

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Biologii Środowiskowej

Dyscyplina naukowa: Nauki biologiczne

mgr Maciej Sylwester Bryś

Rozprawa doktorska

**Morfologiczno-biochemiczne zmiany w ciele tłuszczowym *Apis mellifera* L.
pod wpływem różnych diet monopyłkowych**

***Morphological-biochemical changes in the fat body of *Apis mellifera* L.
fed on the pollen monodiet***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej

Promotor: prof. dr hab. Aneta Strachecka

Lublin, 2025

„Jeśli możesz sobie coś wymarzyć, możesz to zrobić”

~ Walt Disney

*Serdeczne podziękowania kieruję w stronę
Pani Promotor Prof. dr hab. Anety Stracheckiej
za cenne wskazówki dotyczące warsztatu naukowego,
a także merytoryczne rady w opracowaniu rozprawy doktorskiej.
Szczególnie dziękuję za zaszczepienie we mnie fascynacji światem nauki
oraz za zaufanie i wiarę wobec moich naukowych możliwości.*

*Bardzo dziękuję za koleżeńskie i naukowe wsparcie
Pracownikom i Przyjaciółom Katedry Ekofizjologii
Bezkregowców i Biologii Eksperymentalnej.*

*Z głębi serca dziękuję **Rodzicom**, którzy nauczyli mnie,
że ciężką pracą i wytrwałością można osiągnąć sukces
i spełniać marzenia, a także za zainicjowanie pasji do pszczół.*

*Jestem wdzięczny za dobre i pokrzepiające słowa
wypowiedziane przez wszystkie osoby spotkane
na mojej ścieżce naukowej.*

Maciek

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.

Data16.04.2025..... Podpis promotoraAmeta Strachecka.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/~~Promotora~~ ~~pomoenniego~~* 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 załączonym pendrive z wersją elektroniczną.

Data16.04.2025 r..... Podpis autoraMaciej Jonyš.....

*niepotrzebne skreślić

Publikacja wprowadzająca w kontekst badań

(niewchodząca w cykl badań eksperymentalny)

P0: Maciej Sylwester Bryś, Aneta Strachecka. The key role of amino acids in pollen quality and honey bee physiology—a review; 2024, *Molecules*, 29(11), 2605; <https://doi.org/10.3390/molecules29112605>,

Liczba punktów MNiSW: 140, IF₍₂₀₂₄₎: 4,2

Cykl publikacji naukowych składający się na dysertację

P1: Maciej Sylwester Bryś, Bernard Staniec, Aneta Strachecka. The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers; 2024, *Scientific Reports*, 14; DOI: 10.1038/s41598-024-64598-0,

Liczba punktów MNiSW: 140, IF₍₂₀₂₄₎: 3,8

Indywidualny wkład pracy polegał na: pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotezy badawczej, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz laboratoryjnych, mikroskopowa analiza pyłkowa); analiza statystyczna i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków; napisanie pierwszej wersji manuskryptu; redakcja publikacji, korespondencja z redakcją.

Mój udział procentowy szacuję na 85%.

P2: Maciej Sylwester Bryś, Maciej Bartoń, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka. Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets; 2025, *Antioxidants*, 14(1), 69; DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>,

Liczba punktów MNiSW: 100, IF₍₂₀₂₄₎: 6,0

Indywidualny wkład pracy polegał na: pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotez badawczych, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz laboratoryjnych, mikroskopowa analiza

pyłkowa); analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków; napisanie pierwszej wersji manuskryptu; redakcja publikacji, korespondencja z redakcją. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

P3: Maciej Sylwester Bryś, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honey bees workers,

- w trakcie procesu redakcyjnego; *major revision (PLOS One)*,

Liczba punktów MNiSW: 100, IF₍₂₀₂₄₎: 2,9

Indywidualny wkład pracy polegał na: pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotez badawczych, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz biochemicznych, mikroskopowa analiza pyłkowa); analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, napisanie pierwszej wersji manuskryptu; przesłanie manuskryptu do wydawnictwa i odpowiedzi na recenzje, korekta po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obowiązującego w 2024 roku: 340 pkt

Sumaryczny Impact Factor publikacji zgodnie z listą Journal Citation Reports przypadającą na rok 2024: 12,7

Spis treści

Publikacja wprowadzająca w kontekst badań (niewchodząca w cykl badań eksperymentalny)	4
Cykl publikacji naukowych składający się na dysertację.....	4
1. Streszczenie	7
2. Summary	8
3. Wprowadzenie teoretyczne	9
4. Hipotezy i cele badawcze.....	16
5. Materiały i metody.....	18
6. Omówienie wyników i dyskusja	24
7. Stwierdzenia i wnioski.....	39
7. Bibliografia.....	41
8. Oświadczenia współautorów (Załącznik 1)	56
9. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej (Załącznik 2).....	
10. Aneks	

1. Streszczenie

Zbilansowana dieta zapewnia prawidłowy rozwój, a także homeostazę organizmu pszczoły miodnej. Pyłek pszczeli stanowi podstawowe źródło białek, aminokwasów, tłuszczów i innych związków odżywczych. Wielkoobszarowe gospodarstwa i zanik bioróżnorodności roślinnej naraża owady zapylające na korzystanie w głównej mierze z jednego zasobu pokarmowego – tzw. monodiety. W związku z tym, celem dysertacji doktorskiej było określenie wpływu pyłków z określonych roślin (leszczyna, rzepak, sosna, gryka, facelia i nawłóć), w ujęciu monodiety, na morfologię i fizjologię subkutikularnego ciała tłuszczowego z różnych segmentów/lokalizacji u pszczoły miodnej. W doświadczeniu klatkowym, robotnice z grup badawczych otrzymywały ciasto cukrowe z 10% dodatkiem określonego pyłku, zaś z grupy kontrolnej - ciasto cukrowe. Od żywych pszczół w wieku 1-, 7- i 14 dni wypreparowano ciała tłuszczowe z tergitów 3-7 i sternitów oraz wykonano analizy morfometryczne (długość i szerokość trofocytów, średnica jąder enocytów). W ciele tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu oznaczano stężenia substratów energetycznych (białko, glukoza, triacyloglicerole i glikogen), poziom TAC, aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GST i GPx) oraz aktywność systemu proteolitycznego. Pyłek wpływał statystycznie istotnie na stężenia/aktywności ww. parametrów biochemicznych w poszczególnych segmentach ciała tłuszczowego. Pszczoły karmione ciastem cukrowym z pyłkami, szczególnie roślin owadopylnych, miały większe trofocyty i średnice jąder enocytów oraz wyższe stężenia substratów energetycznych oraz aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w porównaniu z grupą kontrolną. Niezależnie od spożywanego pokarmu (ciasto cukrowe vs. ciasto cukrowe z pyłkiem) rozmiary trofocytów, stężenia substratów energetycznych oraz aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w różnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego zwiększały się wraz z wiekiem robotnic. Najwyższe aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego zaobserwowano w ciele tłuszczowym z tergitu 5. Pyłek facelii wpływał najkorzystniej na funkcjonowanie ciała tłuszczowego pszczół (w porównaniu z pozostałymi pyłkami). Wyniki uzyskane w dysertacji mogą pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów, które doprowadziły do różnicowania morfologicznego i funkcjonalnego ciała tłuszczowego zależnego od diety oraz wieku samic eusocjalnych owadów błonkoskrzydłych.

Słowa kluczowe: dieta pyłkowa, ekofizjologia, odporność, ciało tłuszczowe, substraty energetyczne, antyoksydanty, system proteolityczny, pszczoła miodna

2. Summary

A balanced diet ensures proper development as well as homeostasis of the honey bee organism. Bee pollen is the primary source of proteins, amino acids, fats and other nutrients. Large-scale farming and the decline of plant biodiversity expose pollinating insects to the use of mainly one food resource – the so-called monodiet. Therefore, the aim of the doctoral dissertation was to determine the effect of pollen from specific plants (hazel, rapeseed, pine, buckwheat, *Phacelia*, and goldenrod), in the context of a monodiet, on the morphology and physiology of the subcuticular fat body from different segments/locations in the honey bee. In a cage experiment, worker bees from the experimental groups received sugar paste with a 10% addition of a specific pollen, while the control group received sugar paste. From live bees aged 1, 7, and 14 days, fat bodies were dissected from tergites 3–7 and sternites, and morphometric analyses were performed (length and width of trophocytes, diameter of oenocyte nuclei). In the fat body from tergite 3, tergite 5, and the sternite, concentrations of energy substrates (protein, glucose, triacylglycerols, and glycogen), TAC level, activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GST, and GPx), and the activity of the proteolytic system were determined. Pollen had a statistically significant effect on the concentrations/activities of the aforementioned biochemical parameters in individual fat body segments. Bees fed sugar paste with pollen, especially from entomophilous plants, had larger trophocytes and oenocyte nuclei diameters, as well as higher concentrations of energy substrates and activities of the antioxidant and proteolytic systems compared to the control group. Regardless of the food consumed (sugar paste vs. sugar paste with pollen), the size of trophocytes, concentrations of energy substrates, and activities of the antioxidant and proteolytic systems in various fat body segments/locations increased with the age of the workers. The highest activities of the antioxidant and proteolytic systems were observed in the fat body from tergite 5. *Phacelia* pollen had the most beneficial effect on the functioning of the bee fat body (compared to the other pollens). The results obtained in the dissertation may help to better understand the mechanisms that led to the morphological and functional differentiation of the fat body depending on diet and age of eusocial Hymenoptera females.

Keywords: pollen diet, ecophysiology, immunity, fat body, energy substrates, antioxidants, proteolytic system, honey bee

3. Wprowadzenie teoretyczne

W dobie XXI wieku, wiele czynników stresogennych, w tym narażenie na działanie sztucznego pola elektromagnetycznego (Lupi i in., 2021; Migdał i in., 2023; Plotnik i in., 2023; Migdał i in. 2024a), środki ochrony roślin (Migdał i in., 2024b; Paleolog i in., 2021), zafałszowania wosku stearyną i/lub parafiną (Cheć i in., 2021; Strachecka i in., 2024), patogeny oraz pasożyty (Dmochowska-Ślęzak i in., 2016; Ptaszyńska i in., 2016), mikroplastik (Al Naggar i in., 2024) powodują zaburzenia homeostazy organizmu pszczelego. W ostatnich 3-4 latach coraz częściej mówi się, że industrializacja gospodarki, gospodarstwa wielkoobszarowe, częste koszenie poboczy, nasypów kolejowych i rozwój aglomeracji miejskich prowadzi do degradacji siedlisk roślinnych (Jachuła i in., 2021; Jachuła i in., 2022). Zanik bioróżnorodności roślinnej zapewniającej zbilansowaną dietę pyłkową, naraża owady zapylające na stres żywieniowy, który osłabia mechanizmy odporności. Nie ulega wątpliwości, że zbilansowana dieta zapewnia hemodynamikę organizmu, zaś konsekwencją jej zachwiania jest narażenie na inne czynniki stresogenne, takie jak patogeny [tzw. wtórne zakażenia] (Jack i in., 2016). Większość doniesień naukowych, rekomendujących rośliny ważne w diecie pszczoły miodnej, skupia się na składzie fizyko-chemicznym pyłku i/lub nektaru (Denisow i in., 2019; Dmitruk i in., 2024; Tymoszuć i in., 2024). Jednakże silna antropopresja oraz czynniki środowiskowe i klimatyczne wpływają na wartość odżywczą pyłków (np. roślin tego samego gatunku), a w konsekwencji na metabolizm i odporność owadów zapylających. Analiza tego zagadnienia wpisuje się w nurt badań związanych z nutrifizjologią owadów i tym samym z zakresu niniejszej dysertacji doktorskiej.

U pszczoł miodnych wyróżnia się mechanizmy odporności indywidualnej i zbiorowej. Oprócz barier anatomiczno-fizjologicznych (układu pokarmowego, oddechowego i kutikuli), na odporność indywidualną składa się odporność komórkowa (fagocytoza, nodulacja i inkapsulacja) i odporność humoralna (złożona z: 1 - *odporności biochemicznej*, na którą składają się związki systemu proteolitycznego, antyoksydacyjnego i markery biochemiczne; 2 - *białka odpornościowe działające w hemolimfie*, np. fenolooksydaza, lizozym itp.; 3 - *białka odpornościowe działające w innych tkankach*, np. melityna, rojalizyna) (Grzywnowicz i in., 2009; Gliński i in., 2011; Strachecka i Demetraki-Paleolog, 2011; Strachecka i in., 2013; Larsen i in., 2019; Skowronek i in., 2021; Strachecka i in. 2021a; Strachecka i in., 2021b). Mechanizmy odporności komórkowej i biochemicznej uruchamiane są jednocześnie po przełamaniu przez patogen barier

anatomiczno-fizjologicznych. Związki systemu proteolitycznego „tną” swoiste białka patogenu na małe jednostki. Produkty tych reakcji wraz z reaktywnymi formami tlenu (ROS) i toksycznymi metabolitami są neutralizowane i detoksyfikowane przez system antyoksydacyjny. Markery biochemiczne dopełniają te dwa systemy i są uważane za wskaźniki zdrowotności pszczoł (Ma i in., 2016; Strachecka i in., 2022). Jednocześnie, hemocyty otaczają patogen tworząc fagosom (fagocytoza), który następnie łącząc się z lizosomem (fagolizosom), uczestniczy w uwalnianiu enzymów degradujących kwasy nukleinowe, lipidy i białka patogenu. Kolejne hemocyty oraz melaniny, otaczając takie struktury, uwalniają hemokiny, których zadaniem jest, przede wszystkim, zainicjowanie produkcji białek odpornościowych (np. fenolooksydazy, lizozymu, antymikrobiologicznych peptydów itp.) w ciele tłuszczowym (Arrese i Soulages, 2010). Ponieważ mechanizmy odporności biochemicznej stanowią pierwszą i niezwykle ważną linię układu immunologicznego pszczoły miodnej, postanowiłem skupić się właśnie na nich w mojej dysertacji.

Proces proteolizy katalizowany jest przez enzymy proteolityczne (proteazy) i polega na hydrolizie wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami w łańcuchu białkowym. Endopeptydazy hydrolizują wiązania peptydowe w głębi łańcucha peptydowego, zaś egzopeptydazy – na końcach białka (Bańkowski, 2014). W centrum aktywnym tych enzymów są aminokwasy (np. asparaginian, serynę, cysteinę, treoninę, glutaminę) oraz jony metali (Zn^{2+} lub Ca^{2+}). Proteazy wykazują wysoką selektywność działania względem określonego pH, stąd wyróżnia się proteazy kwaśne, obojętne i zasadowe (Grzywnowicz i in., 2009). Proteazy kwaśne (asparaginowe) zaangażowane są głównie w procesy degradacji białek komórkowych, obojętne uczestniczą w obróbce potranslacyjnej, zaś zasadowe (serynowe i cysteinowe) aktywują kaskadę pro-oksydazy fenolowej zaangażowanej m.in. w syntezę melanin. System proteolityczny, oprócz ww. proteaz, składa się również z inhibitorów proteaz, które ściśle regulują aktywację enzymów proteolitycznych poprzez blokowanie ich centrum aktywnego lub zmianę ich konformacji (Gliński i in., 2011). Systemem proteolitycznym (proteazy i inhibitory proteaz) opisano na powierzchni kutikuli, w hemolimfie, przewodzie pokarmowym, gruczołach kieszonkowych, jadzie, a także w ciele tłuszczowym pszczoły miodnej (Grzywnowicz i in., 2009; Strachecka i in., 2013; Dziechciarz i in., 2022; Strachecka i in., 2022; Jaremek i in., 2024). Aktywności tych enzymów determinowane są kastą, wiekiem, stanem fizjologicznym organizmu, wpływem biostymulatorów, a także wcześniej wspomnianymi czynnikami stresogennymi

(Grzywnowicz i in., 2009; Strachecka i in., 2014; Strachecka i in., 2015; Migdał i in., 2021a,b; Dziechciarz i in., 2022).

Bodźce stresowe (biotyczne, abiotyczne i antropogeniczne) poprzez stres oksydacyjny powodują uszkodzenia organelli komórkowych, struktur komórkowych a także tkanek prowadząc do zaburzenia homeostazy w organizmach owadów. Stres oksydacyjny definiowany jest jako stan zaburzonej równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu – RFT (np. anionorodnik nadadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, rodnik hydroksylowy $HO^{\cdot}$, tlen singletowy 1O_2 , nadttlenek wodoru H_2O_2), a zdolnością organizmu do ich neutralizacji za pomocą enzymów antyoksydacyjnych (np. dysmutaza nadadtlenkowa - SOD, katalaza - CAT, peroksydaza glutationowa - GPx, S-transferaza glutationowa - GST). RFT uczestniczą w regulacji procesów komórkowych, takich jak różnicowanie, proliferacja, apoptoza, czy odpowiedź immunologiczna. RFT w wysokich stężeniach działają szkodliwie i inicjują m.in. (1) peroksydację lipidów, prowadząc do uszkodzenia błon komórkowych, (2) powstanie mutacji w DNA oraz (3) degradację lub nieprawidłowe fałdowanie białek, co wpływa na zaburzenia w funkcjonowaniu komórek i całych tkanek (Birch-Machin i Bowman, 2016). Funkcje antyoksydantów enzymatycznych uzupełniane są przez nieenzymatyczne antyoksydanty (Krishanan i Kodrik, 2006; Sandmann, 2019). Przykładami tych związków są: witamina C (kwas askorbinowy), koenzym Q10 (ubichinon), witamina E (α - tokoferol), glutation (GSH), kwas moczowy oraz związki roślinne takie jak karotenoidy i flawonoidy obecne w pyłku i nektarze roślinnym. Ogólną zdolność organizmu do neutralizowania reaktywnych form tlenu określa się za pomocą poziomu TAC (*Total Antioxidant Capacity*). Poziom całkowitego potencjału oksydacyjnego jest sumą aktywności przeciwutleniaczy enzymatycznych i stężeń antyoksydantów nieenzymatycznych w badanej tkance. Aktywność systemu antyoksydacyjnego u pszczoł, podobnie jak systemu proteolitycznego, zależy od wielu czynników, tj. kasta, stan fizjologiczny, wiek, czynniki antropogeniczne i in. (Strachecka i in., 2022). W ostatnim 10-leciu, obserwuje się zwiększone wykorzystanie naturalnych związków czynnych (biostymulatorów, przeważnie roślinnych), aby zastymulować układ odpornościowy owada poprzez zwiększenie aktywności systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego (Strachecka i in., 2015; Skowronek i in., 2021; Skowronek i in., 2022a,b).

W kształtowanie układu odpornościowego u pszczoły miodnej zaangażowane jest przede wszystkim ciało tłuszczowe. *Corpus adiposum* (ciało tłuszczowe) u dorosłych

pszczoł zlokalizowane jest w części ściennej (subkutikularnej), pod warstwą kutikuli oraz w części wisceralnej (trzewiowej), otaczającej narządy jamy brzusznej (Skowronek i in., 2021). Część ścienna ciała tłuszczowego odznacza się segmentowym charakterem. W obrazie morfologicznym komórek ciała tłuszczowego robotnic występują różnice pomiędzy poszczególnymi segmentami, zwłaszcza tergitem 3 i tergitem 5 oraz sternitem (Strachecka i in., 2021b). Omawiana tkanka zbudowana jest z dwóch głównych typów komórek: trofocytów i enocytów. Trofocyty są najliczniejszymi, dużymi, wielokątnymi lub owalnymi komórkami z widoczną ziarnistością (Skowronek i in., 2021). W cytoplazmie tych komórek zawieszone są ziarna glikogenu, krople tłuszczów, struktury białkowe, a także ciała pęcherzykowe, które są widoczne bez konieczności wybarwienia. Wielkość komórek, a także ich kształt, barwa może ulec zmianie na skutek przemian rozwojowych i patologicznych owada, a także innych czynników środowiskowych. Trofocyty oprócz magazynowania związków energetycznych, a także kryształów kwasu moczowego, uczestniczą w procesie syntezy białek (np. witellogeniny), lipidów i hormonów (Arrese i Soulages, 2010; Skowronek i in., 2021). Pomędzy trofocytami (wyjątek – ciało tłuszczowe z tergitu 3 u robotnic) występują owalne, trójkątne lub wrzecionowate enocyty z centralnie położonym jądrem komórkowym (Strachecka i in., 2021b; Jaremek i in., 2024). Enocyty uczestniczą w syntezie feromonów płciowych, lipidów, lipoprotein, a także biorą udział w neutralizacji ksenobiotyków (Wójcik i in., 2022).

W chwili rozpoczęcia przeze mnie badań w zakresie dysertacji, niewiele było informacji na temat tożsamości morfologicznej i biochemicznej ciała tłuszczowego pszczoł. Jedyne publikacje w bazach naukowych były autorstwa zespołu, do którego dołączyłem (Strachecka i in., 2021a,b) i skupiały się na porównaniu cech ciała tłuszczowego u różnych kast/sub-kast (tj. matki, rebeliantki i normalne robotnice). Dlatego postanowiłem zgłębić ten temat u młodych, gniazdowych pszczoł pomiędzy 1 a 14 dniem życia. Jedną z głównych czynności tych robotnic jest karmienie kolejnego pokolenia pszczoł. Jakość mleczka pszczelego wytwarzanego przez karmicielki zależy przede wszystkim od spożywanego przez nie pokarmu, ich witalności i zdrowotności. Stąd w moich badaniach skupiłem się na wpływie diety pyłkowej (w kontekście monodiety) na parametry morfologiczno-biochemiczne ciała tłuszczowego jako te, które warunkują stan odporności, u 1-, 7- i 14-dniowych robotnic.

Otwarty układ krwionośny umożliwia obmywanie komórek ciała tłuszczowego przez hemolimfę. Następuje dwukierunkowa wymiana związków, która polega na

przetransportowaniu tych wchłoniętych z przewodu pokarmowego (po trawieniu pyłku) za pomocą hemolimfy do ciała tłuszczowego, a następnie tych zszytyzowanych w ciele tłuszczowym do hemolimfy i w dalszej kolejności do innych tkanek np. do mięśni poruszających skrzydłami, mózgu itp. W ten sposób hemolimfa umożliwia przenoszenie składników pokarmowych i związków chemicznych pomiędzy poszczególnymi segmentami ciała tłuszczowego i innymi tkankami.

Dostęp do pokarmu stanowi fundament procesów fizjologicznych u prawie wszystkich poznanych do tej pory organizmów (Cai i in., 2022; Mensah, 2024). Owady zapylające są całkowicie uzależnione od zasobów pokarmowych w postaci pyłku kwiatowego i nektaru wytwarzanego przez rośliny w zasięgu żerowania pszczoł (Tsuruda i in., 2021). Jest to przykład mutualistycznej relacji międzygatunkowej, w której rośliny zapewniają pszczołom pokarm (nektar i/lub pyłek), a w zamian pszczoły zapylają rośliny (Vaudo i in., 2024).

W klimacie umiarkowanym, wczesną wiosną, robotnice pszczoły miodnej zbierają pyłek produkowany przez męskie kwiatostany leszczyny (*Corylus* sp.). Pyłek wspomnianej rośliny, już pod koniec lutego, stanowi często jedyne źródło pokarmu dla owadów zapylających (Weryszko-Chmielewska i Piotrowska, 2012). W literaturze brakuje informacji na temat właściwości fizyko-chemicznych pyłku leszczyny. Biorąc pod uwagę fenologię kwitnienia, kapusta rzepak (*Brassica napus* L.) stanowi jeden z głównych pożytków pyłkowych i nektarowych w okresie marca-maja. Kapusta rzepak (zwana dalej rzepakiem) jest powszechną rośliną oleistą uprawianą w Kanadzie, Europie, Chinach, czy Indiach. Roślina ta produkuje pyłek, którego zawartość białka całkowitego wynosi od 20 do 27%, zaś średnia wydajność miodowa to 80-160 kg/ha (Yang i in., 2013; Taha i in., 2019; Hsu i in., 2021). Dzięki temu rzepak jest cennym źródłem pożywienia dla pszczoły miodnej, trzmieli i pszczoł samotnic. Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.), kwitnąca w maju i czerwcu, jest rośliną zapylaną przez wiatr. Mimo masowej produkcji pyłku, nie jest on chętnie zbierany przez robotnice pszczoły miodnej, w przeciwieństwie do pszczoł samotnic (Splitt i in., 2021). Powszechnie przyjmuje się, że pyłek roślin wiatropylnych jest ubogi w białko całkowite (mniej niż 14%), lecz z drugiej strony, stanowi cenne źródło makro- i mikroelementów w diecie pszczoł poprzez jej urozmaicenie (Somerville and Nicol, 2006; Fernández-González i in. 2021). Facelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth) jest rośliną wysiewaną w czerwcu/lipcu przez rolników jako poplon, a także przez pszczelarzy w celu uzupełnienia niedoboru nektaru i pyłku w okresach bezpożytkowych. Ze względu na szybki

okres wegetacji, a także długi okres produkcji nektaru i pyłku jest atrakcyjną rośliną dla owadów zapylających. Kwitnąca latem facelia, produkuje pyłek zawierający około 27% białka, a także liczne polifenole i flawonoidy o charakterze przeciwutleniającym (Owayss i in., 2020; Vergun, 2023). Gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum* Moench) zwana pseudozbożem, masowo uprawiana jest w Azji Środkowej, Stanach Zjednoczonych a także w Europie Środkowej (Skřivan i in., 2023). Wielohektarowe uprawy gryki mają na celu pozyskanie nasion, z których produkuje się kasze i mąkę gryczaną. Ponadto, roślina ta wysiewana jest w celu pozyskania miodu gryczanego. W Europie Środkowej jednym z ostatnich pożytków pyłkowych (pomiędzy lipcem a październikiem) jest nawłóć (*Solidago* sp.). Nawłóć kanadyjska, jako gatunek inwazyjny, wypiera rodzime rośliny zapewniające różnorodność diety pyłkowej, przez co w sposób naturalny wymusza monodietę na owadach (Jachuła i in., 2020; Lenda i in., 2021; Moroń i in., 2021). Nierzadko, ekspansywna gospodarka wielkoobszarowa, a także monokultury wspomnianych roślin warunkują dietę opartą o jeden rodzaj pyłku, tak zwaną monodietę (Bryś i Strachecka, 2024). Uwzględniając aspekt odżywiania pszczoł miodnych, należy zwrócić uwagę na jakość, a nie tylko na ilość produkowanego pyłku. Zagadnienie jakości pyłku wytwarzanego przez rośliny, w kontekście monodiety, który to temat jest przedmiotem niniejszej dysertacji doktorskiej, omówiłem szerzej w publikacji przeglądowej Bryś i Strachecka (2024) (**Publikacja P0**).

Dieta oparta na pyłku z różnych roślin, ze względu na różnorodny skład biochemiczny, uważana jest za najbardziej wartościową (Filipiak i in., 2017). Jakość odżywcza pyłku jest zależna od pochodzenia botanicznego i geograficznego. Dynamiczne zmiany w środowisku determinują zanik bioróżnorodności i tym samym ograniczają dostęp pyłku dla zapylaczy (Borański i in., 2025). Ilość produkowanego pyłku przez rośliny nie przekłada się na wartość odżywczą umożliwiającą prawidłowy rozwój larw. Jakość pyłku powinna być definiowana pod względem zawartości białka całkowitego, proporcji aminokwasów, stechiometrii makro- i mikroelementów, a także innych związków jak kwasy tłuszczowe, flawonoidy etc. (Filipiak, 2019; Tsuruda i in., 2021). Niezbilansowana ilość składników odżywczych w diecie może doprowadzić do zaburzeń metabolicznych zwianych z osłabioną odpowiedzią immunologiczną, zmniejszoną masą ciała, czy przedwczesnym starzeniem się (Alaux i in., 2010; Ihle i in., 2014; Bryś i in., 2021; Cai i in. 2022; Ara Begum i in., 2023). Spożycie pyłku stymuluje rozwój *acini* gruczołów gardzielowych (Crailsheim i in., 1989; Di Pasquale i in., 2013; Omar i in., 2017), liczbę i rodzaj hemocytów (El Mohandes i in., 2010), a także prawidłową gospodarkę/pracę jelita środkowego (Roulston and Cane,

2000; Szymaś i in., 2012;). W dodatku, aminokwasy zawarte w pyłku stymulują produkcję hormonów, neuroprzekaźników, uczestniczą w termoregulacji a także są intermediatami wielu szlaków biochemicznych, w tym odpornościowych (Locatelli i in., 2005; Di Pasquale i in., 2013; Frias i in., 2016; Ma i in., 2016; Bryś i Strachecka, 2024). Egzogenne aminokwasy, dostarczane wraz z dietą pyłkową warunkują ekspresję genów odpornościowych (np. *Defensin2*) i syntezę peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Daniluk i in., 2017). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe np. defensyna i apidycyna hamują rozwój bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, wirusów i grzybów (Wu i in., 2020; Depta i in., 2022).

Jak już wcześniej wspomniano, ciało tłuszczowe pełni wiele kluczowych funkcji, w tym magazynuje substraty energetyczne, jest tkanką endokrynną produkującą hormony, uczestniczy w procesach detoksykacyjnych, i in. (Wang i in., 2019, Strachecka i in., 2021b; Wójcik i in., 2022). Badania Stracheckiej i in. (2021b) wykazały, że cechy morfologiczne i aktywności związków ważnych metabolicznie są różne w zależności od segmentów/lokalizacji ciała tłuszczowego. Dlatego, pojawiło się pytanie – w jaki sposób dieta pyłkowa wpływa na morfologię oraz stężenia substratów energetycznych, aktywności enzymów antyoksydacyjnych i proteolitycznych w poszczególnych segmentach ciała tłuszczowego? Nie ulega wątpliwości, że dieta wielopyłkowa będzie bardziej wartościowa dla pszczół, lecz aby zrozumieć mechanizmy z pogranicza biochemii, fizjologii, anatomii i ekofizjologii, zasadnym wydaje się rozpatrywanie diety w kontekście monodiety. Wybór monodiet został podyktowany powszechnym występowaniem leszczyny, rzepaku, sosny, facelii, gryki i nawłoci w klimacie umiarkowanym. Ponadto, rośliny te stanowią dominujący pożytek dla pszczół od wiosny do jesieni.

4. Hipotezy i cele badawcze

W niniejszej rozprawie doktorskiej przyjęto następujące hipotezy badawcze:

H1: Pyłek roślin owadopylnych (rzepak, facelia, gryka i nawłóć) i wiatropylnych (leszczyna i sosna) w aspekcie monodiety w odmienny sposób wpływa na morfologię subkutikularnego ciała tłuszczowego z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu u 7- i 14-dniowych pszczoł robotnic.

H2: Pyłki rzepaku, facelii, gryki i nawłoci (pyłki roślin owadopylnych), w porównaniu do pyłków leszczyny i sosny (pyłki roślin wiatropylnych), bardziej zwiększają stężenia substratów rezerw energetycznych w określonych lokalizacjach/segmentach ciała tłuszczowego pszczoł.

H3: Pyłek roślin owadopylnych w większym stopniu wpływa na aktywację systemów: antyoksydacyjnego i proteolitycznego w ciałach tłuszczowych (z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu) robotnic w porównaniu z pyłkiem produkowanym przez rośliny wiatropylne.

H4: Dieta pyłkowa, nawet w ujęciu monodiety, wpływa stymulująco na biochemiczne mechanizmy odporności w subkutikularnym cieple tłuszczowym w przeciwieństwie do diety opartej tylko na pokarmie węglowodanowym.

Aby zweryfikować hipotezy sformułowano następujące cele:

1. Określenie wpływu 10% dodatku pyłku z poszczególnych roślin (leszczyna, rzepak, sosna, facelia, gryka, nawłóć) w diecie pszczoł na długość i szerokość trofocytów oraz na średnicę jąder enocytów we wszystkich segmentach subkutikularnego ciała tłuszczowego – **Publikacja P1.**
2. Określenie stężenia glukozy, triacylogliceroli, białka całkowitego i glikogenu w tergicie 3, tergicie 5 i sternicie ciała tłuszczowego pod wpływem diet monopyłkowych – **Publikacja P1.**
3. Określenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w cieple tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu u pszczoł robotnic żywionych różnymi dietami monopyłkowymi i porównanie ich do tych karmionych samym ciastem cukrowym – **Publikacja P2.**

4. Określenie aktywności proteaz i ich inhibitorów w ciele tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu u pszczoł robotnic karmionych monodietami pyłkowymi i porównanie ich do tych z grupy kontrolnej (bez dodatku pyłku, samo ciasto cukrowe)
– **Publikacja P3.**

5. Materiały i metody

W celu wykluczenia wpływu czynników środowiskowych, doświadczenie prowadzono w warunkach laboratoryjnych (nazywane dalej: doświadczenie klatkowe) w Katedrze Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej. Klatki nasiedlono jednodniowymi robotnicami pobranymi z rodzin pszczelich ze Stacji Dydaktyczno-Badawczej Zwierząt Drobnych im. Laury Kaufman, należącej do Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W laboratorium ww. Katedry preparowano ciała tłuszczowe pod mikroskopem stereoskopowym oraz wykonano analizy biochemiczne. Pomiary trofocytów i enocytów wykonano z wykorzystaniem kamery Olympus DP72 i Mikroskopu Olympus BX61 (powiększenie 40×) z przystawką DIC w Katedrze Zoologii i Ochrony Przyrody Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Analizy chromatograficzne pod kątem obecności i ilości pestycydów w obnóżach pyłkowych przeprowadzono w europejskiej sieci laboratoriów badawczych GBA POLSKA Sp. z o.o. Member of GBA GROUP, Filia w Lublinie.

Dysertacja obejmuje trzy niezależne doświadczenia klatkowe, które były prowadzone w latach 2023-2024. Metodologia prowadzonych doświadczeń była identyczna (Figura 1), zaś eksperymenty różniły się hipotezami i celami.

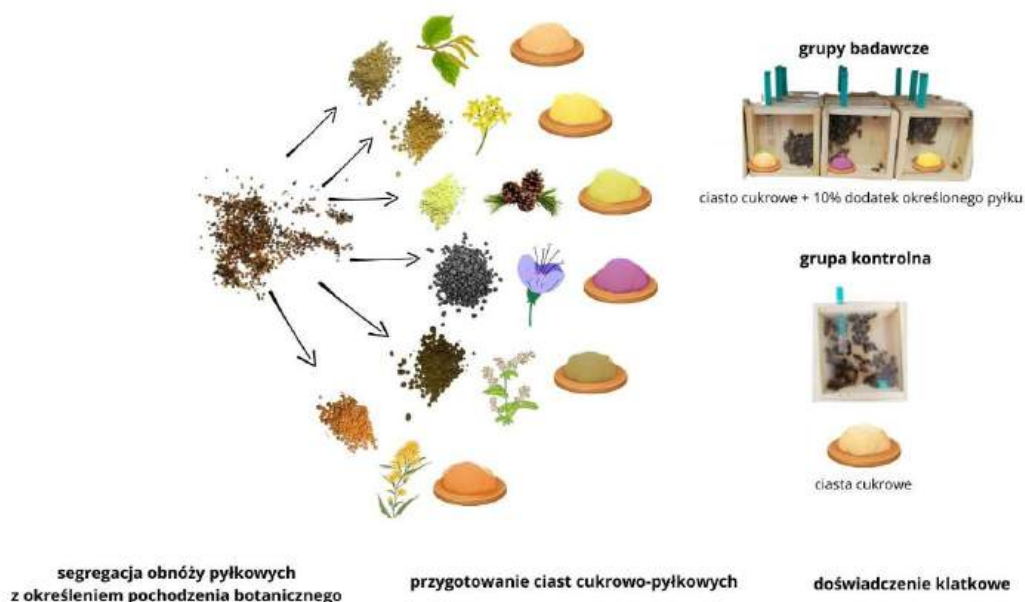


Figura 1. Schemat doświadczeń klatkowych (Na podstawie: Bryś i in., 2025).

Pozyskanie obnóży pyłkowych i określenie pochodzenia botanicznego

Obnóże pyłkowe pozyskano za pomocą wylotowych poławiaczy pyłkowych zamontowanych przed ulami u pszczelarzy z województwa lubelskiego i podkarpackiego. Tereny te powszechnie uznawane są za tzw. „czyste ekologicznie”, czyli nieskażone, wolne od metali ciężkich, pestycydów i innych zanieczyszczeń. Do czasu klasyfikacji, pyłek przechowywano w suchym pomieszczeniu w temperaturze około $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Obnóże pyłkowe sortowano ręcznie, tak aby wyodrębnić dominujące kolory pyłku. Botaniczne pochodzenie pyłku (każdego koloru z osobna) potwierdzono mikroskopową analizą pyłkową zgodnie z walidowaną metodą Filipiaka i in. (2022). Podczas klasyfikacji ziaren pyłku korzystano z własnych preparatów porównawczych, tzw. zielników pyłkowych (opracowanie własne, ziarna pyłku zbierano bezpośrednio z roślin w latach 2015-2024) oraz wykorzystano klucze do oznaczania ziaren pyłku dostępne online (<https://www.palдат.org/> i <https://pollen.tstebler.ch/MediaWiki/index.php?title=Pollenatlas#gsc.tab=0>).

W ten sposób wyróżniono następujące obnóże pyłkowe roślin owadopylnych:

- kapusta rzepak (*Brassica napus* L.);
- facelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth);
- gryka (*Fagopyrum esculentum* Moench);
- nawłóć (*Solidago* sp.);

oraz roślin wiatropylnych:

- leszczyna (*Corylus* sp.);
- sosna (*Pinus sylvestris* L.).

Obnóże te traktowano jako monokwiatowe (=monodieta, dieta monopyłkowa). Do czasu przygotowania ciast cukrowych z pyłkami, a następnie przeprowadzenia doświadczenia klatkowego, posegregowane obnóże pyłkowe przechowywano w temperaturze $-25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Przygotowanie ciast cukrowych z określonym pyłkiem

W doświadczeniu przedstawionym w P1, przygotowano manualnie ciasta cukrowe mieszając cukier puder z wodą w proporcji 2,3kg : 0,5l. W doświadczeniach przedstawionych w P2 i P3 wykorzystano komercyjnie dostępne ciasto cukrowe Apifonda (Łysoń sp. z o. o., Polska). Ciasta cukrowe (w P1, P2 i P3) dzielono na 7 części; pierwsza z nich nie zawierała żadnego dodatku pyłku (grupa kontrolna). Do pozostałych części

dodawano, zmielone za pomocą młynka elektrycznego, obnóża pyłkowe (z leszczyny, rzepaku, sosny, facelii, gryki lub nawłoci) w stężeniu 10%. Dodatek pyłku w stężeniu 10% do ciasta cukrowego wynika z zapotrzebowania pszczoł na białko i węglowodany w stosunku 1:9 i jest uzasadniony warunkami ekonomicznymi (Altaye i in., 2010). Do czasu przeprowadzenia doświadczenia klatkowego, przygotowane ciasta mrożono w temperaturze $-25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Przygotowanie doświadczenia klatkowego

Wszystkie doświadczenia rozpoczęto od pozyskania 1-dniowych robotnic pszczoły miodnej rasy kraińskiej (*Apis mellifera carnica*). Trzykrotnie (do każdego doświadczenia z osobna), w P1 – 10, w P2 i P3 po 3 sztucznie inseminowane matki-siostry zamykano na 12h w jednoramkowych izolatorach, w celu pozyskania jaj w jednakowym wieku. Po tym czasie matki uwalniano, zaś zaczerwione plastry pozostawiano w izolatorach do 20 dnia. W 20. dobie plaster przenoszono do cieplarki/inkubatora z kontrolowaną temperaturą $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, aż do momentu wygryzienia się robotnic. Część świeżo wygryzionych robotnic (robotnice 1-dniowe) pobrano do preparacji ciała tłuszczowego. Pozostałe jednodniowe robotnice liczono i ręcznie umieszczano w drewnianych klatkach (w P1 – 7 grup x 15 klatek x 100 pszczoł; w P2 – 7 grup x 10 klatek x 40 pszczoł; w P3 – 7 grup x 12 klatek x 40 pszczoł) o wymiarach 12 x 12 x 4 cm z szybką. Klatki wyposażone były w dozowniki strzykawkowe z wodą, którą podawano *ad libitum*. Pszczoły miały nieograniczony dostęp do określonych ciast (cukrowego lub cukrowo-pyłkowych), które były podawane na spodeczkach (nakrętki probówkowe). Pszczoły karmiono co 2 dni w godzinach porannych rozmrożonym ciastem, usuwano martwe osobniki i zmieniano wodę. Doświadczenie prowadzono w kontrolowanych warunkach (w pakamerze) w temperaturze $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ i wilgotności względnej $65 \pm 5\%$. W Tabeli nr 1 zestawiono liczbę żywych 1-, 7- i 14-dniowych robotnic wybieranych do preparatyki ciała tłuszczowego w poszczególnych doświadczeniach.

Tabela 1. Liczba pszczoł z których wypreparowano ciała tłuszczowe w poszczególnych doświadczeniach w publikacjach P1-P3.

liczba próbek publikacja	Liczba 1-dniowych robotnic	Liczba 7- i 14- dniowych robotnic
Publikacja P1	45	40-55
Publikacja P2	10	10
Publikacja P3	24	24 (wyjątek: pszczoły karmione ciastem cukrowym z rzepakiem, n=12)

Pobieranie i przygotowanie tkanek do analiz

Ciało tłuszczowe pobierano od robotnic w wieku 1-, 7- i 14-dni.

Procedura przygotowania i wykonania analiz morfologicznych ciała tłuszczowego w P1

Od każdej losowo wybranej pszczoły, z plastra w przypadku robotnic 1-dniowych lub z klatek w przypadku robotnic 7- i 14-dniowych, odcięto głowę, a następnie wypreparowano ciało tłuszczowe z: tergitu 3, tergitu 5, tergitu 6, tergitu 7 oraz sternitu. Ciało tłuszczowe z tergitu 3, tergitu 5 oraz sternitu dzielono na pół; pierwszą część przeznaczono do analiz morfologicznych, a drugą do analiz biochemicznych. Ciało tłuszczowe z pierwszej części, a także z tergity 4, 6 i 7, umieszczano na szkiełku podstawowym w 0,6% chlorku sodu (*pro. inj.*) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. W 100 losowych komórkach ciała tłuszczowego mierzono długość i szerokość trofocytów oraz średnicę jąder enocytów wykorzystując Mikroskop Olympus BX61 (powiększenie 40x z przystawką DIC) sprzężony z Camerą Olympus DP72; zgodnie z metodyką Stracheckiej i in. (2021b). Pomiarów we wszystkich segmentach/lokalizacjach (wyjątek - brak enocytów w tergicie 3) ciała tłuszczowego dokonano na żywych komórkach.

