cultivars tested, showed the lowest foraging intensity (Figure 1). These observations are compatible with previous studies, which also indicated a relationship between the protein content and the foraging activity of storage pests. Perišić et al. [24] evaluated the feeding preference and reproduction of *R. dominica* on different cereals, highlighting that triticale, with its higher protein content, influenced insect development better than other cereals. Cinco-Moroyoqui et al. [31], on the other hand, showed that higher protein intake correlates with increased reproductive success. Mariey et al. [32] confirmed that the foraging intensity of *R. dominica* on different barley cultivars is correlated with protein and carbohydrate contents, which is consistent with the previously cited studies.

Similar relationships were observed for water-soluble sugar (WSC) contents. A higher WSC content was positively correlated with beetle foraging intensity (Figure 5). Soluble sugars are an easily digestible energy source that can positively affect insect development. The WSC content can affect the amount of available sugars in the grains, affecting their

attractiveness as food for storage pests. Therefore, studies on the relationship between the WSC content and the amylose/amylopectin ratio in different cereal species can provide crucial information on the food preference and development of storage pests [25].

The crude fat content differed significantly between the wheat and barley cultivars tested. The results indicate that the cultivar Rusałka had the lowest crude fat content, which may have influenced the lower intensity of insect feeding on this cultivar (Figure 1). Crude fats may be less attractive to insects than proteins and sugars, which explains the observed relationships. It is, therefore, worth focusing more on the contents of individual fatty acids and their effects on insects. The fatty acid analysis noted that the lower contents of most fatty acids were associated with better development of *R. dominica*. In contrast to linoleic acid (C18:2), the lower contents of saturated and polyunsaturated fatty acids may indicate less complex lipid structures, making it easier for insects to absorb energy and nutrients from the grain. A link was observed between the linoleic acid content of grains, a group of potentially entomopathogenic bacteria, and insect foraging (Figure 6). The high C18:2 content of the grains may also have affected the rearrangement of the microbiome, which may interfere with insect function and reduce their foraging efficiency. Nietupski et al. [33], in their study on the development of *S. granarius*, suggest that the development intensity of this species is significantly correlated with higher contents of unsaturated and saturated fatty acids in the grain. A study by Kordan et al. [34] also confirms that the fatty acid content influences the essential functions of *S. granarius*; in particular, fatty acids such as C18:1 and C18:2 have impacts on the survival of this pest. Similar relationships were observed in a study by Kosewska et al. [35] of *S. oryzae*, which developed significantly better on wheat cultivars that had a higher C18:2 fatty acid content.

Furthermore, an association has been observed between linoleic acid (C18:2), a group of potentially entomopathogenic bacteria, and insect feeding behaviour. This supports the hypothesis that a diet low in LA, a fatty acid with inhibitory effects on undesirable microbiota development, influences the rearrangement of the microbiome, thereby impairing insect function. This relationship is not strictly dependent on the insect species, as many insects show a high correlation between the LA content and the development of an undesirable microbiota or internal infection [36,37]. The poor overlap of correlations between the PLS-PM plots constructed for the individual cereal tannins (Figures S1 and S2) indicates the different effects of some of the grain traits studied on the direct and indirect foraging of *R. dominica*. However, it should be noted that, despite the different correlations between changes within a group of traits, there were often extremely different correlations between groups.

The analysis of the diversity of the bacterial microbiome of *R. dominica*, based on the presented dendrogram (Figure 3), indicates the existence of four distinct groups of bacteria. Each group may reflect different microbiological ecosystems or ecological niches associated with *R. dominica*. The microflora of insects is shaped by several factors, which, in addition to diet, include the geographical location, environmental conditions (temperature, humidity, and climate), host species, developmental stage, or integration with other microorganisms [21]. Many metabolites produced by bacteria are influenced by environmental changes, including insect diet changes [36].

It was observed that four groups of bacteria formed, resulting from the influence of the examined cereal cultivar factors. Group 1 consists of *Berkiella*, *Moraxella*, *Escherichia-Shigella*, *Sporosarcina*, *Conchiformibius*, and *Aureimonas*. These bacteria are often associated with animals' digestive systems and aquatic and soil environments. For example, *Escherichia-Shigella* is mainly linked to the intestines of animals. The presence of this group may suggest that *R. dominica* inhabits environments rich in organic matter, where it may come into contact with soil or water, or that the insect has a complex digestive system supporting these bacteria. Group 2 includes *Bacillus*, *Alcaligenes*, and *Microvirga*. *Bacillus* species are soil bacteria often involved in the degradation of organic matter. *Alcaligenes* and *Microvirga* are also associated with soil and water environments. This group's presence might indicate that soil ecosystems are a key environment for *R. dominica*. These bacteria may aid the insect in digesting organic matter and detoxification processes. Group 3

comprises *Acinetobacter*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Massilia*, *Ralstonia*, *Pantoea*, and *Pseudomonas*. These bacteria are widespread in aquatic and soil environments, as well as in the digestive systems of animals. Notably, *Pseudomonas* and *Ralstonia* are known for their ability to degrade complex organic compounds. This group suggests strong associations with organic matter decomposition and possibly pathogenicity, as some of these bacteria can be plant or animal pathogens. *Pantoea* spp., especially *P. agglomerans*, is a bacterium transmitted from plant food to an insect. It has a wide environmental adaptation, and so it is a facultative insect symbiont, but its function is not fully understood. Group 4 is the most diverse, containing *Corynebacterium*, *Brevundimonas*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Sulcia*, *Kocuria*, *Enterobacterales*, *Lysobacter*, *Xanthobacteraceae*, *Ancylobacter*, *Cupriavidus*, *Comamonadaceae*, *Caulobacter*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Paenibacillus*, *Bodea*, *Rhizobium*, *Variovorax*, *Afipia*, *Burkholderia*, and *Methylobacterium*. This group includes soil, water, symbiotic, and potentially pathogenic bacteria. *Rhizobium* and *Variovorax* are known for their nitrogen-fixing abilities, suggesting plant symbiosis. The presence of this diverse group indicates that *R. dominica* engages in a wide range of ecological interactions, including symbiosis with plants, interactions with other microorganisms, and various ecological niches [16,38,39].

