



UNIwersytet
PRZYRODniczy
w Lublinie

WYDZIAŁ
NAUK O ZWIERZĘTACH
I BIOGOSPODARKI

UNIwersytet PRZYRODniczy w Lublinie
WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

Dyscyplina Zootechnika i Rybactwo

mgr inż. Piotr Dziechciarz

**Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy
plastrów o małej i standardowej szerokości komórek**

Possibilities of bees and bee colonies features shaping with the usage of combs with
small and standard cell width

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

dr hab. Krzysztof Olszewski, prof. uczelni

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2022

Praca naukowa finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki jako projekt badawczy
nr 2018/31/B/NZ9/02480

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data Podpis autora

Spis treści

Streszczenie	7
Summary	8
1. Wstęp	9
1.1. Współczesne uwarunkowania pszczelarstwa	9
1.2. Skutki wprowadzenia węży	9
1.3. Problem naukowy podjęty w rozprawie doktorskiej	10
1.3.1. Cechy morfometryczne robotnic	11
1.3.2. Aktywność protez i ich inhibitorów w hemolimfie robotnic	11
1.3.3. Nasilenie zachowania higienicznego rodzin pszczoł	12
1.4. Podsumowanie	13
2. Hipotezy badawcze	15
3. Cel pracy	15
4. Materiał i metody	16
4.1. Praca 1.	16
4.1.1. Wychów robotnic	16
4.1.2. Ocena cech morfometrycznych	17
4.1.3. Analiza statystyczna	17
4.2. Praca 2.	18
4.2.1. Pozyskanie robotnic	18
4.2.2. Pozyskanie hemolimfy i ocena aktywności protez i ich inhibitorów w hemolimfie pszczoł	20
4.2.3. Analiza statystyczna	20
4.3. Praca 3.	21
4.3.1. Efektywność zachowania higienicznego	21
4.3.2. Analiza statystyczna	21
5. Wyniki	22
5.1. Praca 1.	22
5.1.1. Pomiary liniowe głowy, tułowia, języczka i wartość współczynnika wypełnienia komórki	22
5.1.2. Pomiary liniowe skrzydła pierwszej pary i wartość indeksu kubitalnego	22
5.1.3. Pomiary liniowe 3. i 4. tergitu odwłokowego	22
5.1.4. Procentowe zmiany szerokości komórek plastra, liniowych cech morfometrycznych oraz współczynnika wypełnienia komórki	24
5.2. Praca 2.	26
5.2.1. Szerokość komórek plastrów	26

5.2.2. Warunki pogodowe	26
5.2.3. Stężenie białka oraz aktywność proteaz i inhibitorów proteaz	27
5.3. Praca 3.	29
5.3.1. Szerokość komórek plastrów.....	29
5.3.2. Efektywność zachowania higienicznego.....	29
6. Dyskusja	30
6.1. Cechy morfometryczne	30
6.2. Aktywność systemu proteolitycznego.....	31
6.3. Efektywność zachowania higienicznego.....	32
6.4. Mechanizm modyfikowania cech pszczół i rodzin pszczelich w wyniku ich jednoczesnego utrzymania na plastrach o małych i o standardowych komórkach.....	33
7. Wnioski.....	36
8. Piśmiennictwo.....	37
Pełne teksty oraz oświadczenia współautorów prac naukowych stanowiących podstawę do opracowania rozprawy doktorskiej	44

Wykaz prac naukowych stanowiących podstawę do opracowania rozprawy doktorskiej, dane naukowe oraz indywidualny wkład pracy Doktoranta:

Praca 1.

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2021). Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie*, 52(6), 1017-1032. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00884-4>

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 140; IF=2,318**

Indywidualny wkład pracy Doktoranta w publikację (**65%**): zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, redagowanie manuskryptu, dyskusja, korekta po recenzjach.

Praca 2.

Dziechciarz, P., Strachecka A., Olszewski, K. (2022). Effect of comb cell width on the activity of the proteolytic system in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Animals*, 12, 978. <https://doi.org/10.3390/ani12080978>

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 100; IF=2,752**

Indywidualny wkład pracy Doktoranta w publikację (**75%**): zaplanowanie oraz przeprowadzenie doświadczenia w pasiece, gromadzenie materiału oraz analizy laboratoryjne, redagowanie manuskryptu, dyskusja, korekta po recenzjach.

Praca 3.

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2022). Dead brood of *Apis mellifera* is removed more effectively from small-cell combs than from standard-cell combs. *Animals*, 12, 418. <https://doi.org/10.3390/ani12040418>

Liczba punktów w roku publikacji: **MEiN = 100; IF=2,752**

Indywidualny wkład pracy Doktoranta w publikację (**75%**): zaplanowanie oraz przeprowadzenie doświadczenia w pasiece, gromadzenie materiału oraz analizy laboratoryjne, analiza danych, redagowanie manuskryptu.

Łączna liczba punktów MEiN * = 340

IF (Impact factor) = 7,822**

Indywidualny wkład pracy Doktoranta = 71,7%

* - Wykaz czasopism naukowych MEiN

** - Web of ScienceTM – Journal Citation Reports®

Streszczenie

Celem rozprawy była ocena możliwości modelowania cech pszczoł i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej (około 4,90 mm) i o standardowej (około 5,50 mm) szerokości komórek. Analizowano wpływ połączenia plastrów o małych i o standardowych komórkach w tej samej rodzinie pszczelej na cechy morfometryczne i aktywność systemu proteolitycznego robotnic oraz efektywność zachowania higienicznego rodzin pszczelich. Jednoczesne utrzymanie rodzin na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest nowatorskim kierunkiem wykorzystania plastrów o małych komórkach w gospodarce pasiecznej.

Wartości cech morfometrycznych oceniano u robotnic wychowanych w rodzinach o następującej kombinacji plastrów: (1) w plastrach o małych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach, (2) w plastrach o małych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach, (3) w plastrach o standardowych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach, (4) w plastrach o standardowych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach. Ponadto porównano aktywność proteaz i ich inhibitorów w hemolimfie robotnic wychowanych w plastrach o małych i o standardowych komórkach. Miarą efektywności zachowania higienicznego była szybkość usuwania martwego czerwiu z plastrów o małych i o standardowych komórkach.

Wartość większości cech morfometrycznych robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach była zwykle istotnie niższa niż u robotnic wychowanych w plastrach o standardowych komórkach. Jednak zmiana wartości cech morfometrycznych nie była proporcjonalna do zmiany szerokości komórki plastra, w których były one wychowane, ponieważ cechy te zmieniały się w znacznie mniejszym zakresie. Karmienie larw wychowywanych w plastrach o małych komórkach przez robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach skutkowało zwiększeniem długości języczka oraz wartości współczynnika wypełnienia komórki. Wartość cech morfometrycznych wykorzystywanych w ocenie przynależności podgatunkowej pszczoły miodnej zmieniała się w niewielkim zakresie w porównaniu do zmiany szerokości komórki plastra, ponieważ mieściła się w zakresie zmian przyjętych za sezonowe. Odporność tych cech na zmianę szerokości komórki plastra potwierdza ich dużą przydatność w ocenie przynależności podgatunkowej pszczoły miodnej.

Szerokość komórki plastra istotnie wpływała na aktywność proteaz i ich inhibitorów oraz na efektywność usuwania martwego czerwiu. U 1-dniowych robotnic wyższe stężenia białka ogólnego było u robotnic wychowanych w małych komórkach, a aktywność proteaz i ich inhibitorów u robotnic wychowywanych w plastrach o standardowych komórkach. U starszych robotnic w wieku: 7, 14 i 21 dni było odwrotnie. Natomiast martwy czerw był efektywniej usuwany z plastrów o małych komórkach niż z plastrów o standardowych komórkach.

Jednoczesne utrzymanie rodzin pszczelich na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest skutecznym narzędziem modyfikowania cech pszczoł i rodzin pszczelich. Warte zweryfikowania jest hipoteza dotycząca wpływu wychowu robotnic w komórkach o różnej szerokości na podział pracy w kaście robotnic, a co za tym idzie, na wartość cech użytkowych rodzin, która w znacznej mierze jest kształtowana przez interakcje między robotnicami. Przyczyni się to także do wyjaśnienia roli znacznej różnicy między szerokością komórki w plastrach budowanych bez użycia węży, a co za tym idzie dostarczy nowej wiedzy o biologii i ewolucji pszczoły miodnej.

Słowa kluczowe: Pszczoła miodna, *Apis mellifera*, plaster o małych komórkach, cechy morfometryczne, system proteolityczny, zachowanie higieniczne

Summary

The aim of the dissertation was to evaluate the possibility of shaping the features of bees and bee colonies using combs with small (about 4.90 mm) and standard (about 5.50 mm) cells width. The influence of combining combs with small and standard cells in the same bee colony on the morphometric traits and activity of the proteolytic system of worker bees as well as the efficiency of hygienic behavior of the colonies towards dead brood were analyzed. The simultaneous maintenance of colonies small- and standard-cells combs is a novel approach of the use of the small-cells combs in beekeeping.

The values of the morphometric traits of workers (thorax width and length, proboscis length, fore wing length and width, length of cubital vein distances a and b) were assessed in workers reared in colonies with the following combination of combs: (1) bees reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs, (2) bees reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs, (3) bees reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs, and (4) bees reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs. Moreover, the activity of proteases and their inhibitors in the hemolymph of workers reared in combs with small and standard cells was compared. The measure of the efficiency of hygienic behavior was the speed of removal of dead brood from combs with small and standard cells.

The value of most morphometric traits of workers reared in combs with small cells was usually significantly lower than that of workers reared in combs with standard cells. However, the change in the value of the worker morphometric traits was not proportional to the change in the width of the comb cells in which they were reared, since these traits varied to a much lesser extent. Feeding the larvae raised in combs with small cells by workers reared in combs with standard cells resulted in an increase in the length of the proboscis and the value of the cell filling factor. The value of morphometric traits used in the assessment of subspecies affiliation of the honey bee changed to a small extent compared to the change in the width of the comb cells, as such a changes were within the range of changes assumed as seasonal. The resistance of these traits to the change in the width of the comb cells confirms their great suitability in the assessment of subspecies affiliation of the honey bee.

The width of the comb cells significantly influenced the activity of proteases and their inhibitors as well as the effectiveness of dead brood removal. In 1-day-old workers, higher concentrations of total protein were found in workers reared in small-cells combs, and the higher activity of proteases and their inhibitors in 1-day-old workers reared in combs with standard cells. The opposite trend was found for older workers aged of 7, 14 and 21 days old. On the other hand, dead brood was removed faster from combs with small cells than from combs with standard cells.

The simultaneous keeping of bee colonies on combs with small and standard cells is an effective tool for shaping the features of bees and bee colonies. The hypothesis concerning the influence of rearing workers in combs with cells of different widths on the division of labor in a caste of workers, and thus on the value of the functional traits of colonies, which is largely shaped by interactions between workers, is worth verifying. It will also contribute to elucidating the role of the significant difference between the cell width in combs built without the use of a wax foundation, and therefore will provide new insight into the biology and evolution of the honey bee.

Keywords: Honey bee, *Apis mellifera*, small-cells combs, morphometric traits, proteolytic system, hygienic behavior

1. Wstęp

1.1. Współczesne uwarunkowania pszczelarstwa

Współcześnie w krajach rozwiniętych pszczoła miodna jest dominującym zapalaczem, zwłaszcza na terenach intensywnie użytkowanych rolniczo (Hünicken i in., 2021; Papa i in., 2022). Od pracy owadów zapylających zależy plonowanie aż 70% ze 124 gatunków uprawnych (Klein i in., 2007; Eilers i in., 2011), a bez zapylaczy plony owoców spadłyby o ok. 40%, a warzyw o 16% (Klein i in., 2007). Współcześnie poza bezpieczeństwem żywnościowym, od pracy pszczół po części zależy także bezpieczeństwo energetyczne, gdyż oleje roślinne stanowią główny surowiec do produkcji biopaliw. Poza zapyłaniem pszczoła miodna dostarcza szerokiej gamy produktów, a wysoki status materialny obywateli krajów rozwiniętych powoduje duży popyt na te produkty. Jednak wysokie zapotrzebowanie w krajach rozwiniętych na usługi zapyłania oraz produkty pszczele nie idzie jednak w parze z kondycją rodzin pszczelich, a co za tym idzie ich wydajnością. W USA duże straty rodzin pszczelich powoduje polietologiczne zjawisko określane mianem Zespołu Masowego Ginięcia Pszczoły Miodnej (ang. Colony Collapse Disorder, skrót CCD) (Ellis i in., 2010). Także w Europie notuje się znaczne straty. Jednak ich specyfika jest nieco inna, dlatego zjawisko to nazwano Syndrom Depopulacji Rodzin Pszczelich (ang. Colony Depopulation Syndrome, skrót CDS) (VanEngelsdorp i in., 2009; Dainat i in., 2012). Za główne przyczyny start rodzin pszczelich zarówno w Ameryce Północnej jak i w Europie uważa się osłabienie odporności pszczół spowodowane przez środki ochrony roślin i niedobory składników pokarmowych będące skutkiem znacznego zubożenia bioróżnorodności szaty roślinnej. Zarówno osłabione rodziny pszczele jak i pojedyncze pszczoły są bardziej podatne na inwazję pasożytów *Varroa destructor* i *Nosema* spp. (Goulson i in., 2015; Brandt i in., 2016).

Scharakteryzowane wyżej problemy sprawiają, że współcześnie obok doskonalenia metod zwalczania pasożytów poszukuje się technologii pasiecznych wspierających naturalne mechanizmy odporności pojedynczych pszczół jak i rodzin pszczelich. Do takich zabiegów biotechnicznych należy wykorzystanie w gospodarce pasiecznej plastrów o małych komórkach (szerokość komórki około 4,90 mm). Możliwość wykorzystania takich plastrów do modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich jest przedmiotem tej rozprawy.

1.2. Skutki wprowadzenia węzy

Na skutek wprowadzenia sztucznie wytwarzanej węzy jako szablonu, na podstawie którego pszczoły budują komórki plastrów, mają one obecnie niemal jednakową, wystandaryzowaną szerokość (McMullan i Brown, 2006). Poza standaryzacją została zwiększona sama szerokość komórek. W naturalnych gniazdach pszczoły środkowoeuropejskiej (*Apis mellifera mellifera*), szerokość komórek plastrów robotnic wahała się między 4,90 a 5,10 mm (Cowan, 1904). Obecnie w Europie standardowa szerokość zarysów komórek na arkuszu węzy wynosi zwykle około 5,40-5,50 mm (McMullan i Brown, 2006, Coffey i in., 2010, Singer i in., 2019). Natomiast w naturalnych gniazdach zbudowanych bez użycia węzy szerokość komórek waha się w znacznie większym zakresie, gdyż czerw robotnic wychowywany jest w komórkach o szerokości 4,17–6,86 mm (Maggi i in., 2010).

Współcześnie w krajach rozwiniętych wykorzystanie węzy jest standardem w gospodarce pasiecznej. Mimo to wpływ szerokości komórek plastra na cechy pszczół i rodzin pszczelich jest dotychczas mało poznany. Zainteresowanie naukowe plastrami o małych komórkach rozpoczęło się dopiero w XXI wieku i wynikało z doniesień, że wychów czerwiu w tych plastrach o małych komórkach w porównaniu do plastrów o standardowych komórkach ogranicza rozwój populacji powszechnego pasożyta pszczół *V. destructor* (Message i Goncalves, 1995; Piccirillo i De Jong, 2003; Taylor i in., 2008; Ellis i in., 2009; Berry i in., 2010; Coffey i in., 2010; Maggi i in., 2010; Seeley i Griffin 2011; Singer i in., 2019). W Europie mała szerokość zarysów komórek na arkuszu węzy wynosi 4,90 mm (McMullan i Brown, 2006; Coffey i in., 2010; Singer i in., 2019). W warunkach europejskich ograniczenie rozwoju populacji *V. destructor* w skutek utrzymania na plastrach o małych komórkach potwierdziły tylko badania Olszewskiego (2013) oraz Singera i współautorów (2019), a podejmowane przez pszczelarzy próby wykorzystania takich plastrów zapewne nie przyniosły oczekiwanego efektu, gdyż nie weszły one do powszechnego użycia. Stwierdzono jednak istotny wpływ utrzymania rodzin na plastrach o małych komórkach na cechy morfometryczne robotnic oraz biologię rodziny pszczelej. Powodowało ono statystycznie istotne zmniejszenie szerokości głowy (McMullan i Brown, 2006; Seeley i Griffin, 2011) i tułowia (McMullan i Brown, 2006), nie wpływając na wartość indeksu kubitalnego (McMullan i Brown, 2006). Ponadto stwierdzono dłuższe życie robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach (Olszewski i in., 2014a) oraz większe nasilenie zachowania higienicznego w rodzinach utrzymywanych na plastrach o małych komórkach (Olszewski i in., 2014b).

1.3. Problem naukowy podjęty w rozprawie doktorskiej

W przedkładanej rozprawie został zbadany nowy aspekt możliwości wykorzystania plastrów o małych komórkach w gospodarce pasiecznej. Bazując na badaniach Maggieo i in. (2010), którzy stwierdzili znaczną zmienność szerokości komórek plastrów w gnieździe rodziny pszczelej zbudowanym bez użycia węzy, plastry o małych komórkach i plastry o standardowych komórkach umieszczono w gnieździe tej samej rodziny pszczelej. Podczas gdy dotychczas badano rodziny utrzymywane tylko na plastrach o małych komórkach lub tylko na plastrach o standardowych komórkach. Badania będące przedmiotem tej rozprawy zostały przeprowadzone w ramach projektu „Wyjaśnienie fenomenu naddominowania behawioralnego rodzin pszczelich utrzymywanych na dwóch rodzajach plastrów, o standardowym i o małym rozmiarze komórek” nr. 2018/31/B/NZ9/02480, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Przyczynkiem do opracowania tego projektu były obserwacje rodzin utrzymywanych jednocześnie na plastrach o komórkach małych i standardowych, które wskazywały na występowanie interakcji między robotnicami wychowanymi w tych dwóch typach plastrów, co skutkuje efektem podobnym do heterozji. Pod względem siły, szybkości rozwoju wiosennego i wydajności, rodziny te znacznie przewyższają zarówno rodziny utrzymywane tylko na plastrach o małych komórkach jak i te utrzymywane tylko na plastrach o standardowych komórkach.

Prace stanowiące podstawę do opracowania przedkładanej rozprawy doktorskiej dotyczą wpływu plastrów o różnej szerokości komórek (mała/standardowa) na cechy morfometryczne wychowanych w nich robotnic (Praca 1.) i poziom aktywności proteaz i ich

inhibitorów w hemolimfie robotnic (Praca 2.). Ponadto została oceniona efektywność zachowania higienicznego wobec martwego czerwiu w plastrach o małej i o standardowej szerokości komórek (Praca 3.).

1.3.1. Cechy morfometryczne robotnic

Pomiary morfometryczne pszczoł robotnic są wykorzystywane w zootechnice między innymi w pracy hodowlanej do oceny ich przynależności podgatunkowej/rasowej oraz oceny wpływu na rozmiar ciała robotnic różnych czynników środowiskowych, takich jak np. temperatura i jakość żywienia czerwiu (Brodschneider, 2009). Zwiększając szerokość komórek plastrów kierowano się przekonaniem, że proporcjonalnie do zwiększenia komórek wzrośnie też wielkość ciała robotnic (Grout, 1937), jednocześnie zwiększając produktywność. Przekonanie, że wielkość ciała robotnicy zmienia się proporcjonalnie do zmiany szerokości komórki jest wciąż powszechne (Ruttner, 1988; Ruttner, 1992; McMullan i Brown, 2006). Zapewne na tej podstawie Erickson i in. (1990) stwierdzili, że zmiana szerokości komórek plastra umożliwi zmianę wielkości ciała robotnic bez zabiegów hodowlanych. Jednak przeciwne wnioski wynikają z badań McMullana i Browna (2006) oraz Seeleyego i Griffina (2011). Stwierdzili oni, że zmniejszenie szerokości komórek plastra o 7%-8% skutkuje zmniejszeniem szerokości głowy i szerokości tułowia tylko o 1%. Bez statystycznie istotnych zmian pozostawała wartość indeksu kubitalnego (McMullan i Brown, 2006). Wyniki dotychczasowych badań nad wpływem szerokości komórek plastrów na wartość cech morfometrycznych robotnic wskazują na względnie stałą wielkość ciała pszczoły, przy mniejszym niż dotychczas zakładano wpływie na nią szerokości komórki (McMullan i Brown, 2006; Seeley i Griffin, 2011).

Obecny stan wiedzy dotyczącej wpływu szerokości komórek na cechy morfometryczne robotnic nie jest wystarczający, ponieważ zbadano tylko nieliczne cechy morfometryczne takie jak: szerokość głowy, szerokość tułowia i wartość indeksu kubitalnego. Nie jest to wystarczające, gdyż Ruttner (1992) za cechy morfometryczne będące miarą wielkości ciała pszczoł uważa długość skrzydła pierwszej pary oraz szerokość 3. i 4. tergitu odwłokowego. Z gospodarczego punktu widzenia bardzo ważną cechą jest także długość języczka, gdyż decyduje ona o możliwości pobierania nektaru z roślin o długich rurkach kwiatowych z głęboko położonymi nektarnikami, co w konsekwencji może przekładać się na wydajność rodzin. Ponadto ewentualne istotne zmiany wartości cech morfometrycznych jako konsekwencja szerokości komórki, mogą wykluczyć ich przydatność w ocenie przynależności podgatunkowej/rasowej pszczoł. Dlatego zasadne jest zbadanie większej liczby cech morfometrycznych istotnych z hodowlanego i gospodarczego punktu widzenia. Ponadto w kontekście jednoczesnego wykorzystania plastrów o małych i o standardowych komórkach w tej samej rodzinie pszczołej ważna jest ocena wpływu kombinacji rodziny wychowującej czerw (utrzymywana na plastrach o małych lub o standardowych komórkach) oraz szerokości komórek plastra, w którym wychowywane były robotnice (plaster o małych lub o standardowych komórkach) na wartość cech morfometrycznych robotnic (Praca 1.).

1.3.2. Aktywność protez i ich inhibitorów w hemolimfie robotnic

Bardzo duże zagęszczenie robotnic w małej przestrzeni gniazda rodziny pszczołej sprzyja łatwej transmisji czynników chorobotwórczych (Traniello i in., 2002). W odpowiedzi

na to zagrożenie pszczoły miodne wykształciły behawioralne mechanizmy obrony przed patogenami, będące następstwem społecznego trybu życia. Ponadto pojedyncze osobniki posiadają wrodzone bariery immunologiczne. Jednym z elementów układu immunologicznego, jest system proteolityczny, na który składają się proteazy i ich inhibitory w hemolimfie oraz na powierzchni ciała pszczół. System proteolityczny jest aktywowany zarówno przez czynniki środowiska zewnętrznego jak i środowiska wnętrza gniazda rodziny pszczelej. Odporność zarówno behawioralna rodzin jak i immunologiczna pszczół ma bardzo duże znaczenie gospodarcze, ponieważ nawet bardzo wysoki poziom cech użytkowych niweczony jest przez dużą podatność na choroby (Bruder Adam, 1983).

Białka odpornościowe spełniają swoje funkcje dzięki skoordynowanej interakcji ciała tłuszczowego, w którym są syntetyzowane oraz hemolimfy, przez którą są transportowane. Ponadto hemolimfa zapewnia odpowiednie środowisko do funkcjonowania tych białek. Jest więc również źródłem informacji o stanie fizjologicznym organizmu (Chan i Foster, 2008). Niektóre z tych białek mają właściwości proteolityczne, mogą hydrolizować (przecinać) wiązania peptydowe polipeptydów (Strachecka i Grzywnowicz, 2008; Strachecka i in., 2018). Proteazy umożliwiają utrzymanie homeostazy organizmu poprzez aktywację proenzymów, uwalnianie hormonów i fizjologicznie czynnych białek z ich prekursorów czy aktywację receptorów. Ich celem jest również enzymatyczny rozkład białek patogenu (Bode i in., 1999; Evans i in., 2006; Strachecka i Paleolog, 2011; Migdał i in., 2021). Hemolimfa pszczół zawiera proteazy: serynowe, asparaginowe, cysteinowe i metaloproteazy (Asgari i in. 2003; Kanost i in. 2015). Z drugiej strony inhibitory proteazy hamują aktywność enzymów proteolitycznych, zarówno specyficznych dla pszczół, jak i niespecyficznych, należących do patogenów i zapobiegają ich przenikaniu do organizmu owada. Dodatkowo chronią przed przypadkową aktywacją mechanizmów związanych z aktywnością fenylooksydazy, która bierze udział w procesach takich jak przeobrażenie i melanizacja (Kanost i Clarke, 2005; Strachecka i Grzywnowicz, 2008).

Dotychczas stwierdzono, że na aktywność układu proteolitycznego, będącego jedną z miar odporności humoralnej hemolimfy pszczół, mają wpływ między innymi biostymulatory (Strachecka i in., 2014; Strachecka i in., 2015) oraz status kastowy (Strachecka i in., 2021a). Natomiast współcześnie do czynników o silnym działaniu immunosupresyjnym pochodzenia antropogenicznego należą pestycydy (Blacquièrre i in., 2012; Cullen i in., 2019, Paleolog i in. 2020), akarycydy stosowane przeciwko *V. destructor* (Strachecka i in., 2016) oraz niedobory pokarmowe (El-Seedi i in., 2022). W związku z istotnym spadkiem kondycji rodzin pszczelich w krajach rozwiniętych, szczególnie w kontekście negatywnego wpływu czynników pochodzenia antropogenicznego, bardzo interesujące jest czy plastry pszczele o różnej szerokości komórek (mała/standardowa) umieszczone w gnieździe tej samej rodziny pszczelej stwarzają możliwość modelowania poziomu aktywności składowych układu proteolitycznego w hemolimfie robotnic (Praca 2.).

1.3.3. Nasilenie zachowania higienicznego rodzin pszczelich

Owady społeczne obok komórkowych i humoralnych reakcji odpornościowych przeciw patogenom (Siva-Jothy i in., 2005) wykształciły odporność społeczną, której jedną z form jest higiena gniazda (Cremer i in., 2007). Taki rodzaj odporności stwierdzono u termitów (Davis i in., 2018), mrówek (Pull i in., 2018), pszczół bezżądłowych (Al Toufalia

i in., 2016) oraz pszczoł miodnych (Michener, 1974; Spivak i Danko, 2021). Jednak specyficzną jedynie dla pszczoł miodnych formą higieny gniazda jest zachowanie higieniczne, wynikające z wielokrotnego wykorzystania tych samych komórek (Michener, 1974). Zachowanie higieniczne to naturalny mechanizm obrony przed chorobami czerwiu, polegającym na odnajdowaniu i odsklepieniu komórek z martwym lub zainfekowanym czerwiem oraz usuwaniu tego czerwiu z gniazda, zanim infekcja rozprzestrzeni się w rodzinie (Rothenbuhler, 1964; Spivak, 1996; Arathi i in., 2000). Miarą zachowania higienicznego jest szybkość usuwania przez rodzinę próby martwego czerwiu (Büchler i in., 2010). Cecha ta jest uwarunkowana genetycznie, dlatego możliwa jest hodowla ukierunkowana na nasilenie zachowania higienicznego (Palacio i in., 2000; Büchler i in., 2010).

Zachowanie higieniczne może być pomocne w niechemicznej kontroli powszechnych chorób czerwiu, takich jak grzybica wapienna (Spivak, 2001; Invernizzi i in., 2011) i zgnilec amerykański (Palacio i in., 2000; Spivak i Reuter, 2001) oraz ograniczenia porażenia przez *V. destructor* (Büchler i in., 2010; Rinderer i in., 2010). Długotrwała chemiczna walka z chorobami prowadzi do uodpornienia patogenów i pasożytów na substancje czynne leków (Milani, 1999; Kochansky i in., 2001; Evans, 2003; Sammataro i in., 2005) i skażenia produktów pszczelich (Wallner, 1999; Serra-Bonvehi i in., 2010).

Zachowanie higieniczne pomimo uwarunkowań genetycznych, jest modyfikowane przez czynniki środowiskowe, zarówno te na zewnątrz gniazda, między innymi dopływ nektaru (Gerdtts i in., 2018), jak również czynniki środowiska wewnętrznego gniazda na przykład szerokość komórek plastra (Olszewski i in., 2014b). Olszewski i in. (2014b) stwierdzili, że utrzymanie rodzin na plastrach o małych komórkach (szerokość komórki 4,93 mm) skutkuje istotnym wzrostem nasilenia zachowania higienicznego w porównaniu do rodzin utrzymywanych na plastrach o standardowych komórkach (szerokość komórki 5,56 mm). Nie zostało jednak wyjaśnione czy to pszczoły wychowane w małych komórkach, mają lepszą zdolność do identyfikowania komórek z martwym czerwiem i usuwania ich zawartości, czy to martwy czerw w małych komórkach bardziej stymuluje robotnice do oczyszczania komórek, niż ten w standardowych komórkach.

W kontekście znaczenia zachowania higienicznego jako mechanizmu ograniczania rozwoju chorób czerwiu, istotnym jest zbadanie potencjalnych możliwości nasilenia zachowania higienicznego rodzin pszczelich przez umieszczone w ich gnieździe plastrów o różnej szerokości komórek (mała/standardowa) (Praca 3.). Słuszność tego kierunku badań potwierdzają doświadczenia Olszewskiego i in. (2014b). Znaczenie tego zagadnienia zyskuje na aktualności zwłaszcza współcześnie gdy rośnie odporność patogenów na substancje czynne leków co zmusza do zwielokrotniania zabiegów leczniczych, a co za tym idzie dawki leków. Z drugiej jednak strony ogromną wagę przywiązuje się do dbałości o jakość produktów pszczelich, w tym do zapobiegania przenikaniu pozostałości leków do tych produktów.

1.4. Podsumowanie

Rodzina pszczoły miodnej jest skomplikowanym układem socjofizjologicznym. Integralną częścią superorganizmu rodziny pszczelej jest gniazdo składające się z plastrów. Tautz (2007) określa plaster jako największy i najważniejszy organ rodziny pszczelej. Opierając się na tych twierdzeniach można założyć, że zmiana szerokości komórek plastra wpływa nie tylko na cechy morfologiczne wychowanych w nim robotnic, lecz przekłada się

także na biologię całej rodziny. Mimo znacznego rozwoju technik badawczych zagadnie to jest jeszcze mało poznane. Zupełnym novum jest natomiast ocena wpływu jednoczesnego utrzymania rodzin na plastrach o małych i o standardowych komórkach na cechy robotnic i rodzin pszczelich, będąca przedmiotem przedkładanej rozprawy.