Procedura przygotowania ciała tłuszczowego do analiz biochemicznych (P1, P2 i P3)

Ciała tłuszczowe z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu (w **P1** - z drugiej połowy; z **P2 i P3** – całe ciało tłuszczowe z ww. segmentów/lokalizacji) umieszczono indywidualnie w sterylnych probówkach typu Eppendorf zawierających 200 µl schłodzonego 0,6% roztworu NaCl (stężenie dedykowane dla owadów). Następnie tkanki rozdrabniano z wykorzystaniem ręcznego homogenizatora w temperaturze 4 °C i wirowano przez

1 minutę 3000 g. Otrzymany supernatant natychmiast zamrażano w temperaturze -40°C do późniejszych analiz.

Analizy biochemiczne supernatantów z ciała tłuszczowego

W supernatantach ciał tłuszczowych z tergitu 3, tergitu 5 oraz sternitu oznaczono:

- I. Stężenia substratów energetycznych (zgodnie z metodyką zawartą w komercyjnych zestawach odczynników):
 - Glukozy (Alpha Diagnostic),
 - Triacylogliceroli (Alpha Diagnostic),
 - Glikogenu (Sigma Aldrich, USA, No. MAK016),
- II. Stężenie białka całkowitego (ogólnego) metodą Lowry'ego i in. (1951) zmodyfikowaną przez Schacterle i Pollack'a (1973),
- III. Aktywność systemu antyoksydacyjnego (zgodnie z metodyką zawartą w komercyjnym zestawie odczynników, zmodyfikowaną przez Strachecką i in., (2022)):
 - Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. 19160-1KT-F),
 - S-transferaza glutationowa (Glutathione S-transferase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK 435-1KT),
 - Peroksydaza glutationowa (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany, no. MAK437-1KT),
 - Katalaza (Catalase Assay Kit, Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, USA, Item: 707002),
 - Całkowity potencjał antyoksydacyjny (Antioxidant Assay Kit, Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, USA, Item: 709001).

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych przeliczono na 1 mg białka.

- IV. Aktywność specyficzną proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych wg metody Ansona (1938) zmodyfikowanej przez Strachecką i in. (2011).
- V. Aktywność naturalnych inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych wg metody Lee i Lina (1995).

Celem określenia stężeń substratów energetycznych oraz aktywności antyoksydantów, krzywe kalibracyjne wyznaczano zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zestawu odczynników. Krzywa kalibracyjna dla oznaczania stężenia białka całkowitego w supernatantach metodą Lowry'ego została sporządzona przy użyciu albuminy bydlęcej (BSA), jako wzorca referencyjnego. Do oznaczenia aktywności proteolitycznej wykorzystano hemoglobinę jako substrat reakcji. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie (Synergy HTX, BioTek Instruments) przy długości fali 280 nm wobec próby zerowej z wykorzystaniem płytki 96-dołkowej.

Analiza statystyczna

Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania Statistica wersja 13.3 (2017), TIBICO Software Inc, version 13. Modelem statystycznym była trójczynnikowa analiza wariancji ANOVA i test t-Studenta. Testem Shapiro-Wilka dokonano oceny, czy wyniki posiadają rozkład normalny. W przypadku danych nie zaklasyfikowanych do rozkładu normalnego zastosowano test Kruskala-Wallisa. Dane o rozkładzie normalnym testowano analizą wariancji ANOVA, w której jako czynniki uwzględniano m.in. lokalizację ciała tłuszczowego, wiek pszczoł (1-, 7- i 14-dniowe robotnice) oraz rodzaj diety. Dla danych niespełniających założeń parametrycznych zastosowano porównania parami przy użyciu testu U Manna–Whitneya. Porównywano wpływ pyłków pochodzących z roślin wiatropylnych (sosna i leszczyna) i owadopylnych (rzepak, facelia, gryka i nawłóć) na stężenia substratów energetycznych oraz na aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GPx, GST), całkowitą pojemność przeciwutleniającą (TAC) oraz aktywność systemu proteolitycznego w różnych lokalizacjach ciała tłuszczowego.

6. Omówienie wyników i dyskusja

Wyniki uzyskane w niniejszej dysertacji potwierdziły hipotezy badawcze przedstawione w tym opracowaniu na stronie 16, jak również w każdej publikacji. Trzy publikacje oryginalne (tzw. badawcze) są spójnym tematycznie cyklem (**P1-P3**) opublikowanym w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* o sumarycznym *Impact Factor* równym 12,7 (zgodnie z rokiem wydania publikacji) i łącznej liczbie punktów 340 wg punktacji MNiSW. Publikacje skupiają się na określeniu wpływu monodiet pyłkowych na morfologię komórek oraz na aktywności/stężeniu podstawowych parametrów odporności w określonych segmentach/lokalizacjach subkutikularnego ciała tłuszczowego robotnic pszczoł miodnych (*A. mellifera*).

Według Carroll i in. (2017), robotnice pszczoły miodnej bardziej preferują świeży pyłek niż pierzgę. W badaniach niniejszej dysertacji wykorzystano obnóża pyłkowe (pyłek pszczeli) do przygotowania ciast cukrowo-pyłkowych. Obnóża po pobraniu mrożono, a następnie rozmrażano, mikronizowano i mieszano z ciastem cukrowym w stężeniu 10%. Takie podejście zabezpieczało pyłek pszczeli przed fermentacją i jest zgodne z badaniami Frias'a i in. (2016) oraz Omar'a i in. (2017). Bezpośredni zbiór pyłku z kwitnących roślin jest możliwy, lecz mało praktyczny, ze względu na niewielką jego ilość wytwarzaną w kwiecie (Omar i in. 2022). Podczas przechowywania pyłku, zachodzi wyżej wspomniany proces fermentacji kwasu mlekowego, który zwiększa dostępność do składników odżywczych zmagazynowanych w cytoplazmie. Jednakże, Carroll i in. (2017) wykazali, że nie wszystkie parametry fizjologiczne pszczoły miodnej są zależne od czasu przechowywania pyłku. Warto zwrócić uwagę, że pierzga przechowywana w komórkach plastra zawiera różnorodne ziarna pyłku, często z poprzedniego sezonu. Aby ujednolicić metodykę pozyskania monodiet pyłkowych, wykorzystano metodę wylotowych poławiaczy pyłku.

Skład biochemiczny pyłku kwiatowego roślin wiosennych vs. letnich vs. jesiennych różni się głównie proporcjami aminokwasów, kwasów tłuszczowych, makro- i mikroelementów, związków o charakterze przeciwutleniającym i innych substancji biologicznie czynnych (DeGrandi-Hoffman i in., 2018). Informacje te wykorzystano podczas planowania doświadczeń ujętych w **publikacjach P1-P3**. Mimo, że występują różnice w składzie fizyko-chemicznym pyłku w zależności od pochodzenia botanicznego i geograficznego, to w przypadku właściwości pyłku monokwiatowego nie są one tak rozbieżne, jak w przypadku pyłku wielokwiatowego (Castle i in., 2022; Giovanetti i in.,

2022; Vergun i in.. 2023). W tym miejscu nasuwa się pytanie, czy różnice w stężeniach określonych związków w pyłku kwiatowym są na tyle istotne, że wpłyną statystycznie istotnie na parametry fizjologiczne owadów? Dieta oparta o pyłek wielokwiatowy jest optymalna dla pszczoł i innych owadów zapylających (Di Pasquale i in., 2013), lecz aby w pełni zrozumieć jak określony pyłek wpływa na parametry fizjologiczne ciała tłuszczowego, w eksperymencie zbadano ten aspekt przez pryzmat monodiety. Ponadto, wybrane rośliny tj. leszczyna, rzepak, sosna, facelia, gryka i nawłóć stanowią główny pożytek pyłkowy w wielu krajach. Przypadające okresy kwitnienia tych roślin są różne, ustalenie proporcji dla mieszanki wielopyłkowej również mogłoby budzić wiele kontrowersji, dlatego w układzie tych eksperymentów odstąpiono od grupy pszczoł żywionych pyłkiem wielokwiatowym.

Wpływ monodiety pyłkowej na parametry morfologiczne komórek ciała tłuszczowego z poszczególnych segmentów/lokalizacji

Objętość komórek ciała tłuszczowego, a także średnica ich jąder są dodatnio sprzężone z aktywnością metaboliczną tej tkanki (Brejcha i in., 2023). Te morfologiczne parametry są związane z gromadzeniem związków zapasowych - im większa powierzchnia komórek ciała tłuszczowego tym większe jest stężenie zmagazynowanego glikogenu i triacylogliceroli. Wykazałem, że pszczoły karmione samym ciastem cukrowym miały krótsze trofocyty niż te otrzymujące ciasto cukrowe z dodatkiem określonego pyłku. Wyjątkiem były trofocyty w trzecim i czwartym tergicie ciała tłuszczowego u 7-dniowych pszczoł karmionych ciastem z pyłkiem leszczyny. Również w ciele tłuszczowym 7- i 14-dniowych pszczoł karmionych ciastem z pyłkiem sosny zaobserwowano mniejsze długości i szerokości trofocytów. Te wyniki wskazują, iż pyłki roślin wiatropylnych mają niższą wartość odżywczą niż pyłki roślin zapylanych przez owady (Somerville, 2005). Pyłki roślin wiatropylnych są głównie źródłem błonnika i skrobi, a stężenie białka jest często w nich niższe (np. pyłek sosny – 11,7 g białka na 100 g pyłku) w porównaniu z pyłkami roślin owadopylnych (np. pyłek facelii – 27,44 g białka na 100 g pyłku) (Somerville, 2005; Vergun, 2023). Cennym i poszerzającym wiedzę o fizjologii i morfologii owadów spostrzeżeniem było odkrycie, że niezależnie od spożywanego pokarmu (ciasto cukrowe vs. ciasto cukrowe z pyłkiem) długości i szerokości trofocytów w różnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego zwiększały się wraz z wiekiem robotnic. Innym ważnym spostrzeżeniem było

stwierdzenie, że najdłuższe trofocyty posiadają 14-dniowe robotnice *A. mellifera* karmione 10% dodatkiem pyłku rzepaku, facelii i nawłoci. Pyłki tych roślin są cennym źródłem białek, aminokwasów i tłuszczu (Ara Begum i in., 2023), i są „aktywatorem” wielu procesów metabolicznych. Tym samym wpływały, jak prezentują wyniki moich badań, na wielkość trofocytów. Pożytki te (mimo iż zbierane w okresie wegetacyjnym) są kluczowe dla pszczół zimujących, u których wielkość komórek ciała tłuszczowego może decydować o ich przetrwaniu – to zagadnienie wymaga jednak wyjaśnienia w przyszłych badaniach. Należy tutaj wspomnieć, iż w dotychczasowych pracach z zakresu apidologii nie znalazłem tak szczegółowych danych o długości i szerokości komórek ciała tłuszczowego u gniazdowych pszczół letnich. Dlatego moje badania z tego zakresu można uznać za pierwszy, pionierski etap, który umożliwi pełne poznanie morfologii ciała tłuszczowego pszczół.

Moimi badaniami potwierdziłem obserwacje Stracheckiej i in. (2021b), że enocyty są obecne u robotnic we wszystkich segmentach ciała tłuszczowego za wyjątkiem tergitu 3. Średnice jąder oenocytów (w ciele tłuszczowym z tergitu 4, tergitu 5, tergitu 6, tergitu 7 i sternitu) w grupach pszczół karmionych pyłkiem były porównywalne, ale statystycznie istotnie większe niż średnice jąder w grupie pszczół karmionych wyłącznie ciastem. W 7 dniu, najmniejszą średnicę jąder odnotowano w ciele tłuszczowym z tergitu 4 i 6 u pszczół karmionych 10% pyłkiem nawłoci, podczas gdy najwyższe wartości odnotowano w ciele tłuszczowym z tergitu 5 i 7 u pszczół spożywających pyłek rzepaku. U 14-dniowych robotnic karmionych ciastem z pyłkiem facelii zaobserwowano, że ich oenocyty miały największe średnice we wszystkich segmentach ciała tłuszczowego w porównaniu z innymi grupami pszczół. Zauważone przez mnie różnice w średnicach enocytów pomiędzy poszczególnymi segmentami/lokalizacjami ciała tłuszczowego w obrębie grup doświadczalnych są zgodne z wynikami Wójcika i in. (2022). Ponadto autorzy ci zauważyli, że nie tylko średnica jąder enocytów, ale również długość i szerokość enocytów zmieniają się w zależności od lokalizacji/segmentu ciała tłuszczowego. Koubová i in. (2021) i Strachecka i in. (2021a) zasugerowali, że wielkość enocytów zależy również od zmian sezonowych będących wynikiem stanu fizjologicznego i fenotypu osobnika. Co ważne, liczba enocytów zwiększa się wraz z wiekiem pszczół i jest ściśle skorelowana z mianami hormonu juvenilnego i witellogeniny (Strachecka i in., 2021a).

Podsumowując, monodieta pyłkowa wpływała na wymiary trofocytów i średnicę jąder enocytów, co stanowi potwierdzenie przyjętej hipotezy. Moje odkrycia mogą pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów, które doprowadziły do różnicowania się

morfologicznego i funkcjonalnego ciała tłuszczowego zależnego od diety oraz wieku samic eusocjalnych owadów błonkoskrzydłych.

Wpływ monodiety pyłkowej na stężenia substratów energetycznych w ciele tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu

Robotnice pszczoł miodnych karmione ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku leszczyny, sosny, rzepaku, facelii, gryki i nawłoci miały wyższe stężenia białka całkowitego w ciele tłuszczowym w tergicie 3, tergicie 5 oraz sternicie w porównaniu z tymi z grupy kontrolnej. Najprawdopodobniej, związki (głównie białka i aminokwasy) z pyłku są wchłaniane z układu pokarmowego i przetransportowywane przez hemolimfę do ciała tłuszczowego, gdzie dochodzi do syntezy większości białek, w tym tych odpornościowych, krążących w pszczelim organizmie (Skowronek i in., 2021). Przykładem białka wytwarzanego przez trofocyty jest witellogenina (Paes-de-Oliveira i in., 2008), która posiada silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwstarzeniowe (Nicewicz i in., 2025). Nawet pyłek kwiatowy wytwarzany przez rośliny wiatropylne, wpływa regulująco na aminokwasowe szlaki metaboliczne owadów. Białko wraz z aminokwasami jest podstawową miarą jakości pyłku. De Grandi Hoffman i in. (2018) stwierdzili, że mieszanki pyłków wiosennych i jesiennych mają podobne stężenia białka całkowitego, a różnią się składem aminokwasów. Pyłek roślin wiosennych, np. rzepaku, zawiera stosunkowo wysokie stężenia tryptofanu, waliny, glutaminy i seryny. Te aminokwasy są składnikami apsiminy, peptydu alfa-helikalnego, który wspomaga syntezę mleczka pszczelego (Bíliková i in., 2002). Z kolei, rośliny jesienne produkują pyłek bogaty w prolinę i hydroksyprolinę, aminokwasy wspomagające termoregulację, co umożliwia pszczołom przetrwanie zimy. Wykazałem, że stężenia białek w ciele tłuszczowym wzrastały wraz z wiekiem robotnic z większości grup (z wyjątkiem 7-dniowych robotnic karmionych pyłkiem leszczyny i sosny). Białka te są białkami odpornościowymi, enzymatycznymi, strukturalnymi itp. Chang i in. (2017) oraz Breygina i in. (2023) wykazali, że pyłki rzepaku, gruszy i moreli odgrywają ważną rolę w szlakach metabolicznych aminokwasów, których stężenia zmniejszają się wraz z wiekiem pszczoł przetrzymywanych w klatkach. Ponadto, potwierdziłem w moich badaniach obserwacje Stracheckiej i in. (2021b), że ciało tłuszczowe ma charakter segmentalny nie tylko z uwzględnieniem cech morfologicznych, ale przede wszystkim w przypadku charakterystyk biochemicznych. Stężenia białek różniły się

między segmentami ciała tłuszczowego. Szczególnie wysokie wartości obserwowano w ciele tłuszczowym z tergitu 5 u robotnic karmionych pyłkiem gryki. Cennym i poszerzającym wiedzę o fizjologii owadów spostrzeżeniem było odkrycie, że im większe były trofocyty, tym wyższe było stężenie białka. Związek między długością i szerokością trofocytów, a stężeniem białka, obserwowany w niniejszym eksperymencie, wnosi nowe treści dotyczące funkcjonalności ciała tłuszczowego.

Strachecka i in. (2021b) sugerują, że związki, które są szybko metabolizowane w celu uzyskania energii (np. glukoza i triacyloglicerole), są przechowywane w ciele tłuszczowym w tergitech (w przeciwieństwie do sternitów), zwłaszcza w tergicie 3. Tergit ten znajduje się w bliskim sąsiedztwie serca i związki są natychmiast przenoszone do określonych tkanek przez układ krążenia. Potwierdziłem, że ciała tłuszczowe w tergicie 3 i tergicie 5 są metabolicznie najbardziej aktywne w produkcji glukozy, glikogenu i triacylogliceroli. Wykazałem, że nie tylko 1-dniowe pszczoły, jak opisali Strachecka i in. (2021b), ale także starsze robotnice (7- i 14-dniowe) charakteryzowały się zwykle najwyższymi wartościami ww. związków w ciele tłuszczowym z tergitu 3 w porównaniu z innymi segmentami/lokalizacjami. Bardzo wysokie stężenia glukozy obserwowano u 14-dniowych robotnic karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku gryki i facelii. Okres kwitnienia tych roślin przypada na koniec lata, kiedy w rodzinie pojawia się pokolenie robotnic zimowych. Zapotrzebowanie wzrasta wówczas nie tylko na białko (główne dla stadiów preimaginalnych i do „budowania” ciała tłuszczowego imago), ale także na inne związki, w tym węglowodany. Są one wykorzystywane do pozyskiwania energii (np. w mięśniach; do lotu i ogrzewania larw), do syntezy chityny (głównego składnika kutykuli) i w innych procesach (Kunieda i in., 2006). Zarówno gryka, jak i facelia dostarczają pszczołom nie tylko pyłku, ale także nektaru, który jest wodnym roztworem cukrów, głównie fruktozy i glukozy. Węglowodany mogą pochodzić z enzymatycznego trawienia cytoplazmy ziaren pyłku (zarówno przez enzymy pszczół, jak i enzymy uwalniane przez mikroorganizmy w przewodzie pokarmowym pszczół). Węglowodany z przewodu pokarmowego docierają do ciała tłuszczowego poprzez hemolimfę, gdzie są włączane w procesy metaboliczne (Zheng i in., 2019). Następnie glukoza jest magazynowana w postaci glikogenu w trofocytach (Brejcha i in., 2023). Warto zauważyć, że pyłek leszczyny, który jest jednym z pierwszych źródeł pyłku wiosną, doprowadził do największego wzrostu stężenia glukozy w hemolimfie w porównaniu z grupą kontrolną (Brys i in., 2024 – **P1**, *badania nie wchodzące w dysertację*). Mimo że roślina ta jest zapylana przez wiatr, jest

bardzo często odwiedzana przez pszczoły. Stąd można wnioskować, iż pyłek roślin wiosennych wzmacnia pszczelą rodzinę, dostarczając substratów energetycznych, podczas gdy pyłek roślin jesiennych, umożliwia magazynowanie związków w ciele tłuszczowym.

Glikogen zapewnia przetrwanie owadów w okresach głodu (Bretscher i Connor, 2020). Najwyższe stężenia glikogenu obserwowano u pszczoł karmionych pyłkiem gryki, facelii i nawłoci. Wartości te były zawsze wyższe w ciele tłuszczowym, zwłaszcza z tergitu 3, np. w porównaniu do hemolimfy. Pyłki gryki, facelii i nawłoci są szczególnie pożądane u długowiecznych pszczoł zimowych. Stężenia glikogenu i innych związków (np. triacyloglicerole) przekładają się na masę ciała tłuszczowego, która jest najwyższa u pszczoł zimowych (Brejcha i in., 2023). Wartości parametrów biochemicznych ciała tłuszczowego były najniższe u pszczoł karmionych pyłkiem sosny w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczalnymi. Pyłek produkowany przez sosnę charakteryzuje się małym stężeniem cukrów – 13,92% i stężeniem białka – 13,45%. Oprócz glikogenu, w ciele tłuszczowym magazynowane są także triacyloglicerole. Związki te wraz ze sterolami i fosfolipidami dostarczane są do organizmu wraz z pyłkiem (Furse i in., 2023). Antropogeniczne czynniki stresogenne, takie jak pole elektromagnetyczne czy patogeny, powodują zmniejszenie stężenia triacylogliceroli w tkankach pszczoł (Aronstein i in., 2012; Migdał i in., 2021a).

Badania w zakresie stężeń substratów energetycznych w ciele tłuszczowym pszczoł gniazdowych (pomiędzy 1 a 14 dniem życia) wnoszą nowe, istotne treści do wiedzy o roli glukozy, białek i triacylogliceroli w metabolizmie tych owadów, a także w fizjologii procesów zachodzących wraz z wiekiem/starzeniem się w kontekście wpływu monodiety jako stresogenne czynnika środowiskowego.

Wpływ monodiety pyłkowej na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w ciele tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu

Aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD, CAT, GST, GPx i TAC u pszczół, są powszechnie wykorzystywane do monitorowania stresu oksydacyjnego. Do oceny aktywności antyoksydacyjnej powszechnie stosuje się homogenaty z całych odwłoków (Jovanovic i in., 2023; Yazlovytska i in., 2023) i hemolimfy (Migdał i in., 2020; Paleolog i in., 2021; Skowronek i in., 2022b; Dziechciarz i in., 2023; Skowronek i in., 2023). Istnieje niewiele publikacji na temat aktywności tych enzymów w ciele tłuszczowym. Santos i in. (2020) opisali ekspresję genów antyoksydacyjnych (MnSOD, CuZnSOD, katalaza, GST i GSH/GSSG) w ciele tłuszczowym larw matek i robotnic. Brajcha i in. (2023) porównali ekspresję genów (w tym antyoksydacyjnych) w komórkach ciała tłuszczowego zarówno u długowiecznych zimowych, jak i krótkowiecznych letnich robotnic. Hsu i Hsieh (2014) scharakteryzowali aktywność CAT, GPx i SOD w trofocytach i innych komórkach ciała tłuszczowego u 1- i 50-dniowych robotnic. Strachecka i in. (2022) skupili się na porównaniu aktywności antyoksydantów w różnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego u świeżo wygryzionych osobników z różnych kast/sub-kast pszczół (u matek, robotnic i rebeliantek). W publikacji P2 wchodzącej w skład dysertacji doktorskiej uzupełniłem wiedzę z zakresu fizjologii ciała tłuszczowego o następujące treści: (1) scharakteryzowałem aktywność antyoksydantów w różnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego nie tylko u 1-dniowych robotnic, ale także u robotnic gniazdowych w wieku 7 i 14 dni; (2) przedstawiłem wpływ poszczególnych pyłków (w monodiecie) na aktywność powyższych enzymów w ciele tłuszczowym ze sternitu, tergitu 3 i tergitu 5 u robotnic do 14 dnia życia; (3) porównałem wpływ pyłków roślin wiatropylnych i owadopylnych na aktywność systemu antyoksydacyjnego w tkance kluczowej dla odporności pszczół.

Dodanie pyłku leszczyny, rzepaku, sosny, facelii, gryki i nawłoci do ciasta cukrowego zwiększyło aktywności SOD i GST w ciele tłuszczowym ze sternitu, tergitu 3 i tergitu 5 u robotnic w 7. i 14. dniu ich życia. Podobne tendencje zaobserwowano w przypadku aktywności GPx w ciele tłuszczowym z tergitu 3 u 7- i 14-dniowych robotnic, a dodatkowo w ciele tłuszczowym z tergitu 5 u 14-dniowych pszczół. Ponadto, zaobserwowałem wzrost aktywności tych trzech enzymów wraz z wiekiem pszczół z poszczególnych grup eksperymentalnych. W przypadku CAT, dieta pyłkowa spowodowała zwiększenie aktywności antyoksydantów w ciele tłuszczowym z tergitu 3 (wyjątek: leszczyna i sosna), tergitu 5 i sternitu, ale tylko u 7-dniowych robotnic. W pozostałych

przypadkach tendencje nie były tak wyraźne. Hsu i Hsieh (2014) wykazali, że aktywność CAT w ciele tłuszczowym wzrasta wraz z wiekiem robotnic, podczas gdy aktywność SOD maleje. Różnice między moimi wynikami a wynikami uzyskanymi przez tych autorów mogą wynikać z faktu, że określiłem aktywności antyoksydantów w poszczególnych segmentach/lokalizacjach subkutikularnego ciała tłuszczowego. Ponadto, Hsu i Hsieh (2014) nie określili, którą części ciała tłuszczowego (trzewiową [=wisceralną], czy subkutikularną) pobierali do badań, ani nie podali lokalizacji (segmentu) tej tkanki. W moich badaniach potwierdziłem obserwacje Stracheckiej i in. (2022), że aktywności enzymów antyoksydacyjnych różnią się w poszczególnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego (tergit 3, tergit 5 i sternit). Autorzy ci wykazali, że aktywności SOD i CAT są zawsze najwyższe u 1-dniowych robotnic w ciele tłuszczowym ze sternitu, podczas gdy poziomy TAC są najwyższe w tkance z tergitu 3. W moich badaniach, najniższe aktywności SOD, GST i GPx zaobserwowałem w sternicie (z pewnymi wyjątkami) we wszystkich grupach pszczół. Aktywność tych enzymów jest ściśle związana z funkcjonowaniem/metabolizmem poszczególnych organelli w komórkach ciała tłuszczowego i reakcjami związanym z neutralizacją ROS. Jak sugerują Scofield i Amdam (2024), pszczoły karmicielki utrzymują wysoki poziom lipidów i innych związków (w tym antyoksydantów) w odwłoku, w tym w ciele tłuszczowym, podczas gdy zbieraczki mają bardzo niski poziom tych związków. Zjawisko to prawdopodobnie jest związane z efektywnym wykonywaniem różnorodnych ról przez robotnice w rodzinie pszczelej (polietyzm), a tym samym wpływa na kondycje kolonii. Wynika to z ewolucji organizmów eusocjalnych (Scofield i Amdam, 2024), ale także z adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych (Vasilevskaya, 2022), na co również wskazałem w moich badaniach obrazując niezwykle duży wpływ monodiety na organizm pszczół. Chociaż monodieta jest czynnikiem stresogennym dla pszczół, porównując aktywności antyoksydantów w ciele tłuszczowym pszczół karmionych ciastem cukrowym z pyłkiem i bez pyłku, stwierdziłem, że zwykle wyższe wartości były u tych spożywających 10% dodatek pyłku. Podobne wnioski sformułowali również Yazlovytska i in. (2023). Ponadto autorzy ci wykazali, że pszczoły, którym podawano roztwór sacharozy z dodatkiem pyłku wierzby lub sztuczną pierzgę z rzepakem lub sztuczną pierzgę z wierzbą, żyły dłużej i charakteryzowały się wyższymi wartościami peroksydacji lipidów i aktywności katalazy (jako biomarkerów stresu oksydacyjnego) w głowach i odwłoku w porównaniu z grupą karmioną wyłącznie roztworem sacharozy. Aktywności CAT są zgodne z moimi wynikami, zwłaszcza w odniesieniu do 7-dniowych robotnic. Autorzy tej publikacji niestety nie podali, w jaki sposób

zawieszali/mieszali pyłek w roztworze cukru i w jaki sposób karmili pszczoły zawiesiną, np. czy było to równomierne karmienie. Uniknąłem tego błędu, podając pszczołom pyłek w cieście cukrowym (postać stała).

Poziomy TAC były wyższe w ciele tłuszczowym z tergiteów 3 i 5 u 7-dniowych pszczoł karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku w porównaniu do tych karmionych wyłącznie ciastem cukrowym. U 14-dniowych robotnic, wyższe poziomy TAC obserwowano w ciele tłuszczowym ze sternitów, tergitu 3 i tergitu 5 po karmieniu pszczoł ciastem cukrowym wzbogaconym pyłkami (z wyjątkiem pyłku sosnowego) w porównaniu do tych w grupie kontrolnej. Poziom TAC zwiększał się w ciele tłuszczowym z tergitu 3 i sternitu wraz z wiekiem pszczoł karmionych 10% dodatkiem rzepaku, facelii, gryki lub nawłoci. Na podstawie danych literaturowych wiadomo, że pyłek rzepaku, facelii i gryki ma wysoką zawartość kwasów fenolowych i flawonoidów (Nešović i in., 2020; Barbieri i in., 2020). Flawanoidy i karotenoidy są uważane za przeciwutleniacze nieenzymatyczne. Karotenoidy chronią lipoproteiny znajdujące się na przykład w ciele tłuszczowym przed tlenem singletowym, który powoduje peroksydację lipidów (Sandmann i in., 2019). Po utlenieniu flawonoidy działają jako donory elektronów dla tlenu cząsteczkowego, tworząc rodniki ponadtlenkowe (Krishnan i in., 2006). Wartości stężeń głównych związków fenolowych różnią się w kwiatostanach nawłoci: *Canadian goldenrod* L. i *Solidago gigantea* Aiton (Likhanov i in., 2021). Ponieważ ekstrakty z tych roślin różnią się składem związków antyoksydacyjnych, można założyć, że te tendencje będą również występować w pyłku. Należy jednak zadać pytanie: czy pyłek wytwarzany przez różne gatunki nawłoci będzie miał taki sam, czy różny wpływ na parametry fizjologiczne ciała tłuszczowego? Pytaniem tym wytyczam kierunek przyszłych badań.

Pyłek z roślin zapylanych przez owady miał większy wpływ na aktywność antyoksydantów w porównaniu z pyłkiem z roślin zapylanych przez wiatr. Pyłek leszczyny i sosny, wywołał wzrost aktywności SOD i GST dopiero w 14 dniu życia robotnic w porównaniu z tymi karmionymi wyłącznie ciastem cukrowym. Chociaż leszczyna jest rośliną wiatropylną, jest bardzo często odwiedzana przez pszczoły. Jako jedno z pierwszych źródeł pyłku wiosennego w Europie Środkowej może mieć kluczowe znaczenie dla ochrony pszczoł przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez różne czynniki, w tym antropogeniczne. Rośliny wiatropylne mogą okazać się dobrym sposobem na uzupełnienie luk pokarmowych dla pszczoł. Ponadto, luki te mogą uzupełniać sami pszczelarze siejąc np.

facelię. Moje badania wykazały, że pyłek facelii bardziej zwiększa aktywności antyoksydantów w porównaniu z pyłkiem leszczyny, rzepaku, sosny, gryki i nawłoci.

Industrializacja i modernizacja rolnictwa i leśnictwa sprzyjają stosowaniu insektycydów, herbicydów, fungicydów i innych pestycydów (Shakir i in., 2018; Jabłońska-Trypuć i in., 2022). Zaobserwowano, że pestycydy wywołują stres oksydacyjny u pszczoł (Jabłońska-Trypuć i in., 2022), a efekt końcowy zależy od rodzaju związku chemicznego, dawki, sposobu podawania, czasu ekspozycji i rodzaju próbki biologicznej pobranej do oznaczeń biochemicznych (Murawska i in., 2021). Aby wykluczyć wpływ pestycydów zawartych w pyłku, określiłem ich stężenia za pomocą metod chromatograficznych. Wykazałem, że tylko w pyłku rzepaku były szkodliwe związki chemiczne. Ze względu na wielohektarową uprawę rzepaku (praktycznie na całym świecie), do ochrony tej roślin stosuje się pestycydy, których pozostałości mogą być obecne nie tylko w pyłku, ale też w pierdze i miodzie (Karise i in., 2017). Domniemuję, iż substancje czynne wykryte w ładunkach pyłku rzepakowego nie miały negatywnego wpływu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w moim doświadczeniu. Przemawia za tym wyższa aktywności antyoksydantów u pszczoł karmionych ciastem z tym pyłkiem w porównaniu z grupą kontrolną. Mimo to naukowcy zalecają stosowanie naturalnych związków chemicznych (biostymulatorów, tj.: kurkumina, koenzym Q10, kofeina, kannabidiol i witamina C), aby przeciwdziałać negatywnym skutkom stresu (Farjan i in., 2012; Strachecka i in., 2014; Strachecka i in., 2015; Skowronek i in., 2022b;). Prawidłowo zbilansowana dieta pyłkowa, minimalizując skutki stresu oksydacyjnego poprzez wzrost aktywności antyoksydantów, może stanowić rodzaj bariery/tarczy ochronnej przed innymi szkodliwymi czynnikami, takimi jak *Varroa destructor*, *Vairimorpha/Nosema* spp. itp.

Wpływ monodiety pyłkowej na aktywność systemu proteolitycznego w ciele tłuszczowym z tergitu 3, tergitu 5 i sternitu

Aktywności systemu proteolitycznego w ciele tłuszczowym pszczoł karmionych jednym rodzajem pyłku były wyższe niż u tych karmionych wyłącznie ciastem cukrowym. Na tej podstawie można wysunąć wniosek, że chociaż monodietą jest czynnikiem stresogennym dla pszczoł, jej wpływ na fizjologię organizmu pszczoły można uznać w jakimś stopniu za korzystny w porównaniu z dietą opartą na samym cukrze. Potencjał białkowy organizmu pszczoły jest budowany z bogatej w składniki odżywcze cytoplazmy

pyłku po rozerwaniu jego ściany komórkowej w przewodzie pokarmowym owada (Koubová i in., 2021). Jak wspomniano we wcześniejszych podrozdziałach, związki te dostają się poprzez hemolimfę do ciała tłuszczowego, gdzie uczestniczą w syntezie białek, w tym tych, które są częścią systemu proteolitycznego. Różnice w aktywnościach związków systemu proteolitycznego w ciele tłuszczowym robotnic karmionych ciastem cukrowym z pyłkiem różnych roślin mogą wynikać, po pierwsze - z różnych stężeń białek całkowitych w każdym z analizowanych pyłków (**publikacja P3** - Tabela 1); po drugie - związki te mogą być trawione i wchłaniane do organizmu w różnym stopniu (Crailsheim i Stolberg, 1989; Bayram i in., 2021; Alshallash i in., 2023). Warto dodać, że stężenia białek, węglowodanów, lipidów i innych związków biologicznych w pyłku zależą od czynników geograficznych (pochodzenie roślin i warunki środowiskowe) (Thakur i Nanda, 2020). Należy zatem postawić pytanie: czy różnice w składzie biochemicznym pyłku w obrębie tego samego gatunku są na tyle znaczące, aby wpłynąć na aktywności systemu proteolitycznego pszczół? Tym pytaniem wytyczam kierunek przyszłych badań. Basulado i in. (2013) zauważyli, że rodzaj spożywanego pyłku wpływa na stężenie białka całkowitego w ciele tłuszczowym pszczół. Z kolei Alaux i in. (2010) wskazali na korelację między zawartością białka surowego w pyłku a odpornością owadów. Ponadto Danihlik i in. (2018) oraz Negri i in. (2017) wykazali, że pyłek pszczeli, dostarczając egzogennych aminokwasów, wpływa na syntezę peptydów i reguluje ekspresję genów odpornościowych. Moimi badaniami uzupełniłem dotychczasowy stan wiedzy i wykazałem, że aktywności proteaz i ich inhibitorów zależały od rodzaju pyłku i były zawsze wyższe u pszczół karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku rzepaku, facelii, gryki i nawłoci w porównaniu do robotnic karmionych ciastem z pyłkiem leszczyny i sosny. Wyniki te są zgodne z tymi otrzymanymi **w publikacji P1**, w której wykazałem, że stężenia białek w ciele tłuszczowym były zawsze wyższe po spożyciu przez pszczoły pokarmu uzupełnionego pyłkiem z roślin entomofilnych niż z roślin wiatropylnych. Rośliny zapylane przez wiatr wytwarzają pyłek o niskiej zawartości białka surowego. W wielu obszarach Europy Środkowej i Wschodniej, leszczyna jest głównym źródłem pyłku wczesną wiosną, a pszczoły miodne są od niej niemal całkowicie uzależnione. Wyniki tej pracy jednoznacznie potwierdziły, że pyłki leszczyny i sosny są bardzo dobrym pokarmem dla pszczół po zimie lub w okresach „bez nektarowania” i dostarczają owadom dużej dawki cukrów niezbędnych do produkcji energii (**publikacja P1**) oraz do wychowania czerwiu, a także do zaktywowania procesów metabolicznych związanych z odpowiedzią immunologiczną (komórkową i humoralną) (Degrandi-Hoffman i in., 2015). Jest to szczególnie istotne w czasach zmieniającego się

klimatu, czego konsekwencją jest przyspieszone kwitnienie roślin, zmiany w dostępności zasobów roślinnych (Romanovskaja i in., 2023) i zmiany temperatur, szczególnie jesienią i zimą (Rajagopalan i in., 2024). Dlatego diety oparte na pyłkach późnego lata i wczesnej jesieni, takich jak facelia, gryka i nawłóć, poprzez aktywowanie systemu proteolitycznego, wpływają w rezultacie na vitalność, długowieczność i udane przezimowanie pszczoł. Szczególnie wysoką aktywność proteaz i inhibitorów proteaz zaobserwowano u pszczoł karmionych ciastem z pyłkiem facelii. Szybki wzrost i kwitnienie tej rośliny sprawiają, że idealnie nadaje się ona do obszarów rolniczych, oferując pyłek bogaty w białko, który jest wykorzystywany przez pszczoły w przypadku ograniczonych zasobów roślinnych/poużytkowych (Vergun, 2023).

Wykazałem, że aktywność systemu proteolitycznego wzrastała wraz z wiekiem robotnic w ich ciele tłuszczowym. Mimo iż analiza aktywności systemu proteolitycznego w hemolimfie robotnic nie jest przedmiotem niniejszej dysertacji to jednak zwrócę uwagę na odwrotny wzór odpowiedzi organizmu na zadany czynnik (dieta) pomiędzy tą płynną tkanką a ciałem tłuszczowym. W pierwszym dniu życia, wyższą aktywność systemu proteolitycznego obserwowano w hemolimfie robotnic w porównaniu do różnych segmentów/lokalizacji ciała tłuszczowego. Natomiast w kolejnych dniach (w 7 i 14 dniu) zwykle było odwrotnie. Można zatem założyć, że świeżo wygryziona robotnica ma w hemolimfie „zapasy” aktywnych proteaz i ich inhibitorów, które najprawdopodobniej zostały zsyntetyzowane i zaktywowane w okresie preimaginalnym. Aby system ten mógł sprawnie funkcjonować, wymaga dosyntetyzowania i zaktywowania określonych proteaz i ich inhibitorów, do czego niezbędne jest białko z pyłku (**publikacja P3**, Fig. 6). Co ciekawe, jeśli pszczoły nie miały dostępu do pyłku (dieta bezbiałkowa; grupa kontrolna), to nie w ciele tłuszczowym, ale w hemolimfie 7- i 14-dniowych robotnic obserwowano najwyższe aktywności proteaz i inhibitorów proteaz, podobnie jak u 1-dniowych pszczoł. Mogę zatem wnioskować, że brak pyłku w diecie pszczoł ogranicza syntezę i aktywację związków systemu proteolitycznego, i tym samym zwiększa potencjalne ryzyko narażenia owadów na inne czynniki stresogenne. Niniejszymi badaniami wzbogaciłem wiedzę na temat funkcjonowania systemu proteolitycznego nie tylko w hemolimfie, ale w poszczególnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego u pszczoł gniazdowych pomiędzy 1 a 14 dniem życia. Wykonując badania tylko na 1-dniowych pszczołach, Strachecka i in. (2022) zauważyli, że aktywności tych związków są najwyższe w ciele tłuszczowym z tergitu 3. Porównując aktywność systemu proteolitycznego między poszczególnymi

lokalizacjami/segmentami ciała tłuszczowego, zaobserwowałem najwyższe wartości w tergicie 5, niezależnie od wieku pszczoł karmionych ciastem wzbogaconym pyłkiem. Jest to zbieżne z moją wcześniejszą obserwacją zawartą w **publikacji P2**, iż tergity 5 pełni funkcje detoksykacyjne i neutralizujące. Wiadome jest, że te dwa systemy (proteolityczny i antyoksydacyjny) współpracują w celu wyeliminowania negatywnych skutków różnych zagrożeń (np. patogenów, pestycydów itp.). Enzymy proteolityczne „tną” białka patogenu na mniejsze jednostki (Grzywnowicz i in., 2009). Zwiększona aktywność inhibitorów proteaz zapewnia organizmowi pszczoł ochronę przed proteazami wytwarzanymi przez patogeny, zapobiegając ich penetracji do jam ciała (Gliński i in., 2011). Strachecka i in. (2022) wykazali, że inhibitory proteaz kwaśnych oddziałują na grzyby patogenne, inhibitory proteaz zasadowych - na bakterie i wirusy, a inhibitory proteaz neutralnych - na inne czynniki stresogenne. Tak więc dieta oparta wyłącznie na cieście cukrowym, bez dostępu do białka, czyni pszczoły bardziej podatnymi na choroby i pasożyty. Podczas reakcji patogen vs. enzymy pszczoły, wytwarzane są reaktywne formy tlenu, które są następnie usuwane przez antyoksydanty (Paleolog i in., 2021). Ponadto międzykomórkowe enzymy proteolityczne rozpoznają i degradują oksydacyjnie uszkodzone białka do aminokwasów (Strachecka i in., 2022). Zróżnicowanie aktywności proteaz i ich inhibitorów pomiędzy lokalizacjami/segmentami ciała tłuszczowego potwierdziło segmentowy charakter subkutikularnego ciała tłuszczowego, jak zaproponowali Strachecka i in. (2021). Co więcej, wyższe aktywności proteaz i ich inhibitorów wywołane dietą pyłkową mogą stanowić barierę/ochronę przed innymi szkodliwymi czynnikami, takimi jak *Vairimorpha/Nosema* spp., *Varroa destructor* itp. (analogicznie jak w przypadku systemu antyoksydacyjnego; **publikacja P2**).