The causal conclusions drawn from this analysis are as follows. First, the composition of the *R. dominica* microbiome is strongly linked to its living environment. Second, the presence of specific bacteria suggests that the microbiome of *R. dominica* may play roles in digesting organic matter, detoxification, and potentially protecting against pathogens. Third, the broad spectrum of bacteria in Group 4 suggests that *R. dominica* engages in numerous ecological interactions, including symbiosis with plants and other microorganisms. There are few reports on the role of the symbiotic microbiome of *R. dominica*, but limited information and data on other representatives of Coleoptera confirm the above observations [7,21,40].

Bacteria such as *Rhizobium* and *Variovorax* may indicate symbiotic relationships with plants, which could provide additional nitrogen sources to the insect. Pathogenic bacteria like *Pseudomonas* and *Serratia* may play roles in protecting against pathogens or pose a threat themselves, affecting the health and development of the insect. Regarding the environmental adaptation, the bacterial groups adapted to different ecological niches suggest that *R. dominica* is an insect with high ecological plasticity, allowing it to inhabit various environments.

The conducted research showed that changes in the microbiome, metabolism, and behaviour of insects are closely dependent on the specific chemical properties of grain cultivars, rather than the grain species as a whole (Figures 3 and 5). Different cultivars within the same species uniquely affect the composition of the microbiome and metabolism of insects, which can lead to variations in feeding behaviours. For example, the analysis showed a different dominance of bacterial genera in some wheat and barley cultivars (Table 1). These changes influenced the metabolism of insects, suggesting that interactions between the diet and microbiome have direct impacts on their development and adaptation. Furthermore, different grain cultivars can affect insect behaviour, for instance, by reducing feeding efficiency through microbiome reorganization, which disrupts insect functioning and decreases their survival abilities.

The chemical properties of the different cereal cultivars were found to significantly affect the microbiome composition and feeding behaviour of *R. dominica*. Cereal cultivars with higher protein and water-soluble sugar (WSC) contents had a more diverse and active microbiome, which may indicate a better adaptation of the insects to such feeding conditions (Figure 5 and Table 1). *Pantoea* and *Ralstonia* bacteria were dominant in the first generation, while a greater microbial diversity was observed in the second generation, with the prominent presence of *Stenotrophomonas* and *Acinetobacter* (Table 1). Similar results for the effect of the grain composition on the microbiome of grain-feeding insects have been reported in the literature, indicating significant changes in the microbiome structure depending on the insect diet. Insects feeding on several food types and plant species will harbour more complex microbial communities [41]. In our study, such a trend can

also be observed, as the microbiome of insects fed a different food than the basal food (from mass rearing) influenced the biodiversity of the microbiome in the second generation of insect life (Table 1). Pérez-Cobas et al. [42], Montagna et al. [20], Chouaia et al. [43], and Muturi et al. [44] confirmed that the diet can directly affect the composition of the microbiome, as bacteria capable of colonising in the insect gut can be inoculated from food, thereby changing the composition of the microbiome or affecting the promotion of the growth of specific bacteria. The Radek cultivar did not favour the development of a flexible microbiome, resulting in a rearrangement of the bacteriobiome towards a K-type developmental strategy, where bacterial taxa that reproduce strongly and use different autotrophic pathways thrive. Nevertheless, the bacteriobiome in this variant was characterised by a high aerobic chemoheterotrophic potential but a low overall chemoheterotrophic potential. As indicated in publications [40,45], the special symbiont species responsible for urea recycling and nitrogen recovery for amino acid construction is a crucial metabolic component in insects fed a diet low in nitrogen sources. The mechanism of urea utilisation is also linked to detoxification processes, which are important for insecticide degradation. Our results suggest that the complex chemical agents presented in the different cereal cultivars are pre-detoxified by the bacteriobiomes.

A complex analysis of the MetaCyc (MACADAM) database results [46] showed that almost all important OTUs specific to *R. dominica* are extensively involved in urea degradation and amino acid production. The urea degradation I pathway, in which urea-1-carboxylate and carbamate are intermediate metabolites with the participation of urea carboxylase and allophanate hydrolase [47], involves *Burkholderia*, *Pseudarthrobacter*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Microvirga*, *Pseudomonas*, *Bosea*, *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingobium*, *Massilia*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Comamonadaceae*, *Serratia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, and *Staphylococcus*. However, the process of direct degradation of urea to ammonium (urea degradation II) with the participation of urease [48] involves a complex of OTUs such as *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pseudarthrobacter*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Microvirga*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Sporosarcina*, *Aureimonas*, *Bosea*, *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Xanthobacteraceae*, *Sphingobium*, *Massilia*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Moraxella*, *Cupriavidus*, *Ralstonia*, *Comamonadaceae*, *Ancylobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, and *Staphylococcus*. Kiefier et al. [45] also claimed that although most species closely related to *R. dominica* have unique obligate symbionts, these are often lacking in this species. The above scientists show that they are responsible for urea utilisation and amino acid production, especially lysine. Above, we indicated the possibility of urea utilisation by several facultatively symbiotic OTUs, and the accompanying additional study based on MACADAM data (MetaCyc) shows that bacteriobiomes have four pathways for L-lysine production, three of which are complete (Figure S3).

As studies on Coleoptera representatives show, numerous representatives of the genera *Pseudomonas* and *Sphingomonas* are responsible for the detoxification of undesirable substances in beetles [49], as an investigation of the MACADAM database (MetaCyc) also proved. In the present study, these two taxa were always dominant within the bacteriobiomes, despite apparent variations. A previous study showed that the wheat cultivar Rusałka and the barley cultivar Radek were the most resistant to *R. dominica* feeding [35]. In contrast, in the present study, the second-generation analysis showed a break in resistance, which was most noticeable in barley. The lack of significant differences in foraging on Radek compared to the other variants is closely related to the reorganisation of the bacteriome and the co-dominance of *Xanthomonas* sp., *Sulcia* sp. and *Alcaligenes* sp., which were much less important for the other bacteriobiomes. Of the three OTUs mentioned above, the genus *Sulcia* has the most important role in the adaptation to harsh feeding conditions. In many species, it is an obligate symbiont; in many pests, it is carried in the bacteriomes and develops during specific insect developmental stages. In this case, its development was probably triggered by poor living conditions in the first generation, and its development in the second generation broke the protective barrier of the Radek cultivar.