Naddominacja behawioralna, czyli istotna przewaga pod względem cech użytkowych rodzin utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych komórkach nad rodzinami utrzymywanymi tylko na plastrach o małych komórkach, jak i tymi utrzymywanymi tylko na plastrach o standardowych komórkach, wskazuje na występowanie interakcji między robotnicami wychowanymi w tych dwóch typach plastrów. Z dużą dozą prawdopodobieństwa można założyć, że jest to skutek zwiększenia zmienności komórek w gnieździe rodziny pszczelej, a co za tym idzie upodobnienia jego struktury do naturalnego gniazda zbudowanego bez użycia węzy, cechującego się znaczną zmiennością szerokości komórek (Maggi i in., 2010).

Dobre poznanie możliwości modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek może przyczynić się do zwiększenia użyteczności pszczół poprzez opracowanie technologii jednoczesnego utrzymania rodzin pszczelich na plastrach o małych i o standardowych komórkach. Ponadto poszerzy ono wiedzę o biologii i ewolucji pszczoły miodnej w aspekcie podziału pracy w rodzinie pszczelej.

2. Hipotezy badawcze

1. Wykorzystanie plastrów o małej (około 4,90 mm) i o standardowej (około 5,50 mm) szerokości komórek nie jest tak skuteczną metodą modelowania cech morfometrycznych robotnic jak dotychczas zakładano, ponieważ rozmiar ich ciała zmienia się w znacznie mniejszym zakresie niż szerokości komórki, w której zostały one wychowane.
2. Szerokość komórek plastrów, w których są wychowane robotnice istotnie wpływa na stężenie białka ogólnego oraz aktywność proteaz i ich inhibitorów w hemolimfie robotnic.
3. Martwy czerw robotnic jest efektywniej usuwany z plastrów o małych komórkach niż z plastrów o standardowych komórkach.
4. Jednoczesne utrzymanie rodzin pszczelich na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest skutecznym narzędziem modyfikowania cech pszczół i rodzin pszczelich.

3. Cel pracy

Celem pracy była ocena możliwości modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek. Analizowano wpływ połączenia plastrów o małych i o standardowych komórkach w tej samej rodzinie pszczelej na: cechy morfometryczne robotnic, aktywność układu proteolitycznego w hemolimfie robotnic oraz efektywność zachowania higienicznego rodzin wobec martwego czerwiu.

4. Materiał i metody

Doświadczenia będące przedmiotem przedkładanej rozprawy przeprowadzono w latach 2019-2021 w pasiece Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (51°22' N, 22°63' E). We wszystkich badaniach wykorzystano rodziny pszczoł Buckfast, których unasiennione naturalnie matki były siostrami. Wybrano rodziny pszczoł Buckfast ponieważ w pasiece Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie bardzo dobrze zaadaptowały się do życia na plastrach o małych komórkach. Rodziny utrzymywano w ulach typu Dadant-Blatt z gniazdem zlokalizowanym w jednym korpusie mieszczącym 10 plastrów (435×300 mm) oraz nadstawkami, każda z 10 plastrami (435×150 mm). Rodnie były oddzielone od miodni kratami odgradowymi. W badanych nad aktywnością systemu proteolitycznego robotnic (Praca 2.) wykorzystano także rodziny osadzone w ulach odkładowych Dadanta mieszczących 6 plastrów.

4.1. Praca 1.

4.1.1. Wychów robotnic

W 2019 roku wykonano ramki sekcyjne o powierzchni plastra 1,09 dm² (115x95 mm). Sześć ramek z węzą o małych komórkach (szerokość zarysów komórek 4,90 mm) i sześć kolejnych z węzą o standardowych komórkach (szerokość zarysów komórek 5,50 mm). Wszystkie ramki sekcyjne o małych komórkach były odbudowywane w jednej rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach, a ramki sekcyjne o standardowych komórkach w jednej rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowej szerokości komórek. Po odbudowaniu na węzie komórek, plastry sekcyjne wyjęto z rodzin i zmierzono szerokość komórek każdego z nich. W centralnej części plastra zmierzono szerokość 10 sąsiednich komórek stykających się z pionowymi ściankami bocznymi (Praca 1., ryc. 1). Każdą z 10 komórek mierzono oddzielnie (McMullan i Brown, 2006). Pomiaru wykonano na podstawie fotografii oraz za pomocą systemu cyfrowej analizy obrazu Multi Scan v. 14.02 (opcja pomiaru odcinka), dostawca Computer Scanning System II, Warszawa.

W drugiej dekadzie czerwca w pasiece wytypowano trzy silne rodziny. Dwie z nich były utrzymywane na plastrach o standardowych komórkach (**rSK**), a jedna na plastrach o małych komórkach (**rMK**). W jednej z rodzin **rSK** (utrzymywana na plastrach o standardowych komórkach), w centrum gniada co 12 godzin umieszczano na przemian plastry sekcyjne o małych komórkach (**psMK**) i plastry sekcyjne o standardowych komórkach (**psSK**) (Praca 1., ryc. 2). Na każdym plastrze sekcyjnym zamykano matkę przy pomocy izolatora z kraty odgradowej w celu złożenia jaj. Plastry sekcyjne, w których matki złożyły jaja przenoszono do dwóch pozostałych rodzin w celu wychowu czerwiu - rodziny wychowujące. W rodzinie wychowującej **rSK** (utrzymywana na plastrach o standardowych komórkach) i w rodzinie wychowującej **rMK** (utrzymywana na plastrach o małych komórkach) umieszczono po trzy **psMK** i trzy **psSK** (Praca 1., ryc. 2). Plastry sekcyjne umieszczano w świetle pustej ramki zlokalizowanej w centrum pierwszej nadstawki nad gniazdem. Po 19 dniach od umieszczenia w rodzinie wychowującej każdy plaster sekcyjny umieszczano w oddzielnym izolatorze wykonanym z siatki i przenoszono do cieplarki, gdzie pozostawał do wygryzienia się robotnic. Około 100 robotnic z każdego plastra sekcyjnego

umieszczano w oddzielnej klatce i pozostawiano na 7 dni w cieplarni, celem stwardnienia oskórka chitynowego.

Uzyskano 4 grupy robotnic odpowiadające kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej:

- wychowane w plastrach o małych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach ($psMK + rMK$),
- wychowane w plastrach o małych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach ($psMK + rSK$),
- wychowane w plastrach o standardowych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach ($psSK + rMK$),
- wychowane w plastrach o standardowych komórkach, w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach ($psSK + rSK$).

4.1.2. Ocena cech morfometrycznych

Z każdej grupy ($psMK + rMK$, $psMK + rSK$, $psSK + rMK$, $psSK + rSK$) badano 15 robotnic (Ruttner 1988, 1992). Ocena każdej robotnicy miała następujący przebieg:

1. Usypianie octanem etylu.
2. Pomiar pod mikroskopem stereoskopowym Olympus SZX16 od strony grzbietowej: szerokości i długości tułowia.
3. Umieszczenie na szkiełku podstawowym głów pszczół, pomiar pod mikroskopem stereoskopowym Olympus SZX16 szerokości i wysokości głowy.
4. Preparowanie języzka, prawego skrzydła pierwszej pary oraz 3. and 4. tergitu odwłokowego i umieszczenie ich na szkiełku podstawowym.
5. Pomiar pod mikroskopem stereoskopowym Olympus SZX16 części ciała wymienionych w punkcie 4. Uzyskano następujące pomiary liniowe: długość języzka, długość skrzydła pierwszej pary, długość odcinaków a i b żyłki kubitalnej (Ruttner, 1988; 1992). Na podstawie stosunku długości odcinków a / b wyliczono wartość indeksu kubitalnego według Goetze (Ruttner, 1988). Dzieląc szerokości tułowia przez szerokość komórki plastra i mnożąc wynik przez 100 wyliczono procentowy współczynnik wypełniania komórek przez poczwarki (fill factor) (McMullan i Brown, 2006; Seeley i Griffin, 2011).

Sprawdzono również, czy wyrażone w procentach różnice między wartościami liniowych cech morfometrycznych robotnic z czterech grup odpowiadających kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej ($psMK + rMK$, $psMK + rSK$, $psSK + rMK$, $psSK + rSK$) odpowiadają wyrażonej w procentach różnicy szerokości komórek między plastrami $psMK$ a $psSK$.

4.1.3. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano programu Statistica, wersja 13.3 (2017) dla Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA.

Rozkład danych analizowano testem Kołmogorova-Smirnoffa. Szerokość komórek w plastrach sekcyjnych o małych komórkach ($n = 60$) oraz tych o standardowych komórkach ($n = 60$) porównano testem t Studenta dla prób niezależnych. Do oceny wpływu typu plastra ($psMK$, $n = 90$ i $psSK$, $n = 90$) niezależnie od typu rodziny wychowującej i wpływ typu rodziny wychowującej (rMK , $n = 90$ i rSK , $n = 90$) niezależnie od typu plastra oraz

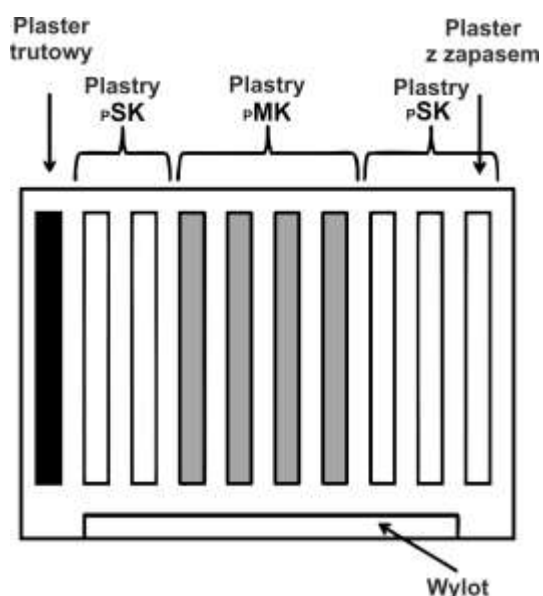
interakcji między tymi czynnikami zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z interakcją. Testem HDS Tukeya porównano średnie wartości cech w czterech grupach robotnic odpowiadających kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej ($p_sMK + rMK$, $n = 45$; $p_sMK + rSK$, $n = 45$; $p_sSK + rMK$, $n = 45$; $p_sSK + rSK$, $n = 45$).

4.2. Praca 2.

W przypadku pszczoł miodnych czynniki środowiskowe mają duży wpływ na wartości cech (Dziechciarz i in., 2019). Dlatego aby znacznie zmniejszyć ryzyko wpływu na wyniki przypadkowych czynników jakie mogą zadziałać w przypadku badań jednosezonowych, doświadczenie w tym samym układzie było powtórzone w trzech kolejnych latach: 2019, 2020 i 2021.

4.2.1. Pozyskanie robotnic

W każdym roku wykorzystano pięć rodzin wychowujących o podobnej sile i strukturze. Rodziny te były utrzymywane jednocześnie na plastrach o małych komórkach (pMK) (szerokość komórek około 4,9 mm) i plastrach o standardowych komórkach (pSK) (szerokość komórek około 5,5 mm). W centrum gniada każdej z rodzin znajdowało się cztery pMK (plastry o małych komórkach). Ponadto w każdym gnieździe było pięć pSK (plastry o standardowych komórkach), z których trzy były zlokalizowane z prawej strony i dwa z lewej strony względem pMK (patrząc od strony wylotu) (ryc. 1.). Dodatkowo w każdym gnieździe znajdował się plaster trutowy zlokalizowany z lewej strony gniada. W jednym pSK po przeciwnej stronie gniada względem plastra trutowego był zapas miodu i pierzgi (ryc. 1.). Pozostałe plastry (pMK i pSK) były niemal całkowicie zajęte przez czerw.



Rycina 1. Schemat rozmieszczenia plastrów w gnieździe rodzin pszczelich. pMK - plastry o małych komórkach; pSK - plastry o standardowych komórkach (Praca 3., ryc. 1.)

W każdym roku, w każdej z pięciu rodzin wychowujących utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych komórkach, w pierwszych dniach czerwca z gniada był usuwany plaster o standardowych komórkach, a w jego miejsce był umieszczany izolator wykonany z kraty odgradowej, z pustym plastrzem doświadczalnym

o standardowych komórkach w środku. Izolator mieścił jeden plaster. Do izolatora była wpuszczana matka, która pozostawała w nim przez 24 godziny, celem złożenia jaj w plastrze doświadczalnym. Po tym czasie z gniada był usuwany plaster o małych komórkach, a w jego miejsce przenoszony z izolatora zaczerwiony plaster doświadczalny o standardowych komórkach. Plaster ten był znakowany. Matka postawała w izolatorze do którego był wkładany pusty plaster doświadczalny o małych komórkach. Matka była izolowana na tym plastrze przez kolejne 24 godziny, celem złożenia jaj. Po tym czasie z gniazda był usuwany izolator wraz z plastrzem doświadczalnym o małych komórkach i matką oraz wyjęty wcześniej z izolatora plaster doświadczalny o standardowych komórkach. W wolnym miejscu powstałym w gnieździe był umieszczany izolator mieszczący dwa plastry do którego były wkładane obydwie plastry eksperymentalne. Matka była wpuszczana do gniada a izolator zamykany, aby matka do niego nie weszła i nie złożyła jaj. Kolejność umieszczania plastrów doświadczalnych w izolatorze, w których matka składała jaja nie była przypadkowa. Plaster doświadczalny o małych komórkach umieszczany był dobę później ponieważ czerw wychowywany w plastrach o małych komórkach zwykle rozwija się około doby krócej od tego wychowanego w plastrach o standardowych komórkach. To umożliwiło uzyskanie imago w tym samym dniu, przez co robotnice wykorzystywane w doświadczeniu były w zbliżonym wieku. W żadnym z plastrów eksperymentalnych nie był wcześniej wychowywany czerw.

Każdy plaster eksperymentalny, w którym były wychowywane robotnice, z jednej strony był fotografowany w centralnej części każdej jego połowy. Na każdej z połówek plastra zmierzono szerokość 10 sąsiednich komórek stykających się pionowymi ściankami bocznymi, zgodnie z procedurą zastosowaną w Pracy 1 (Praca 1., ryc. 1.). W każdym roku (2019, 2020, 2021), w każdym z rodzajów plastrów eksperymentalnych (o małych i o standardowych komórkach) zmierzono po 100 komórek (5 plastrów x 2 pomiary po 10 komórek na każdym plastrze).

Po 20 dniach od zamknięcia matki w izolatorze na plastrze eksperymentalnym o standardowych komórkach każdy z plastrów eksperymentalnych był umieszczany w oddzielnym izolatorze wykonanym z siatki i umieszczany w cieplarni, gdzie pozostawały do wygryzienia robotnic.

Z puli robotnic wygryzionych z każdego plastra eksperymentalnego, z każdej z pięciu rodzin wychowujących, zostało oznakowane po około 1500 pszczoł (marker POSCA PC-3M). Robotnice wychowane w plastrach eksperymentalnych o małych komórkach (**RBMK**) były znakowane innym kolorem niż te wychowane w plastrach eksperymentalnych o standardowych komórkach (**RBSK**). Oznakowane robotnice były wpuszczane do pięciu rodzin utrzymywanych w ulach odkładowych Dadanta mieszczących 6 plastrów. Rodziny te miały zbliżoną siłę i strukturę, w każdej była czerwiała matka i 5 plastrów z czerwem w różnym wieku oraz jeden plaster z pokarmem - miód i pierzga. Matki w tych rodzinach były siostrami w tym samym wieku. Robotnice wychowane z każdej z rodzin wychowujących trafiły do osobnej rodziny. Rodziny utrzymywane na 6 plastrach wykorzystano, ponieważ łatwiej było z nich pozyskiwać oznakowane robotnice.

4.2.2. Pozyskanie hemolimfy i ocena aktywności protez i ich inhibitorów w hemolimfie pszczół

W 7., 14. i 21. dniu po oznakowaniu pszczół, losowo wybierano robotnice **RB^{MK}** (wychowane w plastrach eksperymentalnych o małych komórkach) i robotnice **RB^{SK}** (wychowane w plastrach eksperymentalnych o standardowych komórkach) z każdej z pięciu rodzin utrzymywanych na 6 plastrach. Od każdej robotnicy pobrano hemolimfę (Borsuk i in., 2017). Jedna próba zawierała hemolimfę pobraną od pięciu pszczół. Hemolimfę otrzymaną z każdej grupy pięciu robotnic umieszczano w oddzielnej probówce Eppendorfa (0,5 ml) wypełnionej 150 µl 0,6% NaCl, umieszczonej na bloku chłodzącym, aby zapobiec melanizacji. Hemolimfę od jednodniowych robotnic pobrano w dniu znakowania. Liczbę prób hemolimfy w kolejnych latach przedstawia tabela 1. Natychmiast po pobraniu hemolimfy próby zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C. Stężenie białka ogólnego badano za pomocą metody Lowryego i in. (1951) zmodyfikowanej przez Schacterle i Pollacka (1973). Aktywność proteaz kwasowych (pH 2,4), obojętnych (pH 7,0) i zasadowych (pH 11,2) w hemolimfie analizowano metodą Ansona (1938) zmodyfikowaną przez Strachecką i in. (2011). Aktywność inhibitorów proteaz oznaczono metodą Lee i Lin (1995).

Tabela 1. Liczba prób hemolimfy w poszczególnych grupach wiekowych robotnic (1 dzień, 7 dni, 14 dni, i 21 dni) w trzech kolejnych latach (Praca 2., tab. 1.)

ROK	LICZBA PRÓB							
	1 DZIEŃ		7 DNI		14 DNI		21 DNI	
	RB^{MK}	RB^{SK}	RB^{MK}	RB^{SK}	RB^{MK}	RB^{SK}	RB^{MK}	RB^{SK}
2019	25	25	25	25	20	20	20	20
2020	10	10	20	20	20	20	20	20
2021	10	10	20	20	20	20	20	20

RB^{MK} – robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach; **RB^{SK}** - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach

4.2.3. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano programu Statistica, wersja 13.3 (2017) dla Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA.

Rozkład danych analizowano testem Shapiro-Wilka. Wpływ roku na poszczególne parametry hemolimfy, oddzielnie dla **RB^{MK}** i **RB^{SK}** oceniano testem Kruskal-Wallisa. Wpływ wieku na poszczególne parametry hemolimfy w każdym z lat trzech lat, oddzielnie dla **RB^{MK}** i **RB^{SK}**, oceniano testem Kruskala-Wallisa.

Stężenia białka ogólnego i poziom aktywności poszczególnych proteaz i ich inhibitorów w hemolimfie, w każdym z trzech lat (2019, 2020, 2021), wewnątrz każdej z grup wiekowych (1 dzień, 7 dni, 14 dni i 21 dni) między **RB^{MK}** i **RB^{SK}** dla danych o rozkładzie normalnym porównano testem t Studenta dla prób zależnych, a dla danych które nie miały rozkładu normalnego porównano testem kolejności par Wilcoxona.

Szerokość komórek plastrów eksperymentalnych o małych komórkach z szerokością komórek plastrów eksperymentalnych o standardowych komórkach, w poszczególnych latach (2019, n = 100; 2020, n = 100; 2021, n = 100) porównano testem Manna-Whitneya.

4.3. Praca 3.

4.3.1. Efektywność zachowania higienicznego

W latach 2020 i 2021 wytypowano po 8 rodzin utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych komórkach, posiadających zbliżoną siłę i strukturę. Schemat rozmieszczenia plastrów w gnieździe rodzin przedstawia rycina 1.

W drugiej połowie lipca, w czasie bezpożytkowym, w każdej z rodzin, w jednym z **pMK** (plaster o małych komórkach) i w jednym z **pSK** (plaster o standardowych komórkach) przekłuwano po 100 komórek z poczwarkami. Plastry z przekłutym czerwem ustawiano obok siebie, aby wykluczyć wpływ różnej ich lokalizacji w gnieździe na szybkość usuwania martwego czerwia. Poczwarki przekłuwano w czasie gdy ich ciało miało barwę białą, a oczy fioletową (15-17 dzień rozwoju preimaginalnego). W sezonie 2020 każdej z rodzin test powtórzono trzy razy, a w sezonie 2021 cztery razy. Do przekłuwania wykorzystano „szczotkę” wykonaną ze 100 szpilek entomologicznych (średnica = 0,45 mm), oddzielną do **pMK** i oddzielną do **pSK**. Przekłuty czerw był fotografowany po 24 godzinach, a szybkość jego usuwania była oceniana przy pomocy cyfrowej analizy obrazu MultiScanBase v. 14.02 (opcja zliczanie punktów) dostarczonego przez Computer Scanning System II, Warszawa. Liczono komórki: nieodsklepienie, całkowicie wyczyszczone.

Każdy plaster, w którym przekłuwano czerw zaznaczono, a po wygryzieniu z niego czerwem, gdy był w nim czerw otwarty fotografowano komórki w centrum każdej ćwiartki plastra, z jednej jego strony. Następnie w każdej ćwiartce zmierzono szerokość 10 sąsiednich komórek stykających się pionowymi ściankami bocznymi, zgodnie z procedurą zastosowaną w Pracy 1 (Praca 1., ryc. 1.).

4.3.2. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano programu Statistica, wersja 13.3 (2017) dla Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA.

Rozkład danych analizowano testem Shapiro-Wilka. Wpływ roku wewnątrz rodzaju plastra (**pMK** i **pSK**) dla komórek nieodsklepionych i całkowicie wyczyszczonych oceniano testem Manna-Whitneya. Liczbę komórek nieodsklepionych i całkowicie wyczyszczonych oraz szerokość komórek między **pMK** (2020 n = 320, 2021 n = 320) a **pSK** (2020 n = 320, 2021 n = 320) porównano testem kolejności par Wilcoxon.

5. Wyniki

5.1. Praca 1.

Szerokość komórek **psMK** (4,93 mm, SD = 0,02) była istotnie mniejsza ($p \leq 0,001$) niż w **psSK** (5,59 mm, SD = 0,03).

5.1.1. Pomiary liniowe głowy, tułowia, języczka i wartość współczynnika wypełnienia komórki

W grupach robotnic odpowiadających kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej największą szerokość i wysokość głowy oraz szerokość i długość tułowia miały robotnice **psSK** + **rSK**. Natomiast najdłuższy języczek i najwyższe wartości współczynnika wypełnienia komórki miały robotnice wychowane w **psMK** + **rSK** (ryc. 2.).

Typ rodziny wychowującej (**rMK** / **rSK**) istotnie wpływał na wartości wszystkich pomiarów liniowych: głowy, tułowia i języczka (Praca 1. tab. 3.). Istotnie wyższe wartości tych cech były zawsze u robotnic wychowanych w **rSK**. Natomiast typ plastra (**psMK** / **psSK**) istotnie wpływał na szerokość i wysokość głowy, szerokość tułowia i wartość współczynnika wypełnienia komórki. Większą szerokość i wysokość głowy oraz szerokość tułowia miały robotnice wychowane w **psSK**, a wartość współczynnika wypełnienia komórki wychowane w **psMK**. Przy wysokości głowy, długości języczka i wartości współczynnika wypełnienia komórki wpływ plastra istotnie zależał od rodziny wychowującej (interakcja plaster x rodzina odpowiednio $p = 0,000$, $p = 0,000$ i $p = 0,041$).

5.1.2. Pomiary liniowe skrzydła pierwszej pary i wartość indeksu kubitalnego

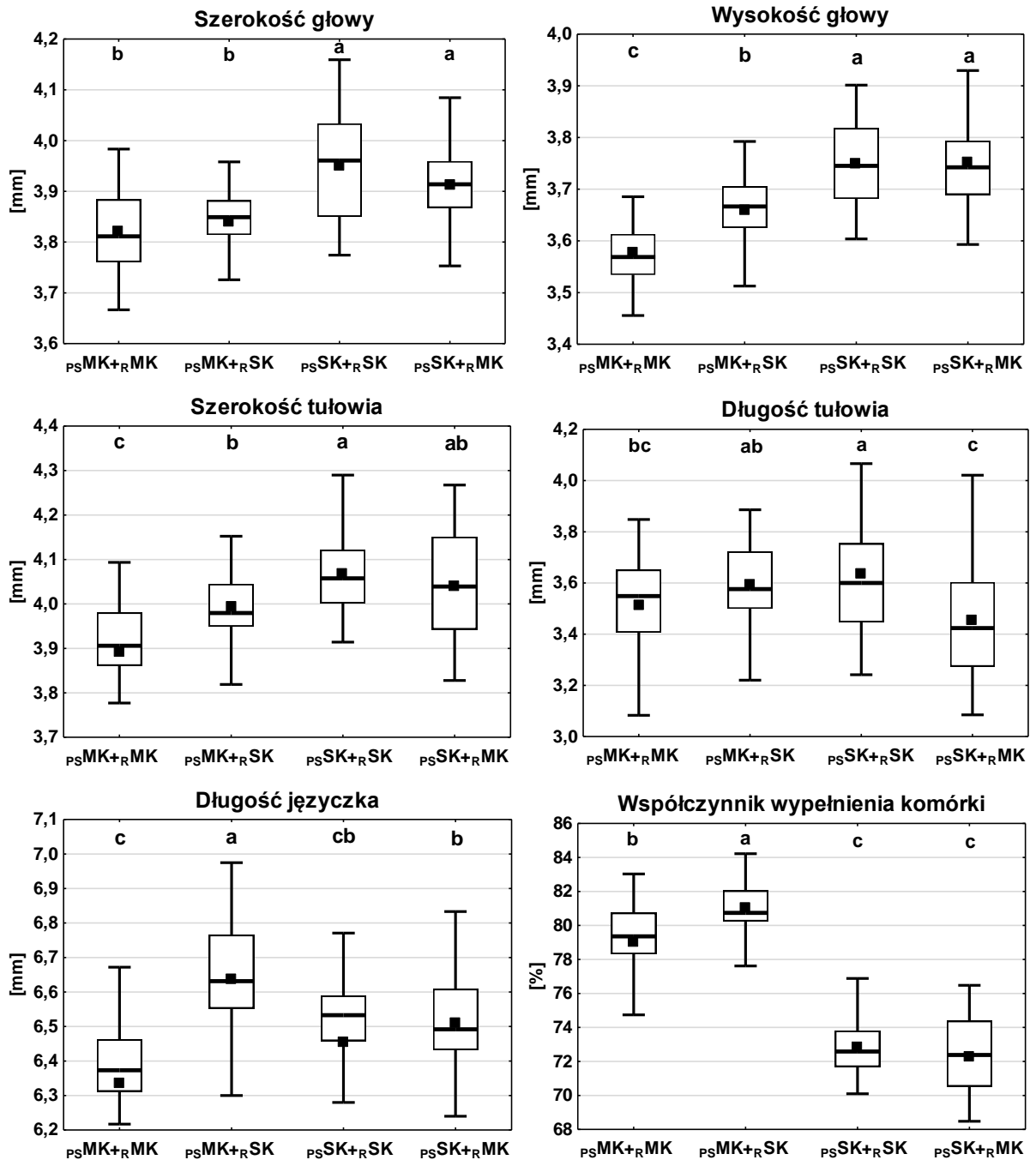
W grupach robotnic odpowiadających kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej najdłuższe skrzydło oraz najdłuższy odcinek b żyłki kubitalnej miały robotnice wychowane w **psSK** + **rSK** (ryc. 3.). Długość odcinka a żyłki kubitalnej i wartość indeksu kubitalnego była zbliżona.

Zarówno typ rodziny wychowującej jak i typ plastra istotnie wpływał na długość skrzydła i długość odcinka b żyłki kubitalnej (Praca 1. tab. 4.). Istotnie wyższe wartości tych cech były zawsze u robotnic wychowanych w **rSK** i **psSK**. Jedynie przy długości skrzydła wpływ plastra istotnie zależał od rodziny wychowującej (interakcja plaster x rodzina odpowiednio $p = 0,000$).

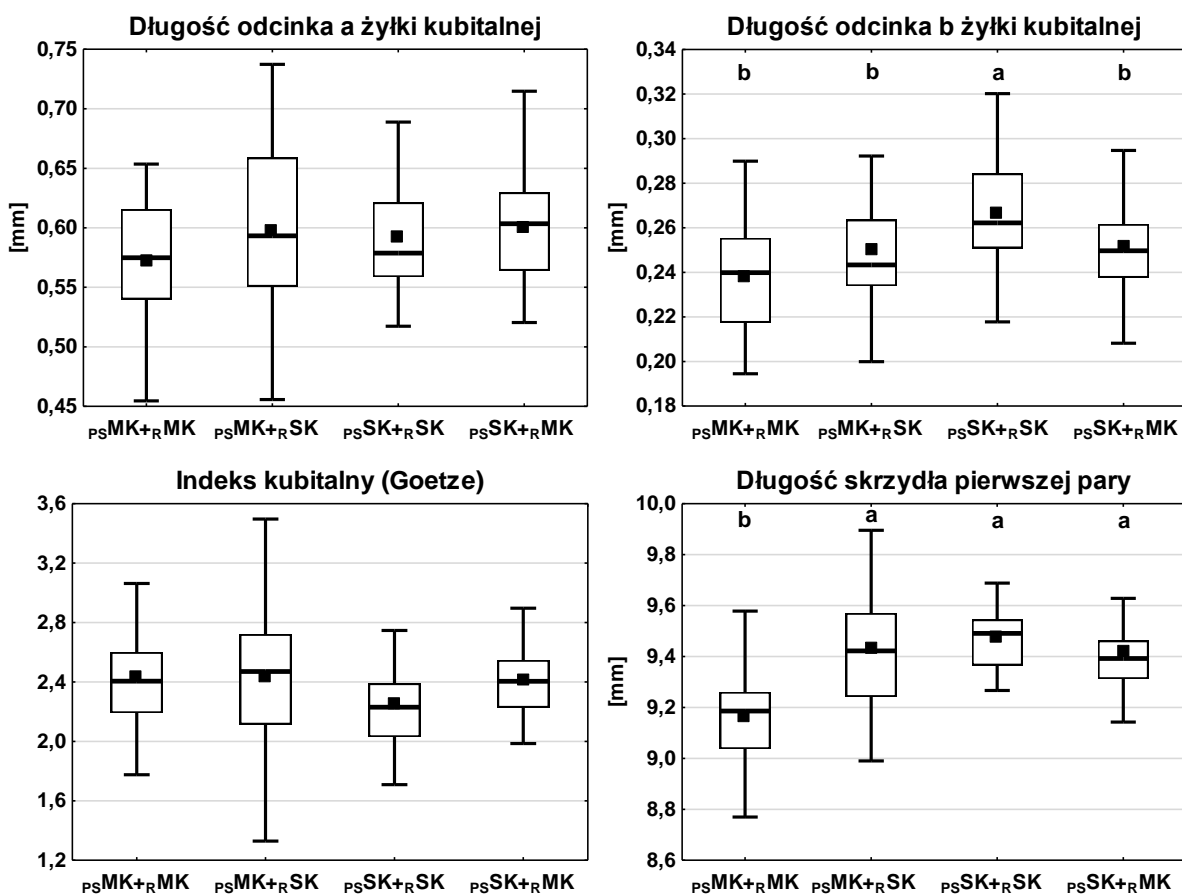
5.1.3. Pomiary liniowe 3. i 4. tergitu odwłokowego

W grupach robotnic odpowiadających kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej szerokość 3. i 4. tergitu oraz suma ich szerokości była największa u robotnic wychowanych w **psSK** + **rSK** i **psSK** + **rMK** (ryc. 4.).