Podsumowanie

Obecnie ciało tłuszczowe owadów jest intensywnie badane i w międzynarodowym dyskursie naukowym obserwujemy zmianę poglądów na funkcję i rolę tego organu. Moje badania wzbogaciły ten dyskurs, wnosząc wkład w lepsze zrozumienie roli ciała tłuszczowego, jako kluczowej tkanki wpływającej na kształtowanie odporności pszczoł. Ponadto, moje badania wpisują się w aktualny dyskurs naukowy związany z nutrifizjologią pszczoł, biorąc pod uwagę zanik bioróżnorodności pyłko- i nektarodajnej, ekspansję roślin inwazyjnych, zwiększenie obszaru gospodarstw wielkoobszarowych, które to czynniki są przyczyną zubożenia diety owadów i warunkowania monodiet. Wyniki (uzyskane przeze mnie i opisane we wcześniejszych podrozdziałach) wniosły nowe treści na temat wpływu tych monodiet na parametry morfologiczno-biochemiczne ciała tłuszczowego. Większość badań analizujących wpływ diet białkowych, pyłkowych lub substytutów proteinowych skupia się na ich wpływie na rozwój *acini* gruczołów gardzielowych, jako wyznacznika jakości pokarmu (Omar i in., 2017). Niewiele publikacji naukowych obrazuje wpływ diety na procesy związane z immunokopetencją (Alaux i in., 2010; Danihlik i in., 2018). W związku z tym uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy w zakresie odporności biochemicznej pszczoł kształtowanej w ich ciałach tłuszczowych. Potwierdziłem, że ciało tłuszczowe ma charakter segmentalny; jednak nie tylko u 1-dniowych robotnic lecz także u tych starszych – 7- i 14-dniowych. Aspekt ten nie był uwzględniany do tej pory w badaniach naukowych i stanowi *novum*, które całkowicie zmienia stan wiedzy i podejście do badań związanych z morfologią i fizjologią pszczoł. Moimi badaniami uzupełniłem dotychczasową wiedzę o następujące wyniki:

- pszczoły karmione ciastem cukrowym z pyłkami roślin owadopylnych miały dłuższe i szersze trofocyty oraz większe średnice jąder niż te otrzymujące samo ciasto cukrowe;
- niezależnie od spożywanego pokarmu (ciasto cukrowe vs. ciasto cukrowe z pyłkiem) długości i szerokości trofocytów w różnych segmentach/lokalizacjach ciała tłuszczowego zwiększały się wraz z wiekiem robotnic;
- robotnice karmione ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku (leszczyny, sosny, rzepaku, facelii, gryki i nawłoci) miały wyższe stężenia białka całkowitego oraz aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w ciele tłuszczowym w tergicie 3, tergicie 5 oraz sternicie w porównaniu z tymi z grupy kontrolnej;

- stężenia substratów energetycznych oraz systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego w ciele tłuszczowym wzrastały wraz z wiekiem robotnic w większości grup eksperymentalnych;
- wartości stężeń/aktywności ww. parametrów biochemicznych były wyższe u pszczół karmionych ciastem cukrowym z pyłkiem roślin owadopylnych w porównaniu do tych spożywających ciasto z dodatkiem pyłku roślin wiatropylnych;
- najwyższe aktywności systemu antyoksydacyjnego i proteolitycznego zaobserwowano w ciele tłuszczowym z tergitu 5.

7. Stwierdzenia i wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań, sformułowano następujące wnioski:

1. Zróżnicowane wartości pomiarów (długość i szerokość) trofocytów w ciele tłuszczowym z tergity 3-7 i sternitu oraz jąder (średnica) enocytów w ciele tłuszczowym z tergity 4-7 i sternitu wskazują na odmienne aktywności metaboliczne oraz funkcje komórek w tych segmentach/lokalizacjach. Można zatem stwierdzić, że ciało tłuszczowe jest tkanką niehomologiczną.
2. Zwiększone długości i szerokości trofocytów, a także większe średnice jąder enocytów w każdym z segmentów/lokalizacji ciała tłuszczowego warunkowane monodieta pyłkową mogą świadczyć o stymulującym wpływie takiego pokarmu na metabolizm komórek. Dopiero określenie wpływu diety wielopyłkowej na morfologię ciała tłuszczowego umożliwi pełną charakterystykę funkcjonalną tej tkanki.
3. Zwiększone stężenia substratów energetycznych (białka całkowitego, glukozy, glikogenu i triacylogliceroli) w ciele tłuszczowym, szczególnie z tergity 3, u robotnic karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku świadczy o mobilizacji organizmu celem pozyskania energii niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania i utrzymania homeostazy oraz umożliwia magazynowanie związków w tej tkance. Dieta bez dodatku pyłku jest mało wartościowa i umożliwia uzyskanie energii tylko z szybko metabolizowanych cukrów.
4. Wyższe aktywności antyoksydantów w ciele tłuszczowym z tergity 3, tergity 5 i sternitu u pszczoł karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku, w porównaniu z tymi karmionymi ciastem bez pyłku, wskazują na zabezpieczenie organizmu przed reaktywnymi formami tlenu, wzmacniają biochemiczne mechanizmy odporności i umożliwiają np. szybką neutralizację pozostałości po stresorach i patogenach.
5. Wyższe aktywności systemu proteolitycznego w ciele tłuszczowym pszczoł karmionych ciastem cukrowym z dodatkiem pyłku świadczą o wysokim potencjale metabolicznym tego pokarmu, nawet w ujęciu monodiety, oraz o wzmożonych, wielokierunkowych kaskadach enzymatycznych związanych z podniesieniem odporności u tych owadów, w porównaniu do pszczoł karmionych jedynie ciastem cukrowym.
6. Wyższe aktywności systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego w ciele tłuszczowym pszczoł karmionych pyłkiem roślin owadopylnych (rzepaku, facelii, gryki i nawłoci) w porównaniu z grupą pszczoł żywionych pyłkiem roślin wiatropylnych (leszczyny i sosny) wskazują na projakościowe właściwości pyłku roślin entomofilnych

oraz na pozytywną stymulację organizmu robotnic i wzmocnienie ich barier ochronnych.

7. Wysokie aktywności antyoksydantów, ale również proteaz i ich inhibitorów w ciele tłuszczowym z tergitu 5 świadczą o funkcjonalnym zaangażowaniu tego segmentu/lokalizacji w procesy detoksykacji i neutralizacji związków toksycznych i zbędnych w pszczelim organizmie.
8. Pyłek facelii wpływa najkorzystniej na funkcjonowanie ciała tłuszczowego pszczoł (w porównaniu z pozostałymi badanymi pyłkami) poprzez silną aktywację systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego, a także zwiększenie rozmiarów trofocytów. Tym samym roślina ta idealnie nadaje się do obszarów rolniczych, oferując pyłek bogaty w białko, który może być wykorzystany przez pszczoły w przypadku ograniczonych zasobów roślinnych/pożytkowych.

Aspekt praktyczny:

1. W praktyce pszczelarskiej, 10% dodatek pyłku do ciasta cukrowego, nawet w ujęciu monodiety, będzie ekonomicznie opłacalny w celu wiosennej stymulacji rozwoju rodziny pszczelej, a także może stanowić alternatywę w okresach bezpożytkowych.
2. Ograniczenie stawiania pasiek wędrownych przy pożytkach o słabych/nieodpowiednich właściwościach prozdrowotnych.
3. Niniejsze badania stanowią przyczynek do opracowania mieszanki nasiennej, która będzie mogła być wysiewana/wysadzana w bliskim sąsiedztwie rodzin pszczelich na zasadzie „łąk kwietnych o wzbogaconym składzie”.
4. Opracowanie zbilansowanej diety dla pszczoł wykorzystywanej w testach laboratoryjnych, tzw. klatkowych.

7. Bibliografia

- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Al Naggar, Y., Ali, H., Mohamed, H., Kholy, S. El, El-Seedi, H. R., Mohamed, A., Sevin, S., Ghramh, H. A., & Wang, K. (2024). Exploring the risk of microplastics to pollinators: focusing on honey bees. In *Environmental Science and Pollution Research*, 31(34), 46898–46909, <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34184-y>
- Alshallash, K. S., Abolaban, G., Elhamamsy, S. M., Zaghlool, A., Nasr, A., Nagib, A., El-Hakim, A. F. A., Zahra, A. A., Hamdy, A. E., & Taha, I. M. (2023). Bee Pollen as a Functional Product – Chemical Constituents and Nutritional Properties. *Journal of Ecological Engineering*, 24(2), 173–183. <https://doi.org/10.12911/22998993/156611>
- Altaye, S. Z., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., & Nicolson, S. W. (2010). Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources. *Journal of Experimental Biology*, 213(19), 3311–3318. <https://doi.org/10.1242/jeb.046953>
- Anson, M. L. (1938). The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin with Hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22, 79-84.
- Ara Begum, H., Idrees, A., Afzal, A., Iqbal, J., Qadir, Z. A., Shahzad, M. F., Li, Z., Salah Shebl Ibrahim, S., Alkahtani, J., & Li, J. (2023). Impact of different pollen protein diets on the physiology of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) workers from essential plant sources. *Journal of King Saud University - Science*, 35(2): 102511. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102511>
- Aronstein, K. A., Saldivar, E., Vega, R., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 3(3), 601–615. <https://doi.org/10.3390/insects3030601>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. In *Annual Review of Entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>

- Barbieri, D., Gabriele, M., Summa, M., Colosimo, R., Leonardi, D., Domenici, V., & Pucci, L. (2020). Antioxidant, nutraceutical properties, and fluorescence spectral profiles of bee pollen samples from different botanical origins. *Antioxidants*, 9(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9101001>
- Bańkowski, E. (2014). *Biochemia. Podręcznik dla studentów studiów licencjackich i magisterskich*. MedPharma Polska, 193-221.
- Basualdo, M., Barragán, S., Vanagas, L., García, C., Solana, H., Rodríguez, E., & Bedascarrasbure, E. (2013). Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(4), 1553–1558. <https://doi.org/10.1603/EC12466>
- Bayram, N. E., Gercek, Y. C., Çelik, S., Mayda, N., Kostić, A., Dramićanin, A. M., & Özkök, A. (2021). Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin – similarities and differences. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(3). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103004>
- Birch-Machin, M. A., & Bowman, A. (2016). Oxidative stress and ageing. In *British Journal of Dermatology*, 175, 26–29. <https://doi.org/10.1111/bjd.14906>
- Borański, M., Jachuła, J., Pustkowiak, S., Celary, W., & Splitt, A. (2025). Solitary bees (*Osmia bicornis*) avoid creating single-component pollen provisions from mass flowering crops in favor of trees' pollen. *Arthropod-Plant Interactions*, 19(2). <https://doi.org/10.1007/s11829-025-10137-1>
- Brejcha, M., Prušáková, D., Sábová, M., Peska, V., Černý, J., Kodrík, D., Konopová, B., Frydrychová, R. Č. (2023). Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 146: 104504.
- Bretscher, H., & O'Connor, M. B. (2020). The role of muscle in insect energy homeostasis. in *frontiers in physiology*. *Frontiers*, 22(11): 580687 <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.580687>
- Breygina, M., Voronkov, A., Ivanova, T., & Babushkina, K. (2023). Fatty Acid Composition of Dry and Germinating Pollen of Gymnosperm and Angiosperm Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119717>

- Bryś, M. S., Olszewski, K., Bartoń, M., & Strachecka, A. (2025). Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets. *Antioxidants*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>
- Bryś, M. S., Skowronek, P., & Strachecka, A. (2021). Pollen diet—properties and impact on a bee colony. *Insects*, 12(9), <https://doi.org/10.3390/insects12090798>
- Bryś, M. S., & Strachecka, A. (2024). The key role of amino acids in pollen quality and honey bee physiology — a review. *Molecules*, 29(11). <https://doi.org/10.3390/molecules29112605>
- Bryś, M. S., Staniec, B., & Strachecka, A. (2024). The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0>
- Cai, D., Liu, H.-Y., Dong, H. & Ahmed, A. A. (2021). Editorial: Integrated role of nutrition and digestive physiology for animal health, Volume II. *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 1109703. doi: 10.3389/fvets.2022.1109703
- Carroll, M. J., Brown, N., Goodall, C., Downs, A. M., Sheenan, T. H., & Anderson, K. E. (2017). Honey bees preferentially consume freshly stored Pollen. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175933>
- Castle, D., Alkassab, A. T., Bischoff, G., Steffan-Dewenter, I., & Pistorius, J. (2022). High nutritional status promotes vitality of honey bees and mitigates negative effects of pesticides. *Science of the Total Environment*, 806: 151280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151280>
- Chęć, M., Olszewski, K., Dziechciarz, P., Skowronek, P., Pietrow, M., Borsuk, G., Bednarczyk, M., Jasina, G., Jasina, J., & Gagoś, M. (2021). Effect of stearin and paraffin adulteration of beeswax on brood survival. *Apidologie*, 52(2), 432–446. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00833-7>
- Crailsheim, K., & Stolberg, E. (1989). Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 35(8), 595–602. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90121-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90121-2)

- Danihlík, J., Škrabišová, M., Lenobel, R., Šebela, M., Omar, E., Petřivalský, M., Crailsheim, K., & Brodschneider, R. (2018). Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in individual honey bees? *Insects*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/insects9030079>
- DeGrandi-Hoffman, G., Gage, S. L., Corby-Harris, V., Carroll, M., Chambers, M., Graham, H., Watkins deJong, E., Hidalgo, G., Calle, S., Azzouz-Olden, F., Meador, C., Snyder, L., & Ziolkowski, N. (2018). Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology*, 109, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.002>
- Denisow, B., Tymoszuć, K., & Dmitruk, M. (2019). Nectar and pollen production of *Helianthus tuberosus* L. – an exotic plant with invasiveness potential. *Acta Botanica Croatica*, 78(2), 135–141. <https://doi.org/10.2478/botcro-2019-0019>
- Depta, J., Małkowska, P., Wysokińska, M., Todorska, K., Sierawska, O., Hryniewicz, R., Bębnowska, D., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2022). Therapeutic role of antimicrobial peptides in diabetes mellitus. *biologics*, 2(1), 92–106. <https://doi.org/10.3390/biologics2010008>
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J. L., & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Dmitruk, M., Denisow, B., Chrzanowska, E., Dąbrowska, A., & Bożek, M. (2024). Comparison of nectar and pollen resources in various *Tilia* species. A case study from southern Poland. *Trees - Structure and Function*, 38(4), 953–967. <https://doi.org/10.1007/s00468-024-02527-4>
- Dmochowska-Ślęzak, K., Dmitryjuk, M., Zaobidna, E., & Żółtowska, K. (2016). The antioxidant defense system of *Varroa destructor* facilitates the infestation of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 163–165. <https://doi.org/10.1515/JAS-2016-0010>
- Dziechciarz, P., Strachecka, A., Borsuk, G., & Olszewski, K. (2023). Effect of rearing in small-cell combs on activities of catalase and superoxide dismutase and total antioxidant capacity in the hemolymph of *Apis mellifera* workers. *Antioxidants*, 12(3): 709.

- 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(8). <https://doi.org/10.3390/ani12080978>
- Farjan, M., Dmitryjuk, M., Lipiński, Z., Biernat-Łopieńska, E., & Zóltowska, K. (2012). Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 263–270. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.07>
- Fernández-González, M., Lara, B., González-Fernández, E., Rojo, J., Pérez-Badia, R., & Rodríguez-Rajo, F. J. (2021). *Pinus* pollen emission patterns in different bioclimatic areas of the Iberian Peninsula. *Forests*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/f12060688>
- Filipiak, M. (2019). Key pollen host plants provide balanced diets for wild bee larvae: A lesson for planting flower strips and hedgerows. *Journal of Applied Ecology*, 56(6), 1410–1418. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13383>
- Filipiak, M., Kuszewska, K., Asselman, M., Denisow, B., Stawiarz, E., Woyciechowski, M., & Weiner, J. (2017). Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183236>
- Filipiak, Z. M., Denisow, B., Stawiarz, E., & Filipiak, M. (2022). Unravelling the dependence of a wild bee on floral diversity and composition using a feeding experiment. *Science of the Total Environment*, 820, 153326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153326>
- Frias, B. E. D., Barbosa, C. D., & Lourenço, A. P. (2016). Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie*, 47(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0373-y>
- Furse, S., Koch, H., Wright, G. A., & Stevenson, P. C. (2023). Sterol and lipid metabolism in bees. *Metabolomics*, 19(9), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02039-1>
- Giovanetti, M., Malabusini, S., Zugno, M., & Lupi, D. (2022). Influence of flowering characteristics, local environment, and daily temperature on the visits paid by *Apis mellifera* to the exotic crop *Phacelia tanacetifolia*. *Sustainability*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/su141610186>

- Gliński, Z., Buczek, K., & Marć, M. (2011). Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia. *Życie Weterynaryjne*, 86(9).
- Grzywnowicz, K., Ciołek, A., Tabor, A., & Jaszek, M. (2009). Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie*, 40(1), 4–19. <https://doi.org/10.1051/apido:2008057>
- Hsu, C. Y., & Hsieh, Y. S. (2014). Oxidative stress decreases in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology*, 15(2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9485-9>
- Hsu, P. S., Wu, T. H., Huang, M. Y., Wang, D. Y., & Wu, M. C. (2021). Nutritive value of 11 bee pollen samples from major floral sources in Taiwan. *Foods*, 10(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods10092229>
- Ihle, K. E., Baker, N. A., & Amdam, G. V. (2014). Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. *Journal of Insect Physiology*, 69, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.026>
- Jabłońska-Trypuć, A., & Wiater, J. (2022). Protective effect of plant compounds in pesticides Toxicity. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 20(7), 1035–1045.
- Jachula, J., Denisow, B., & Strzałkowska-Abramek, M. (2020). Does an invader have a bright side? Floral reward in two *Solidago* species. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 599–608. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1703086>
- Jachula, J., Denisow, B., & Wrzesień, M. (2021). Habitat heterogeneity helps to mitigate pollinator nectar sugar deficit and discontinuity in an agricultural landscape. *Science of the Total Environment*, 782, 146909. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146909>
- Jachula, J., Denisow, B., Wrzesień, M., & Ziółkowska, E. (2022). The need for weeds: Man-made, non-cropped habitats complement crops and natural habitats in providing honey bees and bumble bees with pollen resources. *Science of the Total Environment*, 840, 156551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156551>
- Jack, C. J., Uppala, S. S., Lucas, H. M., & Sagili, R. R. (2016). Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 87, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.004>

- Jaremek, M., Olszewski, K., Chobotow, J., & Strachecka, A. (2024). The morphological image of fat body and tergal gland cells in uninseminated *Apis mellifera* queen bees. *Insects*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/insects15040244>
- Jovanovic, N.M., Glavinic, U., Ristanic, M., Vejnovic, B., Ilic, T., Stevanovic, J., & Stanimirovic, Z. (2023). Effects of plant-based supplement on oxidative stress of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *Animals*, 13(22): 3543.
- Karise, R., Raimets, R., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Pihlik, P., Keres, I., Williams, I.H., Viinalass, H., & Mänd, M. (2017). Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere*, 188, 389–396.
- Koubová, J., Sábová, M., Brejcha, M., Kodrík, D., & Čapková Frydrychová, R. (2021). Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, DNA replication, and nutrients in the fat body of *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79912-9>
- Krishnan, N., & Kodrík, D. (2006). Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology*, 52(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.009>
- Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S. A., Toth, A. L., Ohashi, K., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Kage, E., Morioka, M., Beye, M., Kubo, T., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 563–76.
- Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 10(3), 705–728. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- Lee, T.-M., & Lin, Y.-H. (1995). Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air-or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *Plant Science*, 106, 43–54.
- Lenda, M., Skórka, P., Kuszewska, K., Moroń, D., Bełcik, M., Baczek Kwinta, R., Janowiak, F., Duncan, D. H., Vesk, P. A., Possingham, H. P., & Knops, J. M. H. (2021). Misinformation, internet honey trading and beekeepers drive a plant invasion. *Ecology Letters*, 24(2), 165–169. <https://doi.org/10.1111/ele.13645>

- Likhanov, A., Oliinyk, M., Pashkevych, N., Churilov, A., & Kozyr, M. (2021). The role of flavonoids in invasion strategy of *Solidago canadensis* L. *Plants*, 10(8): 1748.
- Locatelli, F., Bundrock, G., & Müller, U. (2005). Focal and temporal release of glutamate in the mushroom bodies improves olfactory memory in *Apis mellifera*. *Journal of Neuroscience*, 25(50), 11614–11618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3180-05.2005>
- Lupi, D., Mesiano, M. P., Adani, A., Benocci, R., Giacchini, R., Parenti, P., Zambon, G., Lavazza, A., Boniotti, M. B., Bassi, S., Colombo, M., & Tremolada, P. (2021). Combined effects of pesticides and electromagnetic-fields on honeybees: Multi-stress exposure. *Insects*, 12(8), 1–32. <https://doi.org/10.3390/insects12080716>
- Ma, L., Wang, Y., Zhang, W., Wang, H., Liu, Z., & Xu, B. (2016). Alterations in protein and amino acid metabolism in honeybees (*Apis mellifera*) fed different L-leucine diets during the larval stage. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3), 769–774. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.07.005>
- Malone, L. A., & Gatehouse, H. S. (1998). Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(2), 169-174.
- Mensah, K. (2024). Citation: Mensah K. Understanding the physiological relevance of nutrition. *Insights in Nutrition and Metabolism*, 8(3), 208. <https://doi.org/10.35841/aainm-8.3.208>
- Migdał, P., Bieńkowski, P., Cebrat, M., Berbeć, E., Plotnik, M., Murawska, A., Sobkiewicz, P., Łaszkiewicz, A., & Latarowski, K. (2023). Exposure to a 900 MHz electromagnetic field induces a response of the honey bee organism on the level of enzyme activity and the expression of stress-related genes. *PLoS ONE*, 18(5): e0285522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285522>
- Migdał, P., Murawska, A., Berbeć, E., Zarębski, K., Ratajczak, N., Roman, A., & Latarowski, K. (2024a). Biochemical indicators and mortality in honey bee (*Apis mellifera*) workers after oral exposure to plant protection products and their mixtures. *Agriculture*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/agriculture14010005>
- Migdał, P., Murawska, A., Bieńkowski, P., Strachecka, A., & Roman, A. (2021a). Effect of E-field at frequency 50 Hz on protein, glucose, and triglycerides concentration in

- honeybee hemolymph. *European Zoological Journal*, 88(1), 1170–1176.
<https://doi.org/10.1080/24750263.2021.2004247>
- Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2021b). 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*, 11(3): 863.
<https://doi.org/10.3390/ani11030863>
- Migdał, P., Murawska, A., Strachecka, A., Bieńkowski, P., & Roman, A. (2020). Changes in the honeybee antioxidant system after 12 h of exposure to electromagnetic field frequency of 50 Hz and variable intensity. *Insects*, 11(10), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/insects11100713>
- Migdał, P., Plotnik, M., Bieńkowski, P., Murawska, A., Berbeć, E., Sobkiewicz, P., Zarębski, K., & Latarowski, K. (2024b). Changes in honey bee nutrition after exposure to radiofrequency electromagnetic field. *European Zoological Journal*, 91(1), 172–179.
<https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308550>
- Mohandes, E. (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged worker. 3(1), 213–220.
- Moroń, D., Marjańska, E., Skórka, P., Lenda, M., & Woyciechowski, M. (2021). Invader–pollinator paradox: Invasive goldenrods benefit from large size pollinators. *Diversity and Distributions*, 27(4), 632–641. <https://doi.org/10.1111/ddi.13221>
- Murawska, A., Migdał, P. & Roman, A. (2021). Effects of plant protection products on biochemical markers in honey bees. *Agriculture*, 11(7): 648.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11070648>
- Negri, P., Ramirez, L., Quintana, S., Szawarski, N., Maggi, M., Conte, Y. Le, Lamattina, L., & Eguaras, M. (2017). Dietary supplementation of honey bee larvae with arginine and abscisic acid enhances nitric oxide and granulocyte immune responses after trauma. *Insects*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/insects8030085>
- Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Horvacki, N., Šikoparija, B., Nedić, N., Blagojević, S., Ignjatović, L., & Tešić, Ž. (2020). Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen: Polyphenolics in buckwheat. *Royal Society Open Science*, 7(12).
<https://doi.org/10.1098/rsos.201576>

- Omar, E., Abd-Ella, A. A., Khodairy, M. M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., & Brodschneider, R. (2017). Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of *acid* gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48(4), 425–436. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0487-x>
- Owayss, A. A., Shebl, M. A., Iqbal, J., Awad, A. M., Raweh, H. S., & Alqarni, A. S. (2020). *Phacelia tanacetifolia* can enhance conservation of honey bees and wild bees in the drastic hot-arid subtropical Central Arabia. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 569–582. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1735731>
- Paes-de-Oliveira, V. T., Poiani, S. B., Antonialli, W. F., & da Cruz-Landim, C. (2008). Morphometric changes on honeybee *Apis mellifera* L. workers fat body cells after juvenile hormone topic application at emergence. *Micron*, 39(4), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.02.002>
- Paleolog, J., Wilde, J., Miszczak, A., Gancarz, M., & Strachecka, A. (2021). Antioxidation defenses of *Apis mellifera* queens and workers respond to imidacloprid in different age-dependent ways: Old queens are resistant, foragers are not. *Animals*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/ani11051246>
- Plotnik, M., Bieńkowski, P., Berbeć, E., Murawska, A., Latarowski, K., & Migdał, P. (2023). Influence of electromagnetic field with frequency of 50 Hz in form of doses on selected biochemical markers of honey bee. *Journal of Apicultural Science*, 67(1), 27–36. <https://doi.org/10.2478/jas-2023-0003>
- Ptaszyńska, A. A., Paleolog, J., & Borsuk, G. (2016). *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164477>
- Rajagopalan, K., DeGrandi-Hoffman, G., Pruett, M., Jones, V. P., Corby-Harris, V., Pireaud, J., Curry, R., Hopkins, B., & Northfield, T. D. (2024). Warmer autumns and winters could reduce honey bee overwintering survival with potential risks for pollination services. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55327-8>
- Romanovskaja, D., Baksienė, E., & Razukas, A. (2023). Impact of climate change on phenology of entomophilous plants and honey bee (*Apis mellifera* L.). <https://doi.org/10.20944/preprints202305.0787.v1>

- Roulston, T.H., Cane, J.H., & Buchmann, S. L. (2000). What governs protein content of pollen: Pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs*, *Ecological Society of America*, 70, 617–643.
- Sandmann, G. (2019). Antioxidant protection from UV-and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/antiox8070219>
- Santos, D.E., Souza, A.D.O., Tibério, G.J., Alberici, L.C., & Hartfelder, K. (2020). Differential expression of antioxidant system genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development mitigates ROS-mediated oxidative damage in queen larvae. *Genetics and Molecular Biology*, 43(4): e20200173.
- Schacterle G. & Pollack R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of proteins in biologic material. *Analytical Biochemistry* 51, 654–655.
- Scofield, S.L., & Amdam, G.V. (2024). Fat body lipogenic capacity in honey bee workers is affected by age. Social Role and Dietary Protein. *Journal of Experimental Biology*, 227(18): jeb247777.
- Shakir, S.K., Irfan, S., Akhtar, B., Rehman, S., Daud, M.K., Taimur, N., & Azizullah, A. (2018). Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Ecotoxicology*, 27(7), 919–935.
- Skowronek, P., & Strachecka, A. (2023). Cannabidiol (CBD) supports the honeybee worker organism by activating the antioxidant system. *Antioxidants*, 12(2): 279. <https://doi.org/10.3390/antiox12020279>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2021). Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/insects12060547>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2022a). CBD supplementation has a positive effect on the activity of the proteolytic system and biochemical markers of honey bees (*Apis mellifera*) in the apiary. *Animals*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/ani12182313>
- Skowronek, P., Wójcik, Ł., & Strachecka, A. (2022b). Impressive impact of hemp extract on antioxidant system in honey bee (*Apis mellifera*) organism. *Antioxidants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antiox11040707>

- Skřivan, P., Chrpová, D., Klitschová, B., Švec, I., & Sluková, M. (2023). Buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench)—A contemporary view on the problems of its production for human nutrition. *Foods*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/foods12163055>
- Somerville, D. (2005). *Fat Bees Skinny Bees -a manual on honey bee nutrition for beekeepers*. Rural Industries Research and Development Corporation.
- Somerville, D. C., & Nicol, H. I. (2006). Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 141–149. <https://doi.org/10.1071/EA03188>
- Splitt, A., Skórka, P., Strachecka, A., Borański, M., & Teper, D. (2021). Keep trees for bees: Pollen collection by *Osmia bicornis* along the urbanization gradient. *Urban Forestry and Urban Greening*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2021.127250>
- Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J., & Lipiński, Z. (2013). Proteolysis on the body surface of pyrethroid-sensitive and resistant *Varroa destructor*. *Acta Parasitologica*, 58(1), 64–69. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0109-y>
- Strachecka, A., Chęć, A., Olszewski, K., Staniszevska, P., Dziechciarz P., & Gagoś M. (2024). How does adulteration of wax foundation affect phenoloxidase and lysozyme activities as selected parameters of immunity in *Apis mellifera*? *Journal of Veterinary Research*, 68(3), 215-223. DOI: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0040>
- Strachecka, A., & Demetraki-Paleolog, J. (2011). System proteolityczny powierzchni ciała *Apis mellifera* w zachowaniu zdrowotności rodzin pszczelich. *Kosmos*, 60, 43–51. <https://www.researchgate.net/publication/262106459>
- Strachecka, A., Kuszewska, K., Olszewski, K., Skowronek, P., Grzybek, M., Grabowski, M., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2022). Activities of antioxidant and proteolytic systems and biomarkers in the fat body and hemolymph of young *Apis mellifera* females. *Animals*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091121>
- Strachecka, A. J., Olszewski, K., & Paleolog, J. (2015). Curcumin stimulates biochemical mechanisms of *Apis mellifera* resistance and extends the apian life-span. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 129–141. <https://doi.org/10.1515/jas-2015-0014>

- Strachecka, A., Migdał, P., Kuszewska, K., Skowronek, P., Grabowski, M., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2021a). Humoral and cellular defense mechanisms in rebel workers of *Apis mellifera*. *Biology*, 10(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biology10111146>
- Strachecka, A., Olszewski, K., Kuszewska, K., Chobotow, J., Wójcik, Ł., Paleolog, J., & Woyciechowski, M. (2021b). Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93357-8>
- Strachecka, A., Olszewski, K., Paleolog, J., Borsuk, G., Bajda, M., Krauze, M., Merska, M., & Chobotow, J. (2014). Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 86(3), 165–179. <https://doi.org/10.1002/arch.21159>
- Szymaś, B., Łangowska, A., & Kazimierczak-Baryczko, M. (2012). Obraz histologiczny jelita środkowego pszczół (*Apis mellifera* L.) żywionych namiastkami pyłku kwiatowego wzbogaconymi probiotykami. *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 5–12. <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0001-2>
- Taha, E. K. A., Al-Kahtani, S., & Taha, R. (2019). Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.003>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. In *Trends in Food Science and Technology*, 98, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
- Tsuruda, J. M., Chakrabarti, P., & Sagili, R. R. (2021). Honey bee nutrition. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 37(3), 505–519. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.006>
- Tymoszuk, K., Dmitruk, M., Jachuła, J., & Denisow, B. (2024). Flower structure and floral reward in *Scopolia carniolica* (Solanaceae) – is it a plant that can support the bumblebee food base in early spring? *Arthropod-Plant Interactions*, 18(3), 403–416. <https://doi.org/10.1007/s11829-024-10059-4>

- Vaudo, A. D., Dyer, L. A., & Leonard, A. S. (2024). Pollen nutrition structures bee and plant community interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.2317228120>
- Vasilevskaya, N. (2022) Pollution of the environment and pollen: A review. *Stresses*, 2(4), 515–530.
- Vergun, O. (2023). Nutritional composition of *Phacelia tanacetifolia* Benth. Bee pollen and inflorescences. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 7(1). <https://doi.org/10.15414/ainhlq.2023.0011>
- Weryszko-Chmielewska, E., & Piotrowska, K. (2012). Evaluation of the abundance of hazel (*Corylus* spp.) pollen based on the patterns of the pollen seasons in Lublin in the period 2001-2010. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 11(3), 69–78. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865341605&partnerID=40&md5=ee7dc2c9113ad4ee35bb6545e938c65b>
- Wójcik, Ł., Chęć, M., Skowronek, P., Grabowski, M., Persona, K., & Strachecka, A. (2022). Do the different life history strategies of ants and honeybees determine fat body morphology? *Arthropod Structure and Development*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101186>
- Wu, Y., Liu, Q., Weiss, B., Kaltenpoth, M., & Kadowaki, T. (2020). Honey Bee Suppresses the Parasitic Mite Vitellogenin by Antimicrobial Peptide. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01037>
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 708–718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>
- Yazlovytska, L. S., Karavan, V. V., Domaciuk, M., Panchuk, I. I., Borsuk, G., & Volkov, R. A. (2023). Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11:1098350. doi: 10.3389/fevo.2023.1098350
- Zheng, H., Perreau, J., Elijah Powell, J., Han, B., Zhang, Z., Kwong, W. K., Tringe, S. G., & Moran, N. A. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Pnas*, 116(51), 25909 – 2591. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1098350>

Dostęp online:

- <https://www.paldat.org/>

- <https://pollen.tstebler.ch/MediaWiki/index.php?title=Pollenatlas#gsc.tab=0>

8. Oświadczenia współautorów (Załącznik 1)

9. Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej (Załącznik 2)

Lublin, dnia 19 lutego 2025 r.

prof. dr hab. Bernard Staniec
Katedra Zoologii i Ochrony Przyrody,
Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin,
bernard.staniec@mail.umcs.pl

**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

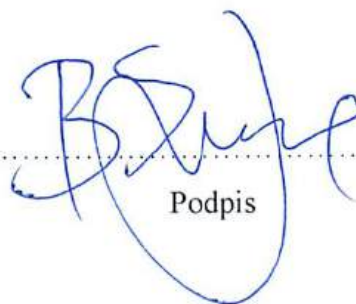
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Bernard Staniec, Aneta Strachecka, 2024, The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. Sci. Rep, 14; DOI: [10.1038/s41598-024-64598-0](https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0)

polegał na pomocy w przygotowaniu próbek do pomiarów mikroskopowych komórek ciała tłuszczowego oraz pomocy technicznej w obsłudze mikroskopu Olympus BX61 z przystawką DIC i oprogramowaniem Olympus DP72.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.



Podpis

Lublin, dnia 19 lutego 2025 r.

mgr inż. Maciej Bartoń
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Skromna 8
20-704 Lublin
maciej.barton@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Maciej Bartoń, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka, 2025, Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets, Antioxidants, 14, 69; DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>

polegał na pomocy w przygotowaniu próbek i analizie substancji czynnych w pyłku pszczelim z wykorzystaniem chromatografii cieczkowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.



.....
Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

prof. dr hab. Krzysztof Olszewski
Zakład Pszczelnictwa,
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

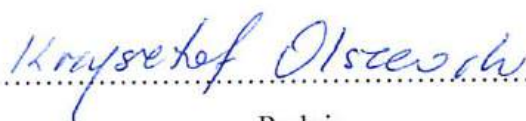
**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honey bees workers, *in press*.

polegał na przygotowaniu rodzin pszczelich w celu pozyskania jednodniowych robotnic, a także pomocy przy wykonaniu analiz statystycznych
Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.


.....
Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

prof. dr hab. Krzysztof Olszewski
Zakład Pszczelnictwa,
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
krzysztof.olszewski@up.lublin.pl

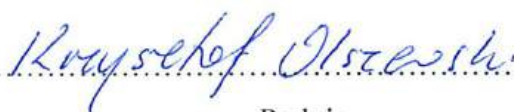
**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Maciej Bartoń, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka, 2025,
Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets, Antioxidants, 14, 69; DOI:
<https://doi.org/10.3390/antiox14010069>

polegał na przygotowaniu rodzin pszczelek w celu pozyskania jednodniowych robotnic,
a także pomocy przy wykonaniu analiz statystycznych
Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 5%.


.....
Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Bernard Staniec, Aneta Strachecka, 2024, The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. Sci. Rep, 14; DOI: [10.1038/s41598-024-64598-0](https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0)

polegał na opracowaniu wstępnych hipotez badawczych, opracowanie metodyki, pomocy naukowej i merytorycznej w zakresie przebiegu doświadczenia, pomoc w interpretacji danych i współredagowanie manuskryptu.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

.....*Aneta Strachecka*.....

Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Maciej Bartoń, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka, 2025,
Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets, Antioxidants, 14, 69; DOI:
<https://doi.org/10.3390/antiox14010069>

polegał na opracowaniu wstępnych hipotez badawczych, opracowanie metodyki, pomocy naukowej i merytorycznej w zakresie przebiegu doświadczenia, pomoc w interpretacji danych i współredagowanie manuskryptu.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

.....*Aneta Strachecka*.....

Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

prof. dr hab. Aneta Strachecka
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
aneta.strachecka@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honey bees workers, *in press*.

polegał na opracowaniu wstępnych hipotez badawczych, opracowanie metodyki, pomocy naukowej i merytorycznej w zakresie przebiegu doświadczenia, pomoc w interpretacji danych i współredagowanie manuskryptu.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

.....*Aneta Strachecka*.....

Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

mgr Maciej Bryś
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
maciej.brys@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Bernard Staniec, Aneta Strachecka, 2024, The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. Sci. Rep, 14; DOI: [10.1038/s41598-024-64598-0](https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0)

pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotezy badawczej, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz laboratoryjnych, mikroskopowa analiza pyłkowa); analiza statystyczna i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków; napisanie pierwszej wersji manuskryptu; redakcja publikacji, korespondencja z redakcją.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 85%.



.....
Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

mgr Maciej Bryś
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
maciej.brys@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Maciej Bartoń, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka, 2025, Changes in the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. due to pollen monodiets, Antioxidants, 14, 69; DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>

pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotez badawczych, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz laboratoryjnych, mikroskopowa analiza pyłkowa); analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków; napisanie pierwszej wersji manuskryptu; redakcja publikacji, korespondencja z redakcją.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 80%.

Maciej Bryś

.....
Podpis

Lublin, dnia 30 marca 2025 r.

mgr Maciej Bryś
Katedra Ekofizjologii Bezkręgowców
i Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Środowiskowej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Doświadczalna 50a
20-280 Lublin
maciej.brys@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Maciej Sylwester Bryś, Krzysztof Olszewski, Aneta Strachecka. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honey bees workers, *in press*.

pomysłodawca badań, inicjatywa badań, twórca hipotez badawczych, opracowanie metodyki; realizacja doświadczenia (założenie doświadczenia, kontrola poszczególnych etapów doświadczenia, pobranie materiału, wykonanie analiz biochemicznych, mikroskopowa analiza pyłkowa); analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, napisanie pierwszej wersji manuskryptu; przesłanie manuskryptu do wydawnictwa i odpowiedzi na recenzje, korekta po recenzjach.

Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 85%.

Maciej Bryś

.....
Podpis

Review

The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review

Maciej Sylwester Bryś *  and Aneta Strachecka 

Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Doświadczalna 50a, 20-280 Lublin, Poland; aneta.strachecka@up.lublin.pl

* Correspondence: maciej.brys@up.lublin.pl

Abstract: When studying honey bee nutrition, it is important to pay attention not only to the quantity but also to the quality of pollen for floral visitors. The recommended way to determine the value of pollen is to determine both the protein concentration and the amino acid composition in the insect's hemolymph. In addition, the composition of pollen also includes lipids, sterols and biogenic elements such as carbon, nitrogen, etc. Very high protein concentration is observed in aloe pollen, averaging 51%. Plants with a high protein content, at the level of 27% in Europe, are rapeseed and phacelia. In turn, a plant that is poor in protein (at the level of 11%) is buckwheat. The aforementioned plants are sown over very large areas. Vast acreages in Central and Eastern Europe are occupied by pollen- and nectar-providing invasive plants, such as goldenrod. Therefore, bees are forced to use one food source—a mono diet—which results in their malnutrition. In the absence of natural pollen, beekeepers use other foods for bees; including soy protein, powdered milk, egg yolks, fish meal, etc. However, the colony is the strongest when bees are fed with pollen, as opposed to artificial protein diets. More research is needed on the relationship between bee pollen composition and nutrition, as measured by protein concentration and amino acid composition in apian hemolymph, colony strength, honey yield and good overwintering.

Keywords: mono diet; amino acid; metabolism; honey bee; nutrition; digestion



Citation: Bryś, M.S.; Strachecka, A. The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review. *Molecules* **2024**, *29*, 2605. <https://doi.org/10.3390/molecules29112605>

Academic Editor: Simona Sagona

Received: 29 April 2024

Revised: 29 May 2024

Accepted: 30 May 2024

Published: 1 June 2024



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

1. Introduction

The topic of pollinating insects' diets has recently come to the forefront of scientific debate [1,2]. An improper diet disrupts the functioning of the gastrointestinal tract, leading to impaired absorption of nutrients; and promotes the development of pathogenic fungi, e.g., *Nosema* spp. [3]. Nutritional stress caused by a mono diet or lack of food results in premature mortality of bee colonies. The physiological nutritional needs of honey bees are not well understood, unlike other farm and companion animals [4]. Bees use flower resources to provide food. Nectar is the main source of simple sugars such as fructose and glucose [5]. In the process of glycogenesis, glucose is transformed into glycogen. Glycogen and triacylglycerols are stored in the cells of the fat body (trophocytes) [6,7]. Compounds such as glycogen, triglycerides and proteins are used to generate energy for 'fuel' during flight, for wintering purposes and for basic metabolic processes (Figure 1). A natural source of easily digestible protein, lipids, vitamins and minerals for bees is pollen [8]. A honey bee consumes it after lactic fermentation, in the form of bee bread [9]. The demand for bee bread depends on the apian genotype, the availability of floral resources around the apiary, the number of workers, the number of larvae and the accumulated resources [10]. An average honey bee colony collects from 15 to 55 kg of pollen per season [11]. The environment around the apiary plays a key role in the nutrition of honey bees, as it provides or does not provide protein food resources that vary throughout the year [4,12]. Protein-rich diets, including the pollen diet, determine a significant overlap in proteome expression patterns and influence the nutritional and metabolic effects in flower visitors [13]. In addition, a

well-balanced diet determines the body's homeostasis through the correct concentration of reserve compounds stored in the fat body. Currently, the relationship between the species diversity of pollen-producing plants and the metabolism of flower-visiting insects is still insufficiently understood [14]. Lack of availability and poor quality of nutrients contained in pollen affects some plant species, so it is important to ensure a variety of food. When talking about the diet of honey bees and other floral visitors, nutritional balance must be taken into account. Moreover, it is not enough to use random mixtures of bee-friendly plants, but they should be selected for their nutrient composition [15]. It is important to understand the foraging preferences of honey bees and other floral visitors throughout the season in different ecosystems. Beekeepers should take into account specific recommendations, such as limiting lawn mowing for the cultivation of *Taraxacum* sp., *Ranunculus* sp., etc., which will help to properly balance the bees' diet [16]. Moreover, the above actions will promote the number of plant species and their numerical strength within the particular species, to increase the population of pollinators. However, these measures are still not sufficient and must evolve to consider what we have learned so far. An important scientific discovery was the identification of the segmental structure of the fat body in *Apis mellifera* L. [6,7]. The segmentation lends it a multi-tasking character, which makes the fat body comparable to the liver, spleen, pancreas and adipose tissue of vertebrates. Trophocytes and oenocytes that build the fat body participate in the energy metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. Currently, there are many unanswered questions related to the pollen diet and its impact on the segmental structure of the fat body.