Bacteria of the genus *Sulcia* are responsible for synthesising at least eight amino acids necessary for host development [50]. It is puzzling that, together with *Sulcia*, the abundance of two other OTUs increased markedly. This may be due to the genome reduction of this symbiont and the inability to carry out several key metabolic pathways, including tryptophan production. Such was the case with Sulcia-CARI, where another symbiont, *Zinderia* sp., evolved together with *Sulcia* sp. to compensate for the metabolic deficiencies of the co-symbiont. Furthermore, both *Alcaligenes* and *Xanthomonas* can produce phytohormones, noting that *Xanthomonas* production of gibberellins may affect the reduction of jasmonic acid, thus lowering plant defences [51–53]. Given the above, it is quite likely that, in contrast to the permanent dominant species, that is, *Pantoea* sp., the occurrence of these three OTUs with a clear dominance of *Sulcia* sp. is a bioindicator indicating a permanent machinery of breaking varietal resistance in cereals by *R. dominica*.

After analysing the results obtained, it should also be noted that in the case of *R. dominica*, its microbiome can effectively support the digestion of the insect, but is not obligatory because by eliminating all its microbes, the insect is able to continue to survive [7,27]. So, the microbiome performs only functions that support and facilitate the functioning and life of this storage pest, underscoring the practical importance of understanding the insect's microbiome.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Design

The experiment involved the following steps: (1) selection of cereal cultivars based on the developmental parameters of the *R. dominica*; (2) establishment and standardisation of mass breeding of *R. dominica*; (3) chemical analyses of the grains; (4) experimentation with different feed variants; (5) DNA isolation and molecular analyses; (6) analysis of the biochemical properties of the insects; (7) assessment of grain degradation; and (8) statistical analysis of the results using XLSTAT software. The detailed methodology is shown in Figure 7.

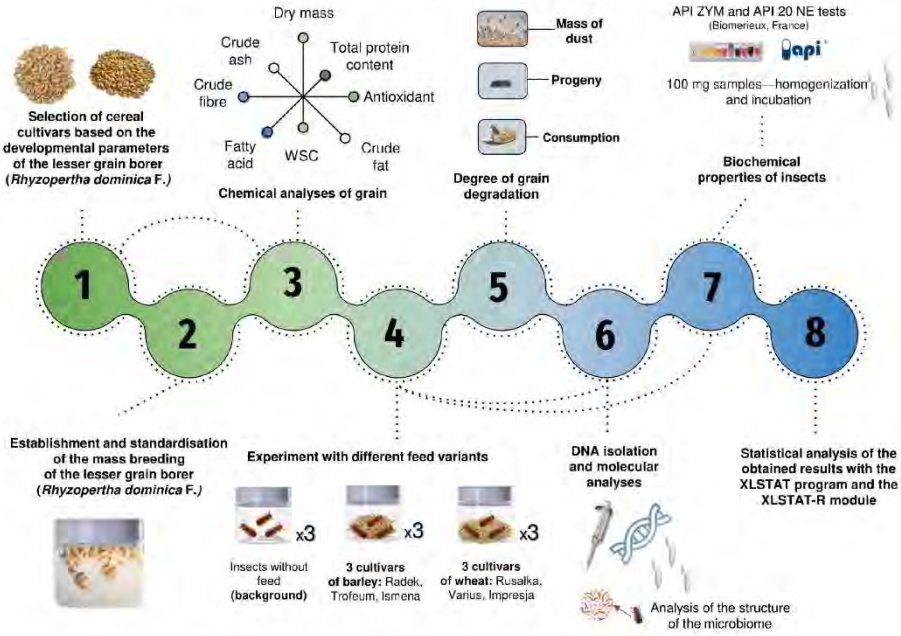


Figure 7. Schematic representation of the experimental workflow for assessing the impacts of different cereal cultivars on the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.).

4.2. Experiment with Different Feed Variants

The lesser grain borer (*R. dominica*) used in the experiment was obtained from mass breeding carried out at the Department of Entomology, Phytopathology, and Molecular Diagnostics at UWM in Olsztyn. Twenty 1–2-day-old adult beetles of *R. dominica* with a 1:1 sex ratio [23] were placed on 500 g of grain in 1-liter glass containers. A chiffon mesh protected the openings of the boxes, allowing air to enter and providing ventilation. The experiment involved using different cultivars of wheat and barley. Specifically, three wheat cultivars (Rusałka, Varius, and Impresja) were chosen, all belonging to the high-quality bread cultivars in the A technological group. Additionally, three cultivars of barley (Radek, Trofeum, and Ismena) were included, and they are classified as fodder type (P) [54]. The cultivars were chosen based on preliminary research involving ten wheat and ten barley cultivars. These cultivars are the focus of a separate study. Through our analysis of the survival data (number of progeny) of the lesser grain borer on the tested cultivars, we have categorised the Radek barley cultivar as resistant, the Ismena cultivar as having intermediate resistance, and the Trofeum cultivar as having low resistance. As for the wheat cultivars, the Rusałka cultivar demonstrated the highest level of resistance, the Varius cultivar showed moderate resistance, and the Impresja cultivar was classified as having low resistance [35]. Insects without food were the background. Each treatment was carried out in three replicates. Cultivation took place under controlled conditions of temperature (30 °C) and humidity (70%) in a breeding chamber (Sanyo MLR—350 H—Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan). The incubation parameters were associated with the best habitat for developing *R. dominica* [55]. Adult insects were selected for analysis after 20 days (first generation; I) and 40 days (second generation; II). The digestive systems of 10 specimens were prepared in a laminar chamber using binoculars and sterile instruments. The insects were anesthetised, sterilised, and homogenised as per the methodology in Kosewska et al. [7].