Typ rodziny wychowującej istotnie wpływał tylko na szerokość 3. tergitu, która była większa u robotnic wychowanych w **rSK** (Praca 1. tab. 5.). Typ plastra istotnie wpływał na szerokość 3. i 4. tergitu i sumę ich szerokości. Istotnie wyższe wartości tych cech były u robotnic wychowanych w **psSK**. Jedynie w przypadku szerokości 4. tergitu wpływ plastra istotnie zależał od rodziny wychowującej (interakcja plaster x rodzina $p = 0,008$) (Praca 1. tab. 5.).



Rycina 2. Wartości pomiarów liniowych głowy, tułowia i języczka oraz współczynnika wypełnienia komórki (Praca 1., ryc. 4.). **PSMK + R MK** - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; **PSMK + R SK** - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; **PS SK + R SK** - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; **PS SK + R MK** - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; pudełka oznaczają dane zawarte między pierwszym a trzecim kwartylem; czarna linia oznacza medianę; czarny kwadrat oznacza wartość średnią; wąsy przedstawiają zakres danych, wartość minimalną i maksymalną; **a, b, c** - różnice między poszczególnymi kombinacjami typu plastra z typem rodziny wychowującej są istotne przy $p \leq 0,05$

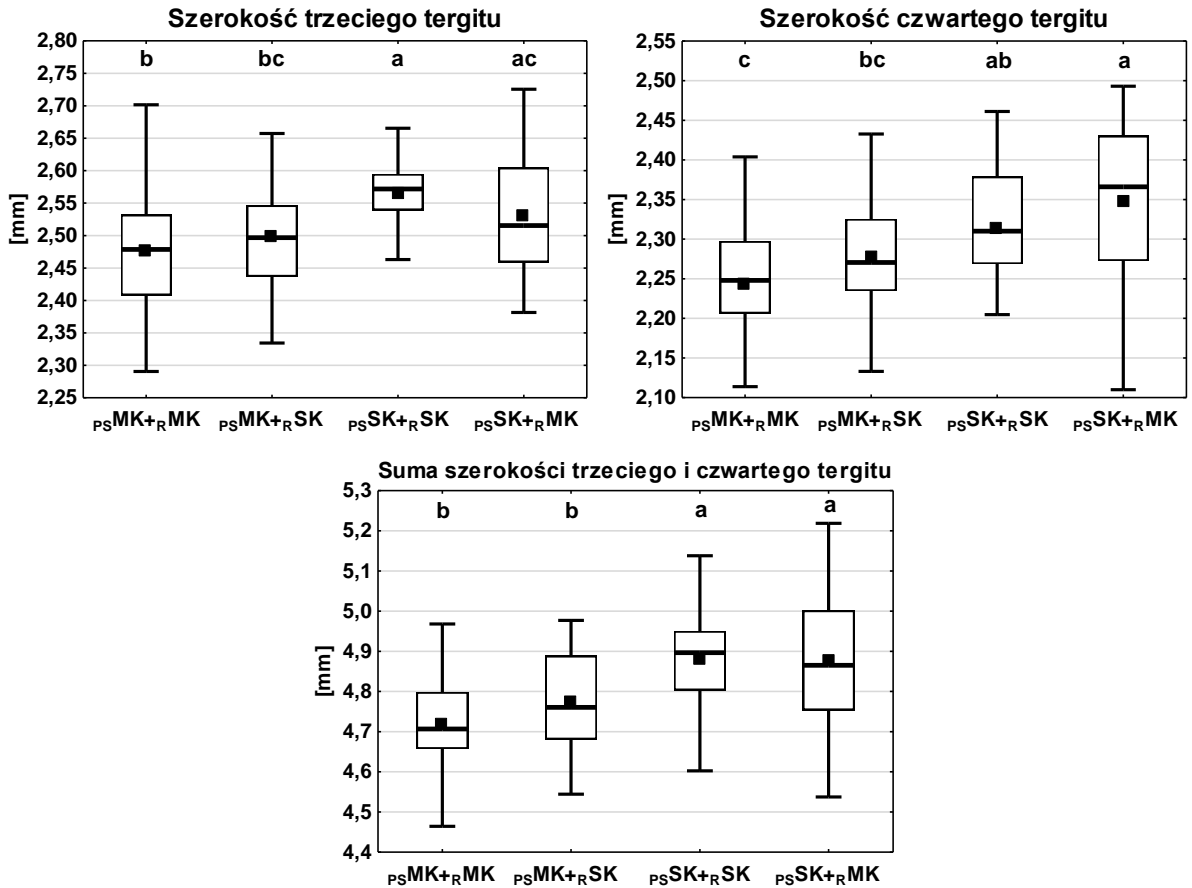


Rycina 3. Wartości pomiarów liniowych odcinka a i b żyłki kubitalnej, indeksu kubitalnego i skrzydła pierwszej pary (Praca 1., ryc. 5.). $psMK + rMK$ - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; $psMK + rSK$ - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; $psSK + rSK$ - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; $psSK + rMK$ - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; pudełka oznaczają dane zawarte między pierwszym a trzecim kwartylem; czarna linia oznacza medianę; czarny kwadrat oznacza wartość średnią; wąsy przedstawiają zakres danych, wartość minimalną i maksymalną; **a, b** - różnice między poszczególnymi kombinacjami typu plastra z typem rodziny wychowującej są istotne przy $p \leq 0,05$

5.1.4. Procentowe zmiany szerokości komórek plastra, liniowych cech morfometrycznych oraz współczynnika wypełnienia komórki

Zakres zmniejszenia zdecydowanej większości liniowych cech morfometrycznych spowodowany wychowem w plastrach o małych komórkach (grupa $psMK + rMK$ i $psMK + rSK$) był znacznie mniejszy niż zmniejszenie szerokości komórek plastra i wahał się w granicach od 0,5% dla długości skrzydła do 4,5% dla wysokości głowy (tab. 2.). Większy zakres zmian dotyczył długości odcinaka b żyłki kubitalnej (odpowiednio -11,1% i -7,4%). Zmniejszenie długości odcinaka b żyłki kubitalnej spowodowało dość wyraźny wzrost wartości indeksu kubitalnego (odpowiednio 8,0% i 8,4%). W grupie $psMK + rMK$ tylko nieznacznie zmniejszyła się długość języczka (1,9%), a w grupie $psMK + rSK$ wzrosła o 2,9%.

Niezależnie od rodziny wychowującej, w skutek zmniejszenia szerokości komórek plastrów u robotnic wychowanych w $PSMK$ w stosunku do wychowanych PSK znacznie wzrósł współczynnik wypełnienia komórki, o 8,5% w grupie $PSMK + RSK$ i o 11,3% w grupie $PSMK + RSK$.



Rycina 4. Wartości pomiarów liniowych trzeciego i czwartego tergitu odwłokowego (Praca 1., ryc. 6.). $PSMK + RSMK$ - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; $PSMK + RSK$ - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; $PSK + RSK$ - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach; $PSK + RSMK$ - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o małych komórkach; pudełka oznaczają dane zawarte między pierwszym a trzecim kwartylem; czarna linia oznacza medianę; czarny kwadrat oznacza wartość średnią; wąsy przedstawiają zakres danych, wartość minimalną i maksymalną; **a, b, c** - różnice między poszczególnymi kombinacjami typu plastra z typem rodziny wychowującej są istotne przy $p \leq 0,05$

Tabela 2. Procentowe zmiany szerokości komórek plastra, współczynnika wypełnienia komórki i cech morfometrycznych w trzech grupach robotnic przy różnej kombinacji typu plastra i typu rodziny wychowującej, w porównaniu do robotnic wychowanych w plastrach o standardowych komórkach w rodzinie utrzymywanej na plastrach o standardowych komórkach ($_{PS}SK + _R SK$)

CECHY	GRUPY		
	$_{PS}MK + _R MK$	$_{PS}MK + _R SK$	$_{PS}SK + _R MK$
Szerokość komórki	-11,8	-11,8	0,0
Szerokość głowy	-3.3	-2.8	-1.0
Wysokość głowy	-4.5	-2.4	0.0
Szerokość tułowia	-4.4	-2.0	-0.7
Długość tułowia	-3.3	-1.1	-4.7
Współczynnik wypełnienia komórki	+8.5	+11.3	-0.7
Długość języczka	-1.9	+2.9	+0.9
Długość skrzydła	-3.4	-0.5	-0.6
Długość odcinak a żyłki kubitalnej	-3.4	+1.7	+1.7
Długość odcinak b żyłki kubitalnej	-11.1	-7.4	-7.5
Indeks kubitalny	+8.0	+8.4	+7.1
Szerokość 3. tergitu	-3.5	-2.7	-1.6
Szerokość 4. tergitu	-3.0	-1.3	+1.7
Suma szerokości 3. i 4. tergitu	-3.3	-2.3	0.0

$_{PS}MK + _R MK$ – robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinach utrzymywanych na plastrach o małych komórkach; $_{PS}MK + _R SK$ - robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach w rodzinach utrzymywanych na plastrach o standardowych komórkach; $_{PS}SK + _R MK$ - robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach w rodzinach utrzymywanych na plastrach o małych komórkach

5.2. Praca 2.

5.2.1. Szerokość komórek plastrów

Szerokość komórek w plastrach eksperymentalnych, zarówno w tych o małych jak i o standardowych komórkach nie różniła się między latami (odpowiednio: $H = 2,935$, $df = 2$, $p = 0,230$; $H = 4,409$, $df = 2$, $p = 0,110$).

Szerokość komórek w plastrach eksperymentalnych o małych komórkach była istotnie mniejsza niż w plastrach eksperymentalnych o standardowych komórkach (w 2019 $p \leq 0,01$; w 2020 $p \leq 0,01$; w 2021 $p \leq 0,01$). Średnia szerokość komórek w plastrach eksperymentalnych o małych komórkach wynosiła w: 2019 - 4,97 mm ($SD = 0,051$), 2020 - 4,96 mm ($SD = 0,037$), 2021 - 4,95 mm ($SD = 0,038$). Średnia szerokość komórek w plastrach eksperymentalnych o standardowych komórkach wynosiła w: 2019 - 5,57 mm ($SD = 0,056$), 2020 - 5,56 mm ($SD = 0,052$), 2021 - 5,57 mm ($SD = 0,054$).

5.2.2. Warunki pogodowe

Warunki pogodowe w kolejnych latach badań były zbliżone (Praca 2., tab. 2.). Jedynie sumy opadów w 2019 roku były znacznie mniejsze niż w kolejnych latach, a w okresie poprzedzającym doświadczenie panowała długa susza.

5.2.3. Stężenie białka oraz aktywność proteaz i inhibitorów proteaz

Zarówno u robotnic **RBMK**, jak i **RBSK** rok (2019, 2020 i 2021) miał istotny wpływ na wszystkie parametry hemolimfy (Praca 2., tab. 3.). Także wiek (1 dzień, 7 dni, 14 dni i 21 dni) we wszystkich latach istotnie wpływał na wszystkie parametry hemolimfy (Praca 2., tab. 3.).

We wszystkich latach (2019, 2020 i 2021) stężenie białka u jednodniowych pszczoł było zawsze istotnie wyższe ($p \leq 0,05$) u robotnic **RBMK** niż u **RBSK** (tab. 3., Praca 2., ryc. 1.). W przypadku aktywności proteaz i ich inhibitorów było odwrotnie, gdyż była ona zawsze wyższa u robotnic **RBSK** niż u **RBMK**, a różnica była zwykle istotna ($p \leq 0,05$) (tab. 3., Praca 2., ryc. 2.-7.).

W pozostałych grupach wiekowych (7, 14 i 21 dni), w latach 2020 i 2021 tendencje dla stężenia białka (tab. 3., Praca 2., ryc. 1.) oraz aktywności proteaz (tab. 3., Praca 2., ryc. 2.-4.) i ich inhibitorów (tab. 3., Praca 2., ryc. 5.-7.) zawsze były niemal identyczne. Niezależnie od wieku robotnic (7, 14 i 21 dni) stężenie białka było zawsze istotnie wyższe ($p \leq 0,05$) u **RBSK** niż u **RBMK** (tab. 3., Praca 2., ryc. 1.). Natomiast w przypadku aktywności proteaz i ich inhibitorów było zwykle odwrotnie, istotnie wyższa ($p \leq 0,05$) były one u **RBMK** niż u **RBSK** (tab. 3., Praca 2., ryc. 2.-7.). Wyjątkiem była aktywność inhibitorów proteaz obojętnych u robotnic w wieku 21 dni w 2020 (tab. 3., Praca 2., ryc. 6.) i inhibitorów proteaz zasadowych u robotnic w wieku 21 dni w 2020 i 2021 (tab. 3., Praca 2., ryc. 7.), które były istotnie wyższe ($p \leq 0,05$) u **RBSK** niż u **RBMK**.

W 2019 tendencje u 7, 14 i 21-dniowych robotnic znacznie odbiegały od tych w 2020 i 2021 (tab. 3., Praca 2., ryc. 1.-7.). Wartości poszczególnych parametrów hemolimfy wahały się znacznie między grupami wiekowymi, ponadto w jednej grupie wiekowej były one wyższe u **RBMK**, w innej u **RBSK**, lub też **RBMK** nie różniły się istotnie od **RBSK**.

W 2020 wraz z wiekiem (7, 14 i 21 dni) aktywności poszczególnych proteaz wzrastały u **RBMK**, a u **RBSK** utrzymywały się na zbliżonym poziomie (Praca 2., ryc. 2.-4.). W 2021 zarówno u robotnic **RBSK** jak i **RBMK**, niezależnie od wieku utrzymywały się na zbliżonym poziomie (Praca 2., ryc. 2.-4.). Natomiast przy inhibitorach proteaz tak jednorodnych tendencji nie było (Praca 2., ryc. 5.-7.).

Tabela 3. Zmiany stężenia białka ogólnego i aktywności proteaz i ich inhibitorów u robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach (**RBMK**) względem robotnic wychowanych w plastrach standardowych komórkach (**RBSK**)

CECHA	2019				2020				2021			
	1 d	7 d	14 d	21 d	1 d	7 d	14 d	21 d	1 d	7 d	14 d	21 d
Stężenie białka ogólnego	↑	n. i.	n. i.	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
Aktywność proteaz kwaśnych	↓	n. i.	n. i.	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Aktywność proteaz obojętnych	↓	n. i.	n. i.	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Aktywność proteaz zasadowych	↓	n. i.	n. i.	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych	↓	↓	n. i.	↓	n. i.	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Aktywność inhibitorów proteaz obojętnych	↓	n. i.	n. i.	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑
Aktywność inhibitorów proteaz zasadowych	↓	↓	n. i.	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓

↑ - wartość cechy jest statystycznie istotnie wyższa u robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach (**RBMK**) niż u robotnic wychowanych w plastrach standardowych komórkach (**RBSK**); ↓ - wartość cechy jest statystycznie istotnie niższa u robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach (**RBMK**) niż u robotnic wychowanych w plastrach standardowych komórkach (**RBSK**); n. i. - różnice są nieistotne statystycznie.

5.3. Praca 3.

5.3.1. Szerokość komórek plastrów

Szerokość komórek w **pMK** była istotnie mniejsza (2020 $p \leq 0,01$; 2021 $p \leq 0,01$) niż **pSK**. Średnia szerokość komórek w **pMK** w 2020 wynosiła 4,97 mm (SD = 0,044), a w 2021 - 4,96 mm (SD = 0,042). Średnia szerokość komórek w **pSK** w 2020 wynosiła 5,57 mm (SD = 0,050), a w 2021 5,56 mm (SD = 0,052).

5.3.2. Efektywność zachowania higienicznego

Rok istotnie wpływał na efektywność zachowania higienicznego. Zarówno w plastrach **pMK** jak i **pSK** w 2020 roku liczba komórek nieodsklepionych była większa niż w 2021 (**pMK** - $U = 234,5$, $p \leq 0,01$; **pSK** - $U = 88,5$, $p \leq 0,01$; test Manna-Whitneya), podczas gdy istotnie większą liczbę całkowicie wyczyszczonych komórek odnotowano w roku 2020 (**pMK** - $U = 62,5$, $p \leq 0,01$; **pSK** - $U = 52,5$, $p \leq 0,01$, test Manna-Whitneya). Niezależnie od roku czerw w plastrach **pMK** był odsklepiany i usuwany istotnie efektywniej niż w plastrach **pSK** (liczba komórek nieodsklepionych $p \leq 0,01$ i komórki całkowicie wyczyszczonych $p \leq 0,01$) (Praca 3., ryc. 2.).

6. Dyskusja

6.1. Cechy morfometryczne

Zwiększając i ujednolicając szerokość komórek plastra pszczelego w ubiegłym stuleciu, zakładano, że proporcjonalnie do zwiększenia komórek wzrośnie też wielkość ciała robotnic (Goetze, 1933; Grout 1937). Także Ruttner (1988) podaje, że przyrost rozmiarów ciała robotnic jest proporcjonalny od zwiększenia szerokości komórki, w której zostały one wychowane. Natomiast Erickson i wsp. (1990) stwierdzili, że zmiana szerokości komórek plastra umożliwia zmianę wielkości ciała pszczół bez zabiegów hodowlanych. Z badań będących przedmiotem przedkładanej rozprawy wynika, że zakres zmian większości liniowych cech morfometrycznych, wahał się w granicach od -0,5% do 3,4%. Zdecydowana większość wartości tych cech mieściła w zakresie zmian sezonowych wynoszącego od 2 do 3% (Ruttner, 1992). Wartość cech uważanych przez Ruttner (1992) za miarę wielkości ciała pszczół, czyli długość skrzydła pierwszej pary i suma szerokości 3. i 4. tergitu wahała się od -0,5% do -3,4% w przypadku skrzydła i od -2,3% do -3,3% w przypadku sumy tergitów. Fakt znacznej odporności wymienionych wyżej cech na zmianę szerokość komórek plastra potwierdza ich dużą przydatność do oceny rozmiarów ciała robotnic, oraz w ocenie przynależności podgatunkowej pszczoły miodnej. W równie małym zakresie wahała się długość języzka (od -1,9% do 2,9%), cecha ta jest ważna gospodarczo ze względu na możliwość pobierania nektaru z kwiatów o długiej i cienkiej rurce kwiatowej z głęboko położonymi nektarnikami.

Podobne wyniki uzyskali McMullan i Brown (2006) oraz Seeley i Griffin (2011), a także Michailoff (1927), który w latach dwudziestych ubiegłego stulecia porównywał robotnice wychowane w komórkach robotnic do robotnic wychowanych w komórkach trutowych. Wychów w komórce trutowej, szerszej od komórki robotnic o 39% spowodował zwiększenie długości języzka o 5%, sumy szerokości 3. i 4. tergitu o 4,37% i długości skrzydła pierwszej pary tylko o 2,69%. Zatem przy znacznie większej zmianie szerokości komórek (o 39%) niż ta w prezentowanych badaniach (11,8%; mała *versus* standardowa komórka), zakres zmian cech morfometrycznych był tylko nieznacznie większy. W prezentowanych badaniach, w grupie **PsMK + R₁MK** względem grupy **PsSK + R₁SK** długość języzka była mniejsza o 1,9%, suma szerokości 3. i 4. tergitu o 3,3% a długość skrzydła pierwszej pary o 3,4%.

Wyniki prezentowanych badań, podobne jak wyniki McMullan i Brown (2006) oraz Seeleya i Griffina (2011) wskazują na względnie stałą wielkość ciała pszczoły, przy mniejszym niż dotychczas zakładano wpływie na nią szerokości komórek plastra (Ruttner 1988). Prowadzi to do spostrzeżenia, że zmniejszenie rozmiarów ciała mniejsze niż zmniejszenie rozmiarów komórki, skutkuje zmniejszeniem wolnej przestrzeni między poczwarką a ścianami komórki. W konsekwencji komórka jest szczelniej wypełniana przez poczwarkę, co może ograniczać reprodukcję *V. destructor*. Mechanizm ten występuje u pszczół afrykanizowanych (Piccirillo i De Jong, 2003) i pszczół afrykańskich *A. m. capensis* (Martin i Kryger, 2002), naturalnie budujących plastry o małych komórkach. Zdaniem Martina i Krygera (2002), szczelniejsze wypełnienie komórek przez poczwarki powoduje zwiększoną śmiertelność samców *V. destructor* na skutek trudności z przemieszczaniem się

w komórce, które może utrudnić tułów poczwarki szczelnie wypełniający światło komórki. Także ruchy poczwarki w ciasnej przestrzeni komórki mogą sprzyjać uszkodzeniu form rozwojowych pasożyta (Donze i Guerin, 1994), które wydają się na to bardzo podatne z powodu niewysyczonego chityną oskórka.

W prezentowanych badaniach na wartość współczynnika wypełnienia komórki istotnie wpływała zarówno szerokość komórek plastra, w których wychowywany był czerw jak również szerokość komórek pozostałych plastrów w gnieździe, a ściślej rozmiary ciała pszczoł karmicielek w rodzinie wychowującej jako konsekwencja szerokość komórek plastrów, w których były wychowywane karmicielki. Na tej podstawie można założyć, że rozmiary części ciała robotnicy wpływają na jej cechy fizjologiczne. Potwierdzeniem tego jest fakt, że wartości zdecydowanej większości cech morfometrycznych były większe u robotnic wychowanych w rodzinie **R_{SK}** niż **R_{MK}**, co było szczególnie widoczne przy kombinacji **ps_{SK}** + **R_{SK}** i skutkowało wyższą wartością współczynnika wypełnienia komórki (81%) niż te dotychczas spotkane w piśmiennictwie. Na rozmiary ciała miało zapewne wpływ obfitsze karmienie larw przez robotnice z **R_{SK}**, u których większa głowa umożliwia lepszy rozwój gruczołów gardzielowych, a co za tym idzie ich wydajność. Ten wynik potwierdza opinię, że robotnice wychowane w większych komórkach lepiej karmią larwy (Willem i in., 2006). Niewykluczone, że taki mechanizm funkcjonuje także w rodzinach o naturalnym gnieździe, w którym zmienność komórek plastra w których wychowywane są robotnice (4,17 – 6,86 mm) (Maggi i in., 2010), powoduje, że w okresie maksymalnego rozwoju, w rodzinie równocześnie funkcjonują robotnice wychowane w komórkach o różnej szerokości, a co za tym idzie różniące się rozmiarami ciała. Zaletą takiego naturalnego układu gniazda może być wykazana w prezentowanych badaniach najwyższa wartość współczynnika wypełnienia komórki przy wychowie robotnic w **ps_{SK}** + **R_{SK}**. Tak zwiększony współczynnik wypełnienia komórki będący następstwem umieszczenie w gnieździe tej samej rodziny zarówno plastrów o małych i o standardowych komórkach może być jednym z czynników ograniczającym reprodukcję *V. destructor*, co zdają się potwierdzać wyniki badań Maggi i in. (2010).

6.2. Aktywność systemu proteolitycznego

Stężenie białka ogólnego w hemolimfie spada wraz z wiekiem robotnic (Łoś i Strachecka, 2018) i podejmowaniem przez nie różnych prac (karmicielka albo zbieraczka) (Wilson i in., 2008). Najwyższe stężenie białka ogólnego jest u larw i poczwarek, mniejsze u karmicielek, a najmniejsze u zbieraczek (Wilson i in., 2008, Eckholm i in., 2015). W prezentowanych badaniach szerokość komórek plastra, w którym były wychowywane robotnice (mała albo standardowa) miała istotny wpływ na stężenie białka ogólnego u 1 dniowych robotnic. U **RB_{MK}**, we wszystkich latach była ona istotnie wyższa (zwykle $p \leq 0.01$) niż u **RB_{SK}**. Być może jest to efekt karmienia larw wychowywanych w małych komórkach przez robotnice wychowane w standardowych, gdyż robotnice o większych rozmiarach ciała są lepszymi karmicielkami niż te o mniejszych rozmiarach ciała (Willem i in., 2006). Pośrednio potwierdzają to badania wartości cech morfometrycznych będące przedmiotem przedkładanej rozprawy (patrz 6. Dyskusja, 6.1. Cechy morfometryczne oraz Praca 1.), z których wynika, że robotnice wychowane w standardowych komórkach mają istotnie większą głowę (szerokość i wysokość) od tych wychowanych w małych komórkach,

co może mieć związek z wielkością, a co za tym idzie wydajnością ich gruczołów gardzielowych. Ta hipoteza jest warta wyjaśnienia. Innym wyjaśnieniem istotnie wyższego stężenia białka ogólnego u 1-dniowych **RBMK**, może być wcześniejsza aktywacja systemu proteolitycznego u **RBSK** niż u **RBMK**, zapewne w końcowym etapie stadium poczwarki, która spowodowała zużycie części białka. Za tą hipotezą przemawia wyższy poziom aktywności protez i ich inhibitorów w pierwszym dniu życia **RBSK**.

Tendencje przy stężeniu białka ogólnego u starszych robotnic (7, 14 i 21 dni) były odwrotne niż u 1-dniowych. Stężenie białka ogólnego było zawsze istotnie większe ($p \leq 0.01$) u **RBSK** niż u **RBMK** (rok 2020 i 2021), natomiast przy aktywności protez i ich inhibitorów było zwykle odwrotnie. Być może jest to skutek predyspozycji robotnic wychowany w plastrach różniących się szerokością komórek (mała lub standardowa) do podejmowania różnych prac w rodzinie. Wychodząc z wyników badań wykazujących, że zbieraczki mają mniejsze stężenie białka ogólnego niż karmicielki (Fluri i in., 1982; Crailsheim, 1986; Wilson i in., 2008; Eckholm i in., 2015) można przypuszczać, że robotnice **RBMK** częściej podejmują pracę jako zbieraczki, a **RBSK** częściej pracują w gnieździe np. jako karmicielki. Crailsheim (1986) twierdzi, że pszczoły karmicielki są wyposażone w sprawniejszy system trawienny niż zbieraczki, zapewne dlatego zarówno ich ciała (Crailsheim, i in., 1992) jak i hemolimfa (Crailsheim, 1986) zawierają więcej białka. Ponadto enzymy trawienne karmicielek działają w stałej temperaturze gniada panującej w jego części zajętej przez czerw, natomiast enzymy w odwłokach zbieraczek działają w różnych temperaturach, często niższych. Zbieraczki konsumują niewielkie ilości pyłku (białka) zależne wyłącznie od ich potrzeb, a stężenie białka i konsumpcja pyłku przez karmicielki zależy od równowagi azotowej w gnieździe (Crailsheim, i in., 1992). Cytowane wyżej publikacje (Wilson i in., 2008; Fluri i in., 1982; Crailsheim, 1986; Crailsheim, i in., 1992; Eckholm i in., 2015) wskazują zatem, że jednym ze wskaźników fizjologicznych pozwalających na odróżnienie zbieraczek od karmicielek jest stężenie białka ogólnego w hemolimfie.

Wyniki badań nad aktywnością układu proteolitycznego robotnic w roku 2019 często znacznie odbiegały od wyników w pozostałych dwóch latach. Nie było to zapewne skutkiem różnych warunków wychowu czerwiu w rodzinach, gdyż w pierwszym dniu życia robotnic tendencje we wszystkich latach były podobne. Różnice pojawiły się dopiero u starszych pszczoł (7, 14 i 21 dni). Wynika to albo z warunków panujących w rodzinach, do których poddano te robotnice po oznakowaniu lub jest konsekwencją warunków środowiskowych. Najprawdopodobniej było to spowodowane znacznym ograniczeniem aktywności lotnej zbieraczek jako konsekwencji upałów i dotkliwej suszy w roku 2019. Wpływ wielu czynników środowiska na pracę zbieraczek potwierdza Abou-Shaara (2014). W tym kontekście, aby zmniejszyć ryzyko wpływu na wyniki badań z pszczołą miodną, przypadkowych czynników jakie mogą zadziałać przy badaniach jednosezonowych wskazane jest przeprowadzenie badań w kilku kolejnych latach.

6.3. Efektywność zachowania higienicznego

Olszewski i in. (2014b) stwierdzili, że utrzymanie rodzin na plastrach o małych komórkach skutkuje nasileniem ich zachowania higienicznego w porównaniu do rodzin utrzymywanych na plastrach o standardowych komórkach. W prezentowanych badaniach w rodzinach utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych

komórkach, szerokość komórek plastrów, w których znajdował się czerw także istotnie wpływała na szybkość usuwania martwego czerw. Był on istotnie szybciej usuwany ze p_{MK} niż ze p_{SK} (liczba komórek nieodsklepionych $p \leq 0.01$ i komórek całkowicie wyczyszczonych $p \leq 0.01$). Przyczyną szybszego usuwania martwego czerw z p_{MK} może być większa koncentracja feromonów wewnątrz komórek, w powietrzu wypełniającym przestrzeń między poczwarką a ścianami komórki, która ułatwia robotnicom identyfikację martwego czerw. Większa koncentracja feromonów może wynikać z faktu, że mimo mniejszej o 8-12% szerokości małej komórki względem komórki standardowej, ciało pszczoły nie ulega zmniejszeniu proporcjonalnemu do zmniejszenia szerokości komórki, gdyż szerokość tułowia zmniejsza się tylko o 0,8-4,4% (McMullan i Brown, 2006; Seeley i Griffin, 2011; Praca 1. tab. 6.). Skutkiem jest szczelniejsze wypełnianie komórki przez poczwarkę, a co za tym idzie mniejsza objętość powietrza w wolnej przestrzeni między poczwarką a ścianami komórki. Przy podobnym poziomie wydzielania feromonów, mniejsza objętość powietrza wewnątrz komórek o małej szerokości będzie nimi bardziej wysycona. Dotychczas potwierdzono, że sygnały zapachowe ułatwiają wykrycie martwego i chorego czerw znajdującego się pod zasklepieniem (McAfee i in., 2018; Spivak i in., 2003). W czerw zabitym przez zamrożenie, β -ocimina oraz kwas oleinowy są silnymi induktorami zachowania higienicznego (McAfee i in., 2018), co prawdopodobnie ma również miejsce w przypadku czerw zabitego przez przekłucie. Sygnały zapachowe są wychwytywane przez czułki, a robotnice higieniczne są bardziej wrażliwe niż niehigieniczne (Masterman i in., 2001), zwłaszcza te zaangażowane w odsklepienie komórek i inicjowanie usuwania ich zawartości (Gramacho i in., 2003).

Niewykluczone, że w przedkładanej rozprawie na szybkość usuwania martwego czerw wpływa nie tylko szerokość komórek, w których było on wychowywany, lecz także obecność w rodzinie pszczoł wychowanych w małych komórkach. Słuszność tej hipotezy wymaga jednak weryfikacji. Lepsze predyspozycje robotnic wychowanych w plastrach o małych komórkach, do usuwania martwego czerw być może wynikają z warunków wychowu jakie stwarzają te plastry, innych niż plastry o standardowych komórkach. Wykazano, że warunki wychowy czerw wpływają na rozwój i pracę mózgu (Jones i in., 2005; Groh i in., 2004), co w wieku dorosłym może decydować o zadaniach wykonywanych przez robotnice. Jednak celem jednoznacznego potwierdzenia tezy dotyczącej wpływu pszczoł wychowanych w plastrach o małych komórkach na nasilenie zachowania higienicznego należy porównać trzy grupy rodzin: utrzymywane tylko na plastrach o małych komórkach, utrzymywane tylko na plastrach o standardowych komórkach, oraz utrzymywane jednocześnie na obydwu rodzajach plastrów.