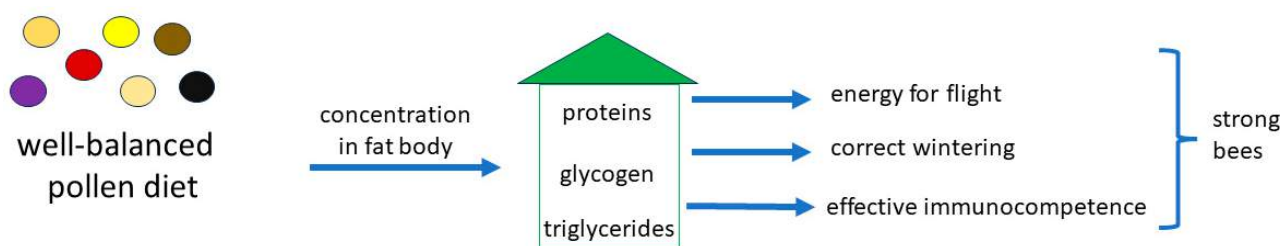


Figure 1. The effect of a well-balanced pollen diet on honey bee fat body and physiology of the honey bee.

The aim of this review is a comprehensive analysis of the literature and a summary/collection of the current and most important data on the impact of amino acids contained in pollen on the physiology of honey bees.

2. Composition of Bee Pollen

Scientists define plants as pollinator-friendly based on the amount of pollen or nectar produced, not its chemical quality [17]. Moreover, recommendations regarding plants that are valuable to insects, widely available to farmers, beekeepers and scientists, are usually inconsistent and unfocused [16]. When scientific data reports mention the biochemical composition of pollen, they usually refer to the crude protein content. This value ranges from 2.5 to 60% of the dry weight of angiosperm pollen [18–20]. A honey bee colony needs a diet containing approximately 20–25% protein for its proper growth and survival [19]. Amino acids and proteins present in the diet of bees should come from the pollen of various plant species (Figure 2). Therefore, it is widely acknowledged that a mono diet is not a balanced diet. Among the exceptions are plants such as *Castanea* sp. and *Trifolium* sp., which produce pollen with a high protein concentration (Table 1). We are not able to document all plant species for the physicochemical content of pollen. Scientists are focusing on the protein content of pollen from plants that dominate the diet of honey bees. Some plants, such as aloe (*Aloe Greatheadii* var. *davyana*), produce pollen with a high total protein content. There are also insect-pollinated plants in the environment that can produce pollen with a low protein content; e.g., sunflower (*Helianthus annuus* L.). Freshly collected aloe pollen for worker bees is characterized by a high protein content (51%), as

opposed to sunflower pollen (26%). Therefore, aloe pollen is preferred for overwintering bees by African beekeepers [21]. The pollen of *Echium plantagineum* L. [22] contains a high percentage of protein, at 37.4%. Buckwheat pollen (*Fagopyrum esculentum* Moench) is quite low in protein (11.4%). Buckwheat pollen, in turn, has a diverse composition of amino acids—especially exogenous amino acids—which enhances its nutritional value [22].

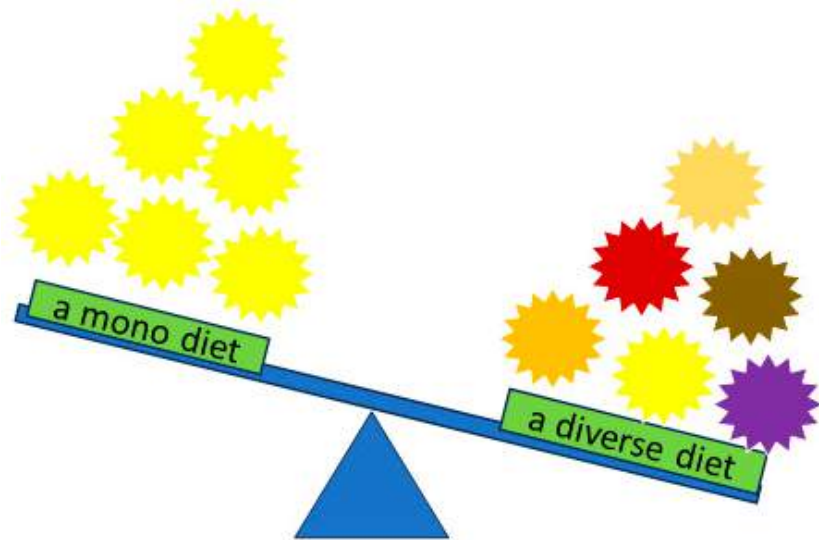


Figure 2. A diverse pollen diet contains different amino acids than a mono diet.

Table 1. Comparison of total protein content and amino acid composition in pollen (based on Google Scholar and Scopus).

Taxon	Total Protein Content [%]	Dominant Amino Acid Composition	Literature
<i>Brassica napus</i>	from 22 to 27	Aspartic acid, Glutamic acid, Lysine, Leucine	[22–26]
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	27.44	Glutamic acid, Proline, Aspartic acid, Leucine, Lysine, Valine	[27]
<i>Solidago gigantea</i> ; <i>Solidago canadensis</i>	>20	No literature data available	[28]
<i>Fagopyrum</i>	11.4	Glutamic acid, Proline, Aspartic acid, Leucine, Tryptophan, Lysine, Valine, Alanine, Arginine	[22,25]
<i>Medicago sativa</i>	20.23	Valine, Leucine, Isoleucine Phenylalanine, Proline	[24]
<i>Phoenix dactylifera</i>	19.77	Methionine, Histidine, Glycine, Alanine	[24]
<i>Vicia faba</i>	from 22 to 24	Proline, Aspartic acid, Glutamic acid, Arginine, Leucine, Tryptophan	[29,30]
<i>Helianthus annuus</i>	15.19	Leucine, Valine, Lysine, Histidine, Aspartic acid, Arginine, Tryptophan, Glutamic acid	[24,25,29]
<i>Zea mays</i>	14.9	Proline, Aspartic acid, Lysine, Alanine, Arginine, Tryptophan	[22,26]
<i>Eucalyptus bridgesiana</i> :	23.1	Proline, Glutamic acid, Aspartic acid, Leucine	[22]

Table 1. Cont.

Taxon	Total Protein Content [%]	Dominant Amino Acid Composition	Literature
<i>Echium plantagineum</i>	37.4	Aspartic acid, Glutamic acid, Leucine, Lysine	[22]
<i>Salix discolor</i>	21.9	Glutamic acid, Aspartic acid, Leucine, Lysine	[22]
<i>Castanea sativa</i>	21.6	Proline, Aspartic acid, Glutamic acid	[31,32]
<i>Rubus</i> sp.	22	Leucine, Lysine, Valine, Phenylalanine, Threonine, Isoleucine	[31,33]
<i>Sinapis</i>	No literature data available	Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Lysine	[34]
<i>Acacia</i> sp.	21.8	Aspartic acid, Glutamic, Glycine	[35]
<i>Calluna vulgaris</i>	17	Glutamic, Aspartic acid, Glycine	[36]

The percentage of protein in the insect diet changes with the season and, therefore, with the frequency of the flowering of pollen-bearing plants. In pollen samples collected from Mediterranean countries, the highest protein concentration was found in the spring pollen, while lower concentrations were found in samples from late summer [37,38]. Researchers have observed a similar trend of decreasing protein content with subsequent seasons in countries surrounded by the Atlantic Ocean and the region bordering the Pacific Ocean [19,39,40]. DeGrandi-Hoffman et al. [41] compared the protein content in pollen mixtures collected in pollen traps in spring and autumn. Microscopic botanical analyses revealed *Brassica* sp., *Raphanus* sp., and *Sisymbrium* L. in the spring pollen and mainly *Xanthium* spp., *Amaranthus cruentus* L. in the autumn pollen. The protein concentration was 421 µg/mg in the spring mixture and 425 µg/mg in the autumn mixture. Although the total protein content was comparable, differences were observed in the proportions of amino acids. Spring plants contained more amino acids, such as tryptophan, valine, isoleucine, serine, asparagine and glutamine; while autumn plants were poorer in proline and hydroxyproline [41]. The individual composition of pollen of the same species collected from different geographical locations may differ. The total protein content of *Brassica napus* pollen among the tested samples ranged from 18.9% (Saudi Arabia) to 27.3% (China) [26]. The authors found a similar trend in other pollens. This is due to the botanical and genetic origin, soil type, climatic conditions and the activities of beekeepers.

The profile and content of pollen amino acids differs between plant species [42]. De Groot's [43] division into 'essential' and 'non-essential' amino acids is justified by presence of arginine, histidine, lysine, phenylalanine, tryptophan, leucine, isoleucine, threonine and valine; and some non-essential amino acids, e.g., alanine, arginine, asparagine, cysteine, glycine, proline, tyrosine. Our review of the amino acid composition of pollen from selected plants shows that a significant number of plants produce pollen rich in leucine, glutamine, lysine and aspartic acid (Table 1). According to Somerville [44], pollen grains often lack isoleucine and valine. Pollen rich in isoleucine is provided by *Eucalyptus* L'Héritier de Brutelle (Myrtaceae) [22]. Proline and glutamic acids are the dominant exogenous amino acids found in most pollen [45]. The high proline content can also be a marker for assessing the freshness of pollen clusters. If the ratio of proline to all amino acids is lower than 0.65, it is assumed that the pollen samples are fresh and have undergone proper drying treatment [46]. In total, 19 amino acids have been identified in rapeseed, pear and apricot pollen. The contents of valine and leucine in rapeseed and apricot are higher than in pear pollen. Statistically significantly higher phenylalanine concentrations are observed in pear pollen. Moreover, rapeseed pollen has the highest level of tryptophan. It turns out that plants such as *Trifolium pratense*, *Trifolium repens* and plants from the Rosaceae

family—that are eagerly visited by honey bee workers—are deficient in one or several amino acids that are necessary for bees [42]. These deficiencies should be supplemented by the insects from other pollen sources and stored in the form of bee bread. Some fluctuations in the amino acid composition are observed in bee bread versus pollen. Bee bread has a higher nutritional value, mainly due to the greater bioavailability of amino acids caused by the action of lactic acid bacteria supplied by the honey bee. This ensures some of the amino acids from proteins are released [46]. Leucine and threonine have 60% higher levels in bee bread [47]. However, bee bread contains significantly lower concentrations of asparagine, proline and aspartic acid compared to pollen grains [26]. For example, the content of essential amino acids (EAA) in corn, eucalyptus and clover pollen is 61.8, 73.0 and 83.5 mg/g, respectively [48].

The nutritional value of pollen also depends on the content of saturated and unsaturated fatty acids. The total lipid content in pollen is 3–20% of its dry weight [4]. The content of individual fatty acids varies depending on the plant species. The most common ones are palmitic acid, linoleic acid and alpha-linolenic acid. In addition to their nutritional properties, decanoic, dodecanoic and myristic acids have antimicrobial properties [2]. Bees also have a nutritional need for sterols, including β -sitosterol and 24-methylene-cholesterol—which determine the synthesis of ecdysteroids—inducing the transformation of larvae and the maturation of female ovaries [1,49]. The above-mentioned sterols are not synthesized by flower-visiting insects, so they must be supplied in a pollen diet. Pollen and nectar are also rich in secondary metabolites produced by plants, such as amygdalin [50], quercetin or flavonol. Amygdalin is a cyanogenic glycoside (a plant secondary metabolite) commonly found in the pollen produced by apple trees, cherry trees, etc. [51,52]. Honey bee workers, while pollinating almonds, come into contact with plant tissues that contain high concentrations of amygdalin in their vacuoles. During digestion, amygdalin is broken down into prunasin and glucose. Prunasin is then further broken down into benzaldehyde and hydrogen cyanide. Hydrogen cyanide is toxic to animals, including bees. Nonetheless, forager bees willingly collect almond pollen. On the other hand, amygdalin reduces the titers of some viruses and other microorganisms [51].

In addition to proteins and amino acids, pollen contains small amounts of carbohydrates, lipids, phenolic compounds and fiber [53]. In addition, an important aspect is the stoichiometry of individual elements, especially carbon, nitrogen, sulfur, potassium, sodium, calcium, magnesium, iron, zinc, manganese and copper. Macronutrients and micronutrients play an important role in the functioning of the bee organism as precursors of enzymes and hormones in all metabolic processes [54,55]. Just like humans, insects lack the ability to synthesize most vitamins, so they must ingest them along with pollen. Bee pollen contains about 0.02–0.7% vitamins in relation to its total content [55]. Due to the deficiency of certain vitamins in some pollens [56], supplementation with artificial vitamins administered with sugar syrup or sugar paste is necessary. Water-soluble vitamins, such as those from the B group (thiamine, riboflavin, niacin, folic acid, etc.), dominate in bee pollen. Additionally, bee pollen contains fat-soluble vitamins A, D, E, and K [55]. A plant that produces pollen with a balanced content of the above-mentioned elements is clover (*Trifolium* sp.), while sunflower pollen (*Helianthus* sp.) is characterized by extremely low values of micro- and macroelements [57]. Filipiak and Filipiak [58] showed, in an experiment with solitary bees, that limiting selected elements inhibits the development of larvae and the formation of cocoons in mason bees.

3. Recognition of the Nutritional Value of Pollen by Worker Bees

The demand for pollen depends on internal factors such as the number of larvae present in the comb cells, the amount of stored bee bread and the genotype of the bee colony; as well as external (environmental) factors; for example, the seasonal availability of resources, time of day, relative humidity, rainfall wind speed, etc. [10,59,60]. It turns out that the pollen preferences of worker bees depend on the interaction of nutrients in relation to their proportions, rather than being related to a single nutrient. Assessment of pollen

quality and nutritional value by workers and nursing bees seems to be difficult because the cytoplasm of pollen grains is surrounded by a thick cell wall [61]. According to research by Beekemna et al. [62], foraging bees are unable to distinguish protein content. This fact is also confirmed by Roulston et al. [63], and by Pernal and Curie [64], who suggest that bees do not prefer diets with higher protein content. In turn, Fewell and Winson [65] found that worker bees are more likely to visit pollen that is rich in nitrogen, which correlates with high protein content. As opposed to the honey bee, research on bumblebees has shown that these insects choose plants with a higher protein content [66]. It is also scientifically confirmed that honey bees collect pollen containing protein and lipids in a ratio of 1:1 to 2:1. For comparison, this ratio in bumblebees is as high as 10:1 [67]. The issue related to the dietary preferences of the honey bee requires further investigation. The diversity of food sources is associated with the possibility of choosing pollen and/or nectar. Human activities related to monocultures (mass flowering of rapeseed) limit the choice of food resources available to honey bee workers [68,69].

4. Physiology of Protein Digestion

A pollen grain is composed of an outer exine layer and an inner layer, where the cytoplasm and cell nucleus are located. Some lipids and amino acids cover the outer pollen membrane. In order to get inside the pollen grain, the cell wall must be digested [46]. Access to the protein stored in the pollen grain depends on the degree of cell wall digestion. Honey bees use osmotic shock to disrupt the pollen wall, digestive enzymes, or mechanical grinding through the mouthpiece [20,63,70]. The average time that pollen stays in the digestive tract of a worker bee ranges from 3 to 24 h. The efficiency of the digestion process is estimated at 75% and is measured by the ratio of digested (empty) grains to intact grains in the feces. Proteins of other origins (e.g., soy) found in artificial diets are digested by bees at a digestive efficiency of 25% [2]. Proteins are digested into amino acids which, like building blocks, form long strings made of tens or even thousands of amino acids. Amino acids can be divided according to the presence of different functional groups, e.g., carboxyl, hydroxyl, or the presence of a ring. Honey bees are invertebrates and share the same protein, lipid and carbohydrate metabolism pathways as mammals. Amino acid metabolic pathways in bees are complicated due to the lack of typical organs such as the vertebrate liver. As in mammals, amino acids can be deaminated or converted into pyruvate and then incorporated into the Krebs cycle (TCA cycle) for the energy to be produced and stored in ATP; e.g., for flight (Figure 3). Most amino acids are transformed into pyruvic acid and then glucose is synthesized. Therefore, some amino acids belong to the group of glucogenic amino acids. The second group are ketogenic amino acids such as phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine, tryptophan and tyrosine, which are broken down into acetyl-CoA. From an energy point of view, burning one molecule of pyruvate is more energetic than burning one molecule of acetyl-CoA. The intermediates incorporated into the Krebs cycle come out in the form of malate. The malate will be converted into pyruvate in the mitochondrion and NADPH₂, and ATP will be produced. A simpler way is to directly incorporate amino acids—e.g., valine and isoleucine—into the Krebs cycle and ultimately produce energy. The final stage of amino acid digestion is the urea cycle. In the urea cycle, ammonia is converted to urea. The enzyme xanthine oxidoreductase converts urea into uric acid. Uric acid is stored in cells in the vacuoles of the fat body [6,71]. Finally, it is excreted with feces.

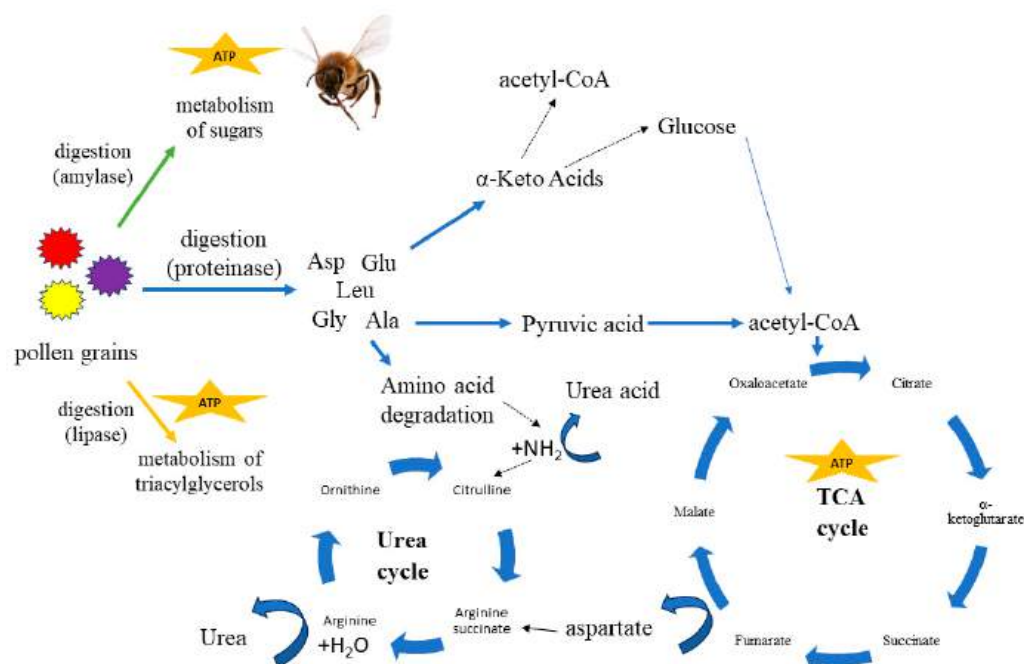


Figure 3. Pollen digestion: amino acid pathway [6,72–79].

5. The Key Role of Protein and Amino Acids in the Metabolism of *Apis mellifera* Workers

The site of protein synthesis in bees is mainly the fat body, and hemolymph distributes proteins throughout the tissues. Hemocytes are found in the hemolymph. Hemocytes are essential during the body's response to pathogens in cellular immunity. The number of hemocytes is higher in bees fed a protein-free diet. Pollen diets (*Salix* sp., *Acer* sp., *Cistus* sp.) with high percentages of proteins induce enhanced glucose oxidase (GOX) activities [80]. Consumption of a protein-rich pollen diet leads to an increase in the total protein concentration in seven-day-old worker bee hemolymph relative to worker bees fed sucrose syrup [81]. In addition, the total protein concentrations in the hemolymph of bees fed fermented pollen are about 39 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ after seven days, and are higher than in bees fed fresh pollen (about 32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) [81]. Dietary proteins play direct and indirect roles in the insect immune system. The crude protein contained in the bee's pollen diet determines the synthesis of the isoform of the antimicrobial peptide apidaecin 1. Bees fed with *Castanea* spp. pollen showed the highest increase in the apidaecin 1 isoform compared to pollen from *Helianthus* spp., *Sinapis* spp. and *Asparagus* spp. [82]. Bee pollen also contains short peptides of 3–20 amino acids, which have strong anti-inflammatory properties and free radical scavenging effects, especially against reactive forms of nitrogen [83].

Apart from proteins, smaller fractions, such as amino acids, also play a role in the bodies of pollinating insects. The amino acids leucine, lysine, phenylalanine, valine, methionine, threonine, histidine, isoleucine and tryptophan are not synthesized by bees (exogenous amino acids); therefore, they must be supplied with pollen [1]. Exogenous amino acids have a higher energy value than endogenous amino acids. The largest amounts of amino acids required for the proper development of honey bee workers include: leucine, isoleucine, valine, lysine and threonine [43,84].

Amino acids perform various functions in bees (Table 2). In addition to their functions as building blocks of proteins and polypeptides, they play direct and indirect roles as neurotransmitters. In addition, they are precursors of digestive enzymes, neurohormones and neuropeptides [85]. Amino acids contained in bee pollen consumed in the first five days of life increase the concentration of free amino acids found in the brain tissue of worker bees. The results suggest that access to pollen in early adulthood influences the development of the nervous system [85].

In many insects, especially honey bees, proline is an important amino acid. Proline is synthesized in fat body cells from acetyl-CoA and alanine [86]. The fat body is washed by hemolymph; so amino acids, including proline, enter the hemolymph. The dominant amino acid in the hemolymph of honey bee workers is proline [87]. The average proline concentration in emergence workers is 20 mM. The value of proline fluctuates throughout the life of the worker, but decreases towards the end of life. Amino acids such as methionine, alanine and phenylalanine did not show statistically significant differences [74]. The complete lack of access to pollen in the diet changed the amino acid profile in the nurse's brain, and this may translate into disorders related to the working behavior of nursing bees [85]. Additionally, an important amino acid in the honey bee's diet is isoleucine. Honey bees need 4% of isoleucine from pollen. However, isoleucine is a limiting factor and less access to this amino acid will result in a lack of protein bioavailability [88]. This result is consistent with the general statement that pollen rich in essential amino acids is more nutritious than other amino acids. Tryptophan plays an important role in the development, olfactory learning, and memory abilities of honey bee workers [76]. In addition, tryptophan can stimulate the development of the pharyngeal gland, which translates into greater production of royal jelly in nurses [76].

Table 2. The role of amino acids in the metabolism of honey bees.

Amino Acids	Role in the Honey Bee Metabolism	Literature
Tryptophan	A precursor of serotonin, a neuromodulator and a hormone whose level in the brain increases with age	[85]
Methionine	The major substitute and active methyl donor for DNA methylation, which is an epigenetic driver of caste differentiation	[89]
Arginine	A substrate used by the enzyme nitric oxide synthase to produce NO, participates in the immune response during injury	[38]
Leucine	Affects many TOR signaling pathways and genes; in insects, as in other animals, it may be associated with the activity of many enzymes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK)	[90]
Phenylalanine	Has a strong phagostimulatory effect	[91]
Tyrosine	Participates in the formation of sclerotin, the matrix in which chitin fibers are embedded	[91]
Histidine	A precursor to histamine	[92]
Cysteine	A limited resource in most insects and is necessary for the production of glutathione; an antioxidant that neutralizes the oxygen forms produced as a result of the reaction and supports immune functions	[93]
Proline	Takes part in physiological changes in temperature, preventing overcooling; proline increases cold tolerance; participates in energy metabolism during flight (energy boost for flight); increases the survival rate and weight of brood larvae	[87,94,95]
Glutamic acid	An important neurotransmitter regulating the processes of learning and memory	[95,96]
Lysine	This amino acid is directly involved in the synthesis of nitric oxide, a known neurotransmitter affecting memory	[85]

6. The Phenomenon of Hunger and Low Protein Diversity in a Bee Colony Conditioned by a Mono Diet and Invasive Plants

Stressful situations caused by periods of starvation for bee colonies are very dangerous. The first symptom associated with starvation is inhibited brood rearing. Then the queen bee stops laying unfertilized eggs, and eggs and young larvae may be eaten by adult worker bees to obtain protein [97]. Additionally, during starvation, disturbed worker bee behaviors such as ejecting larvae outside the hive or disrupted hygiene mechanisms are observed, leading to the development of diseases [56,98]. Starvation is conditioned by either a complete lack of access to food or an unbalanced access to nutrients caused by a mono diet. The problem of the declining diversity of these fodder plants, including: monocrop plants [99], causes nutritional stress [100]. An important effect on pollinators is exerted by vegetation growing on field margins, fallow lands, roadsides and railway embankments [99]. Such vegetation provides extended development and diversity, depending on the environment. Weeds in field margins also diversify pollen production. Unfortunately, most farmland is acres long, providing insects with an invasive monopoly on the agricultural landscape. An example of a mass-grown crop is rapeseed [101]. This plant provides huge amounts of pollen and nectar, which makes it a very attractive food source for honey bees [102]. The percentage of protein in rapeseed pollen is approximately 27% [78,103]. Unfortunately, the crop is often treated with pesticides, which poses a secondary threat to the honey bee. *Phacelium* and *buckwheat* are also widely cultivated on a large scale. *Phacelia* pollen (*Phacelia tanacetifolia* Benh.) contains 27.44% soluble, and other organic compounds such as beta-carotene [27]. In contrast, buckwheat pollen contains approximately 11.4% of protein [44]. Our findings show that buckwheat pollen has the lowest protein content in comparison with other pollen plants mentioned in this study. Large-scale farms are a common phenomenon in Europe and in China. In this case, pollinating insects have access to large amounts of pollen not only from rapeseed, but also from pear and apricot trees. The protein content in monocultures may be low and the amino acid composition not very diverse. Moreover, the periods of rapeseed, apricot and pear flowering overlap and bees are observed to have flower preferences. According to Chang et al. [76], more frequent visits to rapeseed flowers, as opposed to pear flowers, result from the higher sugar content in the rapeseed nectar. In a laboratory experiment, bees fed a mono diet showed a significant preference for apricot pollen over pear pollen. This fact may indicate an amino acid preference. Color and olfactory preferences cannot be ruled out either.

Nutrient deficiency and the natural phenomenon of a mono diet may be caused by pollen from invasive plants, due to honey bees visiting both native plants and invasive plants. Additionally, it is said that as invasive plant species increase, the number of native flower-visiting insects decreases. Nevertheless, the honey bee successfully pollinates some invasive plants. According to a study of pollinator visits conducted by Salisbury et al. [104], higher numbers of pollinators are found on native and near-native plant species than on exotic species. Pollinating insects are reluctant to visit newly introduced plant species, unlike flowers that occur naturally in a given climate zone [51,105]. The reluctance may be due to the low sugar content in the nectar or the poor chemical composition of the pollen, especially low amino acid levels. Pollen from invasive plants, such as *Buddleia davidii* Franch and *Impatiens glandulifera* Royle, contained lower concentrations of amino acids than native species [106]. Goldenrod provides pollen and nectar for honey bees in late summer and early autumn. The total protein content in the pollen produced by *Solidago* spp. is over 20% [28]. The expansion of the invasive *Solidago* sp. species determines the natural creation of the mono diet [99]. According to Denisow [107], several plant species in the Polish climatic zone that bloom in late summer—e.g., *Echium vulgare* L., *Medicago sativa* L. and *Melilotus officinalis* L.—produce pollen with a higher total protein content. Nevertheless, goldenrod is considered a major source of protein due to its abundant flowering. Goldenrod (*Solidago canadensis* L.) globally creates high competition for native fauna. Due to the rapid expansion of its range through seed dispersal, vegetative reproduction, rapid growth dynamics, and the production of allelopathic compounds that inhibit the growth

of neighboring plants, goldenrod is categorized as an invasive species [108]. Pollen and nectar secreted by goldenrod are an important late autumn food for pollinators in North America and Europe, including Poland, stored in the form of bee bread and honey in bee combs [109]. Goldenrod honey is being promoted for its unique properties, driving the demand for it [110]. Discussions among beekeepers on online forums about goldenrod are divided. We are unable to answer the question: How does this plant affect the wintering of bees, and especially the immune processes in bees? Therefore, there is a need for research on a goldenrod pollen-based diet.

The global problem of declining quality and shortage of pollen determines the human search for alternative methods of providing protein to honey bee workers. There are a number of tested supplements based on soy protein, skimmed milk powder, egg yolk powder, casein or fish meal, the ingredients of which were tested on *Apis mellifera* L. colonies [9,111,112]. They stimulate the development of the brood, determine the development of the hypopharyngeal glands (HPG), and all this translates into honey production in the colonies. There are also yeast–gluten mixtures available on the market with the addition of vitamins, amino acids, pollen, etc. It has been reported that the mixtures are perfect for periods of malnutrition and have a positive effect on colony parameters [9,113,114]. Bees fed with pollen, fishmeal and sugar were compared. Sugar had no effect, fishmeal worked satisfactorily, and pollen was the best in terms of bee colony development rate [9].

7. Conclusions and Further Research Directions

Bee pollen is one of the best sources of digestible protein for worker bees. Metabolites formed as a result of protein digestion play an important role in their physiology, especially energy production. Unavailability of one of the amino acids may be a factor that limits individual development. More research is needed on the protein content of worker pollen diets in relation to effects on biochemical parameters such as protein concentration, amino acid and fat content in the hemolymph and fat body. The cited parameters correlate with over-wintering, royal jelly production and honey bee immunity. In addition to the protein contained in pollen, other parameters should be considered, such as elemental composition and sterols etc. The influence of pollen produced by monoculture plants, such as rapeseed, and invasive plants, such as goldenrod, *Solidago* spp., on proper overwintering and resistance, cannot be overlooked.

Author Contributions: Conceptualization, Methodology, Software M.S.B. and A.S.; Data curation, Writing—Original draft preparation M.S.B.; Visualization, Investigation M.S.B. and A.S.; Supervision A.S.; Software, Validation M.S.B. and A.S.; Writing—Reviewing and Editing M.S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the National Science Centre (NCN) of Poland; PRELUDIUM Grant No. 2022/45/N/NZ9/01333 and research within the Doctoral School at the University of Life Sciences in Lublin, no. SD/286/176/2022 and SD/72/NB/2023.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created.

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

References

1. Barraud, A.; Barascou, L.; Lefebvre, V.; Sene, D.; Le Conte, Y.; Alaux, C.; Grillenzoni, F.V.; Corvucci, F.; Serra, G.; Costa, C.; et al. Variations in Nutritional Requirements Across Bee Species. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *6*, 824750. [[CrossRef](#)]
2. Wright, G.A.; Nicolson, S.W.; Shafir, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu. Rev. Entomol.* **2018**, *63*, 327–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Castelli, L.; Branchiccela, B.; Garrido, M.; Invernizzi, C.; Porrini, M.; Romero, H.; Santos, E.; Zunino, P.; Antúnez, K. Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microb. Ecol.* **2020**, *80*, 908–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Tsuruda, J.M.; Chakrabarti, P.; Sagili, R.R. Honey Bee Nutrition. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.* **2021**, *37*, 505–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ebrahimi, Y.; Ramírez-Coronel, A.A.; Al-Dhalimy, A.M.B.; Alfilm, R.H.C.; Al-Hassan, M.; Obaid, R.F.; Alameri, A.A.; Rastiani, F.; Khaledian, Y.; Shokri, S. Effects of honey and bee venom on human health. *Casp. J. Environ. Sci.* **2023**, *21*, 245–249. [[CrossRef](#)]
6. Skowronek, P.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Fat body—Multifunctional insect tissue. *Insects* **2021**, *12*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. 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](#)] [[PubMed](#)]
8. Basualdo, M.; Barragán, S.; Vanagas, L.; García, C.; Solana, H.; Rodríguez, E.; Bedascarrasbure, E. Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **2013**, *106*, 1553–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Paray, B.A.; Kumari, I.; Hajam, Y.A.; Sharma, B.; Kumar, R.; Albeshr, M.F.; Farah, M.A.; Khan, J.M. Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 1167–1176. [[CrossRef](#)]
10. Ghosh, S.; Jeon, H.; Jung, C. Foraging behaviour and preference of pollen sources by honey bee (*Apis mellifera*) relative to protein contents. *J. Ecol. Environ.* **2020**, *44*, 4. [[CrossRef](#)]
11. Avni, D.; Hendriksma, H.P.; Dag, A.; Uni, Z.; Shafir, S. Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern Mediterranean. *J. Insect Physiol.* **2014**, *69*, 65–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bezerra da Silva Santos, K.C.; Frost, E.; Samnegård, U.; Saunders, M.E.; Rader, R. Pollen collection by honey bee hives in almond orchards indicate diverse diets. *Basic Appl. Ecol.* **2022**, *64*, 68–78. [[CrossRef](#)]
13. Ricigliano, V.A. Honey Bee Proteome Responses to Plant and Cyanobacteria (blue-green algae) Diets. *ACS Food Sci. Technol.* **2021**, *1*, 17–26. [[CrossRef](#)]
14. Raderschall, C.A.; Bommarco, R.; Lindström, S.A.M.; Lundin, O. Landscape crop diversity and semi-natural habitat affect crop pollinators, pollination benefit and yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2021**, *306*, 107189. [[CrossRef](#)]
15. Filipiak, Z.M.; Denisow, B.; Stawiarz, E.; Filipiak, M. Unravelling the dependence of a wild bee on floral diversity and composition using a feeding experiment. *Sci. Total Environ.* **2022**, *820*, 153326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lowe, A.; Jones, L.; Brennan, G.; Creer, S.; de Vere, N. Seasonal progression and differences in major floral resource use by bees and hoverflies in a diverse horticultural and agricultural landscape revealed by DNA metabarcoding. *J. Appl. Ecol.* **2022**, *59*, 1484–1495. [[CrossRef](#)]
17. Filipiak, M. A better understanding of bee nutritional ecology is needed to optimize conservation strategies for wild bees—The application of ecological stoichiometry. *Insects* **2018**, *9*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Frias, B.E.D.; Barbosa, C.D.; Lourenço, A.P. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): Impact on adult health. *Apidologie* **2016**, *47*, 15–25. [[CrossRef](#)]
19. Quinlan, G.; Milbrath, M.; Otto, C.; Smart, A.; Iwanowicz, D.; Cornman, R.S.; Isaacs, R. Honey bee foraged pollen reveals temporal changes in pollen protein content and changes in forager choice for abundant versus high protein flowers. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2021**, *322*, 107645. [[CrossRef](#)]
20. Bryś, M.S.; Skowronek, P.; Strachecka, A. Pollen diet—Properties and impact on a bee colony. *Insects* **2021**, *12*, 798. [[CrossRef](#)]
21. Nicolson, S.W.; Da Silva Das Neves, S.; Human, H.; Pirk, C.W.W. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera* scutellata). *J. Insect Physiol.* **2018**, *107*, 302–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Somerville, D.C.; Nicol, H.I. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Aust. J. Exp. Agric.* **2006**, *46*, 141–149. [[CrossRef](#)]
23. Raboanatahiry, N.; Li, H.; Yu, L.; Li, M. Rapeseed (*Brassica napus*): Processing, utilization, and genetic improvement. *Agronomy* **2021**, *11*, 1776. [[CrossRef](#)]
24. Taha, E.K.A.; Al-Kahtani, S.; Taha, R. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 232–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, K.; Wu, D.; Ye, X.; Liu, D.; Chen, J.; Sun, P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 708–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hsu, P.S.; Wu, T.H.; Huang, M.Y.; Wang, D.Y.; Wu, M.C. Nutritive value of 11 bee pollen samples from major floral sources in taiwan. *Foods* **2021**, *10*, 2229. [[CrossRef](#)]
27. Vergun, O.M.; Grygorieva, O.; National, M.M.G.; Garden, B.; Brindza, J. Nutritional composition of *Phacelia tanacetifolia* Benth. bee pollen and inflorescences. *Agrobiodivers. Improv. Nutr. Health Life Qual.* **2023**, *2023*, 95–104. [[CrossRef](#)]
28. Jachula, J.; Denisow, B.; Strzałkowska-Abamek, M. Does an invader have a bright side? Floral reward in two *Solidago* species. *J. Apic. Res.* **2020**, *59*, 599–608. [[CrossRef](#)]
29. McAulay, M.K.; Forrest, J.R.K. How do sunflower pollen mixtures affect survival of queenless microcolonies of bumblebees (*Bombus impatiens*)? *Arthropod. Plant. Interact.* **2019**, *13*, 517–529. [[CrossRef](#)]
30. Somerville, D.C.; Nicol, H.I. Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* **2002**, *42*, 1131–1136. [[CrossRef](#)]

31. Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.L.; Alaux, C. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72016. [CrossRef] [PubMed]
32. Sedláčková, V.H.; Grygorieva, O.; Šramková, K.F.; Shelepova, O.; Goncharovska, I.; Mňahončáková, E. The Chemical Composition Of Pollen, Staminate Catkins, And Honey Of Castanea Sativa Mill. *Potravin. Slovak J. Food Sci.* **2021**, *15*, 433–444. [CrossRef] [PubMed]
33. Kostryco, M.; Chwil, M. Structure of anther epidermis and endothecium, production of pollen, and content of selected nutrients in pollen grains from six *Rubus idaeus* L. Cultivars. *Agronomy* **2021**, *11*, 1723. [CrossRef]
34. Omar, E.; Abd-Ella, A.A.; Khodairy, M.M.; Moosbeckhofer, R.; Crailsheim, K.; Brodschneider, R. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2017**, *48*, 425–436. [CrossRef]
35. Agarwal, A.; Nair, P.K.K. Short communication free and protein-bound amino acids of pollen of *Acacia Auriculaeformis* (Mimosaceae). *Grana* **1989**, *28*, 155–157. [CrossRef]
36. Vanderplanck, M.; Moerman, R.; Rasmont, P.; Lognag, G.; Wathélet, B.; Wattiez, R.; Michez, D. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86209. [CrossRef] [PubMed]
37. Liolios, V.; Tananaki, C.; Dimou, M.; Kanelis, D.; Goras, G.; Karazafiris, E.; Thrasyvoulou, A. Clasificación del polen de las plantas melíferas en función de su aportación de proteínas para las abejas de la miel. *J. Apic. Res.* **2015**, *54*, 582–592. [CrossRef]
38. Negri, P.; Ramirez, L.; Quintana, S.; Szawarski, N.; Maggi, M.; Conte, Y.L.; Lamattina, L.; Eguaras, M. Dietary supplementation of honey bee larvae with arginine and abscisic acid enhances nitric oxide and granulocyte immune responses after trauma. *Insects* **2017**, *8*, 85. [CrossRef] [PubMed]
39. Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.W.; Jones, K.C.; Wilson, K. Honeybee nutrition is linked to landscape composition. *Ecol. Evol.* **2014**, *4*, 4195–4206. [CrossRef]
40. Simanonok, M.P.; Otto, C.R.V.; Smart, M.D. Do the Quality and Quantity of Honey Bee-Collected Pollen Vary Across an Agricultural Land-Use Gradient? *Environ. Entomol.* **2020**, *49*, 189–196. [CrossRef]
41. DeGrandi-Hoffman, G.; Gage, S.L.; Corby-Harris, V.; Carroll, M.; Chambers, M.; Graham, H.; Watkins deJong, E.; Hidalgo, G.; Calle, S.; Azzouz-Olden, F.; et al. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.* **2018**, *109*, 114–124. [CrossRef]
42. Jeannerod, L.; Carlier, A.; Schatz, B.; Daise, C.; Richel, A.; Agnan, Y.; Baude, M.; Jacquemart, A.L. Some bee-pollinated plants provide nutritionally incomplete pollen amino acid resources to their pollinators. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0269992. [CrossRef]
43. de Groot, A.P. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia* **1952**, *8*, 192–194. [CrossRef]
44. Somerville, D.C. *Nutritional Value of Bee Collected Pollens*; Rural Industries Research and Development Corporation, 2001; pp. 1–166. Available online: https://books.google.pl/books/about/Nutritional_Value_of_Bee_Collected_Pollen.html?id=D1A7vgAACAAJ&redir_esc=y (accessed on 28 April 2024).
45. Szczesna, T. Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. *J. Apic. Sci.* **2006**, *50*, 81–90.
46. Bayram, N.E.; Gercek, Y.C.; Çelik, S.; Mayda, N.; Kostić, A.; Dramićanin, A.M.; Özkök, A. Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin—Similarities and differences. *Arab. J. Chem.* **2021**, *14*, 103004. [CrossRef]
47. Degrandi-Hoffman, G.; Eckholm, B.; Huang, M. Methods for comparing nutrients in beebread made by Africanized and European honey bees and the effects on hemolymph protein titers. *J. Vis. Exp.* **2015**, *2015*, e52448. [CrossRef] [PubMed]
48. Alshallash, K.S.; Abolaban, G.; Elhamamsy, S.M.; Zaghloul, A.; Nasr, A.; Nagib, A.; El-Hakim, A.F.A.; Zahra, A.A.; Hamdy, A.E.; Taha, I.M. Bee Pollen as a Functional Product—Chemical Constituents and Nutritional Properties. *J. Ecol. Eng.* **2023**, *24*, 173–183. [CrossRef]
49. Behmer, S.T.; David Nes, W. Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Adv. Insect Physiol.* **2003**, *31*, 1–72. [CrossRef]
50. London-Shafir, I.; Shafir, S.; Eisikowitch, D. Amygdalin in almond nectar and pollen—Facts and possible roles. *Plant Syst. Evol.* **2003**, *238*, 87–95. [CrossRef]
51. Tauber, J.P.; Tozkar, C.Ö.; Schwarz, R.S.; Lopez, D.; Irwin, R.E.; Adler, L.S.; Evans, J.D. Colony-level effects of amygdalin on honeybees and their microbes. *Insects* **2020**, *11*, 783. [CrossRef] [PubMed]
52. Motta, E.V.S.; Gage, A.; Smith, T.E.; Blake, K.J.; Kwong, W.K.; Riddington, I.M.; Moran, N.A. Host-microbiome metabolism of a plant toxin in bees. *eLife* **2022**, *11*, e82595. [CrossRef] [PubMed]
53. Rodríguez-Pólit, C.; Gonzalez-Pastor, R.; Heredia-Moya, J.; Carrera-Pacheco, S.E.; Castillo-Solis, F.; Vallejo-Imbaquingo, R.; Barba-Ostria, C.; Guaman, L.P. Chemical Properties and Biological Activity of Bee Pollen. *Molecules* **2023**, *28*, 7768. [CrossRef]
54. Elsayeh, W.A.; Cook, C.; Wright, G.A. B-Vitamins Influence the Consumption of Macronutrients in Honey Bees. *Front. Sustain. Food Syst.* **2022**, *6*, 804002. [CrossRef]
55. Ghouizi, A.E.; Bakour, M.; Laaroussi, H.; Ousaaïd, D.; El Menyiy, N.; Hano, C.; Lyoussi, B. Bee Pollen as Functional Food: Insights into Its Composition and Therapeutic Properties. *Antioxidants* **2023**, *12*, 557. [CrossRef] [PubMed]