4.3. Chemical Analyses of Grains

The dry mass was determined using the drying method. The raw ash content was determined by burning an air-dried sample. The total protein content was determined based on the total nitrogen (N) content determined by the Kjeldahl method following the Polish Standard PN-ISO 5983.2000. Crude fat was extracted using a Soxhlet extractor, following standard PN-ISO 6492.2005. Fatty acid methyl esters were prepared using a modified Peisker method to determine the fatty acid composition. The anthrone method was used to determine the water-soluble sugar (WSC) content [56]. The crude fibre content was determined by the classic Henneberg–Stohmann method for determining the raw fibre content of feed following the PN–EN ISO 6865.2002 standard. The antioxidant capacity of samples was determined according to the Benzie and Strain method [57] with some modifications [25]. All methods used to determine individual chemical components have been thoroughly described in the publication by Kosewska et al. [25].

4.4. Biochemical Properties of Insects

The digestive tracts of mature insects were assessed for their biochemical activity and carbon source utilisation using API ZYM and API 20 NE tests (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France). Each variant was represented by approximately 100 mg samples, which were then homogenised in vials with glass beads and 1 mL of peptone water. Homogenisation was carried out using a TissueLyser LT bead homogeniser (Qiagen, Hilden, Germany) with 30 oscillations for 5 min. After homogenisation, the resulting suspension was diluted at a 1:10 ratio in peptone water enriched with 1% TSB (Tryptic soy broth, Merck, Germany) and then incubated at 30 °C for 4 h before being used in the API tests, all in line with the manufacturer's guidelines. The samples for the biochemical and carbon source tests were also incubated at 30 °C for 24 h [58]. The genetic material was isolated using the Soil Purification Kit (EURx), and sequencing was conducted with the "16S Barcoding Kit 1–24 (SQK-16S024)". Bacterial 16S rRNA amplification employed 24 barcoding primers and the HiFi ToughMix repliQa polymerase (Quantabio, Beverly, MA, USA). The library construction and pooling procedures adhered to the guidelines provided by

the polymerase supplier ("Rapid 16S Metagenomic Library Preparation for Oxford Nanopore Technologies (ONT)® Platform"; www.quantabio.com/product/repliqa-hifi-toughmix/ (accessed on 5 April 2024)). Subsequent sequencing took place in a flongle flow cell utilising the MinKnown software (https://nanoporetech.com/news/news-introducing-new-minknow-app (accessed on 31 July 2024)). Our DNA data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) of NCBI, BioProject ID: PRJNA1161390. The obtained data, comprising approximately 62,000 reads, underwent analysis via the EPI2ME platform (Metrichor™ Ltd., Oxford, UK) utilising WIMP (What's In My Pot) workflows. The postprocessing and OTU table generation were carried out using the BugSeq bioinformatics platform (https://bugseq.com/ (accessed on 15 April 2024)).

4.5. Statistical Calculations

The chemical properties of the grain and developmental characteristics were tested for normal distributions and homogeneity of variance. Differences between the results were determined using ANOVA (Tukey's test) or the Kruskal–Wallis test (Dunn's test). Additionally, NMDS was performed within species based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix. The taxonomic diversities of the analysed OTUs were determined with the use of Simpson dominance (λ), Shannon diversity (H'), and Pielou's evenness (J') indices. Diversity indices and rarefaction curves were obtained by the PAST 4.13 program [59]. Dominant classes were determined according to previous work [60]. In order to determine the variation between bacterial biomes and the effects of factors on diversity, PERMANOVA and ANOSIM tests (XLSTAT—R vegan) were applied. The MACADAM database [46] was used to explore predicted microbial community functions and FAPROTAX was used to assess metabolic function [61]. Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) dissimilarities of microbiomes were calculated based on the Bray–Curtis method, and dendrograms were constructed based on Ward's method. Principal component analysis (PCA) was performed based on the Pearson similarity matrix, including microbiome data (OTUs > 1%), metabolic activity, microbial predicted physiological properties, and the chemical parameters of grain. Heatmaps were constructed for predicted metabolic functions, and metabolic activity properties were constructed based on N-standardized data. Partial Least Squares Path Modelling (PLS-PM) was performed using standardised weight data for manifest variables, with the centroid as the internal estimate and 95% confidence intervals (bootstrap: 100 resampling). Statistical calculations were made with the XLSTAT program [62]. The network analysis was performed using the AxisForce 2 algorithm with LinLog mode [63] based on Spearman's correlation matrix for edges and the cumulative percentage of each variable for nodes [64].

5. Conclusions

The study found that the chemical properties of different cereal species, such as wheat and barley and their cultivars, significantly impact the development and metabolism of the bacteriobiome of *R. dominica* and its foraging. The results showed that grains with higher levels of total protein (TP) and water-soluble sugars (WSCs) were more attractive to the insect, resulting in more intensive feeding and development of these pests. Wheat cultivars such as Varius, which are characterised by a high protein content, were preferred by *R. dominica*, confirming the hypothesis that the grain chemical composition influences insect foraging intensity. The selection of cultivars of different cereal species with lower TP and WSC contents could be an effective strategy for reducing the population of this pest. An analysis of bacteriobiome diversity indices revealed that the dominance of bacteria from the genera *Pantoea* and *Ralstonia* was a characteristic of most cultivars in the first generation. However, we observed a greater microbial diversity in the second generation, with the prominent presence of *Stenotrophomonas* and *Acinetobacter* bacteria. Notably, grains of the Radek cultivar showed a low potential for utilisation of different carbon sources, suggesting that a low-nitrogen diet may increase the involvement of bacterial symbionts in urea recycling processes and the production of amino acids necessary for insect growth. The composition of the *R. dominica* microbiome is related to the insect

diet. Bacteria from the genera *Pantoea*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, and *Acinetobacter* play crucial roles in insect metabolism, influencing their ability to adapt to different dietary conditions. The linoleic acid (C18:2) content of grains may influence the rearrangement of the insect microbiome, which in turn may reduce their foraging efficiency. In addition, the presence of antioxidants in the grains showed a trend of effects on the microbiome and growth of *R. dominica*. Rearrangements of the microbiome structure contributed to an increase in the share of entomopathogens, which led to the displacement of lysine-producing symbionts. To answer how this happens and what the sequence of events is in this complex system, comprehensive metatranscriptomic and metabolomic analyses of both the insect and microorganisms are necessary. The effect of bacteria-derived lysine on insect metabolism suggests that perturbations in lysine production may negatively affect *R. dominica* foraging. Chemical properties of the grains, such as higher linoleic acid and antioxidant contents, can therefore be used to control the population of this pest by influencing its microbiome and foraging.