6.4. Mechanizm modyfikowania cech pszczoł i rodzin pszczelich w wyniku ich jednoczesnego utrzymania na plastrach o małych i o standardowych komórkach

Prezentowane w przedkładanej rozprawie wyniki nowatorskich badań wskazują, że jednoczesne utrzymanie rodzin pszczelich na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest skutecznym narzędziem modyfikowania cech pszczoł i rodzin pszczelich. Częściowo wyjaśniają one przyczynę fenomenu jakim jest naddominowanie behawioralne rodzin pszczelich utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych komórkach, analizowanego w ramach projektu „Wyjaśnienie fenomenu naddominowania

behawioralnego rodzin pszczelich utrzymywanych na dwóch rodzajach plastrów, o standardowym i o małym rozmiarze komórek” nr. 2018/31/B/NZ9/02480, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Przejawem naddominowania behawioralnego rodzin utrzymanych jednocześnie na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest istotnie większa: siła, szybkość rozwoju wiosennego i wydajność miodowa, zarówno w stosunku rodzin utrzymywanych tylko na plastrach o małych komórkach jak i tych utrzymywanych tylko na plastrach o standardowych komórkach.

Warto zastanowić się nad mechanizmem warunkującym wspomniane wyżej naddominowanie behawioralne. W przypadku umieszczenia w gnieździe tej samej rodziny pszczeliej plastrów o małych i o standardowych komórkach mamy zapewne do czynienia z współdziałaniem robotnic wychowanych w tych dwóch typach plastrów (Trumbo i in., 1997; Johnson, 2003). Mimo tego, że robotnice pochodzą od tej samej matki różnią się zarówno wartością cech morfometrycznych jak i aktywnością układu proteolitycznego. Dlatego za pierwotną przyczynę różnic między robotnicami należy przyjąć szerokość komórek plastra, w którym zostały one wychowane. Konsekwencją wychowu w plastrach o różnej szerokości komórek, są różne wartości cech. Wartość zdecydowanej większości cech morfometrycznych robotnic mieściła się wprawdzie w zakresie przyjętym dla zmian sezonowych, jednak w przypadku robotnic wychowywanych przy kombinacji plastrów i rodziny wychowującej $_{PS}MK + _R MK$ i $_{PS}MK + _R SK$ (wychowane w plastrach o małych komórkach, niezależnie od rodzaju plastrów w rodzinie wychowującej) była zwykle istotnie niższa niż przy kombinacji $_{PS}SK + _R SK$ i $_{PS}SK + _R MK$ (wychowane w plastrach o standardowych komórkach, niezależnie od rodzaju plastrów w rodzinie wychowującej). Co warte podkreślenia, w przypadku kombinacji $_{PS}MK + _R SK$ języczek robotnic był istotnie dłuższy niż u tych wychowanych przy pozostałych trzech kombinacjach.

W tym kontekście zasadnym jest pytanie czy wychów robotnic w plastrach o różnej szerokości komórek, umieszczonych w tej samej rodzinie pszczeliej może zwiększać niereprodukcyjny podział pracy. Z takim zwiększonym niereprodukcyjnym podziałem pracy mamy do czynienia u tych gatunków mrówek, u których występują sub-kasty robotnic różniące się morfologicznie – polietyzm morfologiczny (Mertl i Traniello, 2009). Występowaniu sub-kast morfologicznych w rodzinie pszczoły miodnej może sprzyjać właśnie znaczna zmienność szerokości komórek plastrów w naturalnych gniazdach (Maggi i in., 2010). U pszczoły miodnej dotychczas skupiano się na politeizmie wiekowym. Wynika to zapewne z dużego podobieństwa morfologicznego robotnic, dodatkowo zwiększonego ujednoczeniem/standaryzacją szerokości komórek plastrów z powodu powszechnego wykorzystania węzy. Nie można jednak wykluczyć, że w rodzinie pszczeliej obok politeizmu wiekowego mamy do czynienia także z elementami polietyzmu morfologicznego co można traktować jako kompromis między specjalizacją a elastycznością behawioralną. Do tej pory w kaście pszczoł miodnych zidentyfikowano sub-kastę rebeliantek, które różnią się fizjologicznie i anatomicznie od zwykłych robotnic (Strachecka i in., 2021a, b). Jednak dotychczas nie badano potencjalnych różnic morfologicznych między robotnicami-rebeliantkami a zwykłymi robotnicami.

U pszczoł społecznych różnice fizjologiczne i behawioralne między dużymi a małymi robotnicami w tej samej rodzinie zostały potwierdzone u trzmieli (Spaethe i Weidenmüller, 2002; Worden i in., 2005). Stwierdzono, że w porównaniu do małych robotnic, te duże

częściej pracują jako zbieraczki (Spaethe i Weidenmüller, 2002) i uczą się szybciej (Worden i in., 2005). Wyniki przedkładanej rozprawy wskazują wprawdzie, że to robotnice wychowane w plastrach o małych komórkach, a co za tym idzie mniejszych rozmiarach ciała mają większe predyspozycje do pracy jako zbieraczki, czyli odwrotnie niż u trzmieli. Jednak ze względu na znaczne różnice w stopniu zaawansowania społecznego trybu życia między pszczołą miodną a trzmielami nie wszystkie mechanizmy muszą się powielać.

Jednoznaczne wyjaśnienie poruszonej w przedkładanej rozprawie kwestii wyjaśnienia mechanizmu wpływania na cechy robotnic i rodzin pszczelich jednoczesnego utrzymania rodzin na plastrach o małych i o standardowych komórkach wymaga dalszych badań. Dotychczasowe wyniki tych nowatorskich badań są bardzo obiecujące, a wyjaśnienie wspomnianych wyżej zagadnień rzuci nowe światło na możliwości kształtowania cech użytkowych rodzin pszczelich oraz na biologię i ewolucję pszczoły miodnej.

7. Wnioski

1. Zmiana wartości cech morfometrycznych robotnic nie była proporcjonalna do zmiany szerokość komórek plastra, w których były one wychowane. Cechy te zmieniały się w znacznie mniejszym zakresie, dlatego wykorzystanie plastrów o małej (około 4,90 mm) i o standardowej (około 5,50 mm) szerokości komórek nie jest tak skuteczną metodą modelowania cech morfometrycznych robotnic jak dotychczas zakładano.
2. Karmienie larw wychowywanych w plastrach o małych komórkach przez robotnice wychowane w plastrach o standardowych komórkach, będące skutkiem umieszczenia w gnieździe tej samej rodziny pszczołej zarówno plastrów o małych jak i o standardowych komórkach skutkowało istotnym zwiększeniem długości języczka oraz wartości współczynnika wypełnienia komórki.
3. Względnie stała wielkość ciała robotnic w połączeniu z wychowem w plastrach o małych komórkach w skutek zwiększenia wartości współczynnika wypełnienia komórki może być jednym z czynników zwiększających oporność rodzin pszczelich na *V. destructor*.
4. Odporności cech morfometrycznych wykorzystywanych w ocenie przynależności podgatunkowej/rasowej pszczoły miodnej na zmianę szerokość komórek plastra potwierdza ich dużą przydatność do identyfikacji podgatunków pszczół.
5. Szerokość komórek plastrów, w których były wychowane robotnice istotnie wpływała na stężenia białka ogólnego oraz aktywności proteaz i ich inhibitorów w hemolimfie. U 1-dniowych robotnic wyższe stężenia białka było u pszczół wychowanych w małych komórkach, a aktywność proteaz i ich inhibitorów u robotnic wychowywanych w plastrach o standardowych komórkach. U starszych robotnic w wieku: 7, 14 i 21 dni było odwrotnie.
6. W rodzinach utrzymywanych jednocześnie na plastrach o małych i standardowych komórkach, szerokość komórek plastra istotnie wpływała na efektywność usuwania martwego czerwiu, ponieważ z plastrów o małych komórkach był on usuwany szybciej niż z plastrów o standardowych komórkach.
7. Jednoczesne utrzymanie rodzin pszczelich na plastrach o małych i o standardowych komórkach jest skutecznym narzędziem modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich. W tym kontekście warta zweryfikowania jest hipoteza dotycząca wpływu wychowu robotnic w komórkach o różnej szerokości na podział pracy w kaście robotnic, a co za tym idzie na wartość cech użytkowych rodzin, która w znacznej mierze jest kształtowana przez interakcje między robotnicami. Przyczyni się to także do wyjaśnienia roli znacznej różnicy między szerokością komórek w plastrach budowanych bez użycia węzy, a co za tym idzie dostarczy nowej wiedzy o biologii ewolucji pszczoły miodnej.

8. Piśmiennictwo

1. Abou-Shaara, H.F. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: A review. *Vet. Med.* **2014**, 59, 1-10. <https://doi.org/10.17221/7240-VETMED>.
2. Al Toufailia, H.; Alves, D.A.; Bento, J.M.S.; Marchini, L.C.; Ratnieks, F.L.W. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. *Biol. Open* **2016**, 11, 1712–1718. <https://doi.org/10.1242/bio.018549>.
3. Arathi, H.S.; Burns, I.; Spivak, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (hymenoptera: Apidae) behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **2000**, 106, 368–379. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00556.x>.
4. Asgari, S.; Zhan, G.; Zareie, R.; Schmidt, O.A. Serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 33, 1017–1024. [http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00116-4](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00116-4).
5. Berry, J.A., Owens, W.B., Delaplane, K.S. Small-cell comb foundation does not impede *Varroa* mite population growth in honey bee colonies. *Apidologie* **2010**, 41, 40–44. <https://doi.org/10.1051/apido/2009049>
6. Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; Van Gestel, C.A.; Mommaerts, V. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **2012**, 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.
7. Bode, W.; Fernandez-Catalan, C.; Nagase, H.; Maskos, K. Endoproteinase-protein inhibitor interactions. *Apmis* **1999**, 107, 3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01520.x>.
8. Borsuk, G.; Ptaszyńska, A.A.; Olszewski, K.; Domaciuk, M.; Krutmuang, P.; Paleolog, J. A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE* **2017**, 12, e0170487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170487>.
9. Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R.. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **2016**, 86, 40-47.
10. Brodschneider R., Steiner D., Moder A., Vollmann J., Riessberger-Gallé U., Crailsheim K. Synthetic larval diet produces lighter and smaller honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2009**, 40, 663–664.
11. Bruder Adam. Meine Betriebsweise. Ehrenwirt Verlag, München, **1983**.
12. Büchler, R.; Berg, S.; Le Conte, Y. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* **2010**, 41, 393–408. <https://doi.org/10.1051/apido/2010011>.
13. Chan, Q.W.; Foster, L.J. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biol.* **2008**, 9, R156. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-10-r156>.
14. Coffey, M.F., Breen, J., Brown, M.J., McMullan, J.B. Brood-cell size has no influence on the population dynamics of *Varroa destructor* mites in the native western honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie*, **2010**, 41, 522-530.
15. Cowan T.W. The honeybee; its natural history, anatomy and physiology, 2nd ed., Houlston and Sons, **1904**, London, p. 220.

16. Crailsheim, K. Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *J. Insect Physiol.* 1986, 32, 629–634. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90092-2).
17. Crailsheim, K.; Schneider, L.H.W.; Hrassnigg, N.; Bühlmann, G.; Brosch, U.; Gmeinbauer, R.; Schöffmann, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* **1992**, 38, 409–419. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V).
18. Cremer, S.; Armitage, S.A.; Schmid-Hempel, P. Social immunity. *Curr. Biol.* **2007**, 17, 693–702 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>.
19. Cullen, M.G.; Thompson, L.J.; Carolan, J.C.; Stout, J.C.; Stanley, D.A. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS ONE* **2019**, 14, e0225743.
20. Dainat, B., Vanengelsdorp, D., Neumann, P. Colony collapse disorder in Europe. *Env. microb, rep*, **2012**, 4, 123-125.
21. Davis, H.E.; Meconcelli, S.; Radek, R.; McMahon, D.P. Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 14433. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32721-7>.
22. Donze G, Guerin MP Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1994**, 34, 305-319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
23. Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Prospects and validity of laboratory cage tests conducted in honeybee research part one: Main directions of use of laboratory cage tests in honeybee research. *J. Apic. Sci.* **2019**, 63, 201–207. <https://doi.org/10.2478/JAS-2019-0026>.
24. Eckholm, B.J.; Huang, M.H.; Anderson, K.E.; Mott, B.M.; DeGrandi-Hoffman, G. Honey bee (*Apis mellifera*) intracolony genetic diversity influences worker nutritional status. *Apidologie* **2015**, 46, 150–163. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0311-4>.
25. Eilers E.J., Kremen C., Greenleaf S.S., Garber A.K., Klein A.M. Contribution of pollinator-mediated crops to nutrients in the human food supply. *PLoS One* **2011**, 6, e21363.
26. Ellis A.M., Hayes G.W., Ellis J.D. The efficacy of small cell foundation as a varroa mite (*Varroa destructor*) control. *Exp. Appl. Acarol.* **2009**, 47, 311-316. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9221-3>.
27. Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* **2010**, 49, 134-136.
28. El-Seedi, H.R., Ahmed, H.R., El-Wahed, A.A.A., Saeed, A., Algethami, A.F., Attia, N.F., Wang, K. Bee Stressors from an Immunological Perspective and Strategies to Improve Bee Health. *Vet. Sci.* **2022**, 9, 199.
29. Erickson, E.H., Lusby, D.A., Hoffman, G.D., Lusby, E.W. On the size of cells: speculations on foundation as a colony management tool. *Glean Bee Cult* **1990**, 118, 173-174.

30. Evans, J.D. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertbr. Pathol.* **2003**, *83*, 46–50. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00039-9).
31. Evans, J.D.; Aronstein, K.; Chen, Y.P.; Hetru, C.; Imler, J.-L.; Jiang, H.; Kanost, M.; Thompson, G.J.; Zou, Z.; Hultmark, D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>.
32. Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H.; Gerig, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **1982**, *28*, 61–68. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3).
33. Gerdts, J.; Dewar, R.L.; Simone-Finstrom, M.; Edwards, T.; Angove, M. Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203969>.
34. Goetze, G. Einfluß der Wabenzellengröße auf die Größe der Bienen. *Archiv f Bienen* **1933**, *4*, 137-140.
35. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **2015**, *347*, 1255957.
36. Gramacho, K.P.; Spivak, M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2003**, *54*, 472–479. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0643-y>.
37. Groh, C., Tautz, J., Rössler, W., Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *PNAS* **2004**, *101*, 4268–4273.
38. Grout, R. The influence of size of brood cell upon the size and variability of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Bulletin AES* **1937**, *19*, 1.
39. Hünicken, P.L.; Morales, C.L.; Aizen, M.A.; Anderson, G.K.S.; García, N.; Garibaldi, L.A. Insect pollination enhances yield stability in two pollinator-dependent crops. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2021**, *320*, 107573.
40. Invernizzi, C.; Rivas, F.; Betticci, L. Resistance to Chalkbrood Disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Colonies with Different Hygienic Behaviour. *Neotrop. Entomol.* **2011**, *40*, 28–34. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000100004>.
41. Johnson, B.R. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2003**, *270*, 147-152.
42. Jones, J.C., Helliwell, P., Beekman, M., Maleszka, R., Oldroyd, B.P. The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. comp. physiol. A* **2005**, *191*, 1121-1129. DOI 10.1007/s00359-005-0035-z
43. Kanost, M.; Jiang, H. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. *Curr. Opin. Insect* **2015**, *11*, 47–55. <http://doi.org/10.1016/j.cois.2015.09.003>.

44. Kanost, M.R.; Clarke, T. Proteases. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, 1st ed.; Gilbert, L.I., Gill, S., Eds.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2005**; Volume 4, pp. 247–266.
45. Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan- Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2007**, 274, 303-313.
46. Kochansky, J.; Knox, D.A.; Feldlaufer, M.; Pettis, J.S. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and-resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* **2001**, 32, 215–222 <https://doi.org/10.1051/apido:2001123>.
47. Lee, T.; Lin, Y. Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air-or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Sci.* 1995, 106, 43–54. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04058-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04058-3).
48. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect “Blood” and Body Surface Elution. *Sensors* **2018**, 18, 1494. <http://doi.org/10.3390/s18051494>.
49. Lowry, O.H.; Rosebriugh, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
50. Maggi, M., Damiani, N., Ruffinengo, S., De Jong, D., Principal, J., Eguaras, M. Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the reproductive behavior of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* **2010**, 50, 269-279. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9314-7>
51. Martin, S.J., Kryger, P. Reproduction of *Varroa destructor* in South African bees: does cell space influence *Varroa* male survivorship?. *Apidologie* **2002**, 33, 51-61. <https://doi.org/10.1051/apido:2001007>
52. Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K.; Spivak, M. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* **2001**, 187, 441–452. <https://doi.org/10.1007/s003590100216>.
53. McAfee, A.; Chapman, A.; Iovinella, I.; Gallagher-Kurtzke, Y.; Collins, T.F.; Higo, H.; Higo, H.; Madilao, L.L.; Pelosi, P.; Foster, L.J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Sci. Rep.* **2018**, 8, 5719. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24054-2>.
54. McMullan, J.B., Brown, M.J.F. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2006**, 37, 665-672. <https://doi.org/10.1051/apido:2006041>
55. Message, D., Goncalves, L.S. Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **1995**, 26, 381-386. <https://doi.org/10.1051/apido:19950503>
56. Michailoff, A.S. Über den Zusammenhang zwischen den Umfang der Bienenzelle und dem Umfang des Bienenkörpers und seiner Teile. *Archiv. f. Bienen* **1927**, 8, 313-321.
57. Michener, C.D. *The Social Behavior of the Bees*; Harvard Univ. Press.: Cambridge, MA, USA, **1974**.
58. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Honey Bee Proteolytic System and Behavior Parameters under the Influence of an Electric Field at

- 50 Hz and Variable Intensities for a Long Exposure Time. *Animals* **2021**, 11, 863. <https://doi.org/10.3390/ani11030863>.
59. Milani, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* **1999**, 30, 229–234. <https://doi.org/10.1051/apido:19990211>.
60. Olszewski K.: Biologia, użytkowość oraz oporność na *Varroa destructor* rodzin pszczelich utrzymywanych na plastrach o małych komórkach. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Rozprawa habilitacyjna **2013**, z. 372, ISSN 1899-2374.
61. Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Strachecka, A.J. Life span of worker honeybees reared in colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014a**, 70, 10–13.
62. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A.; Bajda, M. Hygienic behaviour of colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014b**, 70, 774–776.
63. Palacio, M.A.; Figini, E.E.; Ruffinengo, S.R.; Rodriguez, E.M.; del Hoyo, M.L.; Bedascarrasbure, E.L. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **2000**, 31, 471–478. <https://doi.org/10.1051/apido:2000139>.
64. Paleolog, J.; Wilde, J.; Siuda, M.; Bąk, B.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Imidacloprid markedly affects hemolymph proteolysis, biomarkers, DNA global methylation, and the cuticle proteolytic layer in western honeybees. *Apidologie* **2020**, 51, 620–630. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00747-4>.
65. Papa, G.; Maier, R.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Karabagias, I.K.; Plutino, M.; Bianchetto, E.; Aromolo, R.; Pignatti, G.; Ambrogio, A.; et al. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* **2022**, 11, 233. <https://doi.org/10.3390/biology11020233>
66. Piccirillo, G.A., De Jong, D. The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. *Genet. Mol. Res.* **2003**, 2, 36-42.
67. Pull, C.D.; Ugelvig, L.V.; Wiesenhofer, F.; Grasse, A.V.; Tragust, S.; Schmitt, T.; Brown, M.J.F.; Cremer, S. Destructive disinfection of infected brood prevents systemic disease spread in ant colonies. *elife* **2018**, 7, 1-29 e32073. <https://doi.org/10.7554/eLife.32073>.
68. Rinderer, T.E.; Harris, J.W.; Hunt, G.J.; de Guzman, L.I. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie* **2010**, 41, 409–424. <https://doi.org/10.1051/apido/2010015>.
69. Rothenbuhler, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease- killed brood. *Anim. Behav.* **1964**, 12, 578–583. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90082-X](https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90082-X).
70. Ruttner, F, Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, **1988**.
71. Ruttner, F. Naturgeschichte der Honigbienen. Ehrenwirth Verlag, München, **1992**.
72. Sammataro, D.; Untalan, P.; Guerrero, F.; Finley, J. The resistance of varroa mites (*Acari: Varroidae*) to acaricides and the presence of esterase. *Int. J. Acarol.* **2005**, 31, 67–74. <https://doi.org/10.1080/01647950508684419>.

73. Schacterle, G.; Pollack, R. Simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* **1973**, *51*, 654–655. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90523-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90523-x).
74. Seeley, T.D., Griffin, S.R. Small-cell comb does not control *Varroa* mites in colonies of honeybees of European origin. *Apidologie* **2011**, *42*, 526–532. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0054-4>.
75. Serra-Bonvehi, J.; Orantes-Bermejo, J. Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 1230–1235. <https://doi.org/10.1002/ps.1999>.
76. Singer, H.J.; van Praagh, J.P.; Paulus, H.F. Interactions between honeybees and *Varroa* mites influenced by cell sizes and hygienic behaviour. *Entomol. Gen.* **2019**, *38*, 255–273. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0512>.
77. Siva-Jothy, M.T.; Moret, Y.; Rolff, J. Evolutionary ecology of insect immunity. *Adv. Insect. Physiol.* **2005**, *32*, 1–48. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(05\)32001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7).
78. Spaethe, J.; Weidenmüller, A. Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insectes Sociaux* **2002**, *49*, 142–146. <https://doi.org/10.1007/s00040-002-8293-z>.
79. Spivak, M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **1996**, *27*, 245–260. <https://doi.org/10.1051/apido:19960407>.
80. Spivak, M.; Danka, R.G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie* **2021**, *52*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00784-z>.
81. Spivak, M.; Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K.A. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.* **2003**, *55*, 341–354. <https://doi.org/10.1002/neu.10219>
82. Spivak, M.; Reuter, G.S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **2001**, *32*, 555–565. <https://doi.org/10.1051/apido:2001103>.
83. Strachecka, A.; Demetraki-Paleolog, J. System proteolityczny powierzchni ciała *Apis mellifera* w zachowaniu zdrowotności rodzin pszczoł. *Kosmos* **2011**, *60*, 43–51.
84. Strachecka, A.; Łoś, A.; Filipczuk, J.; Schulz, M. Indywidualne i społeczne mechanizmy odporności pszczoły miodnej. *J. Med. Veter.* **2018**, *74*, 426–433. <https://doi.org/10.21521/mw.6013>.
85. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, Ł.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **2021a**, *11*, 13887. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93357-8>.
86. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Reproductive Potential Accelerates Preimaginal Development of Rebel Workers in *Apis mellifera*. *Animals* **2021b**, *11*, 3245. <https://doi.org/10.3390/ani11113245>.
87. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J. *Varroa* treatment with bromfenvinphos markedly suppresses honeybee biochemical defence levels. *Entomol. Exp. Appl.* **2016**, *160*, 57–71. <https://doi.org/10.1111/eea.12451>.

88. Strachecka, A.; Paleolog, J.; Grzywnowicz, K. The surface proteolytic activity in *Apis mellifera*. *J. Apic. Sci.* **2008**, *52*, 49–56.
89. Tautz, J. *Phänomen Honigbiene*, 2nd ed.; Spectrum-Elsevier: Heidelberg, Germany, **2007**; p. 156.
90. Taylor, M.A., Goodwin, R.M., McBrydie, H.M., Cox, H.M. The effect of honey bee worker brood cell size on *Varroa destructor* infestation and reproduction. *J. Apic. Res.* **2008**, *47*, 239–242. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0610-2>
91. Traniello, J.F.A.; Rosengaus, R.B.; Savoie, K. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6838–6842. <https://doi.org/10.1073/pnas.102176599>.
92. Trumbo, S.T., Huang, Z.Y., Robinson, G.E. Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Beh, Ecol. Sociobiol.* **1997**, *41*, 151-163.
93. VanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R., Pettis, J.S. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one* **2009**, *4*, e6481.
94. Wallner, K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **1999**, *30*, 235–248. <https://doi.org/10.1051/apido:19990212>.
95. Willem, J., Boot, J.N.M., Allsopp, C., Allsopp, M. Differential feeding of larvae affects caste differentiation in *Apis mellifera*. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.* **2006**, *17*, 63-69. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0666-4>
96. Wilson-Rich, N.; Dres, S.T.; Starks, P.T. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>.
97. Worden, B.D.; Skemp, A.K.; Papaj, D.R. Learning in two contexts: The effects of interference and body size in bumblebees. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2045–2053. <https://doi.org/10.1242/jeb.01582>

Pełne teksty oraz oświadczenia współautorów prac naukowych stanowiących podstawę do opracowania rozprawy doktorskiej

Praca 1.

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2021). Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie*, 52(6), 1017-1032. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00884-4>



Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest

Piotr DZIECHCIARZ¹, Grzegorz BORSUK¹, and Krzysztof OLSZEWSKI¹ 

¹ Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

Received 25 January 2021 – Revised 20 July 2021 – Accepted 21 July 2021

Abstract – The aim of the study was to investigate the impact of the combination of the colony type (kept on small-cell or standard-cell combs) and the width of worker comb cells (small-cell or standard-cell combs) on the body weight and morphometric traits of worker bees. The values of morphometric parameters of worker bees changed within a substantially lower range than the width of their rearing cells. This indicates that the worker body size is relatively constant, and manipulation with the cell width is not a good method for modeling the body size of workers. The reduction in the thorax weight was proportional to the decrease in the comb cell width, and this part of the body proved to be most susceptible to weight reduction caused by the use of small-cell combs. The rearing of workers in small-cell combs in the colony kept on standard-cell combs resulted in an increase in the value of the fill factor (thorax width to cell width ratio). The relatively constant body size of workers in combination with the use of small-cell combs resulting in an increase in the fill factor may be one of the determinants of increased resistance of the insects to *Varroa destructor*. The values of the morphometric traits commonly used for identification of honeybee subspecies, i.e., the length of the fore wing, the sum of the widths of 3rd and 4th tergites, and the proboscis length, were inconsiderably altered vs. the changes in the comb cell width, which confirms their high suitability for identification of honeybee subspecies.

Apis mellifera / small-cell comb / worker bees / morphometric traits

Abbreviations

SMComb	Small-cell section combs
STComb	Standard-cell section combs
SMCol	Colony on small-cell combs
STCol	Colony on standard-cell combs
SD	Standard deviation
n. s.	Not significant

1. INTRODUCTION

Social insects display task-related division of labor. In some species, division of labor is related to differences in body size, and worker

caste members display morphological adaptations suited for particular tasks (Couvillon and Dornhaus 2009). Such a morphological division of labor is observed, e.g., in termites (Noirot and Pasteels 1987), ants (Mertl and Traniello 2009), and bumblebees (Couvillon and Dornhaus 2009). For example, in the bumblebee *Bombus impatiens*, morphological polymorphism is a result of poorer nutrition of larvae in the peripheral nest zones (Couvillon and Dornhaus 2009). Compared to the social insects mentioned above, the body size in honeybee workers varies within a very narrow range (Sauthier et al. 2016). This is probably a result of good care of larvae, especially during the full season when bee colonies are strong (large numbers of nurse bees), and rearing worker bees in honeycombs with low cell size variability, which is additionally

Corresponding author: K. Olszewski,
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl
Handling Editor: Cedric Alaux

reduced by the use of an artificially produced wax foundation.

Wax foundation is a thin plate with embossed cell bottoms. It is made of beeswax or plastic. Bees build combs on wax foundations. In modern apiary management, the use of a wax foundation is a standard, especially in developed countries.

The introduction of the wax foundation usually resulted in an increase and standardization of the width of worker comb cells (McMullan and Brown 2006). Currently, the width of standard worker cells is usually in the range of 5.40–5.50 mm. In natural nests of European dark bees (*Apis mellifera mellifera*), the width of worker comb cells was found to vary between 4.90 and 5.10 mm (Cowan 1904). At present, 4.90-mm-wide comb cells are referred to as “small cells” (McMullan and Brown 2006), whereas approximately 5.50-mm-wide cells are considered standard. However, the notion of the small or standard width/size of comb cells varies between different regions of the world, where bees with different genotypes are reared (Table I).

Investigations of colony nests built without the wax foundation conducted by Maggi et al. (2010) in South America demonstrated a considerable variation in the comb cell width ranging from 4.17 to 8.07 mm even in the same colony. Worker and drone brood was reared in 4.17–6.86 mm and 5.05–8.07 mm wide cells, respectively. This range includes all cell sizes reported in the studies mentioned above. It cannot be ruled out that

such a large variation in the width of comb cells in the same bee colony influences its biology by modifying the morphological and physiological traits of the insects. Some of these assumptions were considered, and the width of comb cell width was increased when the artificially manufactured wax foundation was introduced. It was assumed that the body size of worker bees would increase proportionally to the increase in comb cells (Grout 1937), which would be accompanied by a rise in productivity, as larger worker bees can theoretically carry heavier pollen and nectar loads (Sauthier et al. 2016). The belief that the size of the worker’s body changes proportionally to alterations in the cell width still persists (Ruttner 1988, 1992; McMullan and Brown 2006). Erickson et al. (1990) claimed that alterations of the comb cell width induced changes in the worker body size without selection and breeding. However, contradictory conclusions were formulated by McMullan and Brown (2006) and Seeley and Griffin (2011). McMullan and Brown (2006) found that a 7–8% reduction of comb cell width resulted in an only 1% decrease in the head and thorax width. Similar results were obtained by Seeley and Griffin (2011). This indicates that the bee body size is relatively constant, and the effect of the cell width on these parameters is lower than previously assumed (McMullan and Brown 2006; Seeley and Griffin 2011).