56. Somerville, D. *Fat Bees Skinny Bees—A Manual on Honey Bee Nutrition for Beekeepers*; RIRDC: Kingston, ON, Canada, 2005.
57. Filipiak, M.; Kuszevska, K.; Asselman, M.; Denisow, B.; Stawiarz, E.; Woyciechowski, M.; Weiner, J. Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Filipiak, Z.M.; Filipiak, M. The scarcity of specific nutrients in wild bee larval food negatively influences certain life history traits. *Biology* **2020**, *9*, 462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Layek, U.; Manna, S.S.; Karmakar, P. Pollen foraging behaviour of honey bee (*Apis mellifera* L.) in southern West Bengal, India. *Palynology* **2020**, *44*, 114–126. [\[CrossRef\]](#)
60. Raffiudin, R.; Dyahastuti, M.; Nugraha, R.; Sayusti, T.; Djuita, N.R.; Suwananda, E.; Allvioningrum, V.; Mardhony, R.; Biagioni, S.; Setyaningsih, C.A.; et al. The effect of land cover on the foraging behavior and pollen in the honey of the giant bee *Apis dorsata* in Sumatra. *Front. Bee Sci.* **2024**, *2*, 1366287. [\[CrossRef\]](#)
61. Corby-Harris, V.; Snyder, L.; Meador, C.; Ayotte, T. Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Beekman, M.; Preece, K.; Schaerf, T.M. Dancing for their supper: Do honeybees adjust their recruitment dance in response to the protein content of pollen? *Insectes Soc.* **2016**, *63*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
63. Roulston, T.; Cane, J. The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evol. Ecol.* **2002**, *16*, 49–65. [\[CrossRef\]](#)
64. Pernal, S.F.; Currie, R.W. The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2001**, *51*, 53–68. [\[CrossRef\]](#)
65. Fewell, J.H.; Winston, M.L. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1992**, *30*, 387–393. [\[CrossRef\]](#)
66. Leonhardt, S.D.; Blüthgen, N. The same, but different: Pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie* **2012**, *43*, 449–464. [\[CrossRef\]](#)
67. Vaudo, A.D.; Tooker, J.F.; Patch, H.M.; Biddinger, D.J.; Coccia, M.; Crone, M.K.; Fiely, M.; Francis, J.S.; Hines, H.M.; Hodges, M.; et al. Pollen protein: Lipid macronutrient ratios may guide broad patterns of bee species floral preferences. *Insects* **2020**, *11*, 132. [\[CrossRef\]](#)
68. Leponiemi, M.; Freitak, D.; Moreno-Torres, M.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Becker-Scarpitta, A.; Tiusanen, M.; Vesterinen, E.J.; Wirta, H. Honeybees' foraging choices for nectar and pollen revealed by DNA metabarcoding. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 14753. [\[CrossRef\]](#)
69. Zayed, A. Monoculture is good if you are a squash bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2023**, *120*, 10–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. McKinstry, M.; Prado-Irwin, S.R.; Adames, T.R.; Snow, J.W. Retained metabolic activity in honey bee collected pollen has implications for pollen digestion and effects on honey bee health. *Apidologie* **2020**, *51*, 212–225. [\[CrossRef\]](#)
71. McNally, J.B.; McCaughey, W.F.; Standifer, L.N.; Todd, F.E. Partition of Excreted Nitrogen From Honey Bees Fed Various Proteins. *J. Nutr.* **1965**, *85*, 113–116. [\[CrossRef\]](#)
72. Nation, J.L. *Insect Physiology and Biochemistry*; CRC Press, Cop: Boca Raton, FL, USA, 2002.
73. Li, X.; Zhou, Y.; Wu, K. Biological Characteristics and Energy Metabolism of Migrating Insects. *Metabolites* **2023**, *13*, 439. [\[CrossRef\]](#)
74. Crailsheim, K.; Leonhard, B. Amino acids in honeybee worker haemolymph. *Amino Acids* **1997**, *13*, 141–153. [\[CrossRef\]](#)
75. Ricigliano, V.A.; Fitz, W.; Copeland, D.C.; Mott, B.M.; Maes, P.; Floyd, A.S.; Dockstader, A.; Anderson, K.E. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2017**, *96*, e21406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Chang, H.; Ding, G.; Jia, G.; Feng, M.; Huang, J. Hemolymph Metabolism Analysis of Honey Bee. *Insects* **2023**, *14*, 37. [\[CrossRef\]](#)
77. Teulier, L.; Weber, J.M.; Crevier, J.; Darveau, C.A. Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *283*, 20160333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Wang, Y.; Ma, L.; Hang, X.; Yang, W.; Liu, F.; Wang, Y.; Ma, L.; Hang, X.; Yang, W.; Liu, F. Digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L.) To cite this version: HAL Id: Hal-01234760 Digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **2015**, *45*, 590–600. [\[CrossRef\]](#)
79. Strachecka, A.; Walerowicz, M. *Anatomia i Fizjologia Pszczoły Miodnej*; Kobiółka, T., Ed.; BEE & HONEY: Klecza Dolna, Poland, 2022; pp. 168–181.
80. Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* **2010**, *6*, 562–565. [\[CrossRef\]](#)
81. Dias, J.M.V.A.; Morais, M.M.; Franco, T.M.; Pereira, R.A.; Turcatto, A.P.; De Jong, D. Fermentation of a Pollen Substitute Diet with Beebread Microorganisms Increases Diet Consumption and Hemolymph Protein Levels of Honey Bees (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology* **2018**, *65*, 760–765. [\[CrossRef\]](#)
82. Daníhlík, J.; Škrabišová, M.; Lenobel, R.; Šebela, M.; Omar, E.; Petřivalský, M.; Crailsheim, K.; Brodschneider, R. Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in individual honey bees? *Insects* **2018**, *9*, 79. [\[CrossRef\]](#)
83. Saisavoey, T.; Sangtanoo, P.; Chanchao, C.; Reamtong, O.; Karnchanatat, A. Identification of novel anti-inflammatory peptides from bee pollen (*Apis mellifera*) hydrolysate in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *J. Apic. Res.* **2021**, *60*, 280–289. [\[CrossRef\]](#)
84. Dufour, C.; Fournier, V.; Giovenazzo, P. Diversity and nutritional value of pollen harvested by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies during lowbush blueberry and cranberry (Ericaceae) pollination. *Can. Entomol.* **2020**, *152*, 622–645. [\[CrossRef\]](#)

85. Gage, S.L.; Calle, S.; Jacobson, N.; Carroll, M.; DeGrandi-Hoffman, G. Pollen Alters Amino Acid Levels in the Honey Bee Brain and This Relationship Changes With Age and Parasitic Stress. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 231. [\[CrossRef\]](#)
86. Bursell, E. The Role of Proline in Energy Metabolism. In *Energy Metabolism in Insects*; Downer, R.G.H., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 1981; pp. 135–154. [\[CrossRef\]](#)
87. Mollaei, M.; Hoseini, S.A.; Karimi, M.; Hekmat, Z. Short communication. Impact of the amino acid proline on the cold hardiness of honey bee, *Apis mellifera* L. *Span. J. Agric. Res.* **2013**, *11*, 714–717. [\[CrossRef\]](#)
88. Huang, Z. Honey bee nutrition. *Am. Bee J.* **2010**, *150*, 773–776. [\[CrossRef\]](#)
89. Chen, W.; Wang, Y.; Zhang, W.; Liu, Z.; Xu, B.; Wang, H. Methionine as a methyl donor regulates caste differentiation in the European honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Sci.* **2021**, *28*, 746–756. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Ma, L.; Wang, Y.; Zhang, W.; Wang, H.; Liu, Z.; Xu, B. Alterations in protein and amino acid metabolism in honeybees (*Apis mellifera*) fed different L-leucine diets during the larval stage. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2016**, *19*, 769–774. [\[CrossRef\]](#)
91. Inouye, D.W.; Waller, G.D. Responses of Honey Bees (*Apis mellifera*) to Amino Acid Solutions Mimicking Floral Nectars. *Ecology* **2016**, *65*, 618–625. [\[CrossRef\]](#)
92. Ghosh, S.; Meyer-Rochow, V.B.; Jung, C. Honey bees and their brood: A potentially valuable resource of food, worthy of greater appreciation and scientific attention. *J. Ecol. Environ.* **2021**, *45*, 31. [\[CrossRef\]](#)
93. McMillan, L.E.; Miller, D.W.; Adamo, S.A. Eating when ill is risky: Immune defense impairs food detoxification in the caterpillar *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb173336. [\[CrossRef\]](#)
94. Micheu, S.; Crailsheim, K.; Leonhard, B. Importance of proline and other amino acids during honeybee flight (*Apis mellifera* carnica POLLMANN). *Amino Acids* **2000**, *18*, 157–175. [\[CrossRef\]](#)
95. Noor-ul-Ane, M.; Jung, C. Effect of non-essential amino acids (proline and glutamic acid) and sugar polyol (sorbitol) on brood of honey bees. *Front. Ecol. Evol.* **2022**, *10*, 1009670. [\[CrossRef\]](#)
96. Locatelli, F.; Bundrock, G.; Müller, U. Focal and temporal release of glutamate in the mushroom bodies improves olfactory memory in *Apis mellifera*. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11614–11618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Schmickl, T.; Crailsheim, K. Cannibalism and early capping: Strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *J. Comp. Physiol.-A Sens. Neural Behav. Physiol.* **2001**, *187*, 541–547. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Schmickl, T.; Crailsheim, K. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2002**, *51*, 415–425. [\[CrossRef\]](#)
99. Jachula, J.; Denisow, B.; Wrzesień, M.; Ziółkowska, E. The need for weeds: Man-made, non-cropped habitats complement crops and natural habitats in providing honey bees and bumble bees with pollen resources. *Sci. Total Environ.* **2022**, *840*, 156551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Wright, A.J.; Mommer, L.; Barry, K.; van Ruijven, J. Stress gradients and biodiversity: Monoculture vulnerability drives stronger biodiversity effects during drought years. *Ecology* **2021**, *102*, e03193. [\[CrossRef\]](#)
101. Bednarska, A.J.; Mikołajczyk, Ł.; Ziółkowska, E.; Kocjan, K.; Wnęk, A.; Mokkapat, J.S.; Teper, D.; Kaczyński, P.; Łozowicka, B.; Śliwińska, R.; et al. Effects of agricultural landscape structure, insecticide residues, and pollen diversity on the life-history traits of the red mason bee *Osmia bicornis*. *Sci. Total Environ.* **2022**, *809*, 151142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Khan, K.A.; Ghramh, H.A. Pollen source preferences and pollination efficacy of honey bee, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera) on *Brassica napus* crop. *J. King Saud Univ.-Sci.* **2021**, *33*, 101487. [\[CrossRef\]](#)
103. Evans, D.E.; Taylor, P.E.; Singh, M.B.; Knox, R.B. Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. *Plant Sci.* **1991**, *73*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
104. Salisbury, A.; Armitage, J.; Bostock, H.; Perry, J.; Tatchell, M.; Thompson, K. Enhancing gardens as habitats for flower-visiting aerial insects (pollinators): Should we plant native or exotic species? *J. Appl. Ecol.* **2015**, *52*, 1156–1164. [\[CrossRef\]](#)
105. Memmott, J.; Waser, N.M. Integration of alien plants into a native flower-pollinator visitation web. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2002**, *269*, 2395–2399. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Drossart, M.; Michez, D.; Vanderplanck, M. Invasive plants as potential food resource for native pollinators: A case study with two invasive species and a generalist bumble bee. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Denisow, B. *Pollen Production of Selected Ruderal Plant Species in the Lublin Area*; WUP Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego: Lublin, Poland, 2011; pp. 1–86.
108. Kabuce, N.; Environment, L.; Agency, M.; Priede, A.; Agency, N.C. NOBANIS—Invasive Alien Species Fact Sheet *Solidago canadensis*. 2012; pp. 1–10. Available online: http://proborshevik.ru/wp-content/uploads/2010/12/Kabuce,%20Priede_2010.pdf (accessed on 28 April 2024).
109. Moroń, D.; Marjańska, E.; Skórka, P.; Lenda, M.; Woyciechowski, M. Invader–pollinator paradox: Invasive goldenrods benefit from large size pollinators. *Divers. Distrib.* **2021**, *27*, 632–641. [\[CrossRef\]](#)
110. Lenda, M.; Skórka, P.; Kuszewska, K.; Moroń, D.; Bełcik, M.; Baczek Kwinta, R.; Janowiak, F.; Duncan, D.H.; Veski, P.A.; Possingham, H.P.; et al. Misinformation, internet honey trading and beekeepers drive a plant invasion. *Ecol. Lett.* **2021**, *24*, 165–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Haydak, M.H. Value of Foods Other Than Pollen in Nutrition of the Honeybee. *J. Econ. Entomol.* **1936**, *29*, 870–877. [\[CrossRef\]](#)
112. Kumari, I.; Kumar, R. Pollen substitute diet for *Apis mellifera*: Consumption and effects on colony parameters in sub-tropical himalaya. *Indian J. Agric. Res.* **2020**, *54*, 147–153. [\[CrossRef\]](#)

113. Al-Ghamdi, A.A.K.; Al-Khaibari, A.M.; Omar, M.O. Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honeybee workers. *Saudi J. Biol. Sci.* **2011**, *18*, 73–77. [[CrossRef](#)]
114. Darvishzadeh, A.; Nehzati, G.; Nowzari, J.; Hosseininaveh, V.; Nozari, J. Effect of proline as a nutrient on hypopharyngeal glands during development of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Arthropods* **2015**, *4*, 137–143.

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



OPEN The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers

Maciej Sylwester Bryś¹✉, Bernard Staniec² & Aneta Strachecka¹

Human activities associated with large-scale farms and the monocultures expose honey bees to one type of food. Moreover, there is an ongoing decline of plant species producing pollen and nectar in Europe. A poorly balanced diet affects a number of processes occurring in a bee's body. The fat body and hemolymph are the tissues that participate in all of them. Therefore, the aim of our study was to determine the effect of hazel, pine, rapeseed, buckwheat, phacelia and goldenrod pollen on the morphological parameters of fat body trophocytes, the diameters of cell nuclei in oenocytes and the concentrations of compounds involved in energy metabolism (glucose, glycogen, triglycerides and protein). In the cage tests, the bees were fed from the first day of life with sugar candy (control group) or candy with a 10% addition of one of the 6 pollen types. Hemolymph and fat body from various locations were collected from 1-, 7- and 14-day-old workers. Pollen produced by plant species such as hazel and pine increased glucose concentrations in the bee tissues, especially in the hemolymph. It can therefore be concluded that they are valuable sources of energy (in the form of simple carbohydrates) which are quickly used by bees. Pollen from plants blooming in the summer and autumn increased the concentrations of proteins, glycogen and triglycerides in the fat body, especially that from the third tergite. The accumulation of these compounds was associated with an increased the length and width of trophocytes as well as with enhanced metabolic activity, which was evidenced in the increasing diameter of oenocyte cell nuclei. It seems a balanced multi-pollen diet is more valuable for bees, but it is important to understand the effects of the particular pollen types in the context of a mono-diet. In the future, this will make it possible to produce mixtures that can ensure homeostasis in the apian body.

Keywords Nutrition, Diets, Biomarkers, Biochemical pathway, Cell metabolism, Honeybee

The causes of the decline in honey bee populations are to be sought in the disruption of immune mechanisms, which are weakened by pathogens, parasites and, above all, human errors, e.g. treating bee colonies with deleterious substances, adulterating beeswax with stearin and paraffin and environmental chemisation^{1–4}. In recent years, a serious problem for pollinating insects is the nutritional stress resulting from the lack of sufficient food and/or the lack of a balanced diet. This is the upshot of the expansion of intensive farming, crop acreage, monocultures and decreasing plant diversity (depending on the season and landscape composition)⁵. The nutritional quantity and quality of pollen and nectar can differ between plant species⁶. A poorly balanced diet and periods of starvation contribute to losses in bee colonies in Europe and around the world^{7,8}. Already in the second half of the twentieth century, supplements based on soy protein, yolk powder, and fish meal were being added to bee diets, but they failed to fully replace flower pollen^{9,10}. Mixed pollen is considered the most valuable for honey

¹Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland. ²Department of Zoology and Nature Protection, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland. ✉email: maciej.brys@up.lublin.pl

bees¹¹ due to the great diversity and composition of the nutrients it contains. Alaux et al.¹² identified an increased expression of several genes, relevant to oxidative stress prevention of, longevity and immune functions in bees that consumed pollen compared to those fed sugar syrup.

Pollen consumption depends not only on the age of bees and the tasks they undertake, but also on the size of the colony and the available plant sources of pollen and nectar within the flight range¹³. Pollen loads are the main source of not only amino acids, saturated and unsaturated fatty acids, vitamins, minerals but also carbohydrates¹¹. Nectar provides mainly simple carbohydrates⁵. Assuming a pollen load a strong bee colony needs about 50 kg of pollen per year¹⁴. In addition, 6–9-day-old nurses also require large amounts of pollen in order to activate the larva feeding mechanisms and also need a source of protein to produce the jelly to feed the larvae^{15,16}. As workers age, they mainly switch to food rich in simple carbohydrates, i.e. nectar, because they are no longer able to digest pollen grains. Pollen deficiency in bees results in the consumption of the glycogen stores accumulated in the trophocytes of the fat body. In such a case, it is necessary for the beekeeper to provide, for example, sugar candies with pollen, which will important nutrients to rebuild the reserves in the fat body¹⁷. Pollen loads are also a source of lipids stored in trophocytes in the form of triglycerides.

In spring, the first food for bees in Central and Eastern Europe is hazel pollen. Even though it is a wind-pollinated and non-nectariferous plant, bees make use of its potential¹⁸. Another such pollen is that of pine trees, well-known as a “natural micro-nutrient bank”, which contains the male spores of *Pinus massoniana* Lamb., *Pinus tabulaeformis* Carr. and other plants of the same genus. Rich in nutrients and bioactive compounds, it can provide the necessary support for the bee body's normal functioning and metabolic regulation. Moreover, it has strong anti-ageing, antioxidant and immunomodulatory properties¹⁹. In May and June, rapeseed blooms intensively. It is widely cultivated and in many cases constitutes the basic and quantitatively dominant food resource for honey bees²⁰. Rapeseed produces significant amounts of both pollen and nectar, which makes it a very attractive food source for honey bees²¹. The protein content in rapeseed pollen is approximately 27%²². Phacelia, which blooms in late June–early July, is a plant sown by beekeepers to supplement the bees' nutritional base. The great potential phacelia, well-known for its antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties, lies in the combined provision of nectar and pollen^{23,24}. Giovanetti et al.²⁵ found a 25% phacelia pollen protein content in fresh beebread. This highly nutritional pollen, reduces the bees' sensitivity to pesticides. In July, bees also benefit from buckwheat, which blooms for 3–4 weeks. Being a pseudocereal, buckwheat is ecologically undemanding and boasts a wealth of nutrients²⁶. Buckwheat pollen contains phenolic acids, including galloylated derivatives and procyanidin dimers, which are antioxidants²⁷. At the beginning of August, goldenrod begins to bloom and continues to do so for about 6 weeks. Individual flowers of *Solidago* sp. do not produce large amounts of nectar and pollen. However, the plants grow in large clusters, forming a mass flower display. The average pollen yield is 30.7 kg/ha²⁸.

An interesting phenomenon is the negative feedback effect associated with pollen collection. Honey bee workers make use of the plants available around the apiary. If one particular pollen accumulates to a high level, it inhibits foragers from collecting other pollen types²⁹. This is of high practical significance, because if the bees quickly fill the honey combs with just one type of pollen loads (e.g. rapeseed pollen), the appearance of new, more attractive pollen produced by different plants will soon not encourage the bees to fly en masse.

Enzymes produced in the head glands, the so-called glycoside hydrolases, help convert nectar into honey³⁰. The actual process of digestion of pollen grains begins only in the midgut, because proteins, lipids and some carbohydrates are broken down in this section of the digestive tract. Pollen consumption stimulates the secretion of proteases, which are analogues of mammalian trypsin and chymotrypsin^{31,32}. Proteolytic enzymes break down polypeptide chains. Deamination leads to the formation of alpha-keto acids which are transformed into glucose, the simplest sugar, or intermediate products for the formation of other compounds. A properly functioning midgut ensures the flow of nutrients to the hemolymph. This tissue distributes nutrients among the organs. In addition, it is an energy reserve for quick use of ingredients, for example during the flight, and participates in the defense against pathogens³³. The circulatory system being open, the circulating hemolymph washes the fat body. The honeybee's fat body is a very important tissue with regard to metabolic carbohydrates, proteins and lipids. In this tissue the process of glycogenesis occurs, i.e. the transformation of glucose into glycogen. This form is stored in the fat body as an energy reserve. On the other hand there are synthesis, transport, accumulation and release of proteins, lipids and carbohydrates take place.

The fat body consists of two main types of cells—trophocytes and oenocytes. Trophocytes in addition to the storage function, secrete and detoxify organic substances. Oenocytes have vacuoles containing drops and granules of lipids, proteins, and glycogen. In turn, the sizes of the nuclei of the oenocytes are indicative of the nuclear metabolic activities^{30,34}. The quantity and quality of nutrients stored in pollen grains will, to a greater or lesser extent, be incorporated into the cells of the fat body. Nutrients stored in the fat body in the form of glycogen and triglycerides are necessary to maintain homeostasis. Thanks to this, trophocytes and oenocytes will produce proteins, including immune proteins and hormones, and synthesize biological compounds.

Therefore, we hypothesized that spring, summer and autumn pollen differently affects the morphology and metabolism of the fat body and hemolymph. Pollen from plants such as rapeseed, buckwheat, phacelia and goldenrod has a greater impact on the metabolism of energy reserves in the form of glucose, triglycerides and glycogen, and also protein synthesis than anemophilous pollen due to its different nutritional composition. The aim of the research was to determine the influence of a mono-diet of pollen from specific plants (hazel, pine, rapeseed, buckwheat, phacelia, goldenrod) on the morphological parameters of the fat body and energy metabolism (glucose, glycogen, triglycerides and protein) in this tissue and in the hemolymph in *Apis mellifera* L.

Materials and methods
Pollen load collection, pollen analysis and preparation of sugar candy with different pollen loads

From May to September 2022 mixed bee pollen loads were collected using pollen traps located at hives of local beekeepers in the Lublin region. The areas from where the pollen was obtained are considered unpolluted and free from heavy metals and pesticides. Until classification, the pollen was stored at a temperature of 20 °C. Pollen loads were then manually color-sorted to obtain the dominant pollen in each sample. Granules of the same color were pooled. For pollen analysis, 3.5 g of bee pollen were collected and suspended in a 1:1 10 ml solution of distilled water with glycerin. The microscopic preparations were prepared from such suspensions/solutions according to the method of Filipiak et al. (2022)³⁵. The results of the botanical analysis of pollen samples of uniform colors are presented in Table 1.

The sugar candy prepared from 500 ml water and 2.3 kg of white granulated sugar, was divided into 7 parts. No pollen was added to the first part and this candy was fed to bees in the control group. Specific, previously micronized, pollen particles (according to Table 1) were then added to every other part at a concentration of 10% and the bees were fed with them *ad libidum* (6 groups). According to Altaye et al.³⁶, worker bees need 10 mg of protein and 90 mg of carbohydrates per 100 mg diets.

Obtaining 1-day-old bees and experimental cages

One-day-old bees were obtained from 10 colonies in an apiary that belongs to University of Life Sciences in Lublin (51° 22' N, 22° 63' E), Poland. The bees in the colonies were in good health. The queens were confined for 12 h in a queen-excluder comb-cage containing one empty comb to lay eggs. Twenty days later, after the queens had laid their eggs, the combs were transferred to an incubator, where the 1-day-old workers emerged. These workers were randomly placed in 105 wooden cages (100 bees per cage) and divided into seven groups (15 cages each). Additionally, 45 freshly emerged workers were collected for laboratory analyses.

All the cages with bees were kept in controlled conditions at 35 °C and 65% relative humidity. The control group was fed sugar candy only while the other groups were fed candy containing the addition of 10% of a specific pollen, such as hazel, pine, rapeseed, buckwheat, phacelia or goldenrod. Thus, 7 groups were formed, the feeding of which began on the first day of the workers' lives. Throughout the entire experimental period, diets and water were replaced every two days and dead individuals were removed from the cages. In each group, 7- and 14-day old workers were collected from the cages for laboratory analysis (2–4 bees per cage). This yielded the following database: 40–55 workers × 7 groups × 2 sampling + 45 1-day old workers.

Laboratory analyses

Hemolymph collection

Fresh hemolymph was individually taken from between the third and fourth tergite of living workers to a glass capillary (20 µl; 'end to end' type; without anticoagulant; Medlab Products, Raszyn, Poland) according to the Łoś and Strachecka's³⁷ method. Prior to hemolymph collection, each bee was punctured with a sterile needle in the abdomen. Hemolymph from one bee was collected into one sterile Eppendorf tube containing 200 µl of ice-cooled 0.6% NaCl and then immediately refrigerated at – 25 °C for further biochemical analyses.

Fat body analysis

Immediately after the hemolymph was collected, the fat bodies from the sternites and from the third, fourth, fifth, sixth, and seventh tergites were dissected under a Stereo Zoom Microscope in 0.6% *natrium chloratum*. Moreover, the fat bodies from these tergites and sternites were divided in half the first half was used to make a microscopic preparation and the second half (from the third and fifth tergites and sternites) was used in the biochemical analyses. The choice of these three locations for biochemical analyses resulted from Strachecka's et al.³⁴ previous research, which proved that the fat body from these three locations is the most metabolically active.

No	Pollen loads samples	Dominant pollen species	Frequency [%]	Other species
1	Hazel	<i>Corylus</i> sp.	98	<i>Prunus</i> sp.
2	Pine	<i>Pinus sylvestris</i> L.	98	<i>Taraxacum</i> sp. <i>Brassica napus</i>
3	Rapeseed	<i>Brassica napus</i> L.	92	<i>Juglans</i> sp. <i>Quercus</i> sp. <i>Carex</i> sp. <i>Pinus sylvestris</i> <i>Taraxacum</i> sp. <i>Prunus</i> sp.
4	Buckwheat	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	75	<i>Trifolium</i> sp. <i>Centaurea</i> sp. <i>Vicia</i> sp. Brassicaceae
5	Phacelia	<i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth	99	<i>Centaurea</i> sp.
6	Goldenrod	<i>Solidago</i> sp.	95	<i>Anthriscus</i> sp. <i>Fagopyrum esculentum</i> <i>Centaurea</i> sp.

Table 1. Frequency (%) of the most widely represented pollen species in the bee diets.

The fat bodies from the first half were placed on glass slides in 0.6% *natrium chloratum* (pro inj.) and covered with cover-glasses. The microscopic preparations were observed with Camera Olympus DP72 (Microscope Olympus BX61; magnification 40×) with a DIC attachment and the fat body cells were measured according to Strachecka et al.'s³⁴ method. This method enables (undistorted) visualization of living preparation according to Strachecka et al.³⁸. The following measurements made under the microscope are the maximum in 100 randomly selected cells:

- the length and width of the trophocytes for each segment,
- diameter of the oenocyte nuclei for all segments except tergite 3, because honey bee workers do not have oenocytes in this place or they are sporadic. We also confirmed these observations in our experiment. Measurements were made according to Strachecka et al.'s³⁴ method. Eight people were involved in the preparation and measurement of the length and width of trophocytes and oenocytes of the fat body.

The fat bodies from the second half were collected in sterile Eppendorf tubes, containing 25 µl of ice-cooled 0.6% NaCl. Next, the tissues were homogenised at 4 °C and centrifuged for 1 min at 3000 g. The supernatants were immediately refrigerated at −40 °C for further biochemical analyses.

Biochemical analysis

The following parameters were determined in the supernatants from the fat bodies and hemolymph solutions:

- glucose and triglyceride concentrations were determined using the Alpha Diagnostics reagent kit (Glucose DST G6620-100; G6620-500; Triglycerides DST T6630-100; T6630-500) according to the manufacturer's instructions;
- total protein concentrations were determined using the Lowry method modified by Schacterle and Pollack³⁹;
- glycogen concentrations were determined colorimetrically using the Glycogen Assay Kit (Sigma Aldrich, USA, No. MAK016).

Statistical analyses

The data were analyzed using Statistica formulas (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA), 13.3 (2017) version for Windows—StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. The normal distribution of data was analyzed using the Shapiro–Wilk test ($p > 0.05$). In order to compare the measurements under the microscope and the biochemical parameters among the workers in the seven groups, a mixed model two-way and three-way ANOVAs were used. If a difference among the groups was statistically significant, the ANOVA procedure was followed with multiple comparison testing using the post hoc Tukey HSD test. In the case of correlations determined with a distribution other than normal (oenocyte diameter), the Kruskal–Wallis test was used.

Results

The fat body in all the groups of bees fed with sugar candy with the addition of 10% bee pollen was better developed than in those fed with sugar candy only. Regardless of the pollen intake, the bees' fat body cells had greater energy reserves in the form glucose, glycogen, triglycerides and protein than those of the bees in the control group. The values of these biochemical parameters were usually higher in bees fed with candy + pollen. Increased metabolic activity is associated with larger trophocyte sizes and oenocyte nucleus diameters in each fat body segment.

Length of trophocytes

Bees fed sugar candy with the pollen addition tended to have longer trophocytes than those fed candy only; exceptions were some trophocytes in bees fed with candy and hazel (in 7-day-old workers—in the third and fourth tergites) and pine pollen (in 7- and 14-day-old workers—in the third to seventh tergites) (Table 2). When comparing 7-day-old bees from different groups, those fed with rapeseed pollen candy had the longest trophocytes. Overall, the 14-day-old bees fed with candy to which rapeseed, phacelia and goldenrod pollen was added had the longest trophocytes.

Width of trophocytes

The trophocyte widths increased with age in all the groups (Table 3). The trends in these widths were similar to those in the trophocyte lengths. The trophocyte widths in each segment in the bees fed pine pollen were similar to those in the cells of the bees in the control sample. In other groups, the bees fed with sugar candy plus added pollen tended to have wider trophocytes than those fed candy only.

Diameters of oenocyte nuclei

The diameters of oenocyte nuclei in the groups of bees fed with pollen were comparable, but statistically significantly larger than those of the nuclei in the group of bees fed with sugar candy only (Table 4). On day 7, the smallest diameter was recorded in tergites 4 and 6 of the bees fed with 10% goldenrod pollen, while the highest values were recorded in tergites 5 and 7 for rapeseed pollen. On day 14, the oenocytes of bees fed the phacelia pollen had the largest diameters in all segments compared to the other groups of bees.

					Pollen added to sugar candy											
Day of life	Localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		P hacelia		Goldenrod	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	Fat body	Sternite	30.69	3.03												
		Tergite 3	50.20	5.47												
		Tergite 4	45.86	7.27												
		Tergite 5	46.02	8.87												
		Tergite 6	41.32	13.62												
		Tergite 7	48.82	10.36												
7	Fat body	Sternite	39.26	2.55	52.17	3.57	40.12	10.84	52.02	8.21	92.36	5.54	48.70	10.29	44.09	8.71
		Tergite 3	57.82	5.47	44.31	3.57	43.19	7.12	82.46	7.58	55.10	4.47	66.46	5.62	41.77	10.05
		Tergite 4	56.92	7.27	48.68	8.24	50.00	5.13	97.05	14.19	72.25	9.65	65.35	8.02	50.35	15.09
		Tergite 5	52.16	8.87	59.72	3.95	40.58	4.78	106.27	18.13	73.21	4.48	56.71	6.15	54.19	8.82
		Tergite 6	50.68	13.62	48.27	4.65	37.87	4.95	117.21	15.07	47.99	9.63	67.82	9.31	56.94	12.29
		Tergite 7	56.65	10.36	69.01	8.24	44.90	3.86	49.41	11.30	69.86	7.84	65.31	10.99	85.19	12.77
14	Fat body	Sternite	39.43	2.74	80.98	6.63	50.53	6.54	83.85	13.11	90.26	6.61	162.00	4.69	97.29	14.11
		Tergite 3	57.53	5.40	69.86	5.42	37.79	7.71	109.30	14.54	75.25	7.71	137.37	5.11	142.01	11.43
		Tergite 4	55.15	7.34	125.29	5.51	53.70	3.21	152.63	19.52	79.59	9.60	110.82	10.05	130.12	8.64
		Tergite 5	54.38	8.76	84.24	4.47	47.10	3.74	80.41	6.34	71.59	10.12	115.37	15.06	113.12	15.69
		Tergite 6	50.23	13.18	83.90	3.32	39.18	7.41	101.30	10.99	75.72	11.09	154.20	8.82	133.64	11.51
		Tergite 7	52.69	10.18	82.65	9.52	47.63	8.84	86.73	14.87	54.93	8.26	134.81	12.29	131.13	9.47
Three-Way Anova	Group $F_{(6,706)} = 576.51; p = 0.05$															
	Localization $F_{(3,706)} = 248.09; p = 0.049$															
	Age $F_{(1,674)} = 16,724.0; p = 0.00$															
	Group * age $F_{(6,674)} = 779.68; p = 0.05$															
	Group * localization tissue $F_{(18,706)} = 42.527; p = 0.00$															
	Age * localization tissue $F_{(3,674)} = 1235.5; p = 0.00$															
	Group * localization tissue * age $F_{(18,674)} = 234.90; p = 0.01$															

Table 2. Length of trophocytes (μm) in the fat body from different locations in the 1-, 7- and 14-day-old workers ($n = 40\text{--}55$ bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with various pollen additions.

Glucose concentrations

Glucose concentrations were always higher in the workers which consumed pollen (candy + 10% pollen) compared to those fed sugar candy only (Table 5). The smallest increase in glucose concentrations was caused by pollen from spring-pollinating flowers, i.e. hazel and pine, while the highest increases were observed in the case of buckwheat and phacelia. Glucose concentrations increased in all the tissues (hemolymph and fat body from three locations) along with the age of the workers, regardless of the food they consumed. The lowest values, within a specific group of workers, were observed in the hemolymph, and the highest usually in the fat body in the third tergite.

Triglyceride concentrations

The addition of pollen to the sugar candy diet increased the concentrations of triglycerides in all the tissues (Table 6). Both sternite and tergite 3 stored the largest amounts of triglycerides, regardless of the age and the study group. Buckwheat and rapeseed pollen produced the greatest increase in triglyceride concentrations compared to the control sample in the two locations above, especially on day 14.

Protein concentrations

Protein concentrations increased with the age of the workers in most groups (with the exception of the 7-day-old workers fed with hazel and pine pollen) (Table 7). The addition of pollen from summer and autumn plants to the diet increased protein concentrations in all the tissues to the greatest extent compared to the control sample. Particularly high values of protein concentrations were observed in the fat body from the fifth tergite in the worker bees fed with buckwheat pollen.

			Pollen added to sugar candy													
Day of life	Localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	Fat body	Sternite	28.95	4.71												
		Tergite 3	37.90	5.66												
		Tergite 4	39.26	5.80												
		Tergite 5	38.23	11.58												
		Tergite 6	33.25	6.68												
		Tergite 7	37.07	4.37												
7	Fat body	Sternite	33.02	4.21	65.09	8.51	38.90	8.14	44.07	8.59	29.00	11.58	33.79	8.63	40.99	4.40
		Tergite 3	40.15	4.71	40.14	4.57	34.87	11.02	52.71	7.99	40.90	13.36	50.04	5.41	32.93	7.26
		Tergite 4	42.49	5.66	42.96	5.56	37.03	10.54	55.06	18.13	39.02	11.28	51.43	8.21	40.28	11.03
		Tergite 5	40.94	5.80	59.36	9.65	42.44	9.58	81.91	9.44	35.56	14.57	43.34	5.33	48.00	8.17
		Tergite 6	35.95	11.58	39.18	4.25	37.52	7.51	83.97	9.77	42.60	10.09	47.79	8.50	47.11	8.09
		Tergite 7	39.68	6.63	47.22	6.54	38.51	4.85	44.96	8.89	26.10	5.54	57.54	12.99	83.94	11.27
14	Fat body	Sternite	34.56	4.24	49.90	4.7	43.94	8.63	84.23	8.41	56.30	9.91	100.00	8.63	78.62	3.50
		Tergite 3	42.00	4.73	54.01	7.81	34.81	7.69	65.92	6.32	70.00	10.74	86.53	12.82	98.73	10.14
		Tergite 4	46.16	5.56	76.48	6.03	65.66	6.31	96.01	4.58	71.54	12.54	100.02	12.25	112.19	12.25
		Tergite 5	42.69	5.74	43.10	7.81	51.60	4.85	48.74	11.58	69.00	14.85	88.22	11.14	106.58	13.13
		Tergite 6	36.84	11.48	58.95	4.15	64.59	8.69	86.24	8.98	50.14	8.51	113.00	12.24	139.47	13.60
		Tergite 7	41.67	6.57	46.79	7.65	47.85	12.27	65.00	14.93	54.25	11.02	114.08	11.84	116.00	14.41
Three-Way Anova	Group		$F_{(6,706)} = 576.51; p = 0.00$													
	Localization		$F_{(3,706)} = 248.09; p = 0.05$													
	Age		$F_{(1,674)} = 16,724.0; p = 0.00$													
	Group * age		$F_{(6,674)} = 779.68; p = 0.00$													
	Group * localization tissue		$F_{(18,706)} = 42.527; p = 0.00$													
	Age * localization tissue		$F_{(3,674)} = 1235.5; p = 0.00$													
	Group * localization tissue * age		$F_{(18,674)} = 234.90; p = 0.01$													

Table 3. Width of the trophocytes (μm) in the fat body from different locations in the 1-, 7- and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with added pollen.

Glycogen concentrations

The glycogen concentrations in the bees fed with sugar candy only (control group) and with candy plus hazel and pine pollen were similar in all the tissues (Table 8). However, the other bee groups (fed with rapeseed, phacelia, buckwheat and goldenrod pollen) were characterized by higher glycogen concentrations. As in the case of the triglyceride concentrations, the fat body in the sternites and tergites 3 contained higher glycogen concentrations than in all the tissue locations.

Discussion

The honey bee exhibits floral fidelity, which consists in visiting mainly one plant species, which is why the pollen load composition is almost uniform⁴⁰. Consequently, we used pollen traps to obtain pollen collected by the bee workers^{15,16}. Other scientists have applied a similar methodology using pollen loads from traps in feeding experiments^{5,41,42}. It is possible to obtain fresh pollen grains directly from plants, but manual collection is difficult due to the fact that pollen is available in small amounts. This method is effective only for plants with large flowers producing a lot of pollen. The method of combing corn pollen is used to study the total protein content in the hemolymph of insects⁴³. However, in the case of the pollen produced by the plants in our experiment, this is mostly impossible because, unlike wind-pollinated plants, rapeseed, phacelia, goldenrod, and buckwheat produce only small amounts of pollen. In order to use the same methodology, hazel and pine pollen were also collected from traps installed in front of the hives. Forager bees mix pollen with saliva, nectar and honey. The pollen grains brought to the hive also contain sugar and enzymes of animal origin. The amount of nectar and honey added to form pollen grains varies, but can be up to 50% of dry matter¹⁶.