The lack of significant correlations at the species level, as shown by the ANOSIM results, is crucial because it indicates substantial differences between cultivars within each species, which complicates the identification of general patterns between species. These results emphasize that research should focus on specific cultivars and their unique traits rather than general differences between grain species. This approach will provide a better understanding of how specific chemical properties of cultivars affect the microbiome, metabolism, and functioning of insects. The results for cultivars were significant, highlighting notable differences in the microbiome structure and insect metabolism, which were also confirmed by structural equation plots. This finding has important implications for future research, suggesting that identifying specific cultivar traits may be more valuable than species-level studies.

This study's results suggest that by manipulating the chemical properties of the grain and understanding the interactions between the diet, microbiome, and insect physiology, we can potentially develop new, more sustainable methods of controlling *R. dominica*.

Growing cultivars of selected cereal species with specific chemical properties can significantly change agricultural practices. First and foremost, selecting and cultivating cereal cultivars that are naturally less attractive to storage pests, such as *R. dominica*, can reduce the need for synthetic pesticides, reducing storage losses and contributing to more sustainable agricultural production. This can also have direct environmental impacts, reducing soil and water pollution levels, as well as reducing negative impacts on beneficial organisms. It should also be emphasised that the use of resistant cereal cultivars will support the development of organic farming. In addition, it can increase farm efficiency by reducing the costs associated with plant protection and increasing the stability of the yields obtained.

It should also be stressed that reducing losses during grain storage is extremely important in the fight against hunger, especially in the poorest regions of the world, where inefficient storage and a lack of resources for pest control lead to more significant losses. The introduction of naturally pest-resistant cultivars could significantly increase food availability, which is particularly important where food is scarce. This will contribute to the creation of stable food stocks, which are invaluable during crises, and will strengthen social stability.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms251810130/s1.

Author Contributions: Conceptualisation, O.K., S.W.P. and M.N.; methodology, O.K. and S.W.P.; software, S.W.P. and O.K.; validation, O.K., S.W.P. and M.N.; formal analysis, O.K., S.W.P. and M.N.; investigation, O.K. and S.W.P.; resources, O.K. and S.W.P.; data curation, O.K. and S.W.P.; writing—original draft preparation, O.K. and S.W.P.; writing—review and editing, O.K., M.N. and S.W.P.; visualisation, O.K., M.N. and S.W.P.; supervision, M.N. and S.W.P.; project administration, O.K.; funding acquisition, O.K., M.N. and S.W.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The results presented in this paper were obtained from a comprehensive study financed by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Entomology, Phytopathology and Molecular Diagnostics (nos. 30.610.010-110 and 30.610.011-110). The study was supported by the Polish National Science Centre under project no. UMO-2021/41/N/NZ9/00364 (2022–2024).

Data Availability Statement: Our DNA data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) of NCBI, BioProject ID: PRJNA1161390.