There are only few fragmentary reports in the apidological literature on the presence or

Table I. Width of comb cells regarded as small and standard in different countries

Country	Cell size [mm]		Paper
	small	standard	
Brazil	4.50–4.60	4.90–5.10	Message and Goncalves (1995)
	4.84	5.16 and 5.27	Piccirillo and De Jong (2003)
The USA	4.90	5.40	Ellis et al. (2009)
	4.90	5.30	Berry et al. (2010)
	4.82	5.38	Seeley and Griffin (2011)
Ireland	4.91	5.48	Coffey et al. (2010)
New Zealand	4.70, 4.80, 4.90 and	5.40	Taylor et al. (2008)
	5.00		

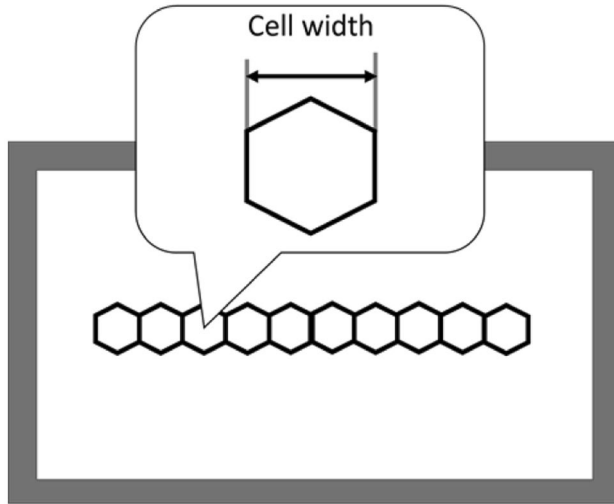


Figure 1. Site and method of measuring cell width in section combs

magnitude of the impact of the wax foundation-assisted standardization and change in the comb cell width on the morphological traits of worker bees. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of the combination of the foster colony (kept on small-cell or standard-cell combs) and the width of worker comb cells (small-cell or standard-cell combs) on the weight and morphometric traits of worker bees.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Rearing workers

The experiment was carried out in the apiary of the University of Life Sciences in Lublin (Poland; 51.224039N–22.634649E) in 2019. Section frames with a 1.09 dm² comb (115 × 95 mm) were constructed. Six frames were equipped with a small-cell foundation (cell width 4.90 mm), and another six frames had with a standard-cell foundation (cell width 5.50 mm). All section frames with the small-cell foundation were drawn out in one colony kept on small-cell combs, and section frames with the standard-cell foundation were drawn out in one colony kept on the standard-cell combs. After

the cells were built on the wax foundation, the section combs were removed from the colonies, and the cell width was measured in each. In the central part of section comb, the widths of 10 adjacent cells contacting with vertical side walls were measured (Figure 1). Each of the 10 cells was measured separately (McMullan and Brown 2006). The measurements were made on photographs with the use of the Multi Scan digital image analysis system v. 14.02 (segment measurement option) supplied by Computer Scanning System II, Warsaw.

In the last week of June, three strong bee colonies kept in Dadant Blatt hives headed by naturally mated Buckfast sister-queens were selected in the apiary. We selected Buckfast bee colonies for the study due to their effective adaptation to living on small-cell combs in the apiary of the University of Life Sciences in Lublin. In each colony, workers populated one brood chamber (10 frames; 435 × 300 mm) and three honey supers (10 frames; 435 × 150 mm). Two of these colonies were kept on standard-cell combs and one was kept on small-cell combs. To rear sister-workers, standard-cell section combs (STComb) and small-cell section combs (SMComb) were placed alternately at 12-h intervals in the space cut out in center of the brood comb located in the

center of the brood chamber in one of the colonies kept on the standard-cell combs (Figure 2). In each section comb, the queen was trapped in a frame cage made of a queen excluder for oviposition. Section combs with laid eggs were transferred into the other colonies, which served as brood-rearing foster colonies. The foster colony kept on the standard-cell combs (STCol) and that kept on the small-cell combs (SMCol) were equipped with 3 STComb (standard-cell section combs) and 3 SMComb (small-cell section combs) each. STComb and SMComb were placed in the frame in the center of the first honey super above the brood chamber. After 19 days in the foster colony, each section comb was placed in a separate mesh frame cage and transferred into an incubator (34.5 °C and 60% RH), where it was kept until emergence of workers. Approximately 100 workers from each section comb were placed in a separate cage and left in the incubator (26 °C and 60% RH) for 7 days to allow their chitin cuticle to harden. During this time, the workers were fed with an aqueous solution of saccharose (1:1). The four groups of workers obtained corresponded to the combination of the comb

type and the foster colony type: bees reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs (SMComb + SMCol), reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs (SMComb + STCol), reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs (STComb + STCol), and reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs (STComb + SMCol).

2.2. Measurement of weight and morphometric evaluation of workers

The measurements involved 15 workers from each group of each section comb (Ruttner 1988, 1992). On each worker the following steps of analysis was procedure: (1) anesthesia with ethyl acetate; (2) measurement of the thorax width and length and the abdomen length on the dorsal side using an Olympus SZX16 stereoscopic microscope; (3) weighing whole bees, dissection of the main body parts (head, thorax with legs and wings, and abdomen), and weighing each

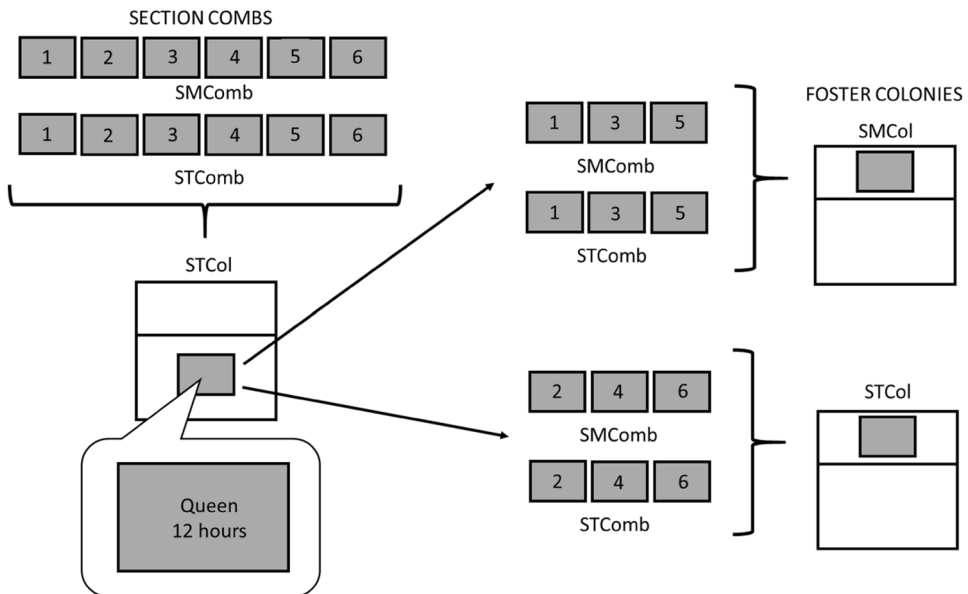


Figure 2. Transfer of the section combs from the single parent colony to the two foster colonies. SMComb, small-cell section combs; STComb, standard-cell section combs; SMCol, foster colony on small-cell combs; STCol, foster colony on standard-cell combs

part separately; (4) measurement of the width and height of bee heads placed on glass slides using an Olympus SZX16 stereoscopic microscope; (5) dissection of the proboscis, the right fore wing, and the 3rd and 4th abdominal tergites and transfer thereof onto glass slides; and (6) measurement of body parts (see point 5) using an Olympus SZX16 stereoscopic microscope. The following linear measurements were obtained: proboscis length, fore wing length and width, cubital vein distances *a* and *b*, and 3rd and 4th abdominal tergites width (Ruttner 1988, 1992). The cubital index was calculated as the distance *a/b* ratio as proposed by Goetze (Ruttner 1988). The percentage fill factor was calculated by dividing the thorax width by the comb cell width and multiplying the result by 100 (McMullan and Brown 2006; Seeley and Griffin 2011).

We checked whether the differences, expressed as a percentage and calculated vs. the STComb + STCol group, between the total body weight and the weight of the main body parts and the values of linear morphometric traits of workers from the other three groups from the comb type-foster colony type combination (SMComb + SMCol, SMComb + STCol, STComb + SMCol) corresponded to the percentage of the differences in the cell width between the small-cell section combs and standard-cell section combs.

2.3. Statistical analysis

The results were analyzed statistically using Statistica software version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., USA. The data distribution was analyzed with the Kolmogorov-Smirnoff test. The widths of cells in the small-cell section combs ($n = 60$) and in the standard-cell section combs ($n = 60$) were compared with Student's *t* test for independent samples. The effect of the section comb on the width of cells in the small-cell section combs and standard-cell section combs was analyzed with a one-way analysis of variance. The effect of the comb type (SMComb, $n = 90$, and STComb, $n = 90$) regardless of the foster colony type, the effect of the

foster colony type (SMCol, $n = 90$, and STCol, $n = 90$) regardless of the comb type, and the interactions between these factors were assessed with a two-way analysis of variance with interaction. The Tukey HSD test was used for comparison of the means in the four worker groups corresponding to the comb type-foster colony type combinations (SMComb + SMCol, $n = 45$; SMComb + STCol, $n = 45$; STComb + STCol, $n = 45$; STComb + SMCol, $n = 45$).

3. RESULTS

3.1. Comb cell width

The width of cells in the small-cell section combs was significantly lower (4.93 ± 0.02 mm; $n = 60$) than in the standard-cell section combs (5.59 ± 0.03 mm; $n = 60$; $p < 0.001$ — Student's *t* test). There was no significant effect of the section comb on the width of cells in the small-cell section combs or in the standard-cell section combs ($F_{5,54} = 0.34$, $p = 0.884$; $F_{5,54} = 0.11$, $p = 0.988$, respectively).

3.2. Weight of the body and its main parts

Irrespective of the comb type, the foster colony type did not exert an effect on the total body weight and the weight of the main body parts (body weight SMCol = 110.09, STCol = 108.20; head weight SMCol = 10.29, STCol = 10.19; thorax weight SMCol = 39.81, STCol = 40.82; abdomen weight SMCol = 59.99, STCol = 57.20) (Table II). Except for the thorax weight, the total body weight and its other main parts were higher in the workers reared in SMCol (colony kept on the small-cell combs) than in STCol (colony kept on the standard-cell combs) (Table II). Regardless of the foster colony type, the total body weight and the weight of the main body parts were higher in workers reared in STComb (Table II), with significance of the total body weight, the thorax weight, and the abdomen weight (body weight SMComb = 104.32,

STComb = 113.97, $p < 0.01$; head weight SMComb = 10.12, STComb = 10.36; thorax weight SMComb = 38.37, STComb = 42.27, $p < 0.001$; abdomen weight SMComb = 55.83, STCol = 61.35, $p < 0.05$). The effect of the comb on the total body weight, the head weight, and abdomen weight was significantly dependent on the foster colony type (comb \times colony interaction; $p < 0.01$, $p < 0.001$, and $p < 0.05$, respectively). In the worker groups representing the comb type and foster colony type combination, worker bees reared in the STComb + SMCCol combination had the highest total body weight and the weight of its main parts, with the exception of the thorax (Figure 3). The highest

thorax weight was found in workers reared in the STComb + STCol variant.

3.3. Linear measurements of the head, thorax, and proboscis and the fill factor value

The foster colony type exerted a significant effect on the values of all linear measurements: the head, thorax, and proboscis (Table III). Significantly higher values of these parameters were always obtained in the STCol worker bees (Table III). In turn,

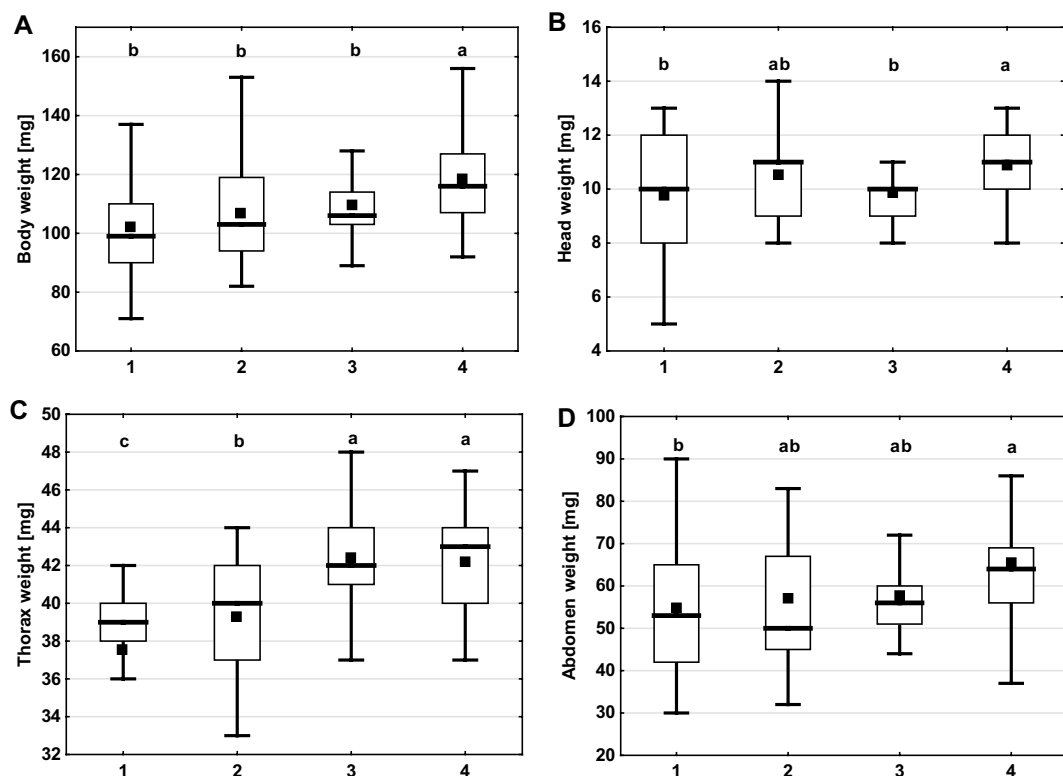


Figure 3. Values of total body weight and weight of the main parts of the body: **A** body weight, **B** head weight, **C** thorax weight, **D** abdomen weight. (1) SMComb + SMCCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$); (2) SMComb + STCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (3) STComb + STCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (4) STComb + SMCCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$). The boxes indicate the data between the 25 and 75% quartiles including the median (black line); the whiskers represent the minimum and maximum values; the black squares represent the mean; (a), (b), (c) — the differences in the values of the traits between the comb type-foster colony type combinations are significant at $p \leq 0.05$

the comb type exerted a significant effect on the head width and height, the thorax width, and the fill factor (Table III). The STComb workers were characterized by a greater head width and height ($p < 0.01$) and thorax width ($p < 0.01$), whereas a higher value of the fill factor ($p < 0.01$) was noted in the group of the SMComb workers. The effect of the comb type on the head height, proboscis length, and fill factor value was significantly dependent on

the foster colony type (comb \times colony interaction; $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.05$, respectively). In the groups of insects from the comb type-foster colony combination variants, the STComb + STCol workers had the highest values of the head width and height and the thorax width and length (Figure 4). In turn, the longest proboscis and the highest fill factor value were noted in the SMComb + STCol worker bees (Figure 4).

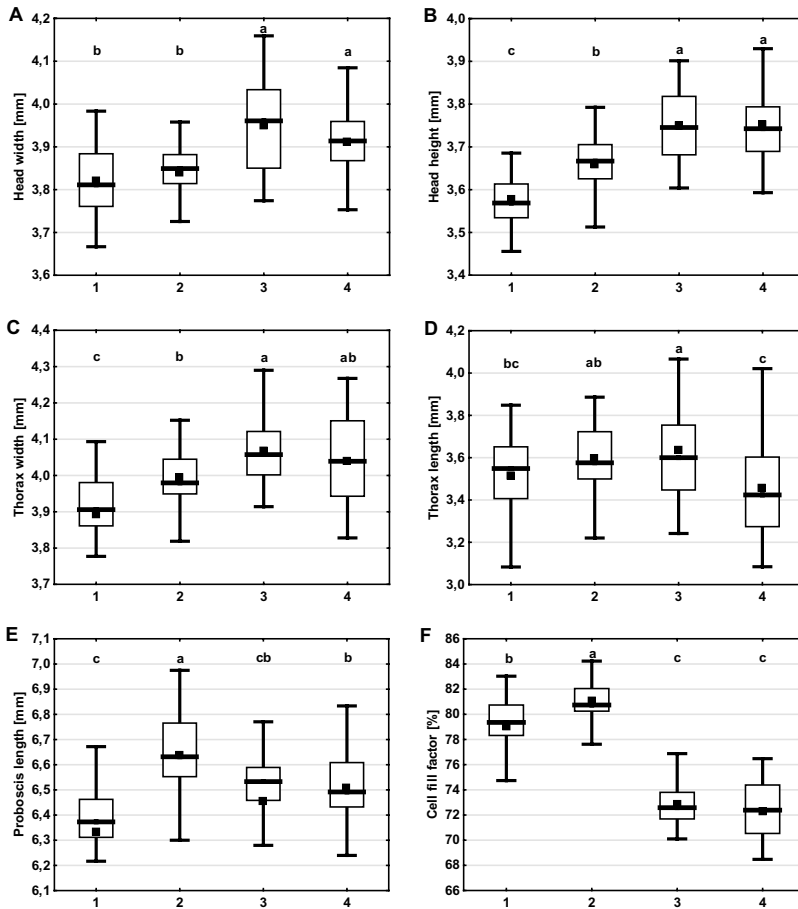


Figure 4. Values of linear measurements of the head, thorax, and proboscis and cell fill factor values: **A** head width, **B** head height, **C** thorax width, **D** thorax length, **E** proboscis length, **F** cell fill factor. (1) SMComb + SMCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n = 45$); (2) SMComb + STCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n = 45$); (3) STComb + STCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n = 45$); (4) STComb + SMCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n = 45$). The boxes indicate the data between the 25 and 75% quartiles including the median (black line); the whiskers represent the minimum and maximum values; the black squares represent the mean; (a), (b), (c) — the differences in the values of the traits between the comb type-foster colony type combinations are significant at $p \leq 0.05$

3.4. Linear measurements of the fore wing and its elements and the cubital index value

The foster colony type had a significant effect on the length and width of the fore wing and distance *b* of cubital vein (Table IV). Significantly higher values of these parameters were recorded in the STCol group ($p < 0.01$). In turn, the comb type exerted a significant effect on the fore wing length and distance *b* of cubital vein ($p < 0.01$). The STComb workers were characterized by significantly higher values of these parameters (Table IV). The effect of the comb on the fore wing length was significantly depend on the foster colony type (comb \times colony interaction; $p < 0.001$). In the groups of workers from the comb type-foster colony type combination, the highest value of the parameters were usually noted in the STComb + STCol variant, with the exception of distance *a* of cubital vein and the cubital index (Figure 5).

3.5. Linear measurements: abdomen, 3rd and 4th abdominal tergites and the sum of the widths of 3rd and 4th tergites

The foster colony type had a significant effect only on the width of the 3rd tergite, which was greater in the STCol workers (Table V). The comb type significantly influenced the width of 3rd and 4th tergites and the sum of their widths. Significantly higher values of these parameters were always found in the STComb workers ($p < 0.01$). The effect of the comb was significantly depend on the foster colony type only in the case of the sum of the widths of 3rd and 4th tergites (comb \times colony interaction, $p < 0.01$). In the groups of workers from the comb type-foster colony type combinations, the abdomen length was similar, and the highest 3rd and 4th tergite width and sums of the 3rd and 4th tergite widths were noted in the STComb + SMCOL and STComb + STCol workers (Figure 6).

3.6. Percentage changes in comb cell width, total body weight, and the weight of the main body parts, linear morphometric traits, and fill factor

The percentage decrease in the total body weight of the SMComb + SMCOL workers, compared to the STComb + STCol group (7.1%), was slightly lower than the percentage decrease in the cell width in the case of SMComb and STComb (11.8%) (Table VI). The decrease in the total body weight was mainly determined by the decrease in the thorax weight, which was similar to the decrease in the cell width, i.e., 11.6% and 11.8%, respectively. A 1.4% and 4.8% decline was noted in the head weight and the abdomen weight, respectively. The reduction of most of the linear morphometric parameters was substantially lower than the decrease in the comb width and ranged from 2.6% (abdomen length) to 4.5% (head height). Slightly stronger reduction was noted in the case of distance *b* of cubital vein (11.1%). The lower distance *b* of cubital vein value was accompanied by a significant 8.0% increase in the cubital index value. The proboscis length decreased only slightly (by 1.9%), whereas the abdomen length increased by 2.6%.

Regardless of the foster colony type, the decrease in the comb cell width in the SMComb group vs. the STComb workers resulted in a significant increase in the fill factor (from 8.5% to 11.3%), with the highest increase in the SMComb + STCol variant (by 11.3%). The head weight in the workers from the SMComb + STCol and STComb + SMCOL groups increased significantly by 6.5% and 9.9%, respectively, compared to those from the SMComb + SMCOL and STComb + STCol groups.

The proboscis length seems to be weakly depended on the comb type-foster colony type combination, as its values changed in a small range from -1.9 to 2.9%. In all groups, the range of the changes in the cubital index value was similar (from 7.1 to 8.4%).

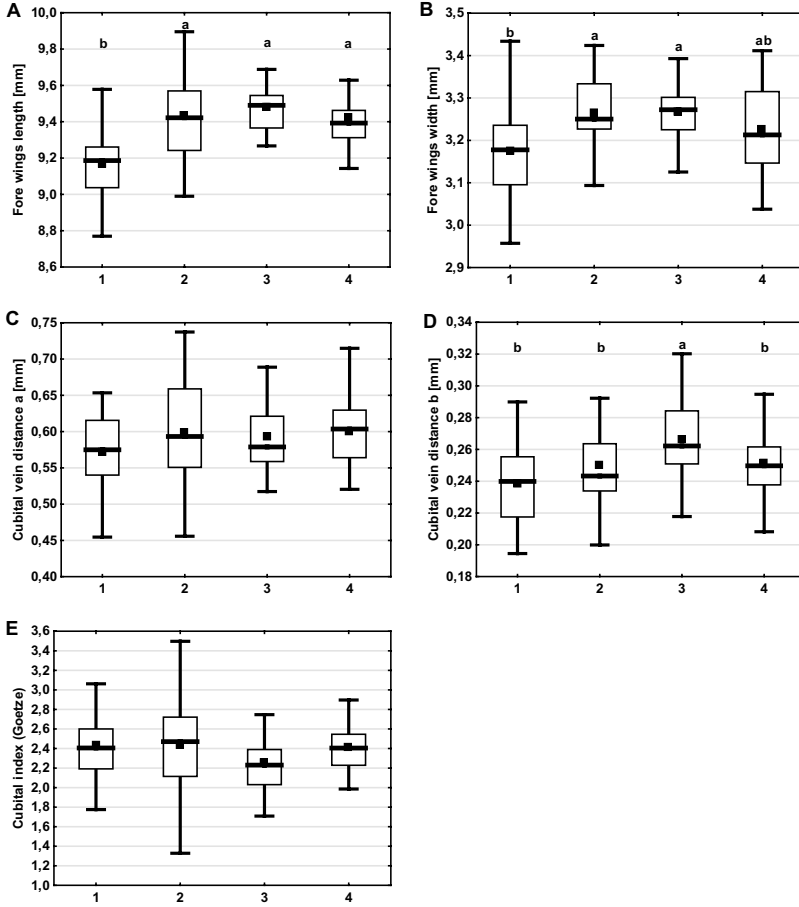


Figure 5. Values of linear measurements of the wing and its elements and cubital index values: **A** fore wings length, **B** fore wings width, **C** cubital vein distance a, **D** cubital vein distance b, **E** cubital index (Goetze). (1) SMComb+SMCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$); (2) SMComb+STCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (3) STComb+STCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (4) STComb+SMCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$). The boxes indicate the data between the 25 and 75% quartiles including the median (black line); the whiskers represent the minimum and maximum values; the black squares represent the mean; (a), (b) — the differences in the values of the traits between the comb type-foster colony type combinations are significant at $p \leq 0.05$

4. DISCUSSION

The increase and standardization of the width of honeycomb cells introduced in the last century was prompted by a belief that the size of the worker bee body would grow proportionally to the increase in the cell size (Goetze 1933; Grout 1937). As reported by Ruttner (1988), the body size gain in workers changed correspondingly to the alterations in the width of cells

where they were reared. Furthermore, Erickson et al. (1990) found that changes in the comb cell width were able to change the worker body size without selection and breeding. Our investigations demonstrated that the decline in the body weight (by 7%) of the SMComb + SMCol bees compared to the body weight of the STComb + STCol workers was significantly lower than the reduction in the width of the SMComb cells compared to the STComb cells

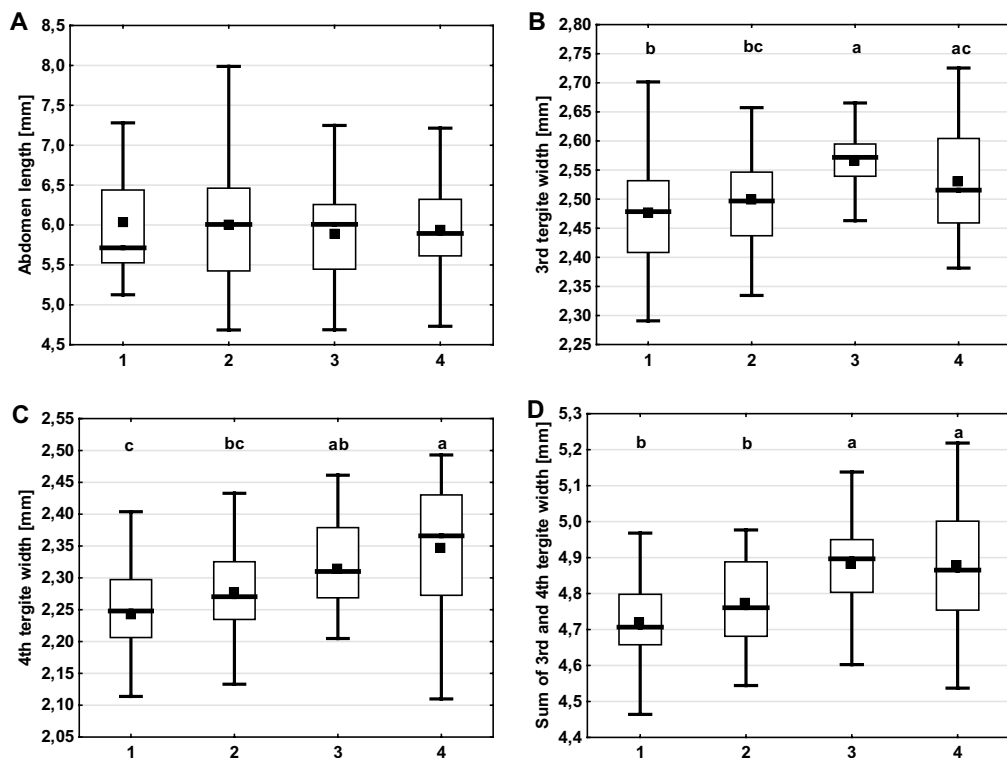


Figure 6. Values of linear measurements of the abdomen and 3rd and 4th abdominal tergites and the sum of the widths of 3rd and 4th tergites [mm]: **A** abdomen length, **B** 3rd tergite width, **C** 4th tergite width, **D** sum of the widths of 3rd and 4th tergites. (1) SMComb+SMCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$); (2) SMComb+STCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (3) STComb+STCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on standard-cell combs ($n=45$); (4) STComb+SMCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs ($n=45$). The boxes indicate the data between the 25 and 75% quartiles including the median (black line); the whiskers represent the minimum and maximum values; the black squares represent the mean; (a), (b), (c) — the differences in the values of the traits between the comb type-foster colony type combinations are significant at $p \leq 0.05$

(by 11.8%). However, the decrease in the total body weight was mainly determined by loss of thorax weight (by 11.6%), which was proportional to the decrease in the cell width. In turn, the range of changes in most of the linear morphometric parameters ranged from 2.6 to 4.5%. These values were within or only slightly different from the range of seasonal changes, i.e., 2–3% (Ruttner 1992). The value of parameters regarded by Ruttner (1992) as a measure of the bee body size, i.e., the length of the fore wing and the sum of the widths of 3rd and 4th tergites, ranged from -0.5% to -3.4% and from 0.0% to -3.3% , respectively. The resistance of

these features and proboscis length to changes in the width of comb cells, manifested by a small range of changes, regardless of the comb type-foster colony type combination, confirms their great suitability for assessment of the size of worker bee body and identification of the honeybee subspecies.

Similar results to the findings of our study were obtained by McMullan and Brown (2006) and Seeley and Griffin (2011) and Michailoff (1927). In the 1920s, the latter researcher compared worker bees reared in worker cells to those reared in drone cells. The rearing in the drone cell, which was by 39% wider than

Table II. Effect of the foster colony irrespective of the comb and effect of the comb irrespective of the foster colony on the mean values of the total body weight and the weight of the main body parts [mg]

Traits	Foster colony impact		Comb impact		Interaction: comb × col- ony
	SMCol	STCol	SMComb	STComb	
Body weight	110.09 <i>n</i> = 90 SD ± 18.87	108.20 <i>n</i> = 90 SD ± 15.19	104.32** <i>n</i> = 90 SD ± 17.41	113.97** <i>n</i> = 90 SD ± 15.44	<i>p</i> < 0.01
Head weight	10.29 <i>n</i> = 90 SD ± 2.00	10.19 <i>n</i> = 90 SD ± 1.34	10.12 <i>n</i> = 90 SD ± 2.04	10.35 <i>n</i> = 90 SD ± 1.27	<i>p</i> < 0.001
Thorax weight	39.81 <i>n</i> = 90 SD ± 4.16	40.82 <i>n</i> = 90 SD ± 3.14	38.37** <i>n</i> = 90 SD ± 3.78	42.27** <i>n</i> = 90 SD ± 2.39	n. s.
Abdomen weight	59.99 <i>n</i> = 90 SD ± 17.18	57.20 <i>n</i> = 90 SD ± 14.20	55.83* <i>n</i> = 90 SD ± 16.91	61.36* <i>n</i> = 90 SD ± 14.12	<i>p</i> < 0.05

SMCol foster colony on small-cell combs, STCol foster colony on standard-cell combs, SMComb small-cell comb, STComb standard-cell comb, SD standard deviation. *The impact of the comb is significant at $p \leq 0.05$; **the impact of the comb is significant at $p \leq 0.01$; n. s. not significant.

the worker cell, resulted in a mere 10% increase in the worker body weight and increased the proboscis length by 5%, the sum of the widths of 3rd and 4th tergites by 4.37%, and the fore wing length by only 2.69%. Thus, the substantially larger difference in cell the width (39%) than that observed in our study (11.8%; small vs. standard cell) contributed to only slightly greater changes in the morphometric traits. In the present study, in the SMComb + SMCol group vs. the STComb + STCol group, the percent decline in the parameters was as follows: 7.1% in the body weight, 1.9% in the proboscis length, and 3.3% in the sum of the widths of 3rd and 4th tergites and 3.3% in the fore wing length.

Similar to the results reported by McMullan and Brown (2006) and Seeley and Griffin (2011), our investigations indicate a relatively constant body size in the worker bees, with a lower effect of the comb cell width on this parameter than assumed previously (Ruttner 1988). This implies that, in the case of small cells, the free space between the pupa and the walls of the cells is reduced, which is associated with the lower value of the decline in the bee body size than that of the

cell size. The cell is then more tightly filled by the pupa, which may restrict reproduction of *V. destructor*. This mechanism has been observed in Africanized bees (Piccirillo and De Jong 2003) and African *A. m. capensis* (Martin and Kryger 2002), which naturally build small-cell combs. As suggested by Martin and Kryger (2002), the tighter filling of cells by the pupa contributes to increased mortality of *V. destructor* males due to difficulties in movement of the mite in the cell, as the pupa thorax fills the cell lumen tightly. Additionally, movements of the pupa in the tight cell may contribute to damage to the developmental forms of the parasite (Donze and Guerin 1994), which seem highly susceptible to damage due to their non-chitinized cuticle.