Pollen provides bee colonies mainly with protein. This parameter, together with the amino acid composition, is the basic measure of pollen quality¹⁶. De Grandi Hoffman et al.⁴⁴ found that spring and autumn pollen mixtures had similar total protein concentrations. Plant pollen from these seasons differs in its amino acid

			Pollen added to sugar candy													
Day of life	Localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	Fat body	Sternite	10.80	0.31												
		Tergite 4	6.32	0.34												
		Tergite 5	8.58	0.24												
		Tergite 6	7.41	0.54												
		Tergite 7	8.40	0.66												
7	Fat body	Sternite	11.59	0.61	16.52	0.32	15.70	0.34	15.91	0.22	14.14	0.68	12.09	0.29	13.92	0.37
		Tergite 4	9.85	0.95	16.12	0.41	11.21	0.41	14.46	0.37	14.79	0.54	9.85	0.33	9.82	0.39
		Tergite 5	10.90	0.84	14.08	0.54	14.37	0.29	17.53	0.31	16.15	0.41	10.90	0.31	10.37	0.54
		Tergite 6	9.05	0.41	15.58	0.41	14.78	0.38	15.45	0.42	16.16	0.29	10.05	0.39	9.69	0.57
		Tergite 7	9.99	0.85	17.32	0.29	16.07	0.41	17.34	0.33	17.28	0.61	10.99	0.41	12.66	0.54
14	Fat body	Sternite	12.49	0.81	15.13	0.47	14.67	0.65	15.09	0.33	14.62	0.68	19.63	0.48	14.04	0.87
		Tergite 4	10.58	0.65	13.78	0.40	13.76	0.41	15.63	0.28	16.61	0.54	18.00	0.51	15.54	0.54
		Tergite 5	11.46	0.32	15.77	0.33	13.56	0.33	16.95	0.33	15.66	0.41	16.00	0.41	15.85	0.41
		Tergite 6	9.56	0.22	15.05	0.32	14.36	0.70	15.27	0.31	16.06	0.29	18.25	0.49	9.33	0.46
		Tergite 7	11.02	0.34	17.20	0.30	14.41	0.65	17.11	0.32	14.63	0.33	17.99	0.37	17.96	0.39
Three-Way Anova	Group		$F_{(6,5537)} = 386.36; p = 0.00$													
	Localization		$F_{(4,5537)} = 19.677; p = 0.00$													
	Age		$F_{(2,557)} = 495.63; p = 0.01$													
	Group * age		$F_{(5,5498)} = 1362.7; p = 0.05$													
	Group * localization tissue		$F_{(24,5537)} = 40.417; p = 0.05$													
	Age * localization tissue		$F_{(8,5557)} = 15.200; p = 0.05$													
	Group * localization tissue * age		$F_{(23,5498)} = 124.46; p = 0.05$													

Table 4. Diameters of the oenocyte nuclei (μm) in the fat body from different locations in the 1-, 7- and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with added pollen.

composition. Spring pollen, e.g. from *Brassica*, contains relatively high concentrations of tryptophan, valine, glutamine and serine. These amino acids are components of apisimin, an alpha-helical peptide that promotes the formation of royal jelly⁴⁵. Autumn plants produce pollen rich in proline and hydroxyproline, amino acids that support thermoregulation related to muscle vibration that enables the bees to survive the winter. In our experiment, we noticed that the bees fed with sugar candy supplemented with hazel, pine, rapeseed, phacelia, buckwheat and goldenrod pollen had higher protein concentrations in the fat body and hemolymph compared to those fed with candy only (control group). This is due to the fact that the plants have different nutrient contents⁴⁶. Chang et al.⁴¹ and Breygina et al.⁴⁷ showed that rapeseed, pear and apricot pollen play an important role in amino acid metabolic pathways and their concentrations decrease with the age of bees kept in cages. These plants are grown in China on large areas and are classified as monocultures. In turn, we showed that the protein concentrations increased with the age of the workers fed rape, buckwheat, phacelia and goldenrod pollen. These proteins in question are immune proteins, enzyme proteins, structural proteins, etc. According to Paes-de-Oliveira et al.⁴⁸ one of such proteins is vitellogenin produced by trophocytes. Presumably, the larger these cells are, the higher their protein concentrations. The relationship between the length and width of trophocytes and the protein concentrations was evident in our experiment. These values differ depending on the location of the fat body. This confirms (cf. Strachecka et al.³⁴) that the segmental nature of the apian fat body is not only structural, but primarily pertains to the functions of this tissue and the biochemical and physiological processes that take place in it. Moreover, Strachecka et al.^{8,34} suggest that the compounds that are rapidly metabolized for energy (e.g. glucose and triglycerides) are held in the fat body in the tergites (as opposed to the sternites), especially the third tergite. This tergite is in close proximity to the heart, ostia and body cavities, and the compounds are immediately transferred to the appropriate tissues by the circulatory system. Our study also confirmed that the fat body in the third and fifth tergites is metabolically the most active in the production of glucose, glycogen and triglycerides. However, we demonstrated that not only 1-day-old bees, as described by Strachecka et al.³⁴, but also older workers (7- and 14-day-old) were usually characterized by the highest values of these parameters in the third tergite fat body. The highest concentrations of these compounds are noted in queens (compared to workers) because, unlike honey bee workers, this caste has oenocytes in the third tergite. In turn, we have shown that not only the reproductive status but also the diet can influence the biochemical parameters in the fat body

				Pollen added to sugar candy												
Day of life	Tissues/localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1	Hemolymph		1.53	0.02												
	Fat body	Sternite	1.85	0.02												
		Tergite 3	2.45	0.03												
		Tergite 5	2.26	0.03												
7	Hemolymph		2.09	0.15	3.57	0.10	2.75	0.07	2.52	0.03	3.21	0.19	2.47	0.18	2.92	0.13
	Fat body	Sternite	2.42	0.00	2.64	0.03	2.60	0.06	3.17	0.19	8.48	0.19	9.54	0.38	7.47	0.26
		Tergite 3	2.47	0.13	5.67	0.05	2.75	0.05	2.92	0.17	3.64	0.21	2.95	0.15	3.85	0.19
		Tergite 5	2.94	0.04	3.0	0.04	2.98	0.10	2.99	0.07	5.84	0.58	6.42	0.29	3.64	0.64
14	Hemolymph		3.38	0.09	3.89	0.04	3.78	0.06	4.6	0.04	5.03	0.12	4.65	0.20	4.61	0.05
	Fat body	Sternite	3.46	0.04	2.64	0.04	3.78	0.04	4.77	0.02	14.7	0.38	10.44	0.10	8.15	0.05
		Tergite 3	4.55	0.05	5.47	0.21	5.07	0.10	8.06	0.02	10.54	0.35	12.13	0.06	9.53	0.04
		Tergite 5	3.84	0.02	3.94	0.04	3.87	0.01	6.15	0.02	13.39	0.18	11.06	0.03	8.89	0.09
Three-Way Anova	Group $F_{(6,706)} = 576.51; p = 0.00$															
	Localization $F_{(3,706)} = 248.09; p = 0.00$															
	Age $F_{(1,674)} = 16,724.0; p = 0.00$															
	Group * age $F_{(6,674)} = 779.68; p = 0.02$															
	Group * localization tissue $F_{(18,706)} = 42.527; p = 0.00$															
	Age * localization tissue $F_{(3,674)} = 1235.5; p = 0.00$															
	Group * localization tissue * age $F_{(18,674)} = 234.90; p = 0.00$															

Table 5. Glucose concentrations (mmol/ml) in the hemolymph and fat body from different locations in the 1-, 7- and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with various pollen additions.

from various locations. Very high glucose concentrations were observed in the 14-day-old worker bees fed with sugar candy with the addition of buckwheat and phacelia pollen. The flowering period of these plants is at the end of the summer, when the generation of winter workers appears in a colony. The demand then increases not only for protein (mainly for the preimaginal stages and for “building” the imago fat body) but also for other compounds, including carbohydrates. They are used to obtain energy (e.g. in muscles; to fly and to warm the larvae), for the synthesis of chitin (a major cuticle component) and in other processes^{49,50}. Both buckwheat and phacelia provide bees not only with pollen but also with nectar, which is an aqueous solution of sugars, mainly fructose and glucose. Carbohydrates may be derived from the enzymatic digestion of the cytoplasm of pollen grains (both by bee enzymes and enzymes released by microorganisms in the bee’s digestive tract; Fig. 1). Carbohydrates from the digestive tract reach the fat body through the hemolymph, where they are incorporated into metabolic processes⁵¹. Glucose present in the hemolymph is used primarily in the bees’ metabolic processes. This may explain why its concentration in our study was the lowest in the hemolymph (regardless of the group). In the natural environment, glucose is used up in metabolic processes faster than in the cage environment. Glucose is stored in the form of glycogen in the trophocytes that form the fat body^{30,34,52,53}. It is worth noting that hazel pollen, which is one of the first sources of pollen in spring, led to the highest increase in glucose concentration in the hemolymph compared to the control group. Even though the plant is wind-pollinated, it is very often visited by bees as it provides the first pollen available in spring⁵⁴. Hence, spring pollen boosts the bee colony by providing carbohydrate energy, while autumn pollen does so by enabling compounds to be stored in the fat body. Glycogen is referred to as “metabolic security” because it ensures the survival of insects during periods of starvation⁵⁵. The glycogen concentration in the fat body depended on the availability of pollen in the bees’ diet. The highest concentrations were observed in the bees fed with buckwheat, phacelia and goldenrod pollen. These values were always higher in the fat body, especially from the third tergite, compared to the hemolymph. As mentioned above, these types of pollen come from plants that bloom in late summer and in autumn. Therefore, they must play a special role in shaping the fat body in long-lived winter bees whose tasks include the regulation of in-hive temperatures during winter and the initiation of brood rearing in early spring⁵⁶. The concentrations of glycogen and other compounds (e.g. triglycerides) undoubtedly translate into the fat body mass, which is the highest in winter bees. The values of the biochemical parameters of the hemolymph and fat body were the lowest in the bees fed pine pollen in comparison with the other experimental groups. Pollen produced by the pine has a low sugar – 13.92% and protein concentration—13.45%, which it is not preferred by bees^{57,58}. Despite the low content of carbohydrates and proteins, this pollen is rich in numerous polyphenolic compounds, e.g. coumaric, methoxycinnamic, and dihydroxydecanoic acids⁵⁹ and its small addition to the diet of insects, especially in

				Pollen added to sugar candy												
Day of life	Tissues/localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
1	Hemolymph		0.23	0.01												
	Fat body	Sternite	0.31	0.00												
		Tergite 3	0.32	0.01												
		Tergite 5	0.38	0.00												
7	Hemolymph		1.06	0.19	1.01	0.07	1.42	0.11	1.42	0.03	0.96	0.11	1.63	0.13	0.87	0.16
	Fat body	Sternite	1.36	0.09	1.16	0.02	1.24	0.02	1.06	0.07	1.76	0.02	1.65	0.04	1.8	0.02
		Tergite 3	0.94	0.15	1.21	0.03	1.14	0.02	1.46	0.05	1.51	0.06	1.64	0.04	1.49	0.05
		Tergite 5	1.06	0.07	1.14	0.02	1.21	0.05	1.46	0.02	1.42	0.06	1.53	0.04	1.53	0.05
14	Hemolymph		1.55	0.05	1.66	0.05	1.67	0.02	2.18	0.02	2.29	0.07	2.05	0.03	1.84	0.01
	Fat body	Sternite	2.09	0.03	2.2	0.04	2.16	0.03	2.94	0.13	4.24	0.17	2.55	0.03	2.36	0.03
		Tergite 3	2.47	0.05	3.17	0.09	2.94	0.06	4.54	0.17	5.51	0.26	4.65	0.22	4.14	0.26
		Tergite 5	1.85	0.02	2.03	0.09	1.9	0.03	2.56	0.04	3.37	0.21	2.37	0.03	2.06	0.02
Three-Way Anova	Group $F_{(6,706)} = 126.89; p = 0.00$															
	Localization $F_{(3,706)} = 240.82; p = 0.00$															
	Age $F_{(1,674)} = 7986.0; p = 0.00$															
	Group * age $F_{(6,674)} = 176.43; p = 0.00$															
	Group * localization tissue $F_{(18,706)} = 12.590; p = 0.01$															
	Age * localization tissue $F_{(3,674)} = 613.03; p = 0.01$															
	Group * localization tissue * age $F_{(18,674)} = 25.613; p = 0.01$															

Table 6. Triglyceride concentrations (mmol/ml) in the hemolymph and fat body from different location in the 1-, 7- and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with added pollen.

monocultures, results in a diversification of nutrients. The phenomenon of dietary diversification can be observed in the pollen mixture from which rapeseed was isolated. In addition to rapeseed, honey bee workers collect pollen from anemophilous plants in order to diversify their diet. After manual sorting, there was still 8% of other pollen grains present, including pine pollen, which we were unable to manually separate due to similar colors or contamination. That is why weeds and other plants growing on floral strips are so important, and bush communities significantly increase the biodiversity in the agricultural landscape^{60,61}. The available literature shows that despite large resources of cultivated pollen plants, honey bees willingly visit non-cultivated plants⁶². Scientists report a lack of research that will allow to assess the impact of individual pollen plants on the physiology of insects, including their immunity¹³. Most studies to date have focused on the impact of pollen diets on the development of the hypopharyngeal glands (HPG)⁴². There are relatively few studies on their impact on immunocompetence¹². Therefore, our research is in line with the latest trends in the field of bee nutriphysiology. Moreover, the variability of protein content in pollen grains depends on the season⁶³ and on the number and species of plants present in the area of the apiary. Reducing dietary protein results in higher worker mortality¹⁶. It has been pointed out that in order to help diversify the bees' diet with protein, it is important to know the changes in its concentration throughout the season⁶³. Our research partially explains this phenomenon, as we have recorded changes in the protein contents and other biochemical parameters in bee tissues depending on the type of pollen. To understand the effect of different pollen types, we selected for research those plants that might be the most important for bees in particular seasons/months and provide a significant proportion of their diet. Although homogenous pollen has a stimulating effect, a pollen combination should produce better results. Frias et al.⁵ suggest that the extension of life is positively related to the amount of consumed protein contained in pollen, and negatively correlated with the low survival of adult workers whose diet contained pollen from the Asteraceae family. In our research, we also used the pollen of *Solidago* sp., a member of this family. In both biochemical and morphometric studies, goldenrod pollen had a similar impact to summer and autumn pollen (e.g. buckwheat and phacelia). Canadian goldenrod, *Solidago canadensis* L., is classified as an invasive species whose encroachment into new geographical regions has accelerated, thereby decreasing native biodiversity⁶⁴. However, it turns out this plant is highly attractive to honey bees⁶⁵. Goldenrod flowers at the very end of the beekeeping season, making up 80% of the bees' diet as compared to other plants⁶⁴. During this period, honey bee workers feed only on goldenrod. In this way, the environment itself provides a mono-diet. In the case of rapeseed, buckwheat, phacelia, soybean and corn, people create large-scale cultures themselves.

Current research shows that bees prefer plants that produce pollen with a higher protein content. Moreover, this preference depends on the ratio of macronutrients contained, not on a single ingredient⁹. Phacelia

Day of life	Tissues/localization tissues		Pollen added to sugar candy													
			Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
1	Hemolymph		0.24	0.01												
	Fat body	Sternite	0.45	0.01												
		Tergite 3	0.45	0.01												
		Tergite 5	0.40	0.01												
7	Hemolymph		0.27	0.00	0.34	0.00	0.32	0.02	0.47	0.00	0.52	0.04	0.46	0.00	0.42	0.00
	Fat body	Sternite	0.42	0.00	0.44	0.00	0.44	0.01	0.85	0.00	0.96	0.01	0.60	0.00	0.51	0.00
		Tergite 3	0.41	0.00	0.40	0.00	0.41	0.00	0.42	0.00	0.51	0.01	0.42	0.00	0.46	0.00
		Tergite 5	0.53	0.00	0.60	0.00	0.57	0.02	0.61	0.00	0.75	0.00	0.57	0.00	0.54	0.00
14	Hemolymph		0.54	0.00	0.58	0.00	0.59	0.02	0.64	0.00	0.65	0.02	0.73	0.00	0.68	0.00
	Fat body	Sternite	1.06	0.00	1.39	0.00	1.18	0.02	1.55	0.00	1.99	0.02	1.98	0.00	1.85	0.00
		Tergite 3	0.85	0.01	0.93	0.02	0.89	0.02	1.07	0.00	1.93	0.02	1.75	0.01	1.36	0.00
		Tergite 5	0.53	0.00	0.94	0.02	0.88	0.02	0.95	0.00	3.12	0.02	1.21	0.01	0.96	0.00
Three-Way Anova	Group		$F_{(6,706)} = 126.89; p = 0.05$													
	Localization		$F_{(3,706)} = 240.82; p = 0.05$													
	Age		$F_{(1,674)} = 7986.0; p = 0.05$													
	Group * age		$F_{(6,674)} = 176.43; p = 0.05$													
	Group * localization tissue		$F_{(18,706)} = 12.590; p = 0.05$													
	Age * localization tissue		$F_{(3,674)} = 613.03; p = 0.05$													
	Group * localization tissue * age		$F_{(18,674)} = 25.613; p = 0.05$													

Table 7. Protein concentrations (mg/ml) in the hemolymph and fat body from different locations in the 1, 7 and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with added pollen.

is a valuable plant for bees from a physiological perspective. When fed with sugar candy supplemented with phacelia pollen in the cage experiments, our bees had higher concentrations of glucose, glycogen, triglycerides and proteins than the worker bees fed with sugar candy only. A standard, balanced diet for bees in commercial beekeeping continues to be sought to meet the nutritional needs of bees around the world⁶⁶. We propose the use of phacelia as a rapidly-growing plant and a tested “superfood” for pollinating insects.

The nutritional value of pollen lies not only in the proteins but also the fats. Pollen is also the principal dietary source of sterols, triglycerides and phospholipids⁶⁷. Fatty acids are stored in the form of triglycerides as energy reserves for use in the fat body. Reserves are used during winter and in times of famine. This means that fats are gradually released into the hemolymph, which is why their concentration increases with age. It turns out that stress, e.g. in the form of pathogens or an E-field, reduces the level of triglycerides in the hemolymph⁶⁸. Bee colony supplements are administered to increase resistance to pathogens and other environmental factors. Natural supplements counteract the negative effects caused by stressors and, for example, increase the concentration of triglycerides⁶⁹. In our case, the addition of pollen resulted in an increase in the concentrations of triglycerides in all the tissues/tissue locations, especially in the fat body of the third tergite. These results correspond to the results of Strachecka et al.⁸. They showed that the greatest amounts of triglycerides were stored in the third tergite. As compared with spring pollen, summer and autumn pollen caused the greatest increase in triglyceride concentrations, especially in the third tergite. This means that insect-pollinated plants produce pollen that is richer in floral rewards than that of wind-pollinated plants⁷⁰.

Nutrients including proteins, lipids and glycogen are stored in trophocytes. There are differences in the cellular structure of trophocytes and oenocytes of the fat body between castes and segments in worker bees³⁴. The pollen diet will also be a factor determining the length and width of cells in the fat body. The greatest influence on the growth of trophocytes was exerted by the addition of summer and autumn pollen. In our case, the increase in trophocyte dimensions was associated with a higher concentration of triglycerides and glycogen. The pine turned out to be the most physiologically neutral pollen (neither harmful nor helpful) with respect to trophocyte dimension. Oenocytes in worker bees are present in all segments except tergite 3³⁴. All the pollen diets resulted in an increase in the oenocyte diameter. Hence, the pollen diet affects the metabolic activities of oenocyte nuclei. The diameter of oenocytes is not normally distributed. According to the Kruskal–Wallis test, the diameter of oenocytes between the groups is statistically significant (see supplementary material S1).

				Pollen added to sugar candy												
Day of life	Tissues/localization tissues		Control		Hazel		Pine		Rape		Buckwheat		Phacelia		Goldenrod	
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
1	Hemolymph		0.02	0.00												
	Fat body	Sternite	0.05	0.00												
		Tergite 3	0.06	0.00												
		Tergite 5	0.02	0.00												
7	Hemolymph		0.02	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.15	0.02	0.06	0.00	0.15	0.02	0.14	0.01
	Fat body	Sternite	0.08	0.00	0.11	0.00	0.09	0.00	0.15	0.02	0.24	0.00	0.16	0.02	0.17	0.01
		Tergite 3	0.09	0.00	0.09	0.00	0.1	0.00	0.23	0.02	0.32	0.00	0.24	0.02	0.25	0.02
		Tergite 5	0.03	0.00	0.05	0.00	0.04	0.00	0.08	0.02	0.08	0.00	0.10	0.02	0.09	0.02
14	Hemolymph		0.03	0.00	0.05	0.00	0.06	0.00	0.20	0.02	0.09	0.00	0.23	0.02	0.09	0.01
	Fat body	Sternite	0.10	0.00	0.22	0.00	0.16	0.00	0.16	0.02	0.25	0.00	0.19	0.02	0.22	0.01
		Tergite 3	0.15	0.00	0.14	0.00	0.16	0.00	0.27	0.02	0.34	0.00	0.32	0.02	0.33	0.02
		Tergite 5	0.04	0.00	0.07	0.00	0.05	0.00	0.09	0.02	0.14	0.00	0.10	0.02	0.15	0.02
Three-Way Anova	Group $F_{(6,571)} = 190.24; p = 0.04$															
	Localization $F_{(3,571)} = 402.62; p = 0.01$															
	Age $F_{(1,539)} = 247.15; p = 0.00$															
	Group * age $F_{(6,539)} = 1.093; p = 0.251$															
	Group * localization tissue $F_{(18,571)} = 24.398; p = 0.05$															
	Age * localization tissue $F_{(3,539)} = 18.854; p = 0.05$															
	Group * localization tissue * age $F_{(18,539)} = 7.8998; p = 0.05$															

Table 8. Glycogen concentrations (µg/µl) in the hemolymph and fat body from different locations in the 1, 7 and 14-day-old workers (n = 40–55 bees per group) fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with added pollen. Explanations: value for SE: Control: 0.00226–0.00362; Hazel: 0.00162–0.00198, Pine: 0.00214–0.00288; Buckwheat: 0.00246–0.00222.

Conclusions

We need to know how particular types of plant pollen that dominate the honey bee’s diet influence the physiological parameters of the fat body. This research will enable the development of mixtures from nectar-producing and pollen-producing plants that will meet the nutritional needs of bees.

Further research is needed on the pollen diet of workers in relation to its impact on biochemical parameters, including immunity and ageing-related processes. Healthier bees correspond with higher pollination efficiency and greater yields of honey and other bee products from a colony. This is obviously financially profitable to the beekeeper. Our pioneering research has shown how particular types of pollen from plants blooming from early spring to late autumn influence the morphology of fat body cells in different locations and the concentrations of compounds important for energy metabolism in the hemolymph and fat body of worker bees. Pollen from early spring plants provides bees only with carbohydrates which are quickly used up by their bodies during the rearing of the first generation of summer bees and during the work performed for the colony at that time. However, pollen from plants blooming in late summer and early autumn increases the concentrations of proteins, glycogen and triglycerides in the fat body, especially in the third tergite. Thus, large amounts of compounds are accumulated, which causes the trophocytes to increase in size. It is important to bear in mind that a multi-pollen diet is always more beneficial for the apian body than a mono-diet. However, in order to understand the mechanisms that occur in bees under the influence of pollen, it is important to know the interactions of the particular pollen types.

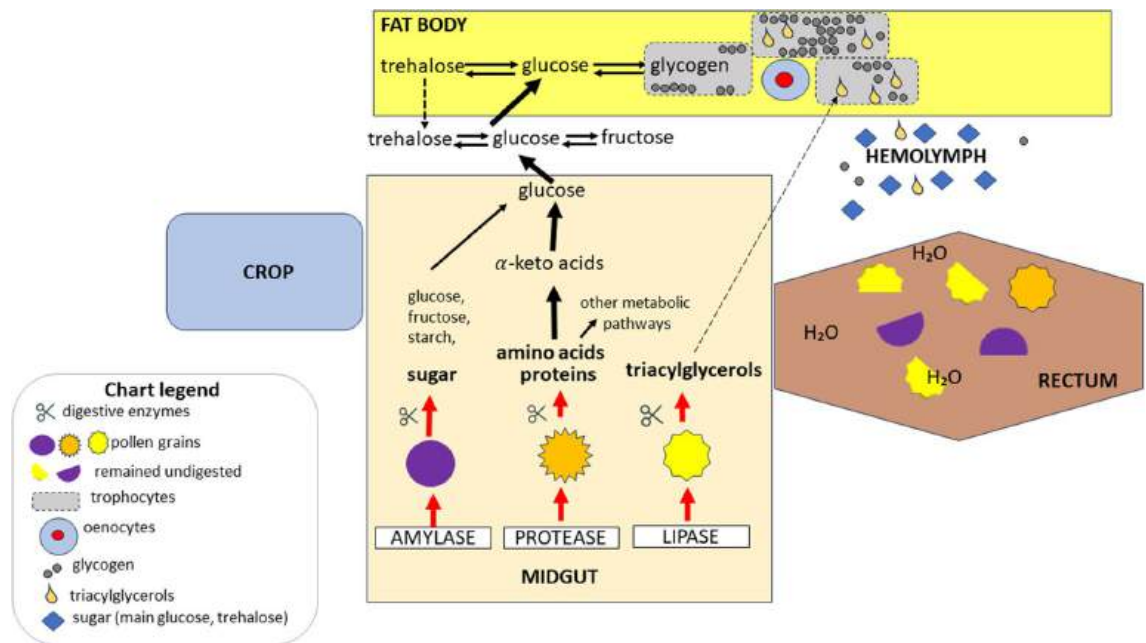


Figure 1. Pollen digestion: the main metabolic pathway, including the function of the fat body (orig.)

Data availability

Raw data is available from the corresponding author. Anyone can access the raw data after sending a query. Moreover, the raw data is stored in the repository of the University of Life Sciences in Lublin (link URL: https://repozytorium.up.lublin.pl/pl/search_results/5420?q%5Bq%5D=&q%5Bsort_attributes%5D%5Bfield_name%5D=created_at&q%5Bsort_attributes%5D%5Border%5D=desc). Handle <https://hdl.handle.net/20.500.12838/5420>

Received: 3 February 2024; Accepted: 11 June 2024

Published online: 02 July 2024

References

- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. & Higes, M. Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* **44**, 1–15 (2013).
- Ostiguy, N. *et al.* Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study. *Insects* **10**, 1–34 (2019).
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N. & Neov, B. veterinary sciences factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Vet. Sci.* **7**, 1–17 (2020).
- Chęć, M. *et al.* Effect of stearin and paraffin adulteration of beeswax on brood survival. *Apidologie* **52**, 432–446 (2021).
- Frias, B. E. D., Barbosa, C. D. & Lourenço, A. P. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): Impact on adult health. *Apidologie* **47**, 15–25 (2016).
- Pamminger, T., Becker, R., Himmelreich, S., Schneider, C. W. & Bergtold, M. The nectar report: Quantitative review of nectar sugar concentrations offered by bee visited flowers in agricultural and non-agricultural landscapes. *PeerJ* **7**, e6329 (2019).
- Watkins de Jong, E., DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Graham, H. & Ziolkowski, N. Effects of diets containing different concentrations of pollen and pollen substitutes on physiology, Nosema burden, and virus titers in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **50**, 845–858 (2019).
- Strachecka, A. *et al.* Humoral and cellular defense mechanisms in rebel workers of *Apis mellifera*. *Biology* **10**, 1–12 (2021).
- Ghosh, S., Jeon, H. & Jung, C. Foraging behaviour and preference of pollen sources by honey bee (*Apis mellifera*) relative to protein contents. *J. Ecol. Environ.* **44**, 1–7 (2020).
- Al-Ghamdi, A. A. K., Al-Khaibari, A. M. & Omar, M. O. Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honeybee workers. *Saudi J. Biol. Sci.* **18**, 73–77 (2011).
- Di Pasquale, G. *et al.* Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* **6**, 562–565 (2010).
- Ara Begum, H. *et al.* Impact of different pollen protein diets on the physiology of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) workers from essential plant sources. *J. King Saud Univ. Sci.* **35**, 102511 (2023).
- Somerville, D. C. Nutritional value of bee collected pollens. *Rural Ind. Res. Dev. Corp.* 1–166 (2001).
- Corona, M., Branchiccela, B., Madella, S., Chen, Y. & Evans, J. Decoupling the effects of nutrition, age and behavioral caste on honey bee physiology and immunity. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/667931> (2019).
- Wright, G. A., Nicolson, S. W. & Shafir, S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 327–344 (2018).
- Corby-Harris, V., Snyder, L. & Meador, C. Fat body lipolysis connects poor nutrition to hypopharyngeal gland degradation in *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* **116**, 1–9 (2019).
- Stawiarz, E. Pollen of non-nectariferous plants in the microscopic image of honeys of some communes of the Świętokrzyskie Voivodeship. *Acta Agrobot.* **62**, 53–58 (2012).
- Li, J. *et al.* Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics. *J. Exp. Biol.* **222**, 1–9 (2019).
- Bednarska, A. J. *et al.* Effects of agricultural landscape structure, insecticide residues, and pollen diversity on the life-history traits of the red mason bee *Osmia bicornis*. *Sci. Total Environ.* **809**, 151142 (2022).

21. Khan, K. A. & Ghranh, H. A. Pollen source preferences and pollination efficacy of honey bee, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera) on *Brassica napus* crop. *J. King Saud Univ. Sci.* **33**, 101487 (2021).
22. Wang, Y. *et al.* Digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L.) to cite this version: HAL Id: hal-01234760 digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L.). (2015). <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0278-1>.
23. Castle, D., Alkassab, A. T., Bischoff, G., Steffan-Dewenter, I. & Pistorius, J. High nutritional status promotes vitality of honey bees and mitigates negative effects of pesticides. *Sci. Total Environ.* **806**, 151280 (2022).
24. Vergun, O. M., Grygorieva, O., National, M. M. G., Garden, B. & Brindza, J. Nutritional composition of *Phacelia tanacetifolia* Benth. bee pollen and inflorescences. **2023**, 95–104 (2023).
25. Giovanetti, M., Malabusini, S., Zugno, M. & Lupi, D. Influence of flowering characteristics, local environment, and daily temperature on the visits paid by *Apis mellifera* to the exotic crop *Phacelia tanacetifolia*. *Sustainability* **14**, 10186 (2022).
26. Liu, Y., Shang, X., Sheng, P. & Song, G. Pollen dispersal in traditional processing of buckwheat and its application in agricultural archaeology. *Sci. China Earth Sci.* **61**, 1792–1803 (2018).
27. Nešović, M. *et al.* Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen. *R. Soc. Open Sci.* **7**, 201576 (2020).
28. Jachula, J., Denisow, B. & Strzałkowska-Abamek, M. Does an invader have a bright side? Floral reward in two *Solidago* species. *J. Apic. Res.* **59**, 599–608 (2020).
29. Tsuruda, J. M., Chakrabarti, P. & Sagili, R. R. Honey bee nutrition. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **37**, 505–519 (2021).
30. Skowronek, P., Wójcik, Ł. & Strachecka, A. Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects* **12**, 547 (2021).
31. Bryś, M. S., Skowronek, P. & Strachecka, A. Pollen diet—properties and impact on a bee colony. *Insects* **12**, 798 (2021).
32. Moritz, B. & Crailsheim, K. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **33**, 923–931 (1987).
33. Mohandes, E. Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged worker. **3**, 213–220 (2010).
34. Strachecka, A. *et al.* Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
35. Filipiak, Z. M., Denisow, B., Stawiarz, E. & Filipiak, M. Unravelling the dependence of a wild bee on floral diversity and composition using a feeding experiment. *Sci. Total Environ.* **820**, 153326 (2022).
36. Altaye, S. Z., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M. & Nicolson, S. W. Convergence of carbohydrate-biased intake targets in caged worker honeybees fed different protein sources. *J. Exp. Biol.* **213**, 3311–3318 (2010).
37. Łoś, A. & Strachecka, A. Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect “blood” and body surface elution. *Sensors* **18**, 1494 (2018).
38. Strachecka, A. *et al.* Insights into the biochemical defence and methylation of the solitary bee *Osmia rufa* L.: A foundation for examining eusociality development. *PLoS One* **12**, 1–23 (2017).
39. Schacterle G. & Pollack R. L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of proteins in biologic material. *Anal. Biochem.* **51**, 654–655 (1973).
40. Madras-Majewska, B. & Ściegosz, J. Wpływ środowiska na pszczoły i pszczoł na środowisko. 26–27 (2012).
41. Chang, H., Ding, G., Jia, G., Feng, M. & Huang, J. Hemolymph metabolism analysis of honey bee. *Insects* **14**, 37 (2023).
42. Omar, E. *et al.* Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **48**, 425–436 (2017).
43. Omar, E. M., Darwish, H. Y. A., Othman, A. A., El-Seedi, H. R. & Al Naggar, Y. Crushing corn pollen grains increased diet digestibility and hemolymph protein content while decreasing honey bee consumption. *Apidologie* **53**, 52 (2022).
44. DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Insect Physiol.* **109**, 114–124 (2018).
45. Bíliková, K. *et al.* Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: Purification and molecular characterization. *FEBS Lett.* **528**, 125–129 (2002).
46. Roulston, T. H., Cane, J. H. & Buchmann, S. L. What governs protein content of pollen: Pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecol. Monogr.* **70**, 617–643 (2000).
47. Breygina, M., Voronkov, A., Ivanova, T. & Babushkina, K. Fatty acid composition of dry and germinating pollen of gymnosperm and angiosperm plants. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 9717 (2023).
48. Paes-de-Oliveira, V. T., Poiani, S. B., Antonialli, W. F. & da Cruz-Landim, C. Morphometric changes on honeybee *Apis mellifera* L. workers fat body cells after juvenile hormone topic application at emergence. *Micron* **39**, 426–430 (2008).
49. Kunieda, T. *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: Insights from the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* **15**, 563–576 (2006).
50. Teulier, L., Weber, J. M., Crevier, J. & Darveau, C. A. Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **283**, 20160333 (2016).
51. Zheng, H. *et al.* Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 25909–25916 (2019).
52. Brejcha, M. *et al.* Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. *J. Insect Physiol.* **146**, 104504 (2023).
53. Chobotow, J. & Strachecka, A. Morphologia i funkcje ciała tłuszczowego owadów z uwzględnieniem pszczoły miodnej *Apis mellifera* L. *Med. Weter.* **69**, 712–715 (2013).
54. Weryszko-Chmielewska, E. & Piotrowska, K. Evaluation of the abundance of hazel (*Corylus* spp.) pollen based on the patterns of the pollen seasons in Lublin in the period 2001–2010. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **11**, 69–78 (2012).
55. Bretscher, H. & O'Connor, M. B. The role of muscle in insect energy homeostasis. *Front. Physiol.* **11**, 1–10 (2020).
56. Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A. & Cappai, M. G. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livest. Sci.* **235**, 104011 (2020).
57. Hassan, H. M. M. Chemical composition and nutritional value of palm pollen grains. *Glob. J. Biotechnol. Biochem.* **6**, 1–7 (2011).
58. Feas, X., Vazquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A. & Iglesias, A. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules* **17**, 8359–8377 (2012).
59. Olennikov, D. N., Shishmarev, V. M. & Shiretorova, V. G. Alkyl Cinnamates from Pollen of *Pinus sylvestris*. *Chem. Nat. Compd.* **59**, 207–211 (2023).
60. Denisow, B. & Wrzesień, M. The anthropogenic refuge areas for bee flora in agricultural landscape. *Acta Agrobot.* **60**, 147–157 (2007).
61. Jachula, J., Denisow, B., Wrzesień, M. & Ziółkowska, E. The need for weeds: Man-made, non-cropped habitats complement crops and natural habitats in providing honey bees and bumble bees with pollen resources. *Sci. Total Environ.* **840**, 156551 (2022).
62. Bezerra da Silva Santos, K. C., Frost, E., Samnegård, U., Saunders, M. E. & Rader, R. Pollen collection by honey bee hives in almond orchards indicate diverse diets. *Basic Appl. Ecol.* **64**, 68–78 (2022).
63. Kninlan, G. *et al.* Honey bee foraged pollen reveals temporal changes in pollen protein content and changes in forager choice for abundant versus high protein flowers. *Agric. Ecosyst. Environ.* **322**, 107645 (2021).
64. Lenda, M. *et al.* Misinformation, internet honey trading and beekeepers drive a plant invasion. *Ecol. Lett.* **24**, 165–169 (2021).

65. Moroń, D., Marjańska, E., Skórka, P., Lenda, M. & Woyciechowski, M. Invader–pollinator paradox: Invasive goldenrods benefit from large size pollinators. *Divers. Distrib.* **27**, 632–641 (2021).
66. Paray, B. A. *et al.* Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 1167–1176 (2021).
67. Furse, S., Koch, H., Wright, G. A. & Stevenson, P. C. Sterol and lipid metabolism in bees. *Metabolomics* **19**, 1–19 (2023).
68. Migdał, P., Murawska, A., Bienkowski, P., Strachecka, A. & Roman, A. Effect of E-field at frequency 50 Hz on protein, glucose, and triglycerides concentration in honeybee hemolymph. *Eur. Zool. J.* **88**, 1170–1176 (2021).
69. Skowronek, P., Wójcik, Ł. & Strachecka, A. CBD supplementation has a positive effect on the activity of the proteolytic system and biochemical markers of honey bees (*Apis mellifera*) in the Apiary. *Animals* **12**, 2313 (2022).
70. Saunders, M. E. Insect pollinators collect pollen from wind-pollinated plants: implications for pollination ecology and sustainable agriculture. *Insect Conserv. Divers.* **11**, 13–31 (2018).

Acknowledgements

We would like to thank PhD Łukasz Wójcik for the training in fat body preparation methods completed in 2021. In addition, we would like to thank the five people (engineering and technical employees) involved in this research who helped prepare the fat body and measure the cells.

Author contributions

M.S.B: Idea, Methodology, Dissected the tissues, Performs laboratory analysis, Writing-first draft preparation, B.S: Assistance in microscopic measurements of tissues, A.S: Idea, Methodology, Review, And ending, Supervision.

Funding

This study was funded by the National Science Centre (NCN) of Poland; PRELUDIUM Grant No. 2022/45/N/NZ9/01333 and research within the Doctoral School at the University of Life Sciences in Lublin, No. SD/286/176/2022 and SD/72/NB/2023.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64598-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.S.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



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/>.

© The Author(s) 2024

Article

Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Due to Pollen Monodiets

Maciej Sylwester Bryś ^{1,*} , Krzysztof Olszewski ² , Maciej Bartoń ³  and Aneta Strachecka ^{1,*} 

¹ Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland

² Subdepartment 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

³ Department of Animal Food Technology, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, 20-950 Lublin, Poland; maciej.barton@up.lublin.pl

* Correspondence: maciej.brys@up.lublin.pl (M.S.B.); aneta.strachecka@up.lublin.pl (A.S.)

Abstract: The increasing prevalence of monocultures has reduced floral diversity, diminishing pollen diet variety for bees. This study examines the impact of monofloral pollen diets (hazel, rapeseed, pine, buckwheat, *Phacelia*, goldenrod) on the antioxidant enzyme activities in the fat body from tergite 3, tergite 5, sternite, and hemolymph of honey bees. We show that pollen from plants such as rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod (rich in phenolic compounds and flavonoids) increases the activities of SOD, CAT, GST, and GPx in the fat body and hemolymph compared to the control group. Although it is commonly known that a monodiet is one of the stress factors for bees, the increase in the activities of these enzymes in the hemolymph and fat body of workers fed with pollen candy compared to those fed only sugar candy has a positive (although inconclusive) effect. These activities in the hemolymph and fat body of bees fed with pollen from anemophilous plants are usually lower compared to those in bees fed with candy containing 10% pollen from rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, or goldenrod. Further research is needed to fully understand the complex interactions among monofloral pollen diets, antioxidant enzyme activities, and the overall physiology of honey bees.

Keywords: antioxidant system; diets; nutrition; immunity; honey bee



Academic Editor: Alessandra Napolitano

Received: 24 November 2024

Revised: 18 December 2024

Accepted: 7 January 2025

Published: 9 January 2025

Citation: Bryś, M.S.; Olszewski, K.; Bartoń, M.; Strachecka, A. Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Due to Pollen Monodiets. *Antioxidants* **2025**, *14*, 69. <https://doi.org/10.3390/antiox14010069>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The honey bee diet consists of nectar and pollen. Simple sugars present in nectar are utilized by worker bees as a primary energy source, for example for flight and thermoregulation, while pollen provides essential nutrients, such as proteins, fats, and enzymes [1,2]. Access to pollen produced by various plant species positively influences physiological parameters such as worker lifespan, the size of hypopharyngeal glands, and gene expression levels and modulates immune competence, as well as conditioning the energy reserves stored in the fat body [2–5]. Pollen also contains antioxidant compounds, the concentrations of which vary depending on the plant of origin. Antioxidant compounds found in pollen are synthesized as secondary metabolites [6]. These compounds, known as free radical scavengers, include phenolic acids and flavonoids [7]. In bee pollen, the most common forms of flavonoids are quercetin, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanins, catechins, and isocatechins [8]. Depending on the botanical origin, the composition of phenolic acids present in bee pollen also varies [6]. In the context of humans, regular

consumption of bee pollen is of great significance for the prevention of metabolic diseases as well as cardiovascular and neurodegenerative disorders, all of which are closely related to oxidative damage [7,9,10].

In Central Europe, spring plants such as hazel, willow, rapeseed, and blackthorn play a crucial role in the development of bee colonies. In addition to their energetic properties, early spring pollens contain antioxidants. Strong antioxidant properties are characteristic of the pollen of *Brassica napus* and *Prunus mume* [11]. It turns out that monofloral pollen, primarily from *Salix* sp., is characterized by a higher total content of phenolic compounds (TPC) compared to other monoflorals, such as *Cistus* sp., *Taraxacum* sp., Rosaceae, Apiaceae, and even by higher concentrations than multifloral pollen [7,12]. In Poland and throughout Europe, the pollen of summer and early autumn plants, such as buckwheat, *Phacelia*, and goldenrod, is crucial and determines the good wintering of bees. The chemical composition, including protein, lipid, and antioxidant profiles, of the selected bee pollen samples is summarized in Table 1. The chemical composition of pollen is specific to each plant species, while the content of polyphenols may differ between flower pollen and nectar [13–16]. *Phacelia* pollen has a well-balanced biochemical composition, with an exceptionally high concentration of crude protein (27.44%) and is a good source of phenolics, flavonoids, and other antioxidants [14]. Asteroideae pollen, such as *Solidago* sp., contains 37 different polyphenols, with flavonols and flavonoid glycosides predominating, both of which act as strong free radical scavengers [17]. No information has been found regarding the antioxidant properties of goldenrod pollen, but the total content of polyphenols in samples of goldenrod honey ranges from 1.19 to 6.16% and that of flavonoids from 0.53 to 2.21% [18]. Pine pollen exhibits antioxidant properties attributed to the presence of flavonoids and phenolic acids. These compounds contribute to the scavenging activity of the DPPH radical and hydrogen peroxide [19,20]. Bee pollen not only offers a rich source of nutrients, but also exhibits antioxidant properties, likely attributable to its high content of polyphenols and flavonoids. These compounds are thought to modulate the activity of antioxidant enzymes in the hemolymph and fat body of bees, thereby contributing to their resistance. Unfortunately, it happens that bees collect pollen loads contaminated with pesticides. The antioxidant properties of pollen are weakened or lost due to the presence of pesticides. The active substances found in bee pollen impair bee metabolism or can lead to death [21,22].