Acknowledgments: We would like to express our heartfelt thanks to Katarzyna Smołka from Fluentbe for her invaluable assistance in the linguistic correction of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Oppert, B.; Muszewska, A.; Steczkiewicz, K.; Šatović-Vukšić, E.; Plohl, M.; Fabrick, J.A.; Vinokurov, K.S.; Koloniuk, I.; Johnston, J.S.; Smith, T.P.L.; et al. The Genome of *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae): Adaptation for Success. *Genes* **2022**, *13*, 446. [CrossRef] [PubMed]
2. Ren, Y.; Wang, T.; Wang, C.; D'Isita, I.; Hu, Q.; Germinara, G.S.; Cao, Y. Population Development of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) on Different Stored Products. *Entomol. Res.* **2023**, *53*, 359–366. [CrossRef]
3. Phillips, T.W.; Throne, J.E. Biorational Approaches to Managing Stored-Product Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 375–397. [CrossRef] [PubMed]
4. Desta, A.G.; Yeshitila, B.H. The Distribution of Insect Pests and the Associated Loss of Stored Sorghum in the Kena District of Konso Zone, South-Western Ethiopia. *PLoS ONE* **2024**, *19*, e0295833. [CrossRef] [PubMed]
5. Mesterházy, Á.; Oláh, J.; Popp, J. Losses in the Grain Supply Chain: Causes and Solutions. *Sustainability* **2020**, *12*, 2342. [CrossRef]
6. Daglish, G.J.; Nayak, M.K. Prevalence of Resistance to Deltamethrin in *Rhyzopertha dominica* (F.) in Eastern Australia. *J. Stored Prod. Res.* **2018**, *78*, 45–49. [CrossRef]
7. Kosewska, O.; Przemieniecki, S.W.; Nietupski, M. The Effect of Antibiotics on Bacteriome of Sitophilus Oryzae and Rhyzopertha Dominica as a Factor Determining the Success of Foraging: A Chance for Antibiotic Therapy in Grain Stores. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 1576. [CrossRef]
8. Klejdysz, T.; Nawrot, J. First Record of Outdoor Occurrence of Stored-Product Coleopterans in Arable Landscape in Poland. *J. Plant Prot. Res.* **2010**, *50*, 551–553. [CrossRef]
9. Ebadollahi, A.; Borzoui, E. Growth Performance and Digestive Enzymes Activity of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) Feeding on Six Rice Cultivars. *J. Stored Prod. Res.* **2019**, *82*, 48–53. [CrossRef]
10. Wilkes Walburn, J.; Wemheuer, B.; Thomas, T.; Copeland, E.; O'Connor, W.; Booth, M.; Fielder, S.; Egan, S. Diet and Diet-associated Bacteria Shape Early Microbiome Development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 275–288. [CrossRef]
11. Dillon, R.J.; Dillon, V.M. The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **2004**, *49*, 71–92. [CrossRef] [PubMed]
12. Engel, P.; Moran, N.A. The Gut Microbiota of Insects—Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 699–735. [CrossRef] [PubMed]
13. Shamjana, U.; Vasu, D.A.; Hembrom, P.S.; Nayak, K.; Grace, T. The Role of Insect Gut Microbiota in Host Fitness, Detoxification and Nutrient Supplementation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2024**, *117*, 71. [CrossRef] [PubMed]
14. Martignoni, M.M.; Kolodny, O. Microbiome Transfer from Native to Invasive Species May Increase Invasion Risk and Shorten Invasion Lag Statements and Declarations. *bioRxiv* **2023**. [CrossRef]
15. Kolodny, O.; Callahan, B.J.; Douglas, A.E. The Role of the Microbiome in Host Evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2020**, *375*, 20190588. [CrossRef]
16. Wielkopolan, B.; Krawczyk, K.; Szabelska-Beręsewicz, A.; Obrępalska-Stęplowska, A. The Structure of the Cereal Leaf Beetle (*Oulema melanopus*) Microbiome Depends on the Insect's Developmental Stage, Host Plant, and Origin. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20496. [CrossRef]
17. Fontaine, S.S.; Mineo, P.M.; Kohl, K.D. Experimental Manipulation of Microbiota Reduces Host Thermal Tolerance and Fitness under Heat Stress in a Vertebrate Ectotherm. *Nat. Ecol. Evol.* **2022**, *6*, 405–417. [CrossRef]
18. Kikuchi, Y.; Hayatsu, M.; Hosokawa, T.; Nagayama, A.; Tago, K.; Fukatsu, T. Symbiont-Mediated Insecticide Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8618–8622. [CrossRef]
19. Muhammad, Z.M.; Tahir, M.; Mudassar, J.; Fatima, S.; Muhammad, A.R. Muhammad A Biology and Management of Stored Products' Insect Pest *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Int. J. Biosci. (IJB)* **2015**, *7*, 78–93. [CrossRef]
20. Montagna, M.; Chouaia, B.; Mazza, G.; Prosdocimi, E.M.; Crotti, E.; Mereghetti, V.; Vacchini, V.; Giorgi, A.; De Biase, A.; Longo, S.; et al. Effects of the Diet on the Microbiota of the Red Palm Weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117439. [CrossRef]