In the present study, the fill factor was significantly influenced by both the width of the cells of section combs and the width of the cells of the other combs in the nest, more specifically, by the body size of nurse bees from the foster colony associated with the width of cells in which they had been reared. Therefore, it can be assumed that the sizes of the body parts exert an impact on the physiological characteristics of the worker. This was confirmed by the higher

Table III. Effect of the foster colony irrespective of the comb and effect of the comb irrespective of the foster colony on the mean values of linear measurements of the head, thorax, and proboscis [mm] and cell fill factor values [%]

Traits	Foster colony impact		Comb impact		Interaction: comb × colony
	SMCol	STCol	SMComb	STComb	
Head width	3.87* <i>n</i> = 90 SD ± 0.09	3.89* <i>n</i> = 90 SD ± 0.10	3.83** <i>n</i> = 90 SD ± 0.08	3.93** <i>n</i> = 90 SD ± 0.09	n. s.
Head height	3.66** <i>n</i> = 90 SD ± 0.12	3.70** <i>n</i> = 90 SD ± 0.09	3.62** <i>n</i> = 90 SD ± 0.07	3.75** <i>n</i> = 90 SD ± 0.09	<i>p</i> < 0.001
Thorax width	3.97** <i>n</i> = 90 SD ± 0.16	4.03** <i>n</i> = 90 SD ± 0.11	3.94** <i>n</i> = 90 SD ± 0.14	4.05** <i>n</i> = 90 SD ± 0.11	n. s.
Thorax length	3.48** <i>n</i> = 90 SD ± 0.20	3.61** <i>n</i> = 90 SD ± 0.21	3.55 <i>n</i> = 90 SD ± 0.21	3.55 <i>n</i> = 90 SD ± 0.23	n. s.
Proboscis length	6.42** <i>n</i> = 90 SD ± 0.24	6.55** <i>n</i> = 90 SD ± 0.27	6.49 <i>n</i> = 90 SD ± 0.27	6.48 <i>n</i> = 90 SD ± 0.26	<i>p</i> < 0.001
Cell fill factor	75.65 <i>n</i> = 90 SD ± 4.38	76.93 <i>n</i> = 90 SD ± 4.59	80.03** <i>n</i> = 90 SD ± 2.92	72.55** <i>n</i> = 90 SD ± 2.04	<i>p</i> < 0.05

SMCol foster colony on small-cell combs, STCol foster colony on standard-cell combs, SMComb small-cell comb, STComb standard-cell comb, SD standard deviation. *The impact of the foster colony is significant at $p \leq 0.05$; **the impact of the foster colony and the impact of the comb are significant at $p \leq 0.01$; n. s. not significant.

values of the vast majority of morphometric traits in the STCol than SMCol workers, which was particularly evident in the SMComb + STCol combination and yielded the highest fill factor reported in the literature (81%). The body size was probably influenced by the more abundant food supply provided to the larvae by the STCol workers, whose larger head promoted better development and enhanced the efficiency of hypopharyngeal glands. This result confirms the observation that workers reared in STComb feed larvae more efficiently (Willem et al. 2006). It is possible that such a mechanism also functions in colonies with natural nests where the variability in worker cell sizes (4.17–6.86 mm) (Maggi et al. 2010) results in simultaneous presence of different-sized workers that had been reared in cells with different widths during the period of maximum colony development. An advantage of such a natural nest arrangement may be the

highest fill factor value in the SMComb + STCol worker group shown in the present study. The increased fill factor may be one of the determinants of limitation of *V. destructor* reproduction, which seems to be confirmed in the study conducted by Maggi et al. (2010).

The results of the present study suggest a question whether the changes in the worker body size, and more specifically in morphological traits caused by the different widths of comb cells where they were reared, can increase the non-reproductive division of labor in the bee colony. Such an increased non-reproductive division of labor is observed in ant species with morphologically different worker sub-castes — morphological polyethism (Mertl and Traniello 2009). The occurrence of morphological sub-castes in a honeybee colony may be favored by the considerable variability in the width of comb cells in natural nests (Maggi et al. 2010). So far, research

Table IV. Effect of the foster colony irrespective of the comb and effect of the comb irrespective of the foster colony on the mean values of linear measurements of the wing and its elements [mm] and cubital index values

Traits	Foster colony impact		Comb impact		Interaction: comb × colony
	SMCol	STCol	SMComb	STComb	
Fore wings length	9.29** <i>n</i> =90 SD ± 0.24	9.45** <i>n</i> =90 SD ± 0.18	9.30** <i>n</i> =90 SD ± 0.25	9.45** <i>n</i> =90 SD ± 0.16	<i>p</i> < 0.001
Fore wings width	3.20** <i>n</i> =90 SD ± 0.11	3.27** <i>n</i> =90 SD ± 0.08	3.22 <i>n</i> =90 SD ± 0.11	3.25 <i>n</i> =90 SD ± 0.09	n. s.
Cubital vein distance a	0.59 <i>n</i> =90 SD ± 0.05	0.60 <i>n</i> =90 SD ± 0.07	0.58 <i>n</i> =90 SD ± 0.07	0.60 <i>n</i> =90 SD ± 0.04	n. s.
Cubital vein distance b	0.24** <i>n</i> =90 SD ± 0.03	0.26** <i>n</i> =90 SD ± 0.03	0.24** <i>n</i> =90 SD ± 0.03	0.26** <i>n</i> =90 SD ± 0.03	n. s.
Cubital index (Goetze)	2.42 <i>n</i> =90 SD ± 0.33	2.34 <i>n</i> =90 SD ± 0.42	2.43 <i>n</i> =90 SD ± 0.43	2.34 <i>n</i> =90 SD ± 0.32	n. s.

SMCol foster colony on small-cell combs, STCol foster colony on standard-cell combs, SMComb small-cell comb, STComb standard-cell comb, SD standard deviation. **The impact of the foster colony and the impact of the comb are significant at *p* ≤ 0.01; n. s. not significant.

of the honeybee has been focused on age polyethism. This is probably related to the high morphological similarity of worker bees, which is

additionally increased by the standardization of the comb cell width by the widespread use of the wax foundation. It cannot be ruled out that,

Table V. Effect of the foster colony irrespective of the comb and effect of the comb irrespective of the foster colony on the mean values of linear measurements of the abdomen and 3rd and 4th abdominal tergites and the sum of the widths of 3rd and 4th tergites [mm]

Traits	Foster colony impact		Comb impact		Interaction: comb × colony
	SMCol	STCol	SMComb	STComb	
Abdomen length	5.98 <i>n</i> =90 SD ± 0.67	5.94 <i>n</i> =90 SD ± 0.73	6.02 <i>n</i> =90 SD ± 0.72	5.91 <i>n</i> =90 SD ± 0.59	n. s.
3rd tergite width	2.50* <i>n</i> =90 SD ± 0.10	2.53* <i>n</i> =90 SD ± 0.07	2.48** <i>n</i> =90 SD ± 0.09	2.54** <i>n</i> =90 SD ± 0.07	n. s.
4th tergite width	2.29 <i>n</i> =90 SD ± 0.10	2.29 <i>n</i> =90 SD ± 0.08	2.26** <i>n</i> =90 SD ± 0.08	2.33** <i>n</i> =90 SD ± 0.09	<i>p</i> < 0.01
Sum of the widths of 3rd and 4th tergites	4.80 <i>n</i> =90 SD ± 0.17	4.85 <i>n</i> =90 SD ± 0.12	4.74** <i>n</i> =90 SD ± 0.13	4.91** <i>n</i> =90 SD ± 0.13	n. s.

SMCol foster colony on small-cell combs, STCol foster colony on standard-cell combs, SMComb small-cell comb, STComb standard-cell comb, SD standard deviation. *The impact of the foster colony is significant at *p* ≤ 0.05; **the impact of the comb is significant at *p* ≤ 0.01; n. s. not significant.

Table VI. Percentage changes in comb cell width, total weight, and weight of the main body parts, and morphometric parameters in three groups of workers reared in colonies with different comb type-foster colony type combinations vs. workers reared in standard-cell combs in a colony kept on standard-cell combs (STComb+STCol)

Traits	Groups: comb type-foster colony type combinations		
	SMComb+SMCol	SMComb+STCol	STComb+SMCol
Cells width	-11.8	-11.8	0.0
Body weight	-7.1	-2.7	+7.8
Head weight	-1.4	+6.5	+9.9
Thorax weight	-11.6	-7.5	-0.6
Abdomen weight	-4.8	-0.8	+11.3
Head width	-3.3	-2.8	-1.0
Head height	-4.5	-2.4	0.0
Thorax width	-4.4	-2.0	-0.7
Thorax length	-3.3	-1.1	-4.7
Proboscis length	-1.9	+2.9	+0.9
Fill factor	+8.5	+11.3	-0.7
Wing length	-3.4	-0.5	-0.6
Wing width	-2.8	-0.3	-1.2
Distance a of cubital vein	-3.4	+1.7	+1.7
Distance b of cubital vein	-11.1	-7.4	-7.5
Cubital index (Goetze)	+8.0	+8.4	+7.1
Abdomen length	+2.6	+2.0	+0.9
3rd tergite width	-3.5	-2.7	-1.6
4th tergite width	-3.0	-1.3	+1.7
Sum of 3rd+4th tergite width	-3.3	-2.3	0.0

SMComb+SMCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on small-cell combs; SMComb+STCol, workers reared in small-cell combs in colonies kept on standard-cell combs; STComb+SMCol, workers reared in standard-cell combs in colonies kept on small-cell combs.

besides age polyethism, the bee colony exhibits elements of morphological polyethism, which may represent a compromise between specialization and behavioral flexibility. In social bees, physiological and behavioral differences between large and small worker bees in the same colony have been observed in bumblebees (Spaethe and Weidenmüller 2002; Worden et al. 2005). Perhaps the answer to the above question will be provided by the research conducted as part of our grant: “Elucidation of the phenomenon of behavioral overdominance of honeybee colonies kept on two types of combs with standard- and small-cell size,” no. 2018/31/B/NZ9/02480, financed by National Science Center, Poland.

5. CONCLUSIONS

The change in the value of the morphometric parameters of the worker bees was not proportional to the change in the width of the comb cells where they were reared. These traits were found to change less substantially than assumed previously; therefore, changing the comb cell width is not a good approach for modeling the body size of worker bees.

In terms of the changes in the weight of the main worker body parts, the thorax weight was most susceptible to reduction resulting from rearing in small cell combs. The decrease in the thorax weight was proportional to the decline in the comb cell width.

Feeding larvae reared in small-cell combs by worker bees reared in standard cell combs, which was possible due to the presence of both small and standard cell combs in the nest of the same bee colony, resulted in an increase in the fill factor value.

The relatively constant body size of worker bees and the use of small cell combs for brood rearing, which increase the fill factor, may be one of the determinants of an increase in resistance to *Varroa destructor*.

The value of morphometric traits that are commonly used for identification of honeybee subspecies, i.e., the fore wing length, proboscis length, and sum of the widths of 3rd and 4th tergites, changed only inconsiderably vs. the changes in the width of the worker comb cells where they were reared. The low dependence of these traits on changes in the comb cell width confirms their high suitability for identification of honeybee subspecies.

AUTHOR CONTRIBUTION

PD concept, research, discussion, writing. GB research, discussion, writing. KO research concept in apiary research, discussion, writing. PD, GB, KO acceptance of manuscript last version.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

DECLARATIONS

Consent for publication All authors have approved the manuscript for submission.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were

made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

- Berry, J.A., Owens, W.B., Delaplane, K.S. (2010) Small-cell comb foundation does not impede *Varroa* mite population growth in honey bee colonies. *Apidologie*. **41**, 40-44. <https://doi.org/10.1051/apido/2009049>
- Coffey, M.F., Breen, J., Brown, M.J.F. McMullan, J.B. (2010) Brood-cell size has no influence on the population dynamics of *Varroa destructor* mites in the native western honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie*. **41**, 522-530. <https://doi.org/10.1051/apido/2010003>
- Couvillon, M.J., Dornhaus, A. (2009) Location, location, location: larvae position inside the nest is correlated with adult body size in worker bumblebees (*Bombus impatiens*). *Proc. R. Soc. B* (2009) **276**, 2411–2418. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0172>
- Cowan T.W. (1904) The honeybee: its natural history, anatomy and physiology. Houlston and Sons, London.
- Donze, G., Guerin, M.P. (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **34**, 305-319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Ellis, A.M., Hayes, G.W., Ellis, J.D. (2009) The efficacy of small cell foundation as a varroa mite (*Varroa destructor*) control. *Exp. Appl. Acarol.* **47**, 311-316. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9221-3>
- Erickson, E.H., Lusby, D.A., Hoffman, G.D., Lusby, E.W. (1990) On the size of cells: speculations on foundation as a colony management tool. *Glean. Bee. Cult.* **118**, 173-174.
- Grout R.A. (1937) The influence of the size of brood cell upon the size and variability of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Iowa Agric. Exp. Sta. Bull.* **218**(19), 260-280.
- Goetze G (1933) Einfluß der Wabenzellengröße auf die Größe der Bienen. *Archiv. f. Bienen.* **4**, 137-140.
- Maggi, M., Damiani, N., Ruffinengo, S., De Jong, D., Principal, J., Eguaras, M. (2010) Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the reproductive behavior of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* **50**, 269-279. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9314-7>
- Martin, S.J., Kryger, P. (2002) Reproduction of *Varroa destructor* in South African bees: does cell space influence *Varroa* male survivorship?. *Apidologie*. **33**, 51-61. <https://doi.org/10.1051/apido:2001007>

- McMullan, J.B., Brown, M.J.F. (2006) The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. **37**, 665–672. <https://doi.org/10.1051/apido:2006041>
- Mertl, A.L., Traniello, J.F.A. (2009) Behavioral evolution in the major worker subcaste of twig-nesting Pheidole (Hymenoptera: Formicidae): does morphological specialization influence task plasticity? *Behav. Ecol. Sociobiol.* **63**, 1411–1426. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0797-3>.
- Message, D., Goncalves, L.S. (1995) Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. **26**, 381–386. <https://doi.org/10.1051/apido:19950503>
- Michailoff AS (1927) Über den Zusammenhang zwischen den Umfang der Bienenzelle und dem Umfang des Bienenkörpers und seiner Teile. *Archiv. f. Bienen* **8**, 313–321.
- Noirot, C., Pasteels, J.M. (1987) Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Cell. Mol. Life Sci.* **43**, 851–952. <https://doi.org/10.1007/BF01951642>.
- Piccirillo, G.A., De Jong, D. (2003) The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. *Genet. Mol. Res.* **2**(1), 36–42.
- Ruttner F (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Ruttner F (1992) Naturgeschichte der Honigbienen. Ehrenwirth Verlag, München
- Sauthier, R., l'Anson Price, R., Grüter, C.h. (2016) Worker size in honeybees and its relationship with season and foraging distance. *Apidologie*. **48**, 234–246. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0468-0>
- Seeley, T.D., Griffin, S.R. (2011) Small-cell comb does not control *Varroa* mites in colonies of honeybees of European origin. *Apidologie*. **42**, 526–532. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0054-4>
- Spaethe, J., Weidenmüller, A. (2002) Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insect. Soc.* **49**, 142–146
- Taylor, M.A., Goodwin, R.M., McBrydie, H.M., Cox, H.M. (2008) The effect of honey bee worker brood cell size on *Varroa destructor* infestation and reproduction. *J. Apic. Res.* **47**(4), 239–242. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0610-2>
- Willem, J., Boot, J.N.M., Allsopp, C., Allsopp, M. (2006) Differential feeding of larvae affects caste differentiation in *Apis mellifera*. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.* **17**, 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0666-4>
- Worden, B.D., Skemp, A.K., Papaj, D.R. (2005) Learning in two contexts: the effects of interference and body size in bumblebees. *J. Exp. Biol.* **208**, 2045–2053. <https://doi.org/10.1242/jeb.01582>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Profesor Grzegorz Borsuk
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
grzegorz.borsuk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechniki i
Rybacko
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2021). Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie*, 52(6), 1017-1032. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00884-4>

mój udział polegał na przeprowadzeniu badań, przeprowadzeniu dyskusji, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022



Podpis

dr hab. Krzysztof Olszewski, prof. Uczelni
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i
Rybacko
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2021). Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie*, 52(6), 1017-1032. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00884-4>

mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji badawczej w pasiece, przeprowadzeniu badań, przeprowadzeniu dyskusji, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 30%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczoł i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022



Podpis

Praca 2.

Dziechciarz, P., Strachecka A., Olszewski, K. (2022). Effect of comb cell width on the activity of the proteolytic system in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Animals*, 12, 978. <https://doi.org/10.3390/ani12080978>

Article

Effect of Comb Cell Width on the Activity of the Proteolytic System in the Hemolymph of *Apis mellifera* Workers

Piotr Dziechciarz ^{1,*}, Aneta Strachecka ² and Krzysztof Olszewski ¹

¹ Department of Apidology, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; aneta.strachecka@up.lublin.pl

* Correspondence: piotr.dziechciarz@up.lublin.pl

Simple Summary: Honeybees are threatened by many biotic factors, e.g., microbes and parasites such as *Nosema* spp. and *Varroa* mites, or predators, as well as environmental factors such as weather conditions, pesticides, or food contaminants. Honeybee colonies have behavioral defense mechanisms against pathogens resulting from their social lifestyle. Moreover, these insects have innate immune barriers. One of the immune defense elements is the proteolytic system consisting of proteases and their inhibitors in the hemolymph (insect blood) and on the body surface. The proteolytic system is activated by both external and internal environmental factors. An important element of the nest environment is the comb. In feral bee colony nests, the bee comb cell size varies in width. In turn, bee colonies in Europe tend to be kept only on standard- (cell width approx. 5.50 mm) or small-cell (cell width approx. 4.90 mm) combs. We assessed the proteolytic system activity in the hemolymph of workers reared in a small-cell comb and a standard-cell comb in colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs. Simultaneous keeping of a colony on standard- and small-cell combs is a novel approach to the use of small-cell combs in beekeeping. The width of comb cells (small or standard) where workers were reared had a significant effect on the protein concentrations and the activities of proteases and protease inhibitors in hemolymph of workers. The protein concentrations in 1-day-old workers were higher in bees reared in small-cell combs than in those reared in standard-cell combs. The opposite was found in the groups of older bees (aged 7, 14 and 21 d). Moreover, the activities of proteases and their inhibitors in 1-day-old workers were always higher in bees reared in standard-cell combs, whereas opposite results were usually obtained in the group of the older workers. The differences between workers reared in the small-cell combs and those from the standard-cell combs may be associated with their different tasks. Workers reared in small-cell combs probably work outside the nest as foragers, whereas those reared in standard-cell combs work in the nest. However, this assumption requires confirmation.

Abstract: This study is a continuation of the innovative research of the impact of rearing of bee colonies simultaneously on standard- and small-cell combs on the traits of worker bees and bee colonies. Its aim was to compare the activities of proteases and their inhibitors in the hemolymph of workers reared in a small-cell comb (SMC) and a standard-cell comb (STC) in colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs. The width of comb cells in which workers are reared has a significant effect on the protein concentration and the proteolytic system in the hemolymph, which is reflected in the activities of proteases and their inhibitors. The protein concentrations in the 1-day-old workers were always higher ($p \leq 0.05$) in the SMC than STC workers. The opposite was found in the older bee workers (aged 7, 14 and 21 d). The activities of proteases and their inhibitors in the 1-day-old workers were always higher (usually significantly at $p \leq 0.05$) in STC than SMC workers, and opposite results were observed in the groups of the older workers (aged 7, 14 and 21 d). The differences between the workers from small-cell combs and those reared in standard-cell combs may be related to their different tasks. Workers reared in small-cell combs probably work as foragers outside the nest, whereas bees reared in standard-cell combs work in the nest. This hypothesis requires confirmation. To reduce the impact of accidental determinants on the results of single-season



Citation: Dziechciarz, P.; Strachecka, A.; Olszewski, K. Effect of Comb Cell Width on the Activity of the Proteolytic System in the Hemolymph of *Apis mellifera* Workers. *Animals* **2022**, *12*, 978. <https://doi.org/10.3390/ani12080978>

Academic Editor: Alessia Giannetto

Received: 16 March 2022

Accepted: 8 April 2022

Published: 10 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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/>).

research on honeybees, it is advisable that such investigations should be conducted for several consecutive years.

Keywords: *Apis mellifera*; hemolymph; proteolytic system; proteases; protease inhibitors; bee comb; small-cell combs

1. Introduction

The diversity of ecological niches inhabited by insects poses a potential threat to bees through the presence of multiple biotic factors, e.g., microbes and parasites such as *Nosema* spp. and *Varroa* mites, or predators, as well as environmental factors such as weather conditions, pesticides, or food contaminants. [1]. During flight, foragers are permanently exposed to external environmental factors; additionally, the environment in the bee colony nest itself may carry a risk of the presence of a pathogenic agent due to the concentration of a large number of individuals in a small space [2]. Honeybees have developed group/behavioral mechanisms of active disruption of the disease chain in the colony, e.g., grooming behavior [3], colony fever [4], and hygienic behavior [5–7]. In addition, bees have innate immunological barriers against pathogens [8].

Immune proteins fulfill their functions thanks to the coordinated interaction of the fat body in which they are synthesized and the hemolymph through which they are transported. In addition, the hemolymph provides an appropriate environment for these proteins to function. Therefore, it is also a source of information about the physiological state of the organism [9]. Some of these proteins have proteolytic properties, i.e., they can hydrolyze (cut) peptide bonds of polypeptides [8,10]. Proteases facilitate maintenance of homeostasis in the organism through activation of proenzymes, release of hormones and physiologically active proteins from their precursors, or activation of receptors. They also target the enzymatic breakdown of pathogens' proteins [11–14]. The hemolymph of bees contains serine, asparagine, cysteine proteases, and metalloproteases [15,16]. In turn, protease inhibitors inhibit the activities of bee-specific and pathogen-specific proteolytic enzymes and prevent pathogens from penetration into the insect's body. In addition, they protect against accidental activation of mechanisms related to the activity of phenyloxidase, which is involved in such processes as metamorphosis and melanization [10,17].

The activity of the proteolytic system, which is one of the measures of humoral immunity in the bee hemolymph, is influenced by pesticides [18–20], acaricides used against *Varroa destructor* [21], biostimulants [22,23], and caste status [24].

Bees have no impact on external conditions that directly involve their immune system, but in response they are capable of precise regulation of the conditions prevailing inside their nest. One of the elements responsible for the regulation is the honeycomb, which is the basic element—an “organ” of the bee colony nest [25]. As a result of the introduction of an artificially produced wax foundation, comb cells built by bees have almost the same standardized width [26]. In Europe, the standard width of cells in the wax foundation is usually approx. 5.40–5.50 mm [26–28]. The width of the cells in natural combs built without the wax foundation has a substantially larger range, i.e., cells where worker brood is reared may be 4.17–6.86 mm wide [29].

At present, the use of the wax foundation is a standard practice in beekeeping management in developed countries. Nevertheless, the impact of the comb cell width on the traits of bees and bee colonies has been poorly explored so far. The scientific interest in small-cell combs began only in the 21st century after the publication of reports showing that rearing brood in small-cell combs versus standard-cell combs limits the growth of populations of the common bee parasite *V. destructor* [27–34]. In Europe, the width of small cells on the wax foundation is 4.90 mm [26–28]. In European conditions, the limitation of the *V. destructor* population through the use of small-cell combs was confirmed only by Singer et al. [28], and the attempts undertaken by beekeepers to keep colonies on small-cell combs probably

did not bring the expected results, as these combs were never widely used. Nevertheless, a significant effect of the use of small-cell combs on the morphological traits of worker bees and bee colony biology was found. It consisted of a decrease in the thorax weight, head width and height, thorax width and length, width and length of fore wings, and width of the third and fourth tergites [26,34–36]. Researchers additionally reported a longer lifespan of workers reared in colonies kept on small cell combs [37] and the contribution of small-cell combs to the higher effectiveness of bees' hygienic behavior [38].

We decided to investigate a new aspect of the use of small-cell combs in apiaries. Based on the research conducted by Maggi et al. [29], who reported a significant variation in the width of comb cells in a bee colony nest constructed without a wax foundation, we decided to combine small-cell combs and standard-cell combs in a nest of the same bee colony. The present study was prompted by our earlier research [36], where brood in small-cell combs was reared in a colony kept on standard-cell combs, i.e., by nurse workers reared in standard-cell combs. The values of the morphometric traits of the workers reared in the small-cell combs in a colony kept on standard-cell combs were higher than in bees reared in small-cell combs in a colony kept on small-cell combs. This indicates that the traits of bees are influenced not only by the width of the comb cells where they are reared, but also by the width of the comb cells where nurse workers were reared. It is highly probable that such a combination of combs with different cell widths in the same colony will also influence the traits of the entire colony as a complex superorganism. This conclusion was confirmed in our previous study [39], which showed a more effective removal of dead brood from small- than standard-cell combs in colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs.

This study is a continuation of our innovative research on the impact of simultaneous maintenance of bee colonies on standard- and small-cell combs on the traits of worker bees and bee colonies [36,39]. The aim of the paper was to compare the activities of proteases and their inhibitors in the hemolymph of workers reared in small-cell combs and standard-cell combs in colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs.

2. Materials and Methods

All the research procedures were conducted at the apiary of the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E). Environmental factors exert a considerable impact on honeybee traits [40]. Therefore, to reduce significantly the risk of an effect of random factors on the results that may occur in a single-season study, we repeated the experiment in the same design in three consecutive years: 2019, 2020 and 2021.

2.1. Acquisition of Bees

Each year, five foster colonies with similar strength and structure, headed by naturally mated Buckfast sister-queens of the same age, were used. We managed Buckfast bee colonies kept in our apiary, as they are very well adapted to living on small-cell combs [36,39]. All colonies were kept simultaneously on small-cell combs (cell width approx. 4.90 mm) and standard-cell combs (cell width approx. 5.50 mm) in Dadant Blatt hives. The scheme of the small- and standard-cell combs in the brood chamber was consistent with that presented by [39].

On the first d of June each year, in five foster colonies maintained simultaneously on the small- and standard-cell combs, we removed the standard-cell brood comb from the brood chamber and replaced it with a frame cage made of a queen excluder with an empty standard-cell experimental comb inside. The frame cage contained one comb. We placed and kept a queen in the frame cage for 24 h for oviposition in the experimental comb. After this time, we removed the small-cell brood comb from the brood chamber and replaced it with a standard-cell experimental comb from the frame cage with the eggs. The comb was labeled. We left the queen in the frame cage and placed an empty small-cell experimental comb. We kept the queen in the frame cage for another 24 h for oviposition in this comb. After this time, we removed the frame cage with the small-cell experimental comb and

the queen as well as the standard-cell experimental comb removed earlier from the frame cage from the brood chamber. In the empty space in the brood chamber, we placed a frame cage containing two combs and placed both standard- and small-cell experimental combs with eggs. We placed the queen to the brood chamber and closed the frame cage to prevent the queen from entering the cage. The timing of the placement of the combs with eggs in the frame cage was not random. The small-cell experimental comb was placed a d later, as brood in such combs emerges one d earlier than brood in standard-cell combs. In this way, the imago stages emerged on the same d and similar-age workers were used in the experiment. No brood had been previously reared in any of the experimental combs.

After 20 d of keeping the queen in the frame cage on the standard-cell experimental comb, we placed each experimental comb in a separate mesh frame cage and kept them in an incubator until emergence of workers.

Approximately 1500 workers from the pool emerging from each experimental comb in each of the five foster colonies were labeled (POSCA PC-3M marker). Workers reared in the small-cell experimental comb (SMC) were labeled with a different color than those reared in the standard cell experimental comb (STC). We placed the labeled workers in five colonies kept in hives with six combs. The colonies had similar strength and structure; each had a properly ovipositing queen, five combs with different aged brood, and one comb with honey and bee breed. The queens in these colonies were sisters of the same age. The workers reared in each of the foster colonies were allocated to a separate colony. We used colonies kept on six combs, as it was easier to collect the labeled workers.

2.2. Collection of Hemolymph and Evaluation of the Activity of Proteases and Their Inhibitors in Bee Hemolymph

On d 7, 14, and 21 [21] after labeling the bees, SMC workers (reared in small-cell combs) and STC workers (reared in standard-cell combs) were selected randomly from each of the five colonies kept on the six combs. Hemolymph was collected from each worker [41]. One sample comprised hemolymph collected from five bees. The hemolymph obtained from each group of five workers was transferred into a separate Eppendorf tube (0.5 mL) filled with 150 μ L of 0.6% NaCl and placed in a cooling block to prevent melanization. Hemolymph from the 1-day-old workers was collected on the labeling d. The number of samples taken in the consecutive years is shown in Table 1.

Table 1. Number of hemolymph samples in each age group of workers (1 d, 7 d, 14 d and 21 d) in the three consecutive years.

Year	Sample Quantity							
	1 DAY		7 DAYS		14 DAYS		21 DAYS	
	SMC	STC	SMC	STC	SMC	STC	SMC	STC
2019	25	25	25	25	20	20	20	20
2020	10	10	20	20	20	20	20	20
2021	10	10	20	20	20	20	20	20

SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs.

Immediately after hemolymph collection, the tubes were frozen and stored at -80 °C. Total protein concentrations were assayed with the Lowry et al. [42] method modified by Schacterle and Pollack [43]. The activities of acidic (pH 2.4), neutral (pH 7.0), and alkaline (pH 11.2) proteases in the hemolymph were analyzed with the Anson [44] method modified by Strachecka et al. [13]. Protease inhibitor activities were determined using Lee and Lin's [45] method.

2.3. Values of the Characteristics of Weather Conditions

Values of the characteristics of weather conditions in years covering experimental period have been shown in Table 2. The data were obtained from the Lublin-Radawiec meteorological station.

Table 2. Values of the characteristics of weather conditions in years covering experimental period. The data are presented as average with \pm standard deviation.

Year	Periods of Experiment (d)	Temperature Min (°C)	Temperature Max (°C)	Relative Humidity (%)	Rainy Days (per Period)	Average Rainfall (mm/m ² per Rainy d)
2019	1–7	10.14 \pm 2.05	20.22 \pm 1.48	68.29 \pm 9.5	5	0.4
	8–14	10.64 \pm 1.94	21.64 \pm 1.64	66.43 \pm 7.9	2	0.2
	15–21	13.22 \pm 2.82	25.43 \pm 2.66	68.28 \pm 6.8	2	2.5
2020	1–7	15.71 \pm 1.13	24.43 \pm 3.18	84.57 \pm 8.0	5	4.6
	8–14	15.21 \pm 2.0	25.0 \pm 2.28	77.3 \pm 8.8	3	8.7
	15–21	13.0 \pm 2.76	22.5 \pm 4.33	76.3 \pm 4.6	4	1.8
2021	1–7	10.66 \pm 2.5	23.43 \pm 1.32	61.43 \pm 3.9	1	0.2
	8–14	11.0 \pm 1.25	22.21 \pm 2.84	72.14 \pm 8.2	4	8.1
	15–21	15.57 \pm 2.66	28.79 \pm 1.66	65.9 \pm 7.0	1	0.2

2.4. Measurements of Comb Cell Width

Each experimental comb in which the workers were reared was photographed in the center of each comb half on one side of the comb. Next, in each half, the widths of 10 adjacent cells contacting with vertical side walls were measured following the procedure used by Dziechciarz et al. [36]. Each year (2019, 2020 and 2021), 100 cells (5 combs \times 2 measurements of 10 cells per combs) were measured in each type of the experimental combs (small- and standard-cell comb).