In recent times, there has been a significant interest in bee pollen as a “superfood” for humans and other animals due to its nutritional and therapeutic properties. According to a literature review, scientists determine the physicochemical and biological properties of pollen depending on its botanical and geographical origin [23–25]. Multifloral pollen loads differ in terms of physicochemical, functional, and sensory properties due to seasonal and regional changes, while the properties of monofloral pollens with a specific botanical origin are fairly consistent [24]. It is generally accepted that the properties of pollen change depending on storage (time, temperature, etc.) due to the lactic acid fermentation process, which increases the availability of nutrients found in the cytoplasm of pollen grains [26]. This hypothesis was contradicted by Carroll et al. [27], who proved that bees prefer fresh pollen. Worker bees fed with pollen stored for 1, 7, and 10 days did not show differences in selected physiological parameters, suggesting that the nutritional value and digestibility of the pollen did not change over time [27].

There is a strong link between the immune system of the honey bee and the quality of pollen food [3,28]. High-quality pollen provides amino acids necessary for the synthesis of immune peptides. The antioxidant system is one of the immune mechanisms [29–31]. ROS are generated primarily in mitochondria, which are, among others, present in the fat body of honey bees [32]. Increased production of reactive oxygen species (ROS) in the fat body causes damage to cellular components, the inactivation of enzymes and

transport proteins, lipid peroxidation, inflammation, premature aging, etc. [30,33]. Stress factors can increase ROS production. Internal stressors include, for example, age, disease state, parasites [31,34–38], while external (environmental) factors comprise pesticides, landscape changes, monoculture, exposure to electromagnetic fields, as well as the type of beekeeping management and beekeepers' mistakes such as adulteration of wax with stearin or paraffin [39–42]. The antioxidants produced by the organism protect it against harmful ROS. In bees, antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) have been identified. However, thioredoxin reductase (TrxR) and thioredoxin peroxidase (TPX) exhibit a similar activity in bees to these antioxidants [43,44]. We hypothesize that (1) different types of pollen affect the activities of antioxidant enzymes in the fat body and hemolymph in different ways, and that (2) pollen produced by insect-pollinated plants has a greater impact on increasing the activities of antioxidant enzymes than pollen from wind-pollinated plants. Finally, we want to find out whether (3) monodiets can disrupt the activities of the antioxidant enzymes of the fat body and hemolymph and be harmful to worker honey bees. The aim of the study is to determine the effect of pollens from individual plants (hazel, rapeseed, pine, buckwheat, *Phacelia*, goldenrod) on antioxidant parameters (SOD, CAT, TAC, GPx) in the fat body and hemolymph.

Table 1. Comparison of total protein, fatty acids, and phenolic and flavonoid compound content of bee pollen samples.

Taxon	Total Protein Content [%]	Fatty Acid Composition	Phenolic and Flavonoid Compounds	Literature
<i>Corylus</i> sp.		No literature data available		
<i>Brassica napus</i>	20	TS: 47.6 g/100 g TP: 36.7 g/100 g Fat: 6.56 g/100 g	TFC: 2.9–4.9 FRAP: 8.3–9.3 DPPH: 12.8–13.5	[13,14,23]
<i>Pinus</i> sp.	10.84	TS: 13.6 mg/g TP: 13.2 mg/g Fat: 7.3 g/100 g	TFC: 2–6 mg/g TPC: 1.9–3.5 mg/kg	[19]
<i>Phacelia</i> sp.	27.44	Fat: 5.35%	TPC: 27.5 mgGAE/g TFC: 3.58 mgQE/g FRAP: 8.16 mgAAE/g DPPH: 10.39 mgTE/g	[13,14]
<i>Fagopyrum</i> sp.	11.4–14.3	TS: 37.2 g/100 g TP: 21.6 g/100 g Fat: 5.15 g/100 g	TFC: 0.24 ppm,	[16,23]
<i>Solidago</i> sp.	>20	No literature data available		

Total saturated fatty acids (TS); total polyunsaturated fatty acids (TP); total phenolic content (TPC); total flavonoid content (TFC); antioxidant capacity-FRAP, antioxidant capacity-DPPH.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of Pollen Loads, Palynological Analyses, and Preparation of Pollen Monodiets

The selection of monofloral pollen diets was dictated by the common occurrence of plant pollen in a temperate climate. Fresh pollen was collected using pollen traps mounted in front of hives belonging to beekeepers from the Lubelskie and Podkarpackie provinces (Poland). The pollen was manually sorted by color to obtain the dominant pollen from a specific plant in each sample [46]. To confirm the botanical origin, microscopic preparations were made and analyzed using the methods described by Filipiak et al. [47]. Microscopic pollen preparations were then used to confirm the identity of the pollen

through morphological features. Samples were examined using a microscope MBL 800 at a 40×15 magnification. At least 300 pollen grains were counted per slide, with two replicate counts for each slide. Pollen assignment was performed to the most accurate taxon (species, genus). Pollen load samples were obtained from wind-pollinated plants, i.e., hazel (*Corylus* sp.) and pine (*Pinus sylvestris* L.), and insect-pollinated plants, i.e., rapeseed (*Brassica napus* L.), *Phacelia* (*Phacelia tanacetifolia* Benth), buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), and goldenrod (*Solidago* sp.). The percentage of the dominant pollen in the sample is presented in Figure 1.

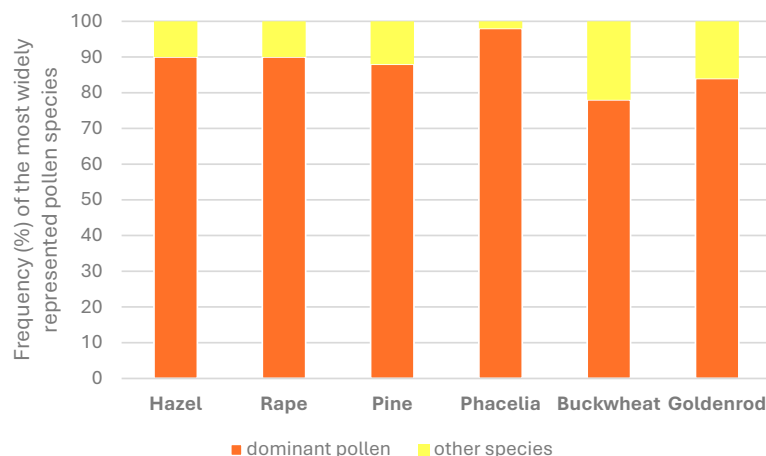


Figure 1. Pollen frequency in the examined pollen loads.

The sorted pollen was frozen at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the preparation of sugar candy with the respective pollen types. Commercial sugar candy (Apifonda, Łysoń, Poland) was divided into seven equal parts. The first part did not contain any pollen supplement (bees from the control group were fed with it). To the remaining parts of sugar candy, one of the six types of pollen, previously micronized using an electric mill, was added at a concentration of 10% (Figure 2). The addition of 10% pollen in this experiment was valid economically, confirmed by its effectiveness [4], and was also based on the theoretical protein requirement of bees at an approximate ratio of 10% protein and 90% carbohydrates according to Altaye [48]. The manually mixed candy batches were frozen at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and gradually thawed before feeding the bees.

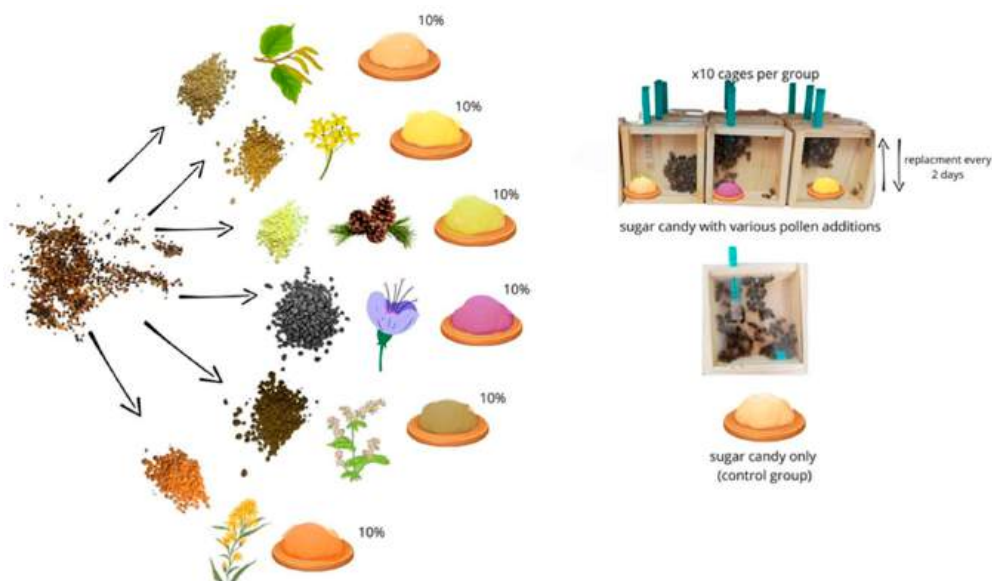


Figure 2. Sugar candy preparation and serving scheme for various pollen additions.

2.2. Analyses of Active Substance Residues in Pollen Loads

The pollen samples were analyzed for pesticide residues. The initial sample preparation was based on the QuEChERS method by Anastassiades et al. [49]. A 2 g portion of pollen was weighed and homogenized. The prepared pollen was subjected to salting out and solid–liquid extraction using acetonitrile [50]. For pesticide detection, liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) (Agilent 6470 Triple Quad) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) (Agilent 7000 Triple Quad) analyses were performed according to the methodology described by Kaila [50], with a limit of quantification (LOQ) of 0.01 mg kg^{−1}. To detect polar pesticides, 2 g of monofloral pollen was homogenized and 10 mL of pure water and 10 mL of cold methanol with 1% formic acid were added. For analysis, 100 µL of standards (depending on the type) or deuterated pesticide analogs were used. The sample was then shaken for 5 min and centrifuged for 5 min. A total of 200 µL of the supernatant was collected and 800 µL of mobile phase A for the chromatograph was added for the analysis of polar pesticides. The mixture was mixed using a vortex. A cellulose filter was applied for filtration according to the QuPPe method. The samples were analyzed using liquid chromatography with mass spectrometry detection (Ultivo Triple Quad). The results are presented in Table 2.

Table 2. Concentrations of active substances detected in pollen loads, LQ < 0.01 mg kg^{−1}.

No.	Pollen Load Samples	Active Substance	Mean ± SD [mg/kg]
1.	Hazel	Anthraquinone	0.053 ± 0.027
		Acetamiprid	0.025 ± 0.013
2.	Rape	Azoxystrobin	0.15 ± 0.07
		Thiminamethoxam	0.009 ± 0.004
3.	Pine	<LOQ	
4.	<i>Phacelia</i>	<LOQ	
5.	Buckwheat	<LOQ	
6.	Goldenrod	<LOQ	

Limit of quantification (LOQ) of 0.01 mg kg^{−1}.

2.3. Obtaining One-Day-Old Bees and the Experiment

Queen bees from three hives originating from an apiary belonging to the University of Life Sciences in Lublin (51°22' N, 22°63' E), Poland, were placed in an isolator on a single frame to obtain eggs and then larvae of a similar age. After 24 h, the queen was released, and the frame with the brood was left in the hive. After 20 days from egg laying, the frame with the brood was removed from the hive and placed in an incubator (35 °C) until the workers emerged. Then, one-day-old workers from the three hives were mixed to ensure uniformity and placed in 70 sterile wooden cages measuring 12 × 12 × 4 cm with a glass window. The experiment was conducted under controlled conditions with a constant temperature of 32 °C and humidity of 65%. The cages were randomly divided into seven groups (10 cages per group). Each cage contained 40 worker bees. At the beginning of the experiment, one-day-old bees were collected for biochemical analyses. The control group received only sugar candy, while the remaining groups received sugar candy and a 10% addition of one of the specific pollens such as hazel, rapeseed, pine, *Phacelia*, buckwheat, or goldenrod. The pollen diets were introduced from the first day of life and were provided *ad libitum* throughout the experiment. Apart from supplying sugar candy with pollen, water was changed every two days and dead individuals were removed from the cages. At the age of 7 and 14 days, living worker bees were collected from the cages for laboratory

analyses (one bee per cage, $n = 10$ bees per group). This resulted in the following dataset: 10 1-day-old workers + 10 worker bees $\times$ 7 groups $\times$ 2 samplings.

2.4. Laboratory Analyses

2.4.1. Obtaining Biological Material for Research

Hemolymph and fat body were used as materials for biochemical analyses [4]. The method of collecting hemolymph from the venous sinus in the bee's abdomen was validated by Łoś and Strachecka [51]. After collecting hemolymph from each bee individually, it was placed in a separate Eppendorf tube containing 200 μ L of 0.6% NaCl. The collected samples were immediately frozen at -25 °C for further analysis. After collecting the hemolymph, the bees were frozen. Subsequently, the individuals were thawed gradually and the fat body from the third and fifth tergites and the sternite was prepared according to the methodology described by Bryś et al. [4]. The choice of these three locations for biochemical analyses was based on previous studies by Strachecka et al. [52] which demonstrated that the fat body from these locations is, metabolically, the most active. Next, the tissues were manually homogenized and centrifuged at 4 °C for 1 min at $3000\times g$. The supernatants were frozen at -25 °C for further biochemical analyses.

2.4.2. Biochemical Analyses

The following parameters were determined in hemolymph solutions and fat body supernatants:

- Superoxide dismutase (SOD) activity according to the method described in the commercial kit SOD Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany, no. 19160-1KT-F;
- Glutathione S-transferase (GST) activity according to the method described in the commercial kit Glutathione S-transferase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany, no. MAK 435-1KT;
- Glutathione peroxidase (GPx) activity according to the method described in the commercial kit Glutathione Peroxidase Assay Kit, Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany, no. MAK437-1KT;
- Catalase (CAT) activity according to the method described in the commercial kit Catalase Assay Kit, Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, USA, Item: 707002;
- Total antioxidant capacity (TAC) according to the method described in the commercial kit Antioxidant Assay Kit, Cayman Chemical Company, East Ellsworth Road Ann Arbor, USA, Item: 709001.

The antioxidant enzyme activities were calculated per 1 mg of protein.

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Statistica formulas (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA) 13.3 (2017), version for Windows—StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Data distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The effect of the tissue/location of fat body (hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) in the 1-day-old workers ($n = 10$ bees) on SOD, GST, GPx, and CAT activities, and TAC levels were measured. ANOVA was used for normally distributed data and the Kruskal–Wallis test was employed for non-normally distributed data. Activity's tissues/locations of fat body for the enzymes (SOD, GST, GPx, CAT, and TAC) for normally distributed data were compared with the Tukey HDS test, and, for non-normally distributed data, the Mann–Whitney U test was used. For each type of pollen, the effect of the tissue/location of fat body (hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, sternite) on SOD, GST, GPx, and CAT activities, and TAC levels was assessed in the 7- and 14-day-old workers ($n = 10$ bees per group). ANOVA

was used for normally distributed data and the Kruskal–Wallis test was employed for non-normally distributed data. SOD, GST, GPx, CAT activities, and TAC levels for hazel, rape, pine, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod pollen were compared with respect to the tissue/location of fat body (hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite). The student's *t*-test was used for normally distributed data and the Mann–Whitney U test was employed for non-normally distributed data. Likewise, the influence of pollen from wind-pollinated plants (hazel and pine) on enzyme activities was compared with that of pollen from insect-pollinated plants (rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, goldenrod).

3. Results

3.1. Activities of Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT), and Total Antioxidant Capacity (TAC) Levels in One-Day-Old Workers

The effect of the tissue/location of fat body (hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite) on the enzyme activities was statistically significant: SOD – $H = 36.63$, $p = 0.000$; GST – $F = 85.12$, $p = 0.000$; GPx – $H = 7.09$, $p = 0.069$; CAT – $F = 70.69$, $p = 0.000$; and TAC – $H = 24.84$, $p = 0.000$, respectively. The highest activities of SOD, GST, and CAT were identified in tergite 5 and the lowest in the hemolymph (Figure 3). There were no statistically significant differences in GPx activities, whereas TAC levels in the hemolymph were statistically significantly higher than those in all the fat body locations, which, in turn, did not significantly differ among each other ($p \leq 0.05$).

3.2. The Effect of the Tissue and Location of the Fat Body on the Enzyme Activities

In all the pollen monodiets and in the control group, both in 7-day-old and 14-day-old workers, the location of the fat body exerted a significant effect on the activities of SOD, GST, GPx, and CAT enzymes and on the TAC levels (Table 3).

Table 3. Effect of the hemolymph and fat body location from tergite 3, tergite 5, and sternite in different age groups of workers (7 and 14 days) on SOD, GST, GPx, CAT, and TAC activities in *A. mellifera* workers fed sugar candy only (control group) and in those fed sugar candy with a pollen addition.

Groups	Age of Workers									
	7-Day-Old					14-Day-Old				
	SOD	GST	GPx	CAT	TAC	SOD	GST	GPx	CAT	TAC
Control gr.	H = 36.67 $p = 0.000$	F = 416.70 $p = 0.000$	F = 222.34 $p = 0.000$	F = 46.81 $p = 0.000$	F = 110.42 $p = 0.000$	H = 36.73 $p = 0.000$	H = 36.73 $p = 0.000$	H = 33.04 $p = 0.000$	F = 153.71 $p = 0.000$	F = 227.25 $p = 0.000$
Hazel	H = 36.64 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 35.52 $p = 0.000$	H = 22.09 $p = 0.000$	H = 34.91 $p = 0.000$	H = 36.72 $p = 0.000$	H = 32.69 $p = 0.000$	H = 34.12 $p = 0.000$	F = 15.05 $p = 0.000$	H = 33.61 $p = 0.000$
Rape	H = 36.61 $p = 0.000$	H = 35.35 $p = 0.000$	H = 34.96 $p = 0.000$	H = 20.29 $p = 0.000$	H = 36.63 $p = 0.000$	H = 36.64 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 36.66 $p = 0.000$	H = 32.51 $p = 0.000$	H = 36.21 $p = 0.000$
Pine	H = 33.76 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 35.28 $p = 0.000$	F = 19.88 $p = 0.000$	H = 34.56 $p = 0.000$	H = 36.67 $p = 0.000$	H = 36.66 $p = 0.000$	H = 35.73 $p = 0.000$	H = 15.79 $p = 0.000$	H = 33.89 $p = 0.000$
<i>Phacelia</i>	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 36.63 $p = 0.000$	H = 36.47 $p = 0.000$	H = 35.49 $p = 0.000$	H = 34.78 $p = 0.000$	H = 36.62 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 36.62 $p = 0.000$	H = 36.64 $p = 0.000$	H = 30.30 $p = 0.000$
Buckwheat	H = 36.63 $p = 0.000$	H = 36.71 $p = 0.000$	H = 36.61 $p = 0.000$	H = 10.84 $p = 0.013$	H = 33.46 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 36.64 $p = 0.000$	H = 34.82 $p = 0.000$	H = 22.82 $p = 0.000$	H = 34.43 $p = 0.000$
Goldenrod	H = 36.61 $p = 0.000$	H = 36.68 $p = 0.000$	H = 33.08 $p = 0.000$	F = 22.06 $p = 0.000$	H = 34.30 $p = 0.000$	H = 36.65 $p = 0.000$	H = 36.71 $p = 0.000$	H = 36.63 $p = 0.000$	H = 31.78 $p = 0.000$	H = 33.06 $p = 0.000$

H—value of statistics for the Kruskal–Wallis test; F—value of Fisher's test for ANOVA; p —probability value.

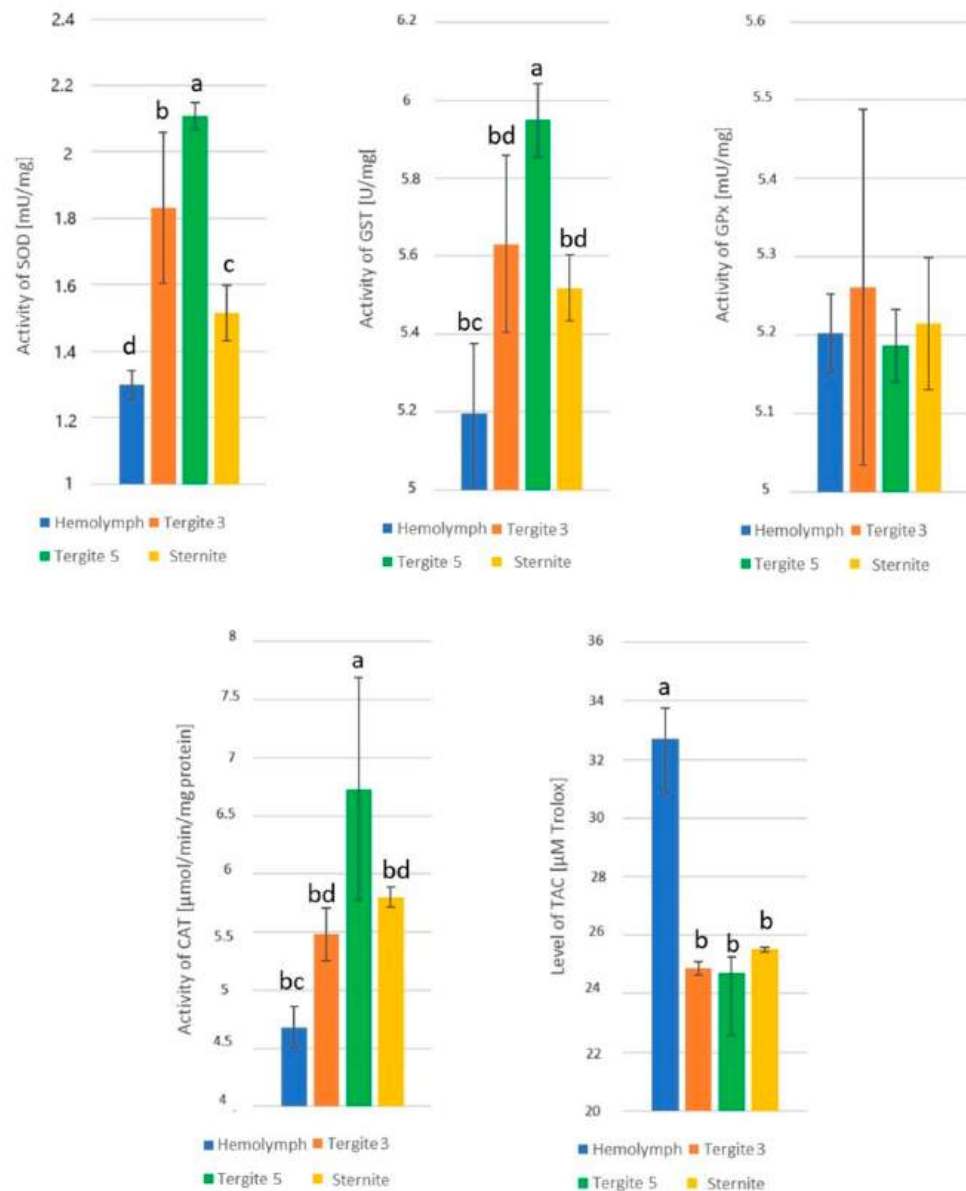


Figure 3. Superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) activities and total antioxidant capacity (TAC) levels in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in 1-day-old workers; a,b,c,d—differences between tissues/location for individual enzymes significant at $p \leq 0.01$; $n = 10$; vertical bars indicate standard deviation.

3.3. Activities of Superoxide Dismutase

In both the 7- and 14-day-old workers fed with a 10% pollen supplement (except for hazel and buckwheat in the tergite 3 and hazel in the sternite), the SOD activities were statistically significantly higher compared to those in the control group (Figure 4). Compared to the other locations, the highest values of superoxide dismutase were observed in the tergite 5. In all cases (tissues/locations of fat body), the SOD activities were higher in the 14-day-old than in the 7-day-old workers. The SOD activities in the hemolymph and fat body of the 7- and 14-day-old workers fed with hazel pollen candy were statistically significantly higher compared to the bees fed with candy containing different pollens produced by insect-pollinated plants ($p = 0.01$).

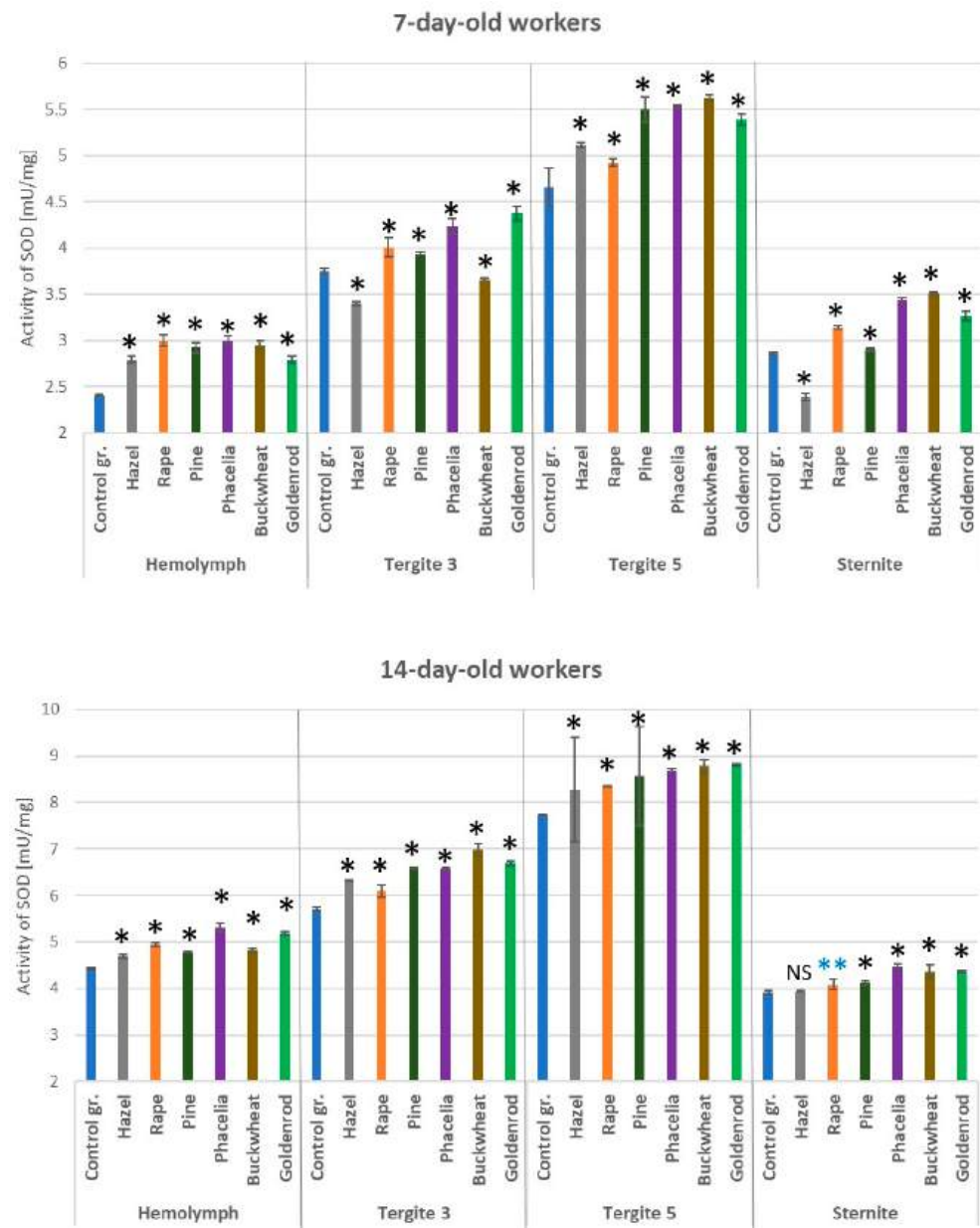


Figure 4. Superoxide dismutase (SOD) activities in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in the 7- and 14-day-old workers fed sugar candy only and in those fed sugar candy with various pollen additions; *—differences between the pollen-fed workers and the control group workers in the same tissues/locations are significant at $p = 0.01$; **— $p = 0.05$; $n = 10$; NS—not significant; vertical bars indicate standard deviation.

3.4. Activities of Glutathione S-Transferase

The addition of pollen to the sugar candy diet increased GST activities in both the hemolymph and the fat body in 7- and 14-day-old workers (Figure 5). Statistically significantly lower GST activities were found in the sternite compared to the other locations. In the bees fed only with sugar candy, especially in the 14-day-old ones, GST activities were lower than in those fed with candy containing individual pollen additions. The highest GST activities in the hemolymph and individual locations of the fat body were observed in the bees fed sugar candy containing *Phacelia* pollen. The GST activities in the hemolymph, tergite 3, tergite 5, and sternite of the bees at 7 days of age fed sugar candy with hazel or pine pollen were statistically significantly lower compared to those in the workers fed with pollen produced by insect-pollinated plants ($p = 0.01$).

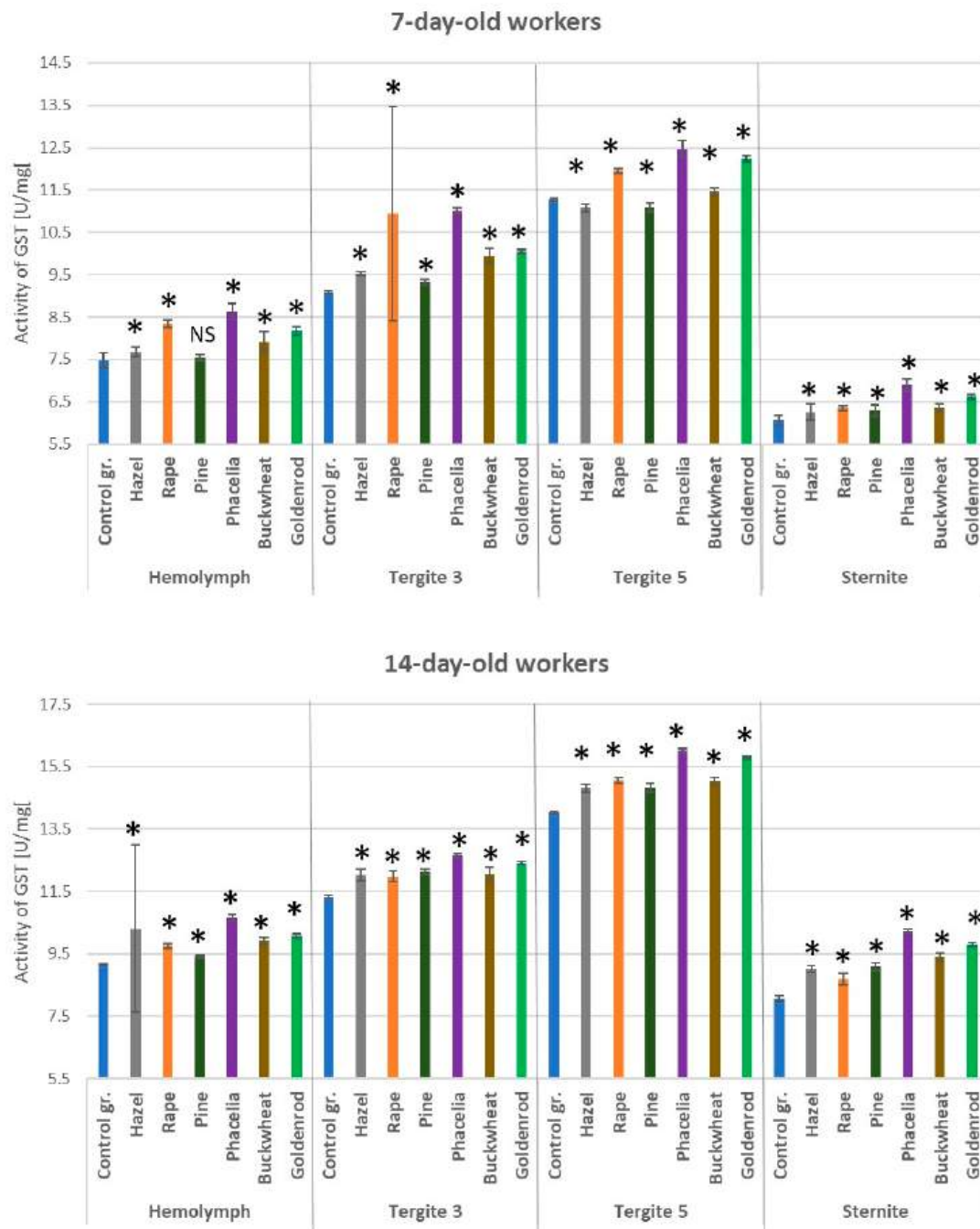


Figure 5. Glutathione S-transferase (GST) activities in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in the 7- and 14-day-old workers fed sugar candy only and in those fed sugar candy with various pollen additions; *—differences between the pollen-fed workers and the control group workers in the same tissues/locations are significant at $p = 0.01$; $n = 10$; NS—not significant; vertical bars indicate standard deviation.

3.5. Activities of Glutathione Peroxidase

The addition of pollen to sugar candy caused an increase in GPx activities in the hemolymph and respective fat body locations in the 7- and 14-day-old workers (Figure 6). Particularly high GPx activities were observed in tergite 3 on the 7th day of life of the bees and in tergites 3 and 5 on the 14th day. Glutathione peroxidase was always higher in the workers which consumed *Phacelia* pollen (sugar candy + 10% pollen) in tergite 3 compared to those fed sugar candy only. The GPx activities in the hemolymph and fat body of the bees fed pollen from wind-pollinated plants were statistically significantly lower only in

the 14-day-old workers compared to the bees fed sugar candy with 10% pollen from rape, *Phacelia*, buckwheat, or goldenrod ($p = 0.01$).

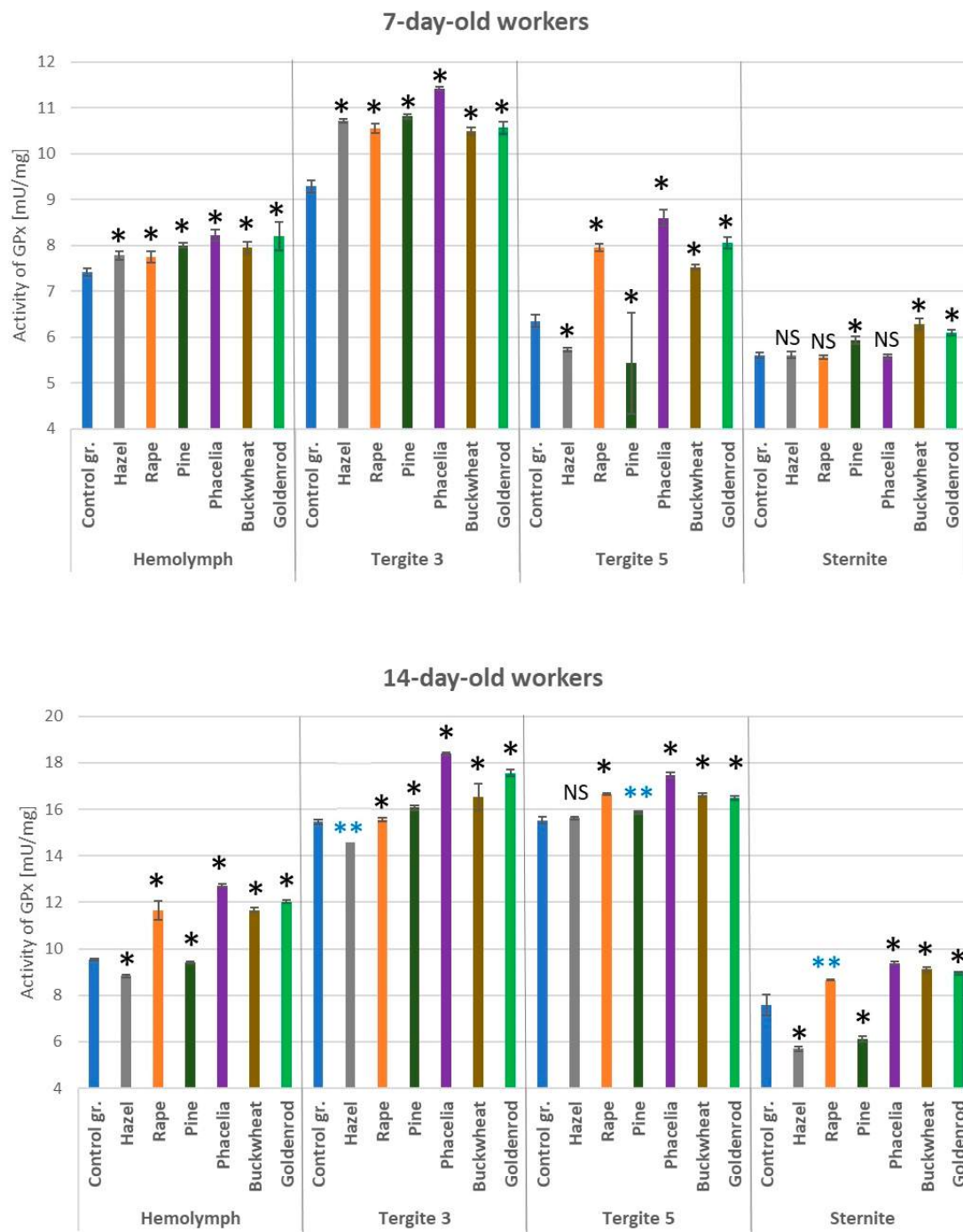


Figure 6. Glutathione peroxidase (GPx) activities in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in the 7- and 14-day-old workers fed sugar candy only and in those fed sugar candy with various pollen additions; *—differences between the pollen-fed workers and the control group workers in the same tissues/locations are significant at $p = 0.01$; **— $p = 0.05$; $n = 10$; NS—not significant; vertical bars indicate standard deviation.

3.6. Activities of Catalase

Catalase activities were higher in the hemolymph of the 7-day-old workers and in the sternite fat body of the 7- and 14-day-old workers fed candy with pollen (hazel, rapeseed, pine, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod) compared to those fed with sugar candy alone

(control group) (Figure 7). A similar situation was observed in the fat body of tergite 3 and 5 in the 7-day-old bees fed *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod pollen. In the 14-day-old workers fed candy containing pine pollen, lower CAT activities were observed in the hemolymph and fat body of tergites 3 and 5 compared to the control group. Considering catalase activities, the lowest statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed in the bees fed with hazel and pine pollen compared to the other groups of bees fed with sugar candy containing a 10% addition of pollen from entomophilous plants.

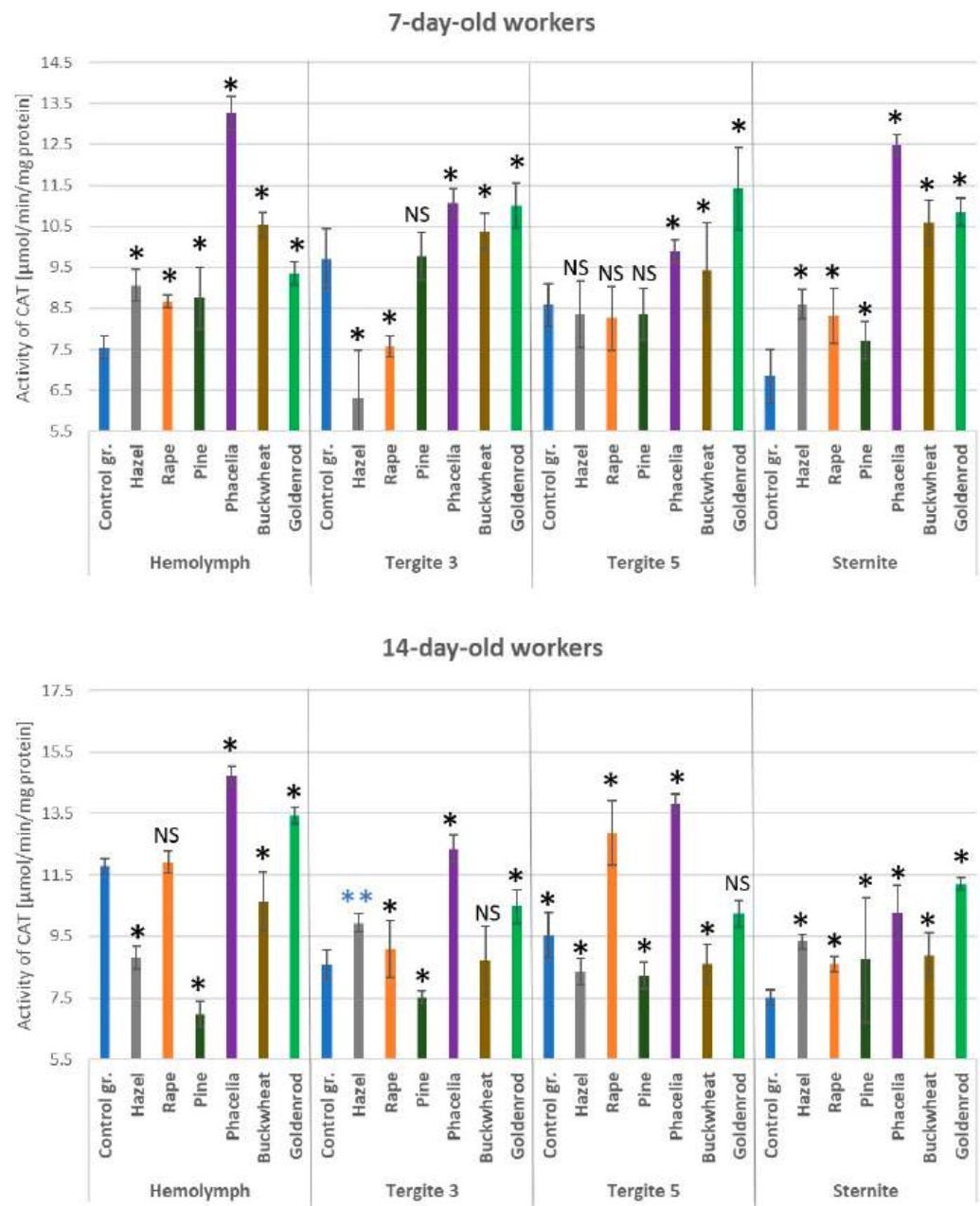


Figure 7. Catalase (CAT) activities in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in the 7- and 14-day-old workers fed sugar candy only and in those fed sugar candy containing various pollen additions; *—differences between the pollen-fed workers and the control group workers in the same tissues/locations are significant at $p = 0.01$; **— $p = 0.05$; $n = 10$; NS—not significant; vertical bars indicate standard deviation.