21. Xue, D.; Chen, T.; Li, Q.; Yang, Y.; Wu, Y. Microbiota Composition of Allopatric Laboratory and Wild Populations of *Rhyzopertha dominica*. *J. Stored Prod. Res.* **2023**, *104*, 102202.
22. Kešnerová, L.; Mars, R.A.T.; Ellegaard, K.M.; Troilo, M.; Sauer, U.; Engel, P. Disentangling Metabolic Functions of Bacteria in the Honey Bee Gut. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2003467.
23. Nietupski, M.; Kwiatkowski, J.; Kosewska, A. Physicochemical Properties of Achenes of Buckwheat Cultivars Affecting the Development of Grain Weevil (*Sitophilus granarius* L.) and Lesser Grain Borer (*Rhyzopertha dominica* F.). *Zemdirb.-Agric.* **2017**, *104*, 311–320.
24. Perisic, V.; Perisic, V.; Vukajlović, F.N.; Pesic, S.B. Feeding Preferences and Progeny Production of *Rhyzopertha dominica* (Fabricius 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) in Small Grains. *Biol. Nyssana* **2018**, *9*, 55–61.
25. Kosewska, O.; Przemieniecki, S.W.; Koronkiewicz, S.; Nietupski, M. Effect of Different Chemical Properties of Cereal Grains on the Foraging and Microbiome of the Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Int. Agrophys.* **2024**, *38*, 165–176.
26. Lorini, I.; Galley, D.J. Deltamethrin Resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a Pest of Stored Grain in Brazil. *J. Stored Prod. Res.* **1999**, *35*, 37–45.
27. Edde, P.A. A Review of the Biology and Control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the Lesser Grain Borer. *J. Stored Prod. Res.* **2012**, *48*, 1–18.
28. Mansour, K. On the Intracellular Microorganisms of Some Bostrychid Beetles. *J. Cell Sci.* **1934**, *s2-77*, 243–253. [CrossRef]
29. Okude, G.; Koga, R.; Hayashi, T.; Nishide, Y.; Meng, X.-Y.; Nikoh, N.; Miyanoshita, A.; Fukatsu, T. Novel Bacteriocyte-Associated Pleomorphic Symbiont of the Grain Pest Beetle *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Zool. Lett.* **2017**, *3*, 13.
30. Kordan, B.; Nietupski, M.; Ludwiczak, E.; Gabryś, B.; Cabaj, R. Selected Cultivar-Specific Parameters of Wheat Grain as Factors Influencing Intensity of Development of Grain Weevil *Sitophilus granarius* (L.). *Agriculture* **2023**, *13*, 1492. [CrossRef]
31. Cinco-Moroyoqui, F.J.; Rosas-Burgos, E.C.; Borboa-Flores, J.; Cortez-Rocha, M.O. α-Amylase Activity of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) Reared on Several Wheat Varieties and Its Inhibition with Kernel Extracts. *J. Econ. Entomol.* **2006**, *99*, 2146–2150. [CrossRef] [PubMed]
32. Mariey, S.A.; Mohamed, E.N.M.; Nasr, G.M.; Ahmed, K.R.; Elsamahy, B.E. Comparative Efficacy of Phenol Concentration against *Rhyzopertha dominica* (F.) in Some Hulled Barley Cultivars Productivity and Grain Quality. *J. Glob. Ecol. Environ.* **2023**, *18*, 1–13. [CrossRef]
33. Nietupski, M.; Ludwiczak, E.; Cabaj, R.; Purwin, C.; Kordan, B. Fatty Acids Present in Wheat Kernels Influence the Development of the Grain Weevil (*Sitophilus granarius* L.). *Insects* **2021**, *12*, 806. [CrossRef]
34. Kordan, B.; Skrajda-Brdak, M.; Tańska, M.; Konopka, I.; Cabaj, R.; Załuski, D. Phenolic and Lipophilic Compounds of Wheat Grain as Factors Affecting Susceptibility to Infestation by Granary Weevil (*Sitophilus granarius* L.). *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2019**, *92*, 64–72.
35. Kosewska, O.; Nietupski, M.; Koronkiewicz, S.; Przemieniecki, S.W. The Chemical Grain Composition of Wheat and Barley Affects the Development of the Lesser Grain Borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *J. Plant Prot. Res.* **2024**. [CrossRef]
36. Grundmann, C.O.; Guzman, J.; Vilcinskas, A.; Pupo, M.T. The Insect Microbiome Is a Vast Source of Bioactive Small Molecules. *Nat. Prod. Rep.* **2024**, *41*, 935–967. [CrossRef]
37. Gołębiowski, M.; Maliński, E.; Boguś, M.I.; Kumirska, J.; Stepnowski, P. The Cuticular Fatty Acids of Calliphora Vicina, Dendrolimus Pini and Galleria Mellonella Larvae and Their Role in Resistance to Fungal Infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38*, 619–627. [CrossRef]
38. Walterson, A.M.; Stavrinides, J. Pantoea: Insights into a Highly Versatile and Diverse Genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 968–984. [CrossRef]
39. Elston, K.M.; Leonard, S.P.; Geng, P.; Bialik, S.B.; Robinson, E.; Barrick, J.E. Engineering Insects from the Endosymbiont Out. *Trends Microbiol.* **2022**, *30*, 79–96. [CrossRef]
40. Mondal, S.; Somani, J.; Roy, S.; Babu, A.; Pandey, A.K. Insect Microbial Symbionts: Ecology, Interactions, and Biological Significance. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2665. [CrossRef]
41. Brunetti, M.; Magoga, G.; Gionechetti, F.; De Biase, A.; Montagna, M. Does Diet Breadth Affect the Complexity of the Phytophagous Insect Microbiota? The Case Study of Chrysomelidae. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24*, 3565–3579. [CrossRef] [PubMed]
42. Pérez-Cobas, A.E.; Maiques, E.; Angelova, A.; Carrasco, P.; Moya, A.; Latorre, A. Diet Shapes the Gut Microbiota of the Omnivorous Cockroach *Blattella germanica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, *91*, fiv022. [CrossRef] [PubMed]
43. Chouaia, B.; Goda, N.; Mazza, G.; Alali, S.; Florian, F.; Gionechetti, F.; Callegari, M.; Gonella, E.; Magoga, G.; Fusi, M.; et al. Developmental Stages and Gut Microenvironments Influence Gut Microbiota Dynamics in the Invasive Beetle *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 4343–4359. [CrossRef] [PubMed]
44. Muturi, E.J.; Dunlap, C.; Ramirez, J.L.; Rooney, A.P.; Kim, C.-H. Host Blood Meal Source Has a Strong Impact on Gut Microbiota of Aedes Aegypti. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *95*, fiy213. [CrossRef] [PubMed]
45. Kiefer, J.S.T.; Bauer, E.; Okude, G.; Fukatsu, T.; Kaltenpoth, M.; Engl, T. Cuticle Supplementation and Nitrogen Recycling by a Dual Bacterial Symbiosis in a Family of Xylophagous Beetles. *ISME J.* **2023**, *17*, 1029–1039. [CrossRef] [PubMed]
46. Le Boulch, M.; Déhais, P.; Combes, S.; Pascal, G. The MACADAM Database: A MetAboliC PAthways DAtabase for Microbial Groups for Mining Potential Metabolic Capacities of Archaeal and Bacterial Taxonomic Groups. Available online: https://macadam.toulouse.inra.fr/ (accessed on 13 July 2024).