2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis of the results was processed using Statistica software formulas, version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. The data distribution was analyzed with the use of the Shapiro–Wilk test.

The effect of the year on the hemolymph parameters (protein concentration and activities of acidic protease, neutral protease, alkaline protease, acidic protease inhibitors, neutral protease inhibitors, and alkaline protease inhibitors) was assessed separately for the SMC and STC workers using the Kruskal–Wallis test, as all these data had no normal distribution.

The effect of age on the hemolymph parameters (protein concentration and activities of acidic protease, neutral protease, alkaline protease, acidic protease inhibitors, neutral protease inhibitors, and alkaline protease inhibitors) was assessed in each year (2019, 2020 and 2021), separately for the SMC and STC workers with the use of the Kruskal–Wallis test, as all these data had no normal distribution.

The protein concentrations and activities of the proteases and their inhibitors in the hemolymph were compared in each year (2019, 2020, and 2021) and within each age group (1 d, 7 d, 14 d and 21 d) between the SMC and STC workers. The paired sample T test was used for normally distributed data, and data with no normal distribution were analyzed using the pairwise Wilcoxon test.

The relationships between the width of the experimental combs cell and the year (2019, 2020 and 2021) were assessed separately for the small-cell combs ($n = 300$) and the standard-cell combs ($n = 300$) with the Kruskal–Wallis test. The Mann–Whitney test was used to compare the cell width in the small-cell experimental combs with the cell width in the standard-cell combs in each year (2019, $n = 100$; 2020, $n = 100$; 2021, $n = 100$).

3. Results

3.1. Protein Concentration, Protease, and Protease Inhibitor Activities

In both the SMC and STC workers, the year (2019, 2020 and 2021) had a significant effect on all hemolymph parameters (Table 3).

Table 3. Effect of the year (2019, 2020, and 2021) and age effect (1 d, 7 d, 14 d, and 21 d) on hemolymph parameters of worker bees reared in small- and standard-cell combs.

Hemolymph Parameters		Impact of the Year		Impact of the Age					
				2019		2020		2021	
		SMC	STC	SMC	STC	SMC	STC	SMC	STC
proteins concentrations	H	110.718	17.971	59.814	63.748	35.397	24.488	39.526	24.126
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of acidic proteases	H	68.288	40.181	65.198	65.936	38.954	30.565	28.372	29.851
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of neutral proteases	H	58.011	84.145	65.952	63.674	27.363	31.819	28.135	31.621
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of alkaline proteases	H	83.719	46.03	65.754	64.485	37.637	29.649	36.193	20.078
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of acidic protease inhibitors	H	106.543	120.807	95.042	97.125	36.897	31.139	48.024	54.35
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of neutral protease inhibitors	H	161.465	60.822	62.598	70.97	18.718	58.403	19.406	23.842
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
activities of alkaline protease inhibitors	H	44.443	6.086	73.821	73.873	42.088	59.088	43.027	54.529
	df	2	2	3	3	3	3	3	3
	p	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs, H—value of the Kruskal–Wallis test, df—number of degrees of freedom, p—probability value.

In all years, the age (1 d, 7 d, 14 d and 21 d) exerted a significant effect on all hemolymph parameters in both the SMC and STC workers (Table 3).

The weather conditions in each experimental period in the subsequent years of research were similar (Table 2). Only the amount of rainfall in 2019 was much lower than in other years, and the time in which the experiment was conducted was preceded by a long drought.

In all years (2019, 2020, and 2021), the protein concentrations in the 1-day-old bees were always significantly higher ($p \leq 0.05$) in the SMC than STC workers (Figure 1). The opposite was found for the activities of proteases and their inhibitors, as it was always higher in the STC than SMC workers, and the difference was usually significant ($p \leq 0.05$) (Figures 2–7). The only exception were the activities of acidic protease inhibitors in 2020, i.e., the difference in this parameter between the STC and SMC workers was not statistically significant (Figure 5) ($p = 0.12$).

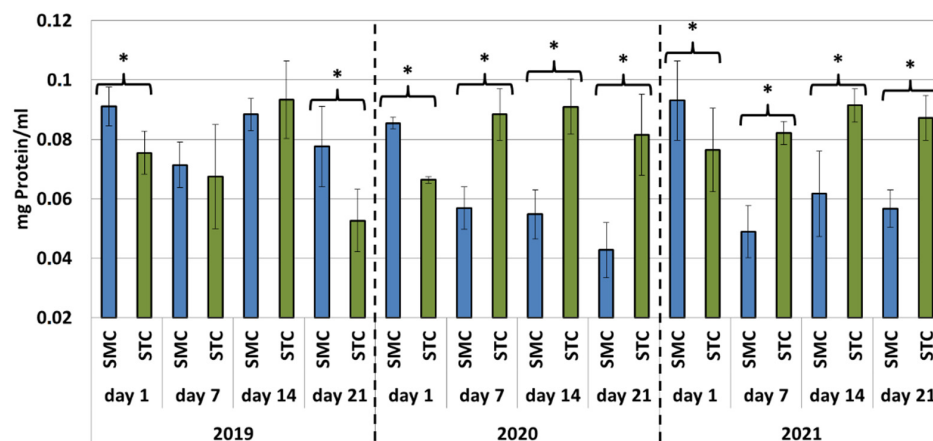


Figure 1. Protein concentrations in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

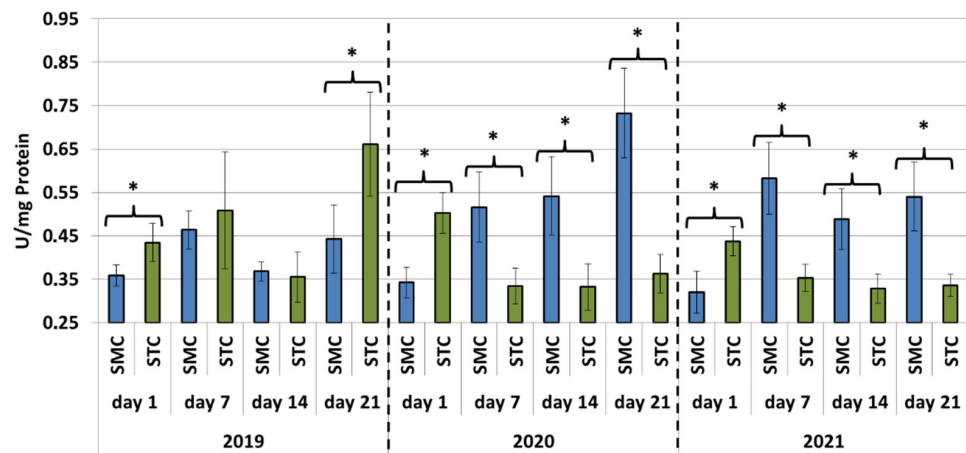


Figure 2. Acidic protease activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

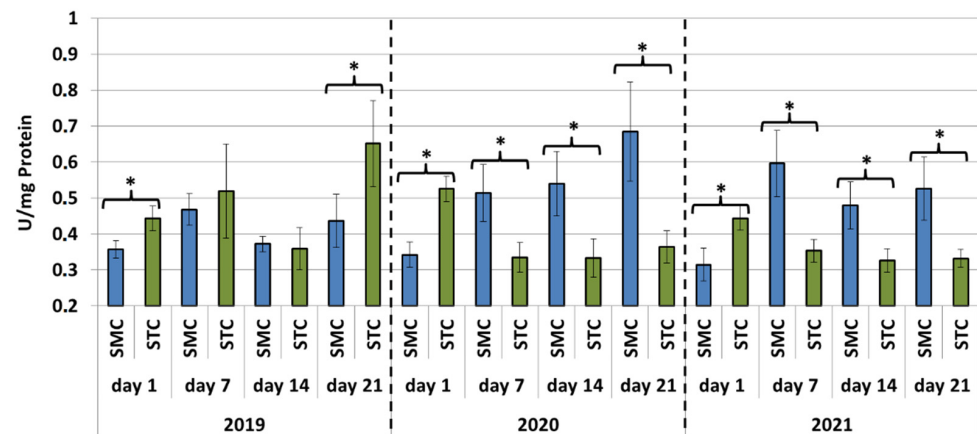


Figure 3. Neutral protease activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

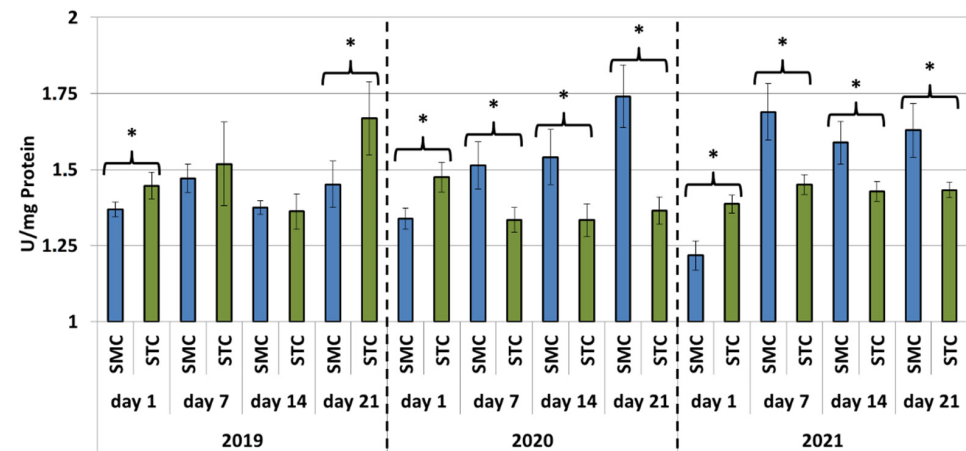


Figure 4. Alkaline protease activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

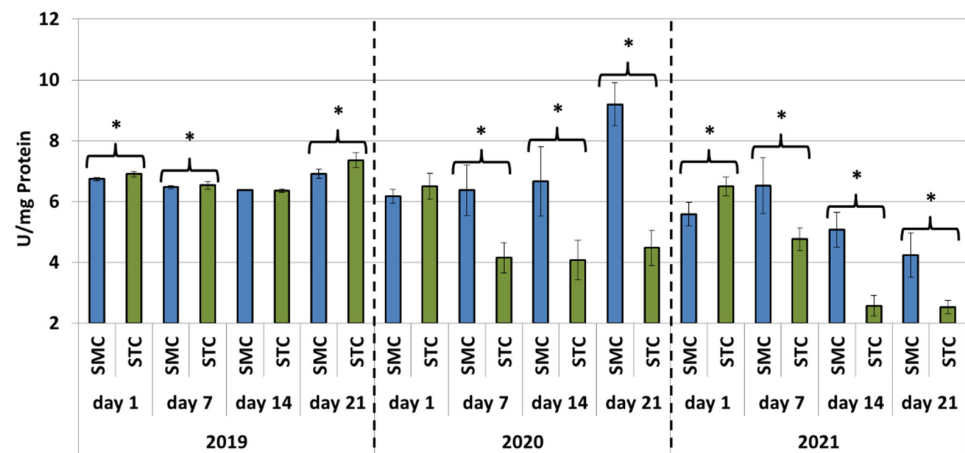


Figure 5. Acidic protease inhibitor activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

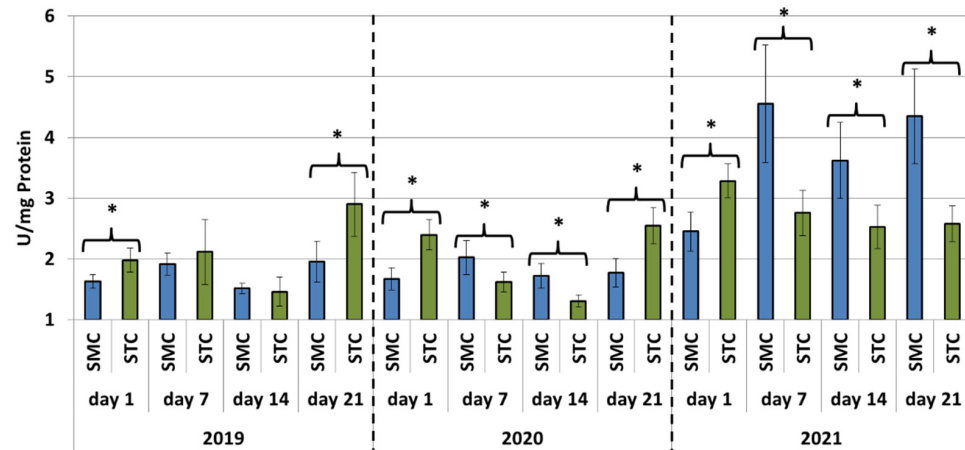


Figure 6. Neutral protease inhibitor activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

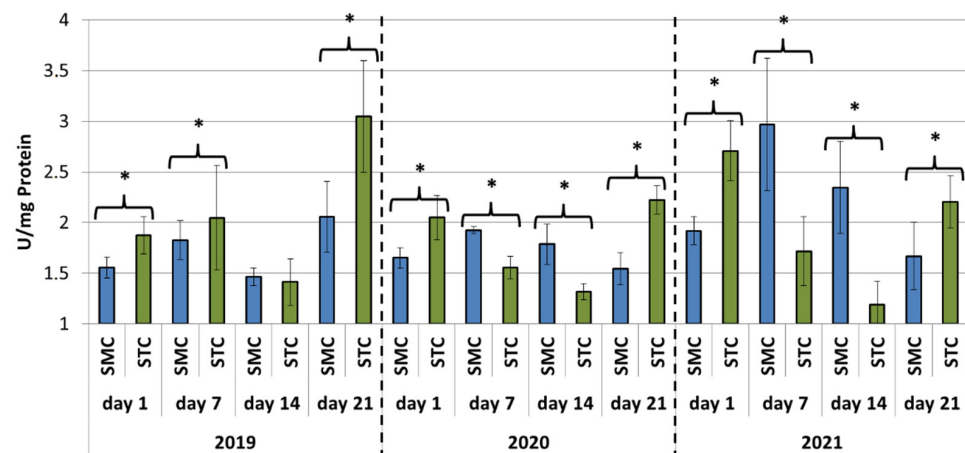


Figure 7. Alkaline protease inhibitor activities in the hemolymph of workers in three consecutive years. SMC—workers reared in small-cell combs; STC—workers reared in standard-cell combs; *—differences between SMC and STC within the age group are significant at $p \leq 0.05$.

In the other age groups (7 d, 14 d and 21 d), the trends in the protein concentration (Figure 1) and in the activities of proteases (Figures 2–4) and their inhibitors (Figures 5–7) were always almost identical in 2020 and 2021. Regardless of the workers' age (7 d, 14 d and 21 d), the protein concentrations were always significantly higher ($p \leq 0.05$) in STC than in SMC (Figure 1). In turn, opposite results were shown for the activities of proteases and their inhibitors, i.e., they were significantly higher ($p \leq 0.05$) in SMC than in STC (Figures 2–7), with the exception of the activities of neutral protease inhibitors in the 21-day-old workers in 2020 (Figure 6) and alkaline protease inhibitors in the 21-day-old workers in 2020 and 2021 (Figure 7), which were significantly higher ($p \leq 0.05$) in STC than in SMC.

In 2019, the trends in the values obtained in the groups of the 7-, 14- and 21-day-old workers differed significantly from those recorded in 2020 and 2021 (Figures 1–7). The values of the hemolymph parameters differed significantly between the age groups. Additionally, one age group exhibited higher values in the SMC workers, another age group was characterized by higher values in the STC workers, or the values in the SMC and STC workers did not differ significantly.

In 2020, the activities of proteases in the age groups (7, 14 and 21 d) increased in SMC and remained at a similar level in STC (Figures 2–4). In 2021, similar values of the parameter were recorded in both the SMC and STC workers, regardless of their age (Figures 2–4). In contrast, no such homogeneous trends were noted in the values of protease inhibitors (Figures 5–7).

3.2. Comb Cell Width

The width of the small-cell and standard-cell experimental combs did not differ between years ($H = 2.935$, $df = 2$, $p = 0.230$; $H = 4.409$, $df = 2$, $p = 0.110$, respectively; Kruskal–Wallis test).

The width of the small-cell experimental combs was significantly smaller (in 2019 $p \leq 0.01$, $n = 100$; in 2020 $p \leq 0.01$, $n = 100$; in 2021 $p \leq 0.01$, $n = 100$; Mann–Whitney test) than that of the standard-cell experimental combs. The mean values of the width of the small-cell experimental combs reached 4.97 mm (SD = 0.051) in 2019, 4.96 mm (SD = 0.037) in 2020, and 4.95 mm (SD = 0.038) in 2021. The mean values of the width of the standard-cell experimental combs were 5.57 mm (SD = 0.056) in 2019, 5.56 mm (SD = 0.052) in 2020, and 5.57 mm (SD = 0.054) in 2021.

4. Discussion

As in the case of hygienic behavior [37,39] or bee lifespan [38], the width of comb cells in which workers were reared had a significant effect on the protein concentrations and the activities of proteases and their inhibitors in hemolymph.

The decrease in the protein concentration in hemolymph is correlated with age [46] and different tasks fulfilled by workers (nurse or forager) [47]. The highest protein concentrations were determined in larvae and pupae; these values were lower in nurse workers and the lowest in foragers [47,48]. In the present study, the width of the comb cells (small or standard) where the workers were reared had a significant impact on the protein concentrations in the 1-day-old workers. In all study years, it was significantly higher (usually $p \leq 0.01$) in the SMC than STC workers. This may have been related to the nutrition of larvae in the small-cell combs reared by workers from standard-cell combs, as workers with larger body sizes are better feeders than smaller ones [49]. This was indirectly confirmed in our previous research showing that workers reared in standard-cell combs have a significantly larger head (width and height) than those reared in small-cell combs [36], which may be associated with the size and performance of hypopharyngeal glands. This hypothesis is worth confirming. Another cause of the significantly higher protein concentrations in the 1-day-old SMC workers may be the earlier activation of the proteolytic system in the STC than SMC workers, probably at the final pupal stage, through utilization of some portion of the protein. This is supported by the higher activities of proteases and their inhibitors on the first d of life in the STC workers.

Interestingly, the trends in the protein concentrations in the older workers (7, 14 and 21 d) were opposite to those in the 1-day olds. The values of this parameter were always significantly higher ($p \leq 0.01$) in STC than in SMC (2020 and 2021), whereas the opposite was usually found in the case of the activities of proteases and their inhibitors. This may have been related to the predisposition of workers reared in the combs with the different cell widths (small or standard) to undertake different tasks in the colony. Since it has been reported that foragers are characterized by lower protein concentrations than nurse workers [47,48,50,51], it can be assumed that SMC workers more often serve as foragers and STC workers more often work in the nest, e.g., as nurse workers. As suggested by Crailsheim [50], nurse workers have a more efficient digestive system than foragers; hence, their bodies [52] and hemolymph [50] contain higher protein levels. Additionally, the digestive enzymes of nurse workers operate at a constant temperature prevailing in the brood rearing area in the nest, while the enzymes of foragers operate at different, often lower, temperatures. Foragers consume small amounts of pollen (protein) only to meet their needs. In turn, the protein concentration and pollen consumption by nurse workers depend on the nitrogen balance in the nest [52]. The publications cited above [47,48,50–52] indicate that the protein concentration in the hemolymph is one of the physiological indicators distinguishing foragers from nurse workers.

The higher activities of proteases and their inhibitors in the SMC workers may be associated with the higher exposure of foragers to pathogens. It can therefore be assumed that the width of comb cells determines the division of labor within the worker caste. This hypothesis was proposed in one of our earlier studies [36]. We assumed that, in addition to age polyethism, the significant variability in the comb cell width in nests formed without the wax foundation [29] introduces elements of morphological polyethism common to some ant species into the bee colony [53], which may represent a compromise between specialization and behavioral flexibility. Certainly, this hypothesis needs to be confirmed, but its validity may be supported by the research on bumblebees conducted by Spaethe and Weidenmüller [54] and Worden [55]. As reported by the authors, compared to small bumblebee workers, large individuals are more likely to work as foragers [54] and learn faster [55]. The present results indicate that the SMC workers had a greater predisposition to work as foragers, in contrast to the results obtained in the study of bumblebees. However, due to the significant differences in the social lifestyles between honeybees and bumblebees, these mechanisms may differ.

The results obtained in 2019 often differed significantly from those from the other two years. Probably, this did not result from the brood rearing conditions in the foster colonies, as the trends on the first day of workers' life were similar in all the years. Differences were noted only in the older bees (7, 14, and 21 d). This may be related to the conditions in the colonies where the labeled bees were placed or is a consequence of environmental conditions. In our opinion, the prolonged period of severe drought in the time preceding the experiment in 2019 limited nectar flow of flower plants and in consequence limited the flight activities of foragers. The impact of many environmental factors on the foraging behavior has been confirmed by Abou-Shaara [56]. Therefore, to reduce the impact of accidental factors on the results of single-year research on honeybees, it is advisable that such investigations should be conducted for several consecutive years.

5. Conclusions

The width of comb cells where the workers were reared exerted a significant effect on the protein concentration and activities of proteases and their inhibitors in honeybee hemolymph. In the group of the 1-day-old workers, higher protein concentrations were determined in bees reared in the small-cell combs, whereas higher activities of proteases and their inhibitors were detected in individuals reared in the standard-cell combs. Opposite results were found in the older workers aged 7, 14 and 21 d.

The hypothesis of the effect of the width of comb cells where workers are reared on the division of labor in the colony is worth elucidation. This may explain the role of the

high variability in the cell width in natural combs formed without the wax foundation and provide new knowledge of the evolution of the honeybee.

Author Contributions: Concept, research, discussion, and writing, K.O. and P.D.; research concept in apiary P.D.; research, writing, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre, Poland, OPUS Grant number 2018/31/B/NZ9/02480.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study, because honey bees (*Apis mellifera*) are not included in the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

References

1. Evans, J.D.; Spivak, M. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, 62–72. [[CrossRef](#)]
2. Traniello, J.F.A.; Rosengaus, R.B.; Savoie, K. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6838–6842. [[CrossRef](#)]
3. Peng, Y.S.; Fang, Y.; Xu, S.; Ge, L. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* **1987**, *49*, 54–60. [[CrossRef](#)]
4. Starks, P.T.; Blackie, C.A.; Seeley, T.D. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 229–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rothenbuhler, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease—Killed brood. *Anim. Behav.* **1964**, *12*, 578–583. [[CrossRef](#)]
6. Spivak, M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **1996**, *27*, 245–260. [[CrossRef](#)]
7. Arathi, H.S.; Burns, I.; Spivak, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (hymenoptera: Apidae) behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **2000**, *106*, 368–379. [[CrossRef](#)]
8. Strachecka, A.; Łoś, A.; Filipczuk, J.; Schulz, M. Indywidualne i społeczne mechanizmy odporności pszczoły miodnej. *J. Med. Veter.* **2018**, *74*, 426–433. [[CrossRef](#)]
9. Chan, Q.W.; Foster, L.J. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biol.* **2008**, *9*, R156. [[CrossRef](#)]
10. Strachecka, A.; Paleolog, J.; Grzywnowicz, K. The surface proteolytic activity in *Apis mellifera*. *J. Apic. Sci.* **2008**, *52*, 49–56.
11. Bode, W.; Fernandez-Catalan, C.; Nagase, H.; Maskos, K. Endoproteinase-protein inhibitor interactions. *Apms* **1999**, *107*, 3–10. [[CrossRef](#)]
12. Evans, J.D.; Aronstein, K.; Chen, Y.P.; Hetru, C.; Imler, J.-L.; Jiang, H.; Kanost, M.; Thompson, G.J.; Zou, Z.; Hultmark, D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 645–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Strachecka, A.; Demetraki-Paleolog, J. System proteolityczny powierzchni ciała *Apis mellifera* w zachowaniu zdrowotności rodzin pszczelich. *Kosmos* **2011**, *60*, 43–51.
14. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Honey Bee Proteolytic System and Behavior Parameters under the Influence of an Electric Field at 50 Hz and Variable Intensities for a Long Exposure Time. *Animals* **2021**, *11*, 863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Asgari, S.; Zhan, G.; Zareie, R.; Schmidt, O.A. Serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *33*, 1017–1024. [[CrossRef](#)]
16. Kanost, M.; Jiang, H. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. *Curr. Opin. Insect* **2015**, *11*, 47–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kanost, M.R.; Clarke, T. Proteases. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, 1st ed.; Gilbert, L.I., Gill, S., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005; Volume 4, pp. 247–266.
18. Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; Van Gestel, C.A.; Mommaerts, V. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **2012**, *21*, 973–992. [[CrossRef](#)]
19. Cullen, M.G.; Thompson, L.J.; Carolan, J.C.; Stout, J.C.; Stanley, D.A. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225743. [[CrossRef](#)]
20. Paleolog, J.; Wilde, J.; Siuda, M.; Bąk, B.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Imidacloprid markedly affects hemolymph proteolysis, biomarkers, DNA global methylation, and the cuticle proteolytic layer in western honeybees. *Apidologie* **2020**, *51*, 620–630. [[CrossRef](#)]

21. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J. *Varroa* treatment with bromfenvinphos markedly suppresses honeybee biochemical defence levels. *Entomol. Exp. Appl.* **2016**, *160*, 57–71. [[CrossRef](#)]
22. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J.; Borsuk, G.; Bajda, M.; Krauze, M.; Merska, M.; Chobotow, J. Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2014**, *86*, 165–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Paleolog, J. Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis mellifera* resistance and extends the apian life-span. *J. Apic. Sci.* **2015**, *59*, 129–141. [[CrossRef](#)]
24. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, L.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–11. [[CrossRef](#)]
25. Tautz, J. *Phänomen Honigbiene*, 2nd ed.; Spectrum-Elsevier: Heidelberg, Germany, 2007; p. 156.
26. McMullan, J.B.; Brown, M.J.F. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2006**, *37*, 665–672. [[CrossRef](#)]
27. Coffey, M.F.; Breen, J.; Brown, M.J.F.; McMullan, J.B. Brood-cell size has no influence on the population dynamics of *Varroa destructor* mites in the native western honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie* **2010**, *41*, 522–530. [[CrossRef](#)]
28. Singer, H.J.; van Praagh, J.P.; Paulus, H.F. Interactions between honeybees and *Varroa* mites influenced by cell sizes and hygienic behaviour. *Entomol. Gen.* **2019**, *38*, 255–273. [[CrossRef](#)]
29. Maggi, M.; Damiani, N.; Ruffinengo, S.; De Jong, D.; Principal, J.; Eguaras, M. Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the reproductive behavior of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* **2010**, *50*, 269–279. [[CrossRef](#)]
30. Message, D.; Goncalves, L.S. Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **1995**, *26*, 381–386. [[CrossRef](#)]
31. Piccirillo, G.A.; De Jong, D. The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 36–42.
32. Ellis, A.M.; Hayes, G.W.; Ellis, J.D. The efficacy of small cell foundation as a varroa mite (*Varroa destructor*) control. *Exp. Appl. Acarol.* **2009**, *47*, 311–316. [[CrossRef](#)]
33. Berry, J.A.; Owens, W.B.; Delaplane, K.S. Small-cell comb foundation does not impede *Varroa* mite population growth in honey bee colonies. *Apidologie* **2010**, *41*, 40–44. [[CrossRef](#)]
34. Seeley, T.D.; Griffin, S.R. Small-cell comb does not control *Varroa* mites in colonies of honeybees of European origin. *Apidologie* **2011**, *42*, 526–532. [[CrossRef](#)]
35. Taylor, M.A.; Goodwin, R.M.; McBrydie, H.M.; Cox, H.M. The effect of honey bee worker brood cell size on *Varroa destructor* infestation and reproduction. *J. Apic. Res.* **2008**, *47*, 239–242. [[CrossRef](#)]
36. Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie* **2021**, *52*, 1017–1032. [[CrossRef](#)]
37. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A. Life span of worker honeybees reared in colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014**, *70*, 10–13.
38. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A.; Bajda, M. Hygienic behaviour of colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014**, *70*, 2013–2015.
39. Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Dead brood of *Apis mellifera* is removed more effectively from small-cell combs than from standard-cell combs. *Animals* **2022**, *12*, 418. [[CrossRef](#)]
40. Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Prospects and validity of laboratory cage tests conducted in honeybee research part one: Main directions of use of laboratory cage tests in honeybee research. *J. Apic. Sci.* **2019**, *63*, 201–207. [[CrossRef](#)]
41. Borsuk, G.; Ptaszyńska, A.A.; Olszewski, K.; Domaciuk, M.; Krutmuang, P.; Paleolog, J. A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170487. [[CrossRef](#)]
42. Lowry, O.H.; Rosebriugh, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
43. Schacterle, G.; Pollack, R. Simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* **1973**, *51*, 654–655. [[CrossRef](#)]
44. Anson, M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **1938**, *22*, 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lee, T.; Lin, Y. Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air-or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Sci.* **1995**, *106*, 43–54. [[CrossRef](#)]
46. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect “Blood” and Body Surface Elution. *Sensors* **2018**, *18*, 1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wilson-Rich, N.; Dres, S.T.; Starks, P.T. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 1392–1399. [[CrossRef](#)]
48. Eckholm, B.J.; Huang, M.H.; Anderson, K.E.; Mott, B.M.; DeGrandi-Hoffman, G. Honey bee (*Apis mellifera*) intracolony genetic diversity influences worker nutritional status. *Apidologie* **2015**, *46*, 150–163. [[CrossRef](#)]
49. Willem, J.; Boot, J.N.M.; Allsopp, C.; Allsopp, M. Differential feeding of larvae affects caste differentiation in *Apis mellifera*. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.* **2006**, *17*, 63–69. [[CrossRef](#)]

50. Crailsheim, K. Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *J. Insect Physiol.* **1986**, *32*, 629–634. [[CrossRef](#)]
51. Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H.; Gerig, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **1982**, *28*, 61–68. [[CrossRef](#)]
52. Crailsheim, K.; Schneider, L.H.W.; Hrassnigg, N.; Bühlmann, G.; Brosch, U.; Gmeinbauer, R.; Schöffmann, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* **1992**, *38*, 409–419. [[CrossRef](#)]
53. Mertl, A.L.; Traniello, J.F. Behavioral evolution in the major worker subcaste of twig-nesting *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae): Does morphological specialization influence task plasticity? *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2009**, *63*, 1411–1426. [[CrossRef](#)]
54. Spaethe, J.; Weidenmüller, A. Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insectes Sociaux* **2002**, *49*, 142–146. [[CrossRef](#)]
55. Worden, B.D.; Skemp, A.K.; Papaj, D.R. Learning in two contexts: The effects of interference and body size in bumblebees. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2045–2053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Abou-Shaara, H.F. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: A review. *Vet. Med.* **2014**, *59*, 1–10. [[CrossRef](#)]

dr hab. Aneta Strachecka, prof. Uczelni
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i
Rybacko
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Strachecka A., Olszewski, K. (2022). Effect of comb cell width on the activity of the proteolytic system in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Animals*, 12, 978. <https://doi.org/10.3390/ani12080978>

mój udział polegał na przeprowadzeniu badań, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022



Podpis

dr hab. Krzysztof Olszewski, prof. Uczelni
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i
Rybacktwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Strachecka A., Olszewski, K. (2022). Effect of comb cell width on the activity of the proteolytic system in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Animals*, 12, 978. <https://doi.org/10.3390/ani12080978>

mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu badań, przeprowadzeniu dyskusji, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 15%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022


Podpis

Praca 3.

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2022). Dead brood of *Apis mellifera* is removed more effectively from small-cell combs than from standard-cell combs. *Animals*, 12, 418. <https://doi.org/10.3390/ani12040418>

Article

Dead Brood of *Apis mellifera* Is Removed More Effectively from Small-Cell Combs Than from Standard-Cell Combs

Piotr Dziechciarz , Grzegorz Borsuk and Krzysztof Olszewski *

Department of Apidology, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, 13 Akademicka St., 20-950 Lublin, Poland; piotr.dziechciarz@up.lublin.pl (P.D.); grzegorz.borsuk@up.lublin.pl (G.B.)

* Correspondence: krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

Simple Summary: Honeybee workers are able to detect dead or infected brood in comb cells and remove it outside the nest before the infection spreads onto the colony. Such a phenomena is called an hygienic behaviour. Colonies with efficient hygienic behaviour are more resistant to diseases. Bee comb cells may vary in width. In Europe, standard-cell combs (cell width approx. 5.50 mm) and small-cell combs (cell width approx. 4.90 mm) are used. Typically, colonies are kept only on standard- or small-cell combs. We assessed the dead brood removal efficiency in colonies kept on both comb types. Simultaneous keeping of a colony on standard- and small-cell combs is a novel approach to the use of small-cell combs in beekeeping. The removal from small-cell combs was significantly more efficient than in the case of the standard-cell combs, which indicates that bees find dead brood in small-cell combs faster or devoted more attention to the removal. Better understanding of the effect of the simultaneous keeping of colonies on standard- and small-cell combs on the efficiency of hygienic behaviour may contribute to enhancement of the resistance of bee colonies to diseases.

Abstract: The efficiency of the hygienic behaviour in bee colonies towards dead brood was assessed in small-cell combs (SMCombs) and in standard-cell combs (STCombs). Each colony had both types of combs in the nest on a permanent basis. Simultaneous keeping of a colony on standard- and small-cell combs is a novel approach to the use of small-cell combs in beekeeping. The number of killed pupae removed within 24 h was the measure of the hygienic behaviour efficiency. Regardless of the year, the brood in the SMCombs was uncapped and removed significantly more efficient ($p \leq 0.01$) than in the STCombs (number of non-uncapped cells: in 2020 SMCombs = 3.79, STCombs = 11.62; in 2021 SMCombs = 2.34, STCombs = 5.28 and completely removed cells: in 2020 SMCombs = 87.46, STCombs = 80.04; in 2021 SMCombs = 96.75, STCombs = 92.66). In colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs, the width of the comb cells has a significant effect on the efficiency of removal of dead brood, which is removed more efficient from small-cell combs than from standard-cell combs.

Keywords: *Apis mellifera*; hygienic behaviour; bee comb; small-cell combs



Citation: Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Dead Brood of *Apis mellifera* Is Removed More Effectively from Small-Cell Combs Than from Standard-Cell Combs. *Animals* **2022**, *12*, 418. <https://doi.org/10.3390/ani12040418>

Received: 10 January 2022

Accepted: 8 February 2022

Published: 10 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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

In addition to cellular and humoral immune responses against pathogens [1], social insects have developed social resistance, with nest hygiene as one of its forms [2,3]. This type of resistance was detected in termites [4], ants [5,6], stingless bees [7], and honeybees [8,9]. However, the hygienic behaviour forced by the repeated use of the same cells is specific only to honeybees [8]. Hygienic behaviour is a natural defence mechanism against brood diseases. It consists in recognition and uncapping cells with dead or infected brood and removal of the brood from the nest before the infection spreads in the colony [10–12]. The number or percentage of killed pupae that are completely removed per unit of time, most often within 24 h, is a measure of hygienic behaviour [13].

Hygienic behaviour can be helpful in non-chemical control of common brood diseases, e.g., chalk brood [14,15] and American foulbrood [14,16], and in reduction of *Varroa* infestations [13,17]. Long-term chemical disease control leads to immunisation of pathogens and parasites to the active substances of the applied medicaments [18–21] and to contamination of bee products [22,23].

Hygienic behaviour is modified by environmental factors, e.g., nectar flow [24], and factors of the internal environment in the nest, e.g., comb cell width [25]. As reported by Olszewski et al. [25], keeping colonies on small-cell combs (cell width of 4.93 mm) results in a significant increase in the efficiency of hygienic behaviour in comparison with colonies kept on standard-cell combs (cell width of 5.56 mm). However, it has not been clarified whether bees reared on small-cell combs are more efficient in identification of dead brood cells and removal of their contents or whether dead brood in small-cell combs stimulates worker bees to clean the cells more efficiently than brood in standard-cell combs. Summing up, the question is whether the greater intensity of hygienic behaviour in colonies kept on small-cell combs is associated with workers traits or brood traits.

The interest in small-cell combs has been aroused by reports showing that the development of *Varroa destructor* parasite populations can be reduced by rearing brood in small-cell combs instead of standard-cell combs. With its global range, the *V. destructor* mite causes large colony losses, and is therefore the biggest and most common problem of modern apiculture [26–28]. To date, the reduction of the development of *V. destructor* populations in brood reared in small-cell combs has been confirmed in Europe [29], Argentina [30], and Brazil [31,32]. In contrast, this has not been confirmed by studies conducted in the USA [28,33,34], New Zealand [35], and some studies carried out in Europe [36]. However, it has been shown that keeping colonies on small-cell combs exerts a significant effect on the morphological traits and the biology of worker bees. This results in a decrease in the thorax weight, head width and height, thorax width and length, width and length of fore wings, and width of the 3rd and 4th tergites [28,37,38]; additionally, it contributes to a higher effectiveness of hygienic behaviour [25] and a higher rate of springtime colony development [33] as well as extension of the lifespan of workers [39].

The aim of the study was to investigate the efficiency of dead brood removal from small-cell combs and from standard-cell combs in colonies kept simultaneously on both types of combs. This is a novel approach to the use of small-cell combs in beekeeping. Previous investigations were focused on comparison of colonies kept only on small-cell combs with colonies kept only on standard-cell combs.

2. Materials and Methods

2.1. Characteristics of Bee Colonies

The study was conducted in the 2020 and 2021 years at the apiary of the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E). In each year, eight strong colonies with a similar strength and structure headed by naturally mated Buckfast sister-queens were analysed. The colonies were kept in Dadant Blatt hives. The Buckfast bee colonies kept in our apiary are very well adapted to living on small-cell combs [37], hence we used these bees in our experiment. Each colony was kept in one brood chamber with 10 frames (435mm × 300 mm) and two honey supers, each with 10 frames (435mm × 150 mm). The honey supers were separated from the brood chamber by a queen excluder. In the centre of the nest in each colony, there were four small-cell combs (SMCombs) and five standard-cell combs (STCombs); three of the latter combs were located to the right and two to the left of the SMCombs (small-cell combs) (view facing the hive entrance) (Figure 1). Additionally, one drone-brood comb was located as the leftmost comb of the nest. The honey and beebread were stored in the standard-cell comb on the opposite side of the nest to the drone-brood comb (Figure 1). The other worker combs (SMCombs and STCombs) were almost completely occupied by brood.

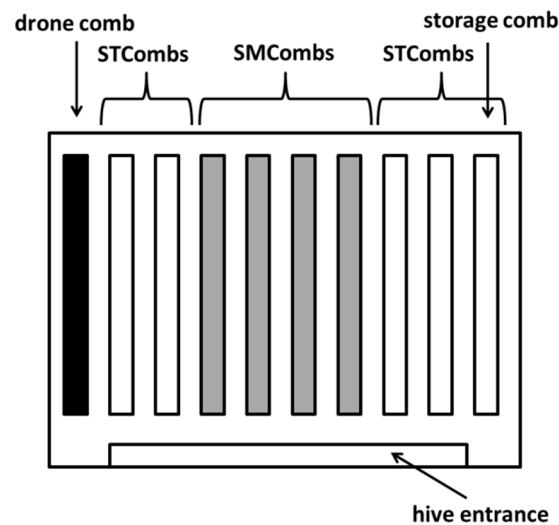


Figure 1. Scheme of the arrangement of the combs in the colony brood-chamber. SMCombs—small-cell combs; STCombs—standard-cell combs.

2.2. Assessment of Hygienic Behaviour

In the second half of July, during the period without nectar flow, 100 cells with pupae were pierced in each of the colonies in one of the SMCombs and one of the STCombs (pin test). Combs with pierced brood were placed side by side to exclude the impact of the different location in the nest on the rate of dead brood removal. The pupae were pierced when their body was white and their eyes were purple (days 15–17 of preimaginal development). In each colony, the test was repeated three times in 2020 and four times in 2021. Two kinds of “Brushes” made of 100 pins (entomological pins, size No 2, diameter = 0.45 mm) were used for piercing, separate brush in the SMCombs and separate brush in the STCombs. The arrangement of the pins in the brushes facilitated piercing the pupa in the centre of each cell. The pin test was chosen, as it is a standard European method for the assessment of hygienic behaviour in selection for disease-resistant bees [13,40]. In our opinion, it is also more reliable than other methods [41]. The pierced brood was photographed 24 h after it was pricked and its removal rate was assessed by means of the digital image analysis system MultiScanBase v. 14.02 (scoring option) supplied by Computer Scanning System II, Warsaw, Poland. Non-uncapped and completely removed cells (with a completely removed pupa) were counted.

2.3. Measurements of Comb Cell Width

Each comb in which the brood was pierced was marked and, after young bees emerged, the cells with open brood were photographed in the centre of each comb quarter on one side of the comb. Next, in each quarter, the widths of 10 adjacent cells contacting with vertical side walls were measured [37].

2.4. Statistical Analysis

The results were analysed statistically using Statistica software formulas, version 13.3 (2017) for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA.

The data distribution was analysed with the use of the Shapiro–Wilk test. Since the data were not normally distributed, non-parametric tests were used for the analysis. The effect of the year relative to the comb type (SMCombs, STCombs) on types of pierced brood cells (non-uncapped, completely removed) was assessed using the Mann–Whitney test. The number of individual cell types between SMCombs and STCombs was compared with the pairwise Wilcoxon test.

The widths of the cells in the SMCombs (in 2020 $n = 320$, in 2021 $n = 320$) and in the STCombs (in 2020 $n = 320$, in 2021 $n = 320$) were compared with the pairwise Wilcoxon test.

3. Results

3.1. The Efficiency of Hygienic Behaviour

The year had a significant effect on the efficiency of hygienic behaviour. In the SMCombs and STCombs, there were larger numbers of non-uncapped cells in the 2020 than in 2021 (SMCombs— $U = 234.5$, $p \leq 0.01$; STCombs— $U = 88.5$, $p \leq 0.01$; Mann–Whitney test), whereas significantly higher numbers of completely removed cells were noted in the 2020 (SMCombs— $U = 62.5$, $p \leq 0.01$; STCombs— $U = 52.5$, $p \leq 0.01$, Mann–Whitney test). Regardless of the season, the brood in the SMCombs was uncapped and removed with significantly more efficiency than in the STCombs (number of non-uncapped cells $p \leq 0.01$ and completely removed cells $p \leq 0.01$) (Figure 2).

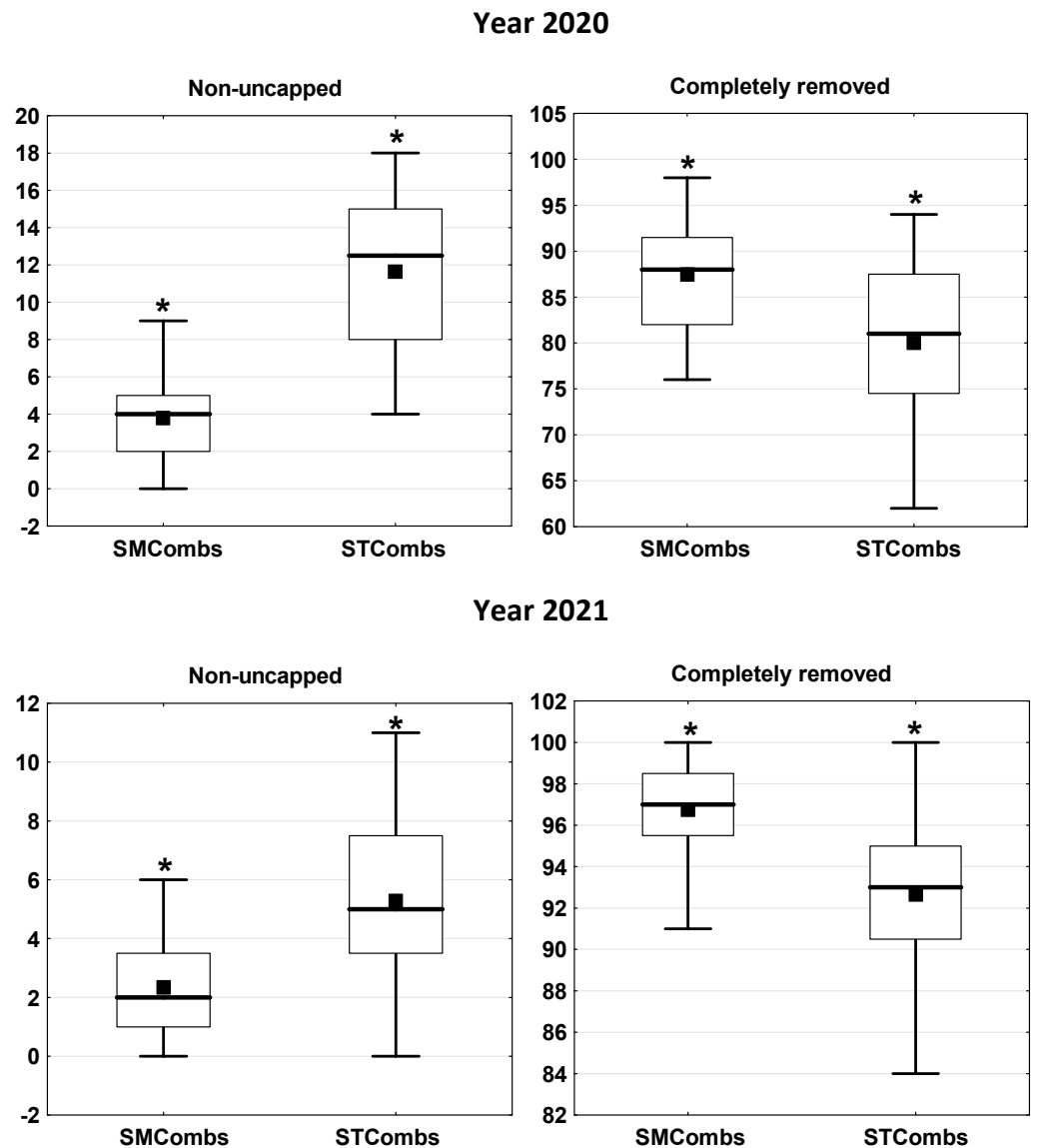


Figure 2. Years 2020 and 2021; number of cells with pierced brood, non-uncapped and completely removed in small-cell and standard-cell combs. SMCombs—small-cell combs; STCombs—standard-cell combs; the boxes indicate the data between the 25 and 75% quartiles including the median (black line); the black squares represent the mean; the whiskers represent the minimum and maximum values; *—the difference between SMCombs and STCombs is significant at $p \leq 0.01$; (pairwise Wilcoxon test).

3.2. Comb Cell Width

The width of the SMCombs was significantly smaller (in 2020 $p \leq 0.01$, in 2021 $p \leq 0.01$) than that of the STCombs. The mean values of width of SMCombs in 2020 reached 4.97 mm (SD = 0.044), and in 2021 reached 4.96 mm (SD = 0.042). The mean values of width of STCombs in 2020 reached 5.57 mm (SD = 0.050), and in 2021 reached 5.56 mm (SD = 0.052).

4. Discussion

Simultaneous keeping of a colony on standard- and small-cell combs is a novel approach to the use of small-cell combs in beekeeping. There is no information of such a management in the literature. Previous investigations were focused on comparison of colonies kept only on small-cell combs with colonies kept only on standard-cell combs. Olszewski et al. [25] found that colonies kept on small-cell combs exhibited higher hygienic behaviour in comparison with colonies kept on standard-cell combs. In the present study, the width of the comb cells with brood in the colonies kept simultaneously on small- and standard-cell combs had a significant effect on the efficiency of dead brood removal as well. In this study, the dead brood was removed significantly more efficient from the SMCombs than from the STCombs (number of completely removed cells $p \leq 0.01$). The more efficient removal of dead brood from the SMCombs may have been caused by the higher concentration of pheromones inside the cells, i.e., in the air filling the space between the pupa and the cell walls, which enabled workers to better identify dead brood. The higher concentration of pheromones may be related to the fact that, despite the 8–12% smaller width of the small versus standard cells, the honeybee body does not decrease in proportion to the cell width, as the thorax width decreases only by 0.8–4.4% [28,37,38]. This results in tighter filling of the cell by the pupa, and thus the presence of a smaller volume of air in the free space between the pupa and the cell walls. The fill factor, i.e., the thorax width to cell width ratio, is a measure of cell filling by the pupa [28,37,38]. At a similar level of secretion, the smaller air volume inside small-width cells is characterized by a higher degree of saturation with pheromones. It has been confirmed that odorant signals facilitate detection of dead and diseased brood in the capped cell [42,43]. In brood killed by freezing, β -ocimene and oleic acid [42] are strong inducers of hygienic behaviour, as probably in the case of pin-killed brood. Odorant signals are picked up by antennae, and hygienic workers are more sensitive than unhygienic ones [44], especially those involved in uncapping cells and initiating removal [45].

Some of the present conclusions may seem to be too bold. However, the current knowledge of the impact of keeping a colony simultaneously on standard-cell combs and small-cell combs on bee traits and colony biology is insufficient [37]. The basis for these conclusions was provided by the research conducted as part of the project “Elucidation of the phenomenon of behavioural overdominance of honeybee colonies kept on two types of combs with standard- and small-cell size,” no. 2018/31/B/NZ9/02480, financed by the National Science Centre, Poland. In colonies kept on both standard-cell combs and small-cell combs, there is an effect of the interaction of workers reared in these two types of combs, which is similar to the effect of heterosis. In terms of the colony strength, springtime colony development rate, and productivity, these colonies significantly exceed those kept only on small- or standard-cell combs [46].

Noteworthy, keeping the same colony on standard- and small-cell combs in the nest results in an increased variability of the cell width, which is similar to that in natural nests constructed without a wax foundation [30]. In such a nest, the variation in the comb cell width range from 4.17 to 8.07 mm. Worker and drone brood was reared in 4.17–6.86 mm and 5.05–8.07 mm wide cells, respectively, which indicates that both castes were reared in cells with a width in the range of 5.05–6.86 mm. We suspect that the increased cell variability in the colony results in increased variability in worker bees. The results reported by Maggi et al. [30] and our present [46] and previous [37] studies raise the question of whether the potentially differing brood rearing conditions related to the different comb cell width and the changes in the morphological traits of worker bees

caste (greater variability of workers in the colony) regarded as one of the consequences of the different conditions [37] may increase the non-reproductive division of labour in the worker caste. Such a mechanism was confirmed in bumblebees, which were characterised by behavioural and physiological differences between large and small workers observed in the same colony [47]. Large bumblebee workers are more likely to work as foragers [48] and learn faster [49], whereas small ones tend to work in the nest [48] and learn more slowly [49]. On this basis, Worden et al. [49] proposed that the learning predisposition related to the body size should be considered a factor in the division of labour between large and small bumblebee workers. In the case of honeybees, the focus has so far been placed mainly on age polyethism, which probably results from the morphological similarity of worker bees, i.e., the absence of clearly distinct morphological sub-castes of worker bees. This morphological similarity is further increased by the uniformity of the comb cell width resulting from the widespread use of the wax foundation. In our opinion, it cannot be ruled out that, in colonies with a natural variability of comb cells and those reared simultaneously on standard- and small-cell combs, in addition to age polyethism, an effect is exerted by elements of morphological polyethism, which may be a compromise between specialisation and behavioural flexibility. One of the effects of this mechanism may be the greater intensification of hygienic behaviour in colonies reared simultaneously on standard- and small-cell combs.

Thus far, a subcaste of rebel workers, which are physiologically and anatomically different from normal workers, has been identified in the honeybee caste [50,51]. However, potential morphological differences of rebel workers from normal workers have not been investigated to date.

5. Conclusions

In colonies kept simultaneously on standard- and small-cell combs, the width of the comb cells has a significant effect on the efficiency of removal of dead brood, which is removed more efficiently from small-cell combs than from standard-cell combs.

Author Contributions: Concept, research, discussion, writing, K.O. and P.D.; research concept in apiary P.D.; research, writing, G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre, Poland, OPUS Grant number 2018/31/B/NZ9/02480.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study, because honey bees (*Apis mellifera*) are not included in the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

References

1. Siva-Jothy, M.T.; Moret, Y.; Rolff, J. Evolutionary ecology of insect immunity. *Adv. Insect. Physiol.* **2005**, *32*, 1–48. [[CrossRef](#)]
2. Cremer, S.; Armitage, S.A.; Schmid-Hempel, P. Social immunity. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 693–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Evans, J.D.; Spivak, M. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, 62–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Davis, H.E.; Meconcelli, S.; Radek, R.; McMahon, D.P. Termites shape their collective behavioural response based on stage of infection. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pull, C.D.; Ugelvig, L.V.; Wiesenhofer, F.; Grasse, A.V.; Tragust, S.; Schmitt, T.; Brown, M.J.F.; Cremer, S. Destructive disinfection of infected brood prevents systemic disease spread in ant colonies. *Elife* **2018**, *7*, e32073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Currie, C.R.; Stuart, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. B* **2001**, *268*, 1033–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Al Toufailya, H.; Alves, D.A.; Bento, J.M.S.; Marchini, L.C.; Ratnieks, F.L.W. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. *Biol. Open* **2016**, *11*, 1712–1718. [[CrossRef](#)]
8. Michener, C.D. *The Social Behavior of the Bees*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1974.
9. Spivak, M.; Danka, R.G. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie* **2021**, *52*, 1–16. [[CrossRef](#)]
10. Rothenbuhler, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Anim. Behav.* **1964**, *12*, 578–583. [[CrossRef](#)]
11. Spivak, M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **1996**, *27*, 245–260. [[CrossRef](#)]
12. Arathi, H.S.; Burns, I.; Spivak, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (hymenoptera: *Apidae*) behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **2000**, *106*, 368–379. [[CrossRef](#)]
13. Büchler, R.; Berg, S.; Le Conte, Y. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* **2010**, *41*, 393–408. [[CrossRef](#)]
14. Spivak, M.; Reuter, G.S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **2001**, *32*, 555–565. [[CrossRef](#)]
15. Invernizzi, C.; Rivas, F.; Betticci, L. Resistance to Chalkbrood Disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: *Apidae*) Colonies with Different Hygienic Behaviour. *Neotrop. Entomol.* **2011**, *40*, 28–34. [[CrossRef](#)]
16. Palacio, M.A.; Figini, E.E.; Ruffinengo, S.R.; Rodriguez, E.M.; del Hoyo, M.L.; Bedascarrasbure, E.L. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **2000**, *31*, 471–478. [[CrossRef](#)]
17. Rinderer, T.E.; Harris, J.W.; Hunt, G.J.; de Guzman, L.I. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie* **2010**, *41*, 409–424. [[CrossRef](#)]
18. Milani, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* **1999**, *30*, 229–234. [[CrossRef](#)]
19. Kochansky, J.; Knox, D.A.; Feldlaufer, M.; Pettis, J.S. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and-resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* **2001**, *32*, 215–222. [[CrossRef](#)]
20. Evans, J.D. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertbr. Pathol.* **2003**, *83*, 46–50. [[CrossRef](#)]
21. Sammataro, D.; Untalan, P.; Guerrero, F.; Finley, J. The resistance of varroa mites (Acari: *Varroidae*) to acaricides and the presence of esterase. *Int. J. Acarol.* **2005**, *31*, 67–74. [[CrossRef](#)]
22. Wallner, K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **1999**, *30*, 235–248. [[CrossRef](#)]
23. Serra-Bonvehí, J.; Orantes-Bermejo, J. Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 1230–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gerdts, J.; Dewar, R.L.; Simone-Finstrom, M.; Edwards, T.; Angove, M. Hygienic behaviour selection via freeze-killed honey bee brood not associated with chalkbrood resistance in eastern Australia. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A.; Bajda, M. Hygienic behaviour of colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014**, *70*, 774–776.
26. De la Rúa, P.; Jaffe, R.; Dall’Olio, R.; Munoz, I.; Serrano, J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* **2009**, *40*, 263–284. [[CrossRef](#)]
27. Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, 96–119. [[CrossRef](#)]
28. Seeley, T.D.; Griffin, S.R. Small-cell comb does not control Varroa mites in colonies of honeybees of European origin. *Apidologie* **2011**, *42*, 526–532. [[CrossRef](#)]
29. Singer, H.J.; van Praagh, J.P.; Paulus, H.F. Interactions between honeybees and Varroa mites influenced by cell sizes and hygienic behaviour. *Entomol. Gen.* **2019**, *38*, 255–273. [[CrossRef](#)]
30. Maggi, M.; Damiani, N.; Ruffinengo, S.; De Jong, D.; Principal, J.; Eguaras, M. Brood cell size of *Apis mellifera* modifies the reproductive behavior of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* **2010**, *50*, 269–279. [[CrossRef](#)]
31. Message, D.; Goncalves, L.S. Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **1995**, *26*, 381–386. [[CrossRef](#)]
32. Piccirillo, G.A.; De Jong, D. The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 36–42. [[PubMed](#)]
33. Ellis, A.M.; Hayes, G.W.; Ellis, J.D. The efficacy of small cell foundation as a varroa mite (*Varroa destructor*) control. *Exp. Appl. Acarol.* **2009**, *47*, 311–316. [[CrossRef](#)]
34. Berry, J.A.; Owens, W.B.; Delaplane, K.S. Small-cell comb foundation does not impede varroa mite population growth in honey bee colonies. *Apidologie* **2010**, *41*, 40–44. [[CrossRef](#)]
35. Taylor, M.A.; Goodwin, R.M.; McBrydie, H.M.; Cox, H.M. The effect of honey bee worker brood cell size on Varroa destructor infestation and reproduction. *J. Apicult. Res.* **2008**, *47*, 239–242. [[CrossRef](#)]
36. Coffey, M.F.; Breen, J.; Brown, M.J.F.; McMullan, J.B. Brood-cell size has no influence on the population dynamics of *Varroa destructor* mites in the native western honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Apidologie* **2010**, *41*, 522–530. [[CrossRef](#)]
37. Dziechciarz, P.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Possibility to change the body size in worker bees by a combination of small-cell and standard-cell combs in the same nest. *Apidologie* **2021**, *52*, 1017–1032. [[CrossRef](#)]
38. McMullan, J.B.; Brown, M.J.F. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2006**, *37*, 665–672. [[CrossRef](#)]

39. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A. Life span of worker honeybees reared in colonies kept on small-cell combs. *Med. Weter.* **2014**, *70*, 777–780.
40. Büchler, R.; Andonov, S.; Bienefeld, K.; Costa, C.; Hatjina, F.; Kezic, N.; Kryger, P.; Spivak, M.; Uzunov, A.; Wilde, J. Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* **2013**, *52*, 1–30. [[CrossRef](#)]
41. Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Strachecka, A. Validation of the methods of hygienic behaviour evaluation in the honeybee. *Med. Weter.* **2013**, *69*, 749–751.
42. McAfee, A.; Chapman, A.; Iovinella, I.; Gallagher-Kurtzke, Y.; Collins, T.F.; Higo, H.; Higo, H.; Madilao, L.L.; Pelosi, P.; Foster, L.J. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Spivak, M.; Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K.A. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.* **2003**, *55*, 341–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K.; Spivak, M. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* **2001**, *187*, 441–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gramacho, K.P.; Spivak, M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2003**, *54*, 472–479. [[CrossRef](#)]
46. Olszewski, K.; (University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland). Elucidation of the phenomenon of behavioural overdominance of honeybee colonies kept on two types of combs with standard- and small-cell size. Personal communication, 2021, project unpublished outcomes.
47. Garófalo, C.A. Bionomics of *Bombus (fervidobombus) morio*: 2. Body size and length of life of workers. *J. Apic. Res.* **1978**, *17*, 130–136. [[CrossRef](#)]
48. Spaethe, J.; Weidenmüller, A. Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insectes Sociaux* **2002**, *49*, 142–146. [[CrossRef](#)]
49. Worden, B.D.; Skemp, A.K.; Papaj, D.R. Learning in two contexts: The effects of interference and body size in bumblebees. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2045–2053. [[CrossRef](#)]
50. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Reproductive Potential Accelerates Preimaginal Development of Rebel Workers in *Apis mellifera*. *Animals* **2021**, *11*, 3245. [[CrossRef](#)]
51. Strachecka, A.; Olszewski, K.; Kuszewska, K.; Chobotow, J.; Wójcik, Ł.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13887. [[CrossRef](#)]

Profesor Grzegorz Borsuk
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
grzegorz.borsuk@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i
Rybacktwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2022). Dead brood of *Apis mellifera* is removed more effectively from small-cell combs than from standard-cell combs. *Animals*, 12, 418. <https://doi.org/10.3390/ani12040418>

mój udział polegał na przeprowadzeniu badań, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022



.....
Podpis

dr hab. Krzysztof Olszewski, prof. Uczelni
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 13
20-950, Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Zootechnika i
Rybacko
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Dziechciarz, P., Borsuk, G., Olszewski, K. (2022). Dead brood of *Apis mellifera* is removed more effectively from small-cell combs than from standard-cell combs. *Animals*, 12, 418. <https://doi.org/10.3390/ani12040418>

mój udział polegał na sformułowaniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu badań, przeprowadzeniu dyskusji, pisaniu manuskryptu. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 20%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu „Możliwość modelowania cech pszczół i rodzin pszczelich przy pomocy plastrów o małej i standardowej szerokości komórek” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr inż. Piotra Dziechciarza.

Lublin, 09.05.2022



Podpis