47. Metacyc. Available online: https://metacyc.org/pathway?orgid=META&id=PWY-5703 (accessed on 13 July 2024).
48. Metacyc. Available online: https://metacyc.org/pathway?orgid=META&id=PWY-5704 (accessed on 13 July 2024).
49. Jing, T.-Z.; Qi, F.-H.; Wang, Z.-Y. Most Dominant Roles of Insect Gut Bacteria: Digestion, Detoxification, or Essential Nutrient Provision? *Microbiome* **2020**, *8*, 38. [CrossRef] [PubMed]
50. Rupawate, P.S.; Roylawar, P.; Khandagale, K.; Gawande, S.; Ade, A.B.; Jaiswal, D.K.; Borgave, S. Role of Gut Symbionts of Insect Pests: A Novel Target for Insect-Pest Control. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1146390. [CrossRef]
51. McCutcheon, J.P.; Moran, N.A. Functional Convergence in Reduced Genomes of Bacterial Symbionts Spanning 200 My of Evolution. *Genome Biol. Evol.* **2010**, *2*, 708–718. [CrossRef]
52. Coolen, S.; Rogowska-van der Molen, M.; Welte, C.U. The Secret Life of Insect-Associated Microbes and How They Shape Insect–Plant Interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2022**, *98*, fiac083. [CrossRef]
53. Nagel, R.; Turrini, P.C.G.; Nett, R.S.; Leach, J.E.; Verdier, V.; Van Sluys, M.; Peters, R.J. An operon for production of bioactive gibberellin A_4 phytohormone with wide distribution in the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *New Phytol.* **2017**, *214*, 1260–1266. [CrossRef]
54. COBORU Research Centre for Cultivar Testing. Cultivars Data. Available online: https://www.coboru.gov.pl/en/search (accessed on 13 July 2024).
55. Golebiowska, Z. The Feeding and Fecundity of *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Wheat Grain. *J. Stored Prod. Res.* **1969**, *5*, 143–155. [CrossRef]
56. Arthur Thomas, T. An Automated Procedure for the Determination of Soluble Carbohydrates in Herbage. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, *28*, 639–642. [CrossRef]
57. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [CrossRef] [PubMed]
58. Przemieniecki, S.W.; Kosewska, A.; Kosewska, O.; Purwin, C.; Lipiński, K.; Ciesielski, S. Polyethylene, Polystyrene and Lignocellulose Wastes as Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Diets and Their Impact on the Breeding Condition, Biometric Parameters, Metabolism, and Digestive Microbiome. *Sci. Total Environ.* **2022**, *832*, 154758. [CrossRef] [PubMed]
59. Hammer, D.A.T.; Ryan, P.D.; Hammer, Ø.; Harper, D.A.T. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, 4. Available online: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm (accessed on 31 July 2024).
60. Przemieniecki, S.W.; Damszel, M.; Ciesielski, S.; Kubiak, K.; Mastalerz, J.; Sierota, Z.; Gorczyca, A. Bacterial Microbiome in *Armillaria Ostoyae* Rhizomorphs Inhabiting the Root Zone during Progressively Dying Scots Pine. *Appl. Soil Ecol.* **2021**, *164*, 103929. [CrossRef]
61. Louca, S.; Parfrey, L.W.; Doebeli, M. Decoupling Function and Taxonomy in the Global Ocean Microbiome. *Science (1979)* **2016**, *353*, 1272–1277. [CrossRef]
62. Lumivero XLSTAT Basic Solutions. Available online: https://www.xlstat.com/en/solutions/basic (accessed on 13 July 2024).
63. Jacomy, M.; Venturini, T.; Heymann, S.; Bastian, M. ForceAtlas2, a Continuous Graph Layout Algorithm for Handy Network Visualization Designed for the Gephi Software. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98679. [CrossRef]
64. Bastian, M.; Heymann, S.; Jacomy, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proc. Int. AAAI Conf. Web Soc. Media* **2009**, *3*, 361–362. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

9. OŚWIADCZENIA KANDYDATA ORAZ WSPÓŁAUTORÓW DOTYCZĄCE ICH WKŁADU W PRZYGOTOWANIE OPUBLIKOWANYCH ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

Olga Kosewska
(imię i nazwisko kandydata)
rolnictwo i ogrodnictwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., & Nietupski, M. (2023). The effect of antibiotics on bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy i n grain stores. Applied Sciences, 13(3), 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Kosewska Olga
(podpis kandydata)

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

Olga Kosewska
(imię i nazwisko kandydata)
rolnictwo i ogrodnictwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Kosewska Olga
(podpis kandydata)

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

Olga Kosewska
(imię i nazwisko kandydata)
rolnictwo i ogrodnictwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryz*ae L.). International Agrophysics, 38(2), 165-176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Kosewska Olga
(podpis kandydata)

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

Olga Kosewska
(imię i nazwisko kandydata)
rolnictwo i ogrodnictwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2024). Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis. International Journal of Molecular Sciences; 25(18):10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Kosewska Olga
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2023). The effect of antibiotics on bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy i n grain stores. Applied Sciences, 13(3), 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji i metodologii badań, udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mariusz Nietupski
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji i metodologii badań, opracowaniu części wyników oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mariusz Nietupski
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). International Agrophysics, 38(2), 165-176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji badań oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mariusz Nietupski
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Mariusz Nietupski, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2024). Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis. International Journal of Molecular Sciences; 25(18):10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji badań oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Mariusz Nietupski
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

adiunkt, dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2023). The effect of antibiotics on bacteriome of *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica* as a factor determining the success of foraging: A chance for antibiotic therapy in grain stores. Applied Sciences, 13(3), 1576. https://doi.org/10.3390/app13031576) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji i metodologii badań, opracowaniu części wyników i ich wizualizacji oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Przemieniecki Sebastian
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

adiunkt, dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji badań oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Przemieniecki, Sebastian
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

adiunkt, dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). International Agrophysics, 38(2), 165-176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji i metodologii badań, opracowaniu części wyników oraz udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Przemieniecki Sebastian
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 07.01.2025
(miejscowość, data)

adiunkt, dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Nietupski, M. (2024). Influence of the Chemical Properties of Cereal Grains on the Structure and Metabolism of the Bacteriome of *Rhyzopertha dominica* (F.) and Its Development: A Cause–Effect Analysis. International Journal of Molecular Sciences; 25(18):10130. https://doi.org/10.3390/ijms251810130 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w tworzeniu koncepcji i metodologii badań, opracowaniu części wyników, udziale w pisaniu początkowej i końcowej wersji manuskryptu oraz współudziale w korespondencji z Edytorem czasopisma i recenzentami.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

Przemieniecki Sebastian
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 28.11.2024
(miejscowość, data)

dr hab. Stanisława Koronkiewicz
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Nietupski, M., Koronkiewicz, S., Przemieniecki, S. W. (2024). The chemical grain composition of wheat and barley affects the development of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* F.) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Journal of Plant Protection Research. https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150254 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w opracowaniu metodyki dotyczącej oznaczania potencjału antyoksydacyjnego oraz szkoleniu w przeprowadzeniu analiz.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

S. Koronkiewicz
.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 28.11.2024
(miejscowość, data)

dr hab. Stanisława Koronkiewicz
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
rolnictwo i ogrodnictwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Pszczółkowska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Kosewska, O., Przemieniecki, S. W., Koronkiewicz, S., Nietupski, M. (2024). Effect of different chemical properties of cereal grains on the foraging and microbiome of the rice weevil (*Sitophilus oryz*ae L.). International Agrophysics, 38(2), 165-176. https://doi.org/10.31545/intagr/185216 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w opracowaniu metodyki dotyczącej oznaczania potencjału antyoksydacyjnego oraz szkoleniu w przeprowadzeniu analiz.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Olgę Kosewską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Olgi Kosewskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonywaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.

S. Koronkiewicz
.....
podpis