3.7. Levels of Total Antioxidant Capacity

TAC levels were higher in the fat body of tergites 3 and 5 in the 7-day-old bees fed candy with pollen supplements compared to those fed sugar cake alone (Figure 8). In the 14-day-old workers, higher TAC levels were observed in the fat body of sternites and tergites 3 and 5 after feeding the bees with pollen-enriched candy (except pine pollen) compared to those in the control group. The TAC levels were statistically significantly higher in the fat body of tergite 5 and sternite of the 7-day-old workers fed candy with hazel pollen than in those of bees fed with other types of pollen ($p < 0.05$).

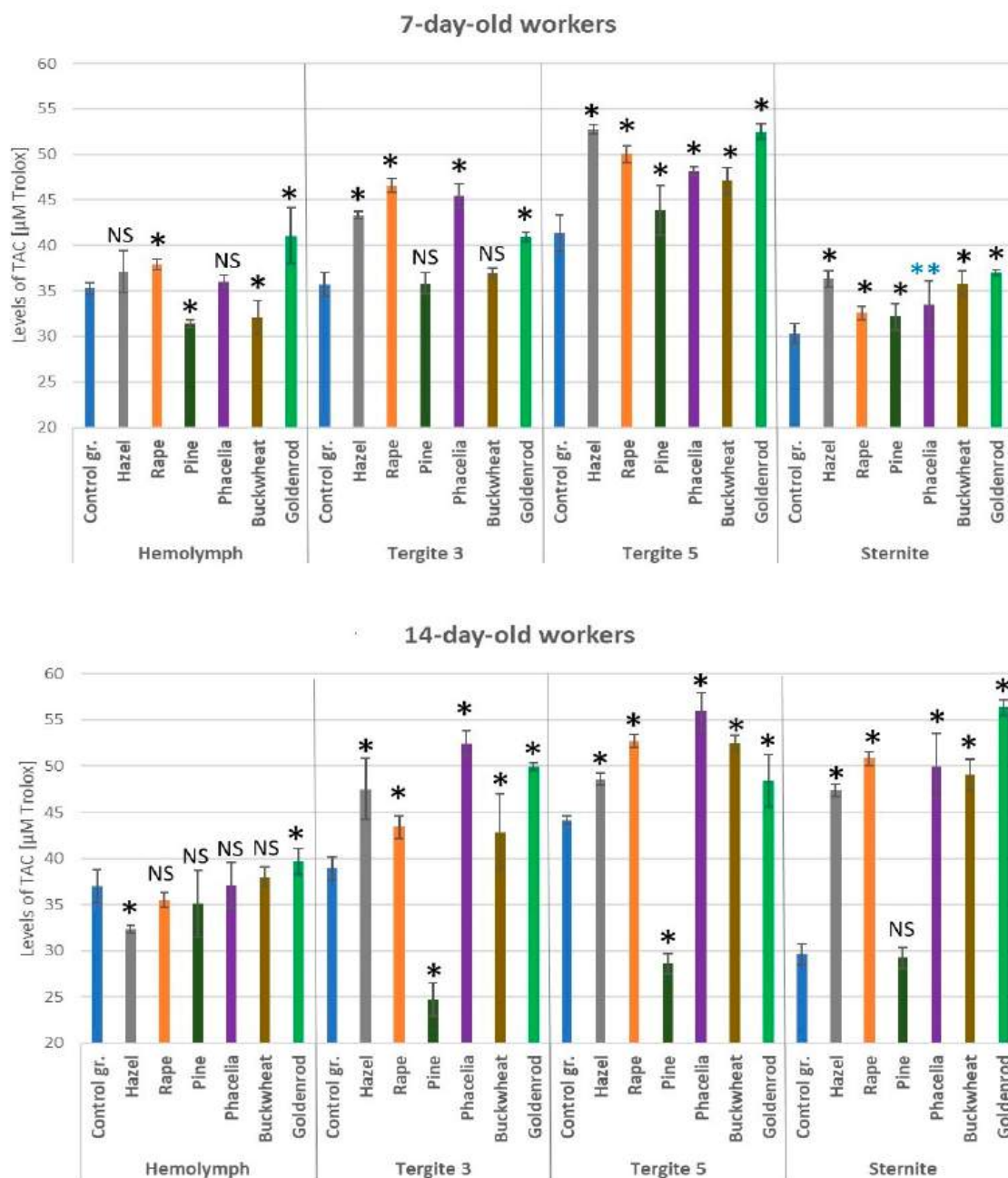


Figure 8. Total antioxidant capacity (TAC) levels in the hemolymph and fat body from tergite 3, tergite 5, and sternite in the 7- and 14-day-old workers fed sugar candy only and in those fed sugar candy containing various pollen additions; *—differences between the pollen-fed workers and the control group workers in the same tissues/locations are significant at $p = 0.01$; **— $p = 0.05$; $n = 10$; NS—not significant; vertical bars indicate standard deviation.

4. Discussion

The activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GST, GPx, and TAC in bees are commonly used to monitor oxidative stress. To assess antioxidant activities, homogenates from entire abdomens [37,53–55] and hemolymph [29,30,39–41,56] are widely used. There are few publications on the activities of these enzymes in the fat body. Santos et al. [32] reported the expression of antioxidant genes (MnSOD, CuZnSOD, catalase, Gst1, and GSH/GSSG) in the fat body of queen and worker larvae. Brajcha et al. [57] compared the expression of genes (including antioxidant ones) of fat body cells in both long-lived winter and short-lived summer worker bees (the youngest stage of hive bees and forager bees). Hsu and Hsieh [58] characterized the activities of CAT, GPx, and SOD in trophocytes and other fat body cells in 1- and 50-day-old workers. In our previous study [31], we focused on comparing the activities of antioxidants in different locations of the fat body in different castes of bees—queens, workers, and rebels just after their emergence. This publication supplements the knowledge of the fat body physiology with the following content: (1) it characterizes the activities of antioxidants in different segments/locations of the fat body not only in 1-day-old workers, but also in nest workers at the age of 7 and 14 days, (2) it presents the influence of particular pollens (in a monodiet) on the activities of the above enzymes in the fat body of the sternite, tergite 3, and tergite 5 and in the hemolymph of workers up to 14 days of age, and (3) it compares the influence of pollen from anemophilous and entomophilous plants on the antioxidant system in two tissues crucial for bee immunity.

The underlying problem of beekeeping all over the world, and especially in Europe, is an improper, poorly balanced pollen diet which results in reduced immunity [3,59,60]. Indeed, one of the lines of defense is the antioxidant system. We assessed the effect of specific pollens on the physiological/biochemical parameters of the fat body and hemolymph in laboratory conditions (in cage tests), with strictly controlled parameters and limited environmental influence. Filipiak et al. [46] showed that even a small addition of pollen to the diet of bees has a beneficial effect on their vitality. In turn, Jachuła et al. [61] found that there is no ideal mixture that will meet all the metabolic needs of bees. In order to verify the dietary potential of pollen, it is necessary to know its content of polyphenols and flavonoids, the composition, as well as their direct effect on the bee's organism. It is undeniable that a multipollen diet is optimal for honey bees, but to fully grasp how the properties of pollens interact with honey bee antioxidant system, we need to examine this diet through the lens of monodiets. Hence, our research complements this discourse.

The addition of hazel, pine, rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod pollen to sugar candy increased the activities of SOD and GST in both the hemolymph and the fat body of the sternite, tergite 3, and tergite 5 in the workers on the 7th and 14th day of their life. Similar trends were observed in the case of GPx activities in the hemolymph and fat body of tergite 3 in the 7- and 14-day-old workers and, additionally, in the fat body of tergite 5 in the 14-day-old bees. Moreover, we observed an increase in the activities of these three enzymes corresponding with the age of the bees. In the case of CAT, the pollen diet resulted in higher activities in the hemolymph and fat body of tergite 3 (exception: hazel and pine), tergite 5, and sternite in the 7-day-old workers. In the remaining cases, the trends were not so clear. Hsu and Hsieh [58] indicate that CAT activities in the fat body increase with age, while SOD activities decrease. The difference between our results and those obtained by these authors may be due to the fact that we presented the activities of the antioxidants in individual segments/locations of the subcuticular fat body. Hsu and Hsieh [58] did not specify the part of the fat body sampled (visceral or subcuticular) or its location (segment). In our study, we confirmed the observations of Strachecka et al. [31] that antioxidant enzyme activities vary depending on the type of tissue (hemolymph vs. fat body) and fat

body segments/locations (tergite 3, tergite 5, and sternite). These authors showed that the activities of SOD and CAT were always highest in the sternite, while the levels of TAC were highest in tergite 3 in the workers. In our study, a monodiet produced the lowest activities of SOD, GST, and GPx in the sternite (with some exceptions) in each group of bees. The activities of these enzymes are closely related to the functioning/metabolism of individual organelles in the fat body cells and ROS neutralization reactions. As suggested by Scofield and Amdam [62], nurse bees maintain high levels of lipids and other substances in the abdomen, including the fat body, while foragers have very low levels of these compounds, a phenomenon which probably contributes to the efficient performance of their social role and, thus, to the colony's fitness. This results from the evolution of eusocial organisms [62], but also from the adaptation to changing environmental conditions [63], as indicated also in our studies showing how much influence a monodiet has on the bee organism. Although the monodiet is a stress factor for bees, by comparing the hemolymph and fat body of bees fed sugar candy with pollen, antioxidant activities were usually found to be higher than in the control group. Similar conclusions were also formulated by Yazlovytska et al. [53]. Moreover, under cage conditions, these authors showed that bees which received a sucrose solution with the addition of willow pollen or artificial rapeseed beebread or artificial willow beebread lived longer and were characterized by higher values of lipid peroxidation and catalase activities (as oxidative stress biomarkers) in their heads and abdomen compared to the group fed with the sucrose solution only. These CAT activities are consistent with our results, especially in reference to the 7-day-old bees. The authors of that publication, unfortunately, did not state how they suspended/mixed the pollen in the sugar solution and how they fed the suspension to the bees, e.g., whether it was an even feeding. We avoided this mistake by giving the bees pollen in sugar candy.

TAC levels were the least consistent and there were virtually no statistical differences in the hemolymph of the 14-day-old bees, regardless of the diet. This is probably due to the fact that the total antioxidant activity is the sum of the activities of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Nevertheless, it was noted that the TAC level increased with age in tergite 3 and sternite in bees fed with a 10% addition of rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, or goldenrod. Based on literature data, the pollen of rapeseed, *Phacelia*, and buckwheat plants has a high content of phenolic acids and flavonoids [16,64]. Flavonoids and carotenoids are considered non-enzymatic antioxidants. Carotenoids protect the lipoproteins found, for example, in the fat body from singlet oxygen, which causes lipid peroxidation [65]. Upon oxidation, flavonoids act as electron donors to molecular oxygen, forming superoxide radicals [66]. There was no information to be found on phenolic compounds in goldenrod pollen, but the concentrations of the main phenolic compounds differ in the inflorescences of *Canadian goldenrod* L. and *Solidago gigantea* Aiton [67]. Since there are differences in the composition of antioxidant compounds in plant extracts, there will most likely also be differences in the composition of pollen. However, the question arises: will pollen produced by different species of goldenrod have the same or different effects on the physiological parameters of hemolymph and fat body? Goldenrod is a key plant species throughout Europe, as it provides vast amounts of pollen (about 100–200 kg of pollen per hectare) for bees. From a botanical point of view, goldenrod is an invasive plant, but, on the other hand, it is valuable for pollinators [68,69]. The industrialization and modernization of agriculture and forestry promote the use of various groups of chemical compounds, including insecticides, herbicides, fungicides, and other pesticides [70,71]. There is increasing research on the toxicity of pesticides to honey bees. It has been observed that contact of bees with pesticides induces oxidative stress [71], and the final effect may be different, even within the same chemical group, and may vary depending on the dose, mode of administration, exposure time, and type of biological sample taken for biochemical determinations [72]. To exclude

the influence of pesticides contained in pollen, we determined their concentrations using chromatographic methods. The concentrations of active substances detected in the pollen samples were not a cause for concern, except for rapeseed pollen. Three groups of chemical compounds were identified in rapeseed pollen. Due to the multihectare cultivation of rapeseed practically all over the world, pesticides are used to protect plants, and residues of active substances in rapeseed pollen, bee bread, and honey pose a global problem [73]. In our study, the enzymatic activities of antioxidants in the hemolymph of bees fed with candy supplemented with rapeseed pollen were significantly higher ($p = 0.01$) than in the control group. In our case, the active substances detected in rapeseed pollen loads did not have a negative impact on the activities of antioxidant enzymes. Many of the aforementioned stressors have a harmful effect on the homeostasis of the antioxidant system. To counteract the negative effects caused by stress, scientists recommend the use of natural chemical compounds. A positive effect of biostimulants such as curcumin, coenzyme Q10, caffeine, cannabidiol, and vitamin C has been observed, consisting of increasing the activity of the antioxidant enzyme system [29,30,44,74–77]. There is a high probability that a well-balanced pollen diet will condition an increase in the activities of enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress. Higher concentrations of, for example, SOD, CAT, and GPx generated by a pollen diet will constitute a kind of barrier against other harmful factors such as varroa, *Vairimorpha*/Nosema, etc.

Each pollen type possesses unique biological characteristics that impact various aspects of apian physiology, including its immune and antioxidant systems. This influence is evident in the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GST, GPx, and in the total antioxidant capacity (TAC) levels. However, pollen from insect-pollinated plants induced a greater increase in antioxidant parameters compared to pollen from wind-pollinated plants. Hazel and pine pollen, specifically, led to an increase in SOD and GST activities at 14 days of age compared to the bees fed sugar candy only. Although hazel is a wind-pollinated plant, it is very frequently visited by bees. As one of the first spring pollen sources in Central Europe, it can be crucial for protecting bees from oxidative stress caused by various factors. As Romanovskaja et al. [78] report, shifts in earlier phenological phases during blooming, including in *Corylus* sp., reflect climate change. Wind-pollinated plants prove to be a good way to fill food gaps for bees. Beekeepers frequently sow *Phacelia* between June and July/August to provide bees with a consistent supply of pollen and nectar. This plant's rapid growth and flowering make it ideal for agricultural areas, offering protein-rich pollen, especially when bee food sources are scarce. Our studies have revealed that *Phacelia* pollen has a pronounced effect on enzyme activities in comparison with hazel, rape, pine, buckwheat, and goldenrod.

Enzyme SOD, GPx, GST, and CAT activities and TAC levels varied among tergite 3, tergite 5, and the sternite. Our earlier research indicates that monodiets influence the concentrations of energy storage compounds in the fat body differently based on the segment [4]. This study, thus, corroborates the segmented organization of the fat body, as proposed by Strachecka et al. [52]. The segmented structure of the fat body underlies the varying activities of antioxidant enzymes (particularly in tergite 5) and energy compounds (in tergite 3 and the sternite), implying distinct physiological functions of individual fat body segments. Diverse stressors disrupt antioxidant activities within bee tissues, notably in the hemolymph. Our study suggests that higher enzymatic activities of CAT, SOD, GPx, and GST and higher levels of TAC in bees fed various pollen monodiets are a consequential response to the presence of certain compounds in the flower pollen. We posit that this enhanced enzymatic activity functions as an endogenous protective mechanism, safeguarding against the deleterious effects of additional stressors, such as parasites.

5. Conclusions

Each pollen has individual biological properties, which translate into the functioning of the bee's organism, including its immune and antioxidant systems. Specific pollen types, such as those from rapeseed, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod, can positively influence the activity of antioxidant enzymes as opposed to sugar candy only, contributing to improved bee health and colony survival. SOD, GPx, and GST activities increased with the age of the bees, while CAT showed the opposite trend, and this parameter may be an indicator of monodiet harmfulness. We provide further evidence that the spring pollen diet plays a significant role in the early development of the short-lived generation of bees. Moreover, summer and autumn pollens, e.g., from *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod, support antioxidant systems, creating potential for the long-lived generation. Furthermore, based on literature data, considering the strong antioxidant properties of *Phacelia* pollen, as well as its beneficial effects on antioxidant properties, the introduction of this plant to flower mixtures may have an impact on antioxidant parameters and may counteract unfavorable environmental factors.

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

Funding: This study was funded, in part, by the National Science Centre, Poland (NCN); PRE-LUDIUM Grant No. 2022/45/N/NZ9/01333 and by research within the Doctoral School at the University of Life Sciences in Lublin, No. SD/286/176/2022 and SD/72/NB/2023. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any author accepted manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data contained within the article. At a justified request of the interested party, they may be made available by the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Krzysztof Kondziola from GBA POLSKA Sp. z o.o., headquartered in Lublin, for the help in marking active substances in bee pollen loads.

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

References

1. Frias, B.E.D.; Barbosa, C.D.; Lourenço, A.P. Pollen Nutrition in Honey Bees (*Apis mellifera*): Impact on Adult Health. *Apidologie* **2016**, *47*, 15–25. [\[CrossRef\]](#)
2. Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.L.; Alaux, C. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. Diet Effects on Honeybee Immunocompetence. *Biol. Lett.* **2010**, *6*, 562–565. [\[CrossRef\]](#)
4. Bryś, M.S.; Staniec, B.; Strachecka, A. The Effect of Pollen Monodiets on Fat Body Morphology Parameters and Energy Substrate Levels in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Workers. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 15177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. DeGrandi-Hoffman, G.; Gage, S.L.; Corby-Harris, V.; Carroll, M.; Chambers, M.; Graham, H.; Watkins deJong, E.; Hidalgo, G.; Calle, S.; Azzouz-Olden, F.; et al. Connecting the Nutrient Composition of Seasonal Pollens with Changing Nutritional Needs of Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Colonies. J. Insect Physiol.* **2018**, *109*, 114–124. [\[CrossRef\]](#)
6. Rodríguez-Flores, M.S.; Escuredo, O.; Seijo, M.C.; Rojo, S.; Vilas-Boas, M.; Falcão, S.I. Phenolic Profile of Castanea Bee Pollen from the Northwest of the Iberian Peninsula. *Separations* **2023**, *10*, 270. [\[CrossRef\]](#)

7. Alimoglu, G.; Guzelmeric, E.; Yuksel, P.I.; Celik, C.; Deniz, I.; Yesilada, E. Monofloral and Polyfloral Bee Pollens: Comparative Evaluation of Their Phenolics and Bioactivity Profiles. *LWT* **2021**, *142*, 110973. [\[CrossRef\]](#)
8. Fatrcová-Šramková, K.; Nôžková, J.; Kačániová, M.; Máriássyová, M.; Rovná, K.; Stričík, M. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Monofloral Bee Pollen. *J. Environ. Sci. Health B* **2013**, *48*, 133–138. [\[CrossRef\]](#)
9. Dinu, L.D.; Gatea, F.; Roaming Israel, F.; Lakicevic, M.; Dedović, N.; Vamanu, E. The Modulation Effect of a Fermented Bee Pollen Postbiotic on Cardiovascular Microbiota and Therapeutic Perspectives. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2712. [\[CrossRef\]](#)
10. El Ghouizi, A.; Bakour, M.; Laaroussi, H.; Ousaaïd, D.; El Menyiy, N.; Hano, C.; Lyoussi, B. Bee Pollen as Functional Food: Insights into Its Composition and Therapeutic Properties. *Antioxidants* **2023**, *12*, 557. [\[CrossRef\]](#)
11. Nguyen, H.C.; Liu, L.-C.; Wu, M.-C.; Lin, T.-P.; Yang, C.-Y.; Huang, M.-Y. Chemical constituents, antioxidant, and anticancer activities of bee pollen from various floral sources in Taiwan. *Naturae Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2022**, *50*, 12644. [\[CrossRef\]](#)
12. Mărghitaș, L.A.; Stanciu, O.G.; Dezmirean, D.S.; Bobiș, O.; Popescu, O.; Bogdanov, S.; Campos, M.G. In Vitro Antioxidant Capacity of Honeybee-Collected Pollen of Selected Floral Origin Harvested from Romania. *Food Chem.* **2009**, *115*, 878–883. [\[CrossRef\]](#)
13. Vergun, O. Nutritional Composition of Phacelia Tanacetifolia Benth. Bee Pollen and Inflorescences. *Agrobiodiversity Improv. Nutr. Health Life Qual.* **2023**, *7*, 95–104. [\[CrossRef\]](#)
14. Végh, R.; Sipiczki, G.; Csóka, M. Investigating the Antioxidant and Color Properties of Bee Pollens of Various Plant Sources. *Chem. Biodivers.* **2023**, *20*, e202300126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Owayss, A.A.; Shebl, M.A.; Iqbal, J.; Awad, A.M.; Raweh, H.S.; Alqarni, A.S. Phacelia Tanacetifolia Can Enhance Conservation of Honey Bees and Wild Bees in the Drastic Hot-Arid Subtropical Central Arabia. *J. Apic. Res.* **2020**, *59*, 569–582. [\[CrossRef\]](#)
16. Nešović, M.; Gašić, U.; Tosti, T.; Horvacki, N.; Šikoparija, B.; Nedić, N.; Blagojević, S.; Ignjatović, L.; Tešić, Ž. Polyphenol Profile of Buckwheat Honey, Nectar and Pollen: Polyphenolics in Buckwheat. *R. Soc. Open Sci.* **2020**, *7*, 201576. [\[CrossRef\]](#)
17. Kostić, A.; Milinčić, D.D.; Gašić, U.M.; Nedić, N.; Stanojević, S.P.; Tešić, Ž.L.; Pešić, M.B. Polyphenolic Profile and Antioxidant Properties of Bee-Collected Pollen from Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant. *LWT* **2019**, *112*, 1091. [\[CrossRef\]](#)
18. Czigle, S.; Filep, R.; Balažová, E.; Szentgyörgyi, H.; Balázs, V.L.; Kocsis, M.; Purger, D.; Papp, N.; Farkas, Á. Antioxidant Capacity Determination of Hungarian-, Slovak-, and Polish-Origin Goldenrod Honeys. *Plants* **2022**, *11*, 792. [\[CrossRef\]](#)
19. Cheng, Y.; Wang, Z.; Quan, W.; Xue, C.; Qu, T.; Wang, T.; Chen, Q.; Wang, Z.; Zeng, M.; Qin, F.; et al. Pine Pollen: A Review of Its Chemical Composition, Health Effects, Processing, and Food Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2023**, *138*, 599–614. [\[CrossRef\]](#)
20. Lee, K.-H.; Kim, A.-J.; Choi, E.-M. Antioxidant and antiinflammatory activity of pine pollen extract in vitro. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 41–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Alves, T.; Trivellato, M.; Freitas, T.; Kato, A.; Gomes, C.; Ferraz, Y.; Serafim, J.; De Jong, D.; Prado, E.; Vicente, E.; et al. Pollen Contaminated with a Triple-Action Fungicide Induced Oxidative Stress and Reduced Bee Longevity Though with Less Impact on Lifespan in Bees from Well Fed Colonies. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2024**, *112*, 104587. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Almasri, H.; Liberti, J.; Brunet, J.L.; Engel, P.; Belzunces, L.P. Mild Chronic Exposure to Pesticides Alters Physiological Markers of Honey Bee Health without Perturbing the Core Gut Microbiota. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 4281. [\[CrossRef\]](#)
23. Yang, K.; Wu, D.; Ye, X.; Liu, D.; Chen, J.; Sun, P. Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 708–718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Thakur, M.; Nanda, V. Composition and Functionality of Bee Pollen: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *98*, 82–106. [\[CrossRef\]](#)
25. Denisow, B.; Denisow-Pietrzyk, M. Biological and Therapeutic Properties of Bee Pollen: A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4303–4309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Nicolson, S.W.; Da Silva Das Neves, S.; Human, H.; Pirk, C.W.W. Digestibility and Nutritional Value of Fresh and Stored Pollen for Honey Bees (*Apis mellifera* Scutellata). *J. Insect Physiol.* **2018**, *107*, 302–308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Carroll, M.J.; Brown, N.; Goodall, C.; Downs, A.M.; Sheenan, T.H.; Anderson, K.E. Honey Bees Preferentially Consume Freshlystored Pollen. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0249458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Moliné, M.P.; Vázquez, M.M.; Moran Giardini, P.; Domínguez, E.; Fernández, N.J.; Damiani, N.; Quintana, S.; Gende, L.B. Immune and Antioxidant Gene Expression Stimulation of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Larvae by *Saccharomyces Cerevisiae* from the Brewing Industry. *J. Appl. Entomol.* **2024**, *148*, 382–390. [\[CrossRef\]](#)
29. Skowronek, P.; Strachecka, A. Cannabidiol (CBD) Supports the Honeybee Worker Organism by Activating the Antioxidant System. *Antioxidants* **2023**, *12*, 279. [\[CrossRef\]](#)
30. Skowronek, P.; Wójcik, Ł.; Strachecka, A. Impressive Impact of Hemp Extract on Antioxidant System in Honey Bee (*Apis mellifera*) Organism. *Antioxidants* **2022**, *11*, 707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Strachecka, A.; Kuszewska, K.; Olszewski, K.; Skowronek, P.; Grzybek, M.; Grabowski, M.; Paleolog, J.; Woyciechowski, M. Activities of Antioxidant and Proteolytic Systems and Biomarkers in the Fat Body and Hemolymph of Young *Apis mellifera* Females. *Animals* **2022**, *12*, 1121. [\[CrossRef\]](#)

32. Santos, D.E.; Souza, A.d.O.; Tibério, G.J.; Alberici, L.C.; Hartfelder, K. Differential Expression of Antioxidant System Genes in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Caste Development Mitigates ROS-Mediated Oxidative Damage in Queen Larvae. *Genet. Mol. Biol.* **2020**, *43*, e20200173. [\[CrossRef\]](#)
33. Birch-Machin, M.A.; Bowman, A. Oxidative Stress and Ageing. *Br. J. Dermatol.* **2016**, *175*, 26–29. [\[CrossRef\]](#)
34. Wang, H.; Lei, L.; Chen, W.; Chi, X.; Han, K.; Wang, Y.; Ma, L.; Liu, Z.; Xu, B. The Comparison of Antioxidant Performance, Immune Performance, IIS Activity and Gut Microbiota Composition between Queen and Worker Bees Revealed the Mechanism of Different Lifespan of Female Casts in the Honeybee. *Insects* **2022**, *13*, 772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Seehuus, S.C.; Norberg, K.; Gimsa, U.; Krekling, T.; Amdam, G.V. Reproductive Protein Protects Functionally Sterile Honey Bee Workers from Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 962–967. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Weirich, G.; Collins, A.; Williams, V.; Weirich, G.F.; Collins, A.M.; Williams, V.P. Antioxidant Enzymes in the Honey Bee, *Apis Mell-Lifera*. *Apidologie* **2002**, *33*, 3–14. [\[CrossRef\]](#)
37. Jovanovic, N.M.; Glavinic, U.; Ristanic, M.; Vojnovic, B.; Ilic, T.; Stevanovic, J.; Stanimirovic, Z. Effects of Plant-Based Supplement on Oxidative Stress of Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Nosema Ceranae*. *Animals* **2023**, *13*, 3543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Dmochowska-Ślęzak, K.; Dmitryjuk, M.; Zaobidna, E.; Żółtowska, K. The Antioxidant Defense System of *Varroa Destructor* Facilitates the Infestation of *Apis mellifera*. *J. Apic. Sci.* **2016**, *60*, 163–165. [\[CrossRef\]](#)
39. Dziechciarz, P.; Strachecka, A.; Borsuk, G.; Olszewski, K. Effect of Rearing in Small-Cell Combs on Activities of Catalase and Superoxide Dismutase and Total Antioxidant Capacity in the Hemolymph of *Apis mellifera* Workers. *Antioxidants* **2023**, *12*, 709. [\[CrossRef\]](#)
40. Paleolog, J.; Wilde, J.; Miszczak, A.; Gancarz, M.; Strachecka, A. Antioxidation Defenses of *Apis mellifera* Queens and Workers Respond to Imidacloprid in Different Age-Dependent Ways: Old Queens Are Resistant, Foragers Are Not. *Animals* **2021**, *11*, 1246. [\[CrossRef\]](#)
41. Migdał, P.; Murawska, A.; Strachecka, A.; Bieńkowski, P.; Roman, A. Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects* **2020**, *11*, 713. [\[CrossRef\]](#)
42. Tahir, F.; Goblirsch, M.; Adamczyk, J.; Karim, S.; Alburaki, M. Honey Bee *Apis mellifera* L. Responses to Oxidative Stress Induced by Pharmacological and Pesticidal Compounds. *Front. Bee Sci.* **2023**, *1*, 1275862. [\[CrossRef\]](#)
43. Corona, M.; Robinson, G.E. Genes of the Antioxidant System of the Honey Bee: Annotation and Phylogeny. *Insect. Mol. Biol.* **2006**, *15*, 687–701. [\[CrossRef\]](#)
44. Farjan, M.; Dmitryjuk, M.; Lipiński, Z.; Biernat-Łopieńska, E.; Żółtowska, K. Supplementation of the Honey Bee Diet with Vitamin C: The Effect on the Antioxidative System of *Apis mellifera* Carnica Brood at Different Stages. *J. Apic. Res.* **2012**, *51*, 263–270. [\[CrossRef\]](#)
45. Jachula, J.; Denisow, B.; Strzałkowska-Abramek, M. Does an Invader Have a Bright Side? Floral Reward in Two *Solidago* Species. *J. Apic. Res.* **2020**, *59*, 599–608. [\[CrossRef\]](#)
46. Filipiak, M.; Kuszewska, K.; Asselman, M.; Denisow, B.; Stawiarz, E.; Woyciechowski, M.; Weiner, J. Ecological Stoichiometry of the Honeybee: Pollen Diversity and Adequate Species Composition Are Needed to Mitigate Limitations Imposed on the Growth and Development of Bees by Pollen Quality. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183236. [\[CrossRef\]](#)
47. Filipiak, Z.M.; Denisow, B.; Stawiarz, E.; Filipiak, M. Unravelling the Dependence of a Wild Bee on Floral Diversity and Composition Using a Feeding Experiment. *Sci. Total Environ.* **2022**, *820*, 153326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Altaye, S.Z.; Pirk, C.W.W.; Crewe, R.M.; Nicolson, S.W. Convergence of Carbohydrate-Biased Intake Targets in Caged Worker Honeybees Fed Different Protein Sources. *J. Exp. Biol.* **2010**, *213*, 3311–3318. [\[CrossRef\]](#)
49. Et, A. Fast and Easy Multiresidue Method. Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431.
50. Kaila, L.; Ketola, J.; Toivonen, M.; Loukola, O.; Hakala, K.; Raiskio, S.; Hurme, T.; Jalli, M. Pesticide Residues in Honeybee-Collected Pollen: Does the EU Regulation Protect Honeybees from Pesticides? *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 18225–18244. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Łoś, A.; Strachecka, A. Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect “Blood” and Body Surface Elution. *Sensors* **2018**, *18*, 1494. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. 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*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
53. Yazlovytyska, L.S.; Karavan, V.V.; Domaciuk, M.; Panchuk, I.I.; Borsuk, G.; Volkov, R.A. Increased Survival of Honey Bees Consuming Pollen and Beebread Is Associated with Elevated Biomarkers of Oxidative Stress. *Front. Ecol. Evol.* **2023**, *11*, 1098350. [\[CrossRef\]](#)
54. Kramer, B.H.; Nehring, V.; Buttstedt, A.; Heinze, J.; Korb, J.; Libbrecht, R.; Meusemann, K.; Paxton, R.J.; Séguret, A.; Schaub, F.; et al. Oxidative Stress and Senescence in Social Insects: A Significant but Inconsistent Link? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2021**, *376*, 20190732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

55. Spremo, J.; Purać, J.; Čelić, T.; Đorđević, S.; Pihler, I.; Kojić, D.; Vukašinović, E. Assessment of Oxidative Status, Detoxification Capacity and Immune Responsiveness in Honey Bees with Ageing. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2024**, *298*, 111735. [\[CrossRef\]](#)
56. Bialecka, N.; Garbacz, K.; Berbeć, E.; Murawska, A.; Madras-Majewska, B.; Migdał, P. Changes in Selected Biochemical Markers of Honey Bees Exposed to Fermented Common Tansy Solution (*Tanacetum vulgare* L.). *Animals* **2024**, *14*, 2857. [\[CrossRef\]](#)
57. Brejcha, M.; Prušáková, D.; Sáblová, M.; Peska, V.; Černý, J.; Kodrlik, D.; Konopová, B.; Čapková Frydrychová, R. Seasonal Changes in Ultrastructure and Gene Expression in the Fat Body of Worker Honey Bees. *J. Insect Physiol.* **2023**, *146*, 104504. [\[CrossRef\]](#)
58. Hsu, C.Y.; Hsieh, Y.S. Oxidative Stress Decreases in the Trophocytes and Fat Cells of Worker Honeybees during Aging. *Biogerontology* **2014**, *15*, 129–137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Bryś, M.S.; Strachecka, A. The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review. *Molecules* **2024**, *29*, 2605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Ara Begum, H.; Idrees, A.; Afzal, A.; Iqbal, J.; Qadir, Z.A.; Shahzad, M.F.; Li, Z.; Salah Shebl Ibrahim, S.; Alkahtani, J.; Li, J. Impact of Different Pollen Protein Diets on the Physiology of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Workers from Essential Plant Sources. *J. King Saud. Univ. Sci.* **2023**, *35*, 102511. [\[CrossRef\]](#)
61. Jachula, J.; Denisow, B.; Wrzesień, M. Habitat Heterogeneity Helps to Mitigate Pollinator Nectar Sugar Deficit and Discontinuity in an Agricultural Landscape. *Sci. Total Environ.* **2021**, *782*, 146909. [\[CrossRef\]](#)
62. Scofield, S.L.; Amdam, G.V. Fat Body Lipogenic Capacity in Honey Bee Workers Is Affected by Age, Social Role and Dietary Protein. *J. Exp. Biol.* **2024**, *227*, jeb247777. [\[CrossRef\]](#)
63. Vasilevskaya, N. Pollution of the Environment and Pollen: A Review. *Stresses* **2022**, *2*, 515–530. [\[CrossRef\]](#)
64. Barbieri, D.; Gabriele, M.; Summa, M.; Colosimo, R.; Leonardi, D.; Domenici, V.; Pucci, L. Antioxidant, Nutraceutical Properties, and Fluorescence Spectral Profiles of Bee Pollen Samples from Different Botanical Origins. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1001. [\[CrossRef\]](#)
65. Sandmann, G. Antioxidant Protection from UV-and Light-Stress Related to Carotenoid Structures. *Antioxidants* **2019**, *8*, 219. [\[CrossRef\]](#)
66. Krishnan, N.; Kodrlik, D. Antioxidant Enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are They Enhanced to Protect Gut Tissues during Oxidative Stress? *J. Insect Physiol.* **2006**, *52*, 11–20. [\[CrossRef\]](#)
67. Likhanov, A.; Oliinyk, M.; Pashkevych, N.; Churilov, A.; Kozyr, M. The Role of Flavonoids in Invasion Strategy of *Solidago canadensis* L. *Plants* **2021**, *10*, 1748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Moroń, D.; Marjańska, E.; Skórka, P.; Lenda, M.; Woyciechowski, M. Invader–Pollinator Paradox: Invasive Goldenrods Benefit from Large Size Pollinators. *Divers. Distrib.* **2021**, *27*, 632–641. [\[CrossRef\]](#)
69. Lenda, M.; Skórka, P.; Kuszewska, K.; Moroń, D.; Bęcik, M.; Baczek Kwinta, R.; Janowiak, F.; Duncan, D.H.; Vesk, P.A.; Possingham, H.P.; et al. Misinformation, Internet Honey Trading and Beekeepers Drive a Plant Invasion. *Ecol. Lett.* **2021**, *24*, 165–169. [\[CrossRef\]](#)
70. Shakir, S.K.; Irfan, S.; Akhtar, B.; Rehman, S.; Daud, M.K.; Taimur, N.; Azizullah, A. Pesticide-Induced Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Seedlings. *Ecotoxicology* **2018**, *27*, 919–935. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Jabłońska-Trypuć, A.; Wiater, J. Protective Effect of Plant Compounds in Pesticides Toxicity. *J. Environ. Health Sci. Eng.* **2022**, *20*, 1035–1045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Murawska, A.; Migdał, P.; Roman, A. Effects of Plant Protection Products on Biochemical Markers in Honey Bees. *Agriculture* **2021**, *11*, 648. [\[CrossRef\]](#)
73. Karise, R.; Raimets, R.; Bartkevics, V.; Pugajeva, I.; Pihlik, P.; Keres, I.; Williams, I.H.; Viinalass, H.; Mänd, M. Are Pesticide Residues in Honey Related to Oilseed Rape Treatments? *Chemosphere* **2017**, *188*, 389–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Farjan, M.; Łopieńska-Biernat, E.; Lipiński, Z.; Dmitryjuk, M.; Zółtowska, K. Supplementing with Vitamin C the Diet of Honeybees (*Apis mellifera* Carnica) Parasitized with Varroa Destructor: Effects on Antioxidative Status. *Parasitology* **2014**, *141*, 770–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Strachecka, A.J.; 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. [\[CrossRef\]](#)
76. Hacke, A.C.M.; Lima, D.; de Costa, F.; Deshmukh, K.; Li, N.; Chow, A.M.; Marques, J.A.; Pereira, R.P.; Kerman, K. Probing the antioxidant activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in Cannabis sativa extracts. *Analyst* **2019**, *144*, 4952–4961. [\[CrossRef\]](#)

-
77. Syama, P.S.; Sreeranjit Kumar, C.V. Evidence of Diet Supplementation with Vitamin C Protecting Honeybees from Imidacloprid Induced Peroxidative Damage: A Study with *Apis Cerana Indica*. *Sociobiology* **2022**, *69*, e7763. [[CrossRef](#)]
 78. Romanovskaja, D.; Baksienė, E.; Razukas, A. Impact of Climate Change on Phenology of Entomophilous Plants and Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Preprints* **2023**, 2023050787. [[CrossRef](#)]

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

The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honey bees workers

Maciej Sylwester Bryś^{1*}, Krzysztof Olszewski², Aneta Strachecka¹

¹ Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Doświadczalna 50A, 20-280 Lublin, Poland

² Subdepartment 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

*Corresponding author: maciej.brys@up.lublin.pl (M.S.B.)

Abstract

The homogenization of landscapes through the introduction of large-scale farms, the decline of biodiversity conditioned by high summer temperatures and dry weather, as well as the expansion of alien species determine the monodiet feeding of honeybees. In this study, we investigated the effect of monopollen feeding regimens (containing hazel, rape, pine, buckwheat, *Phacelia*, and goldenrod) on the activity of the proteolytic system in the tergite 3, tergite 5 or sternite apian fat body, and hemolymph. We showed that pollen from rapeseed, phacelia, buckwheat, and goldenrod increased the activities of acidic, neutral, and alkaline proteases and their inhibitors in the fat body and hemolymph when compared to the group fed with sugar candy only. The activities of proteases and their inhibitors in bees fed with pollen from hazel and pine were usually higher compared to the activities of bees fed with sugar candy only, but lower than in workers fed sugar candy with the pollen of entomophilous plants. Moreover, when comparing the proteolytic system activity between localizations/segments, the highest values were observed in tergite 5, regardless of what age the bees were and whether they were fed candy with added pollen. It is important to understand the impact of individual types of pollen in the context of potential future monodiets. Furthermore, the beneficial impact of *Phacelia* pollen to drive the rise of protease and protease inhibitor activities, helping to counteract negative environmental factors, can be supported by introducing, for example, flower mixtures for the insects or pollen-supplemented sugar candies for bees during periods without access to pollen.

Keywords: proteases; protease inhibitors; diets; nutrition; immunity; honey bee

Introduction

While changing their diet from meat to pollen during evolution, honeybee populations began to be domesticated and used by humans ever since the Stone Age, as evidenced by the remains of cave art [1]. In the 21st century, progressing industrialization, the development of technologies that generate electromagnetic fields [1,2], chemical contamination of the environment [3-6], the adulteration of bee products [7], frequent mowing of roadsides and railway lines [8], as well as the homogenization of agriculture through monoculture practices [9-13], among other things, have led to a massive decline in bee populations.

Pollen quality, defined as the content of essential and non-essential amino acids, plays a crucial role in the physiology of the honey bee [14,15]. It turns out that access to a large amount of pollen produced by a single plant (the so-called monodiet) may not ensure proper development of insects due to an unbalanced nutritional profile [16]. Firstly, humans, through large-area farm cultivation of, for example, rapeseed, buckwheat, sunflower, etc., expose bees to stress caused by an undifferentiated diet. Secondly, large-area crops of industrial cereals around the world, such as corn, rice, sorghum and soybeans, provide honey bees with poor quality pollen [17]. Moreover, cereal plants are wind-pollinated and do not produce nectar, which does not encourage bees to visit them. Thirdly, there is also the phenomenon of invasive alien species, such as the Canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L.), which outcompetes native plant species and almost forces bees to use its floral resources [18,19]. Good practices to supplement nutritional gaps include sowing flower meadows and cultivating specific plants, such as *Phacelia* (*Phacelia tanacetifolia* Benth). *Phacelia* has a short growing season and produces large amounts of biochemically balanced pollen and nectar [20,21]. According to our previous research, *Phacelia* pollen increases the energy reserves stored in the fat body and increases the activities of oxidative stress markers, preventing adverse stressors [10,22]. Therefore, the selection of pollen in our study was dictated by the basic diet of honeybees in Poland and Central Europe. Hazel (*Corylus* sp.) pollen is the first source of pollen, even before the flowering period of other insect-pollinated plants. Pine (*Pinus sylvestris* L.) pollen is produced in large quantities, but it is not readily collected by foraging bees. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) blooms between July and early autumn and is a valuable source of pollen, although the biochemical composition of the pollen is poorly balanced. Goldenrod (*Solidago* sp.) is a common invasive plant, and in many countries this plant is the last source of food before wintering. Data concerning the

amount of pollen produced as well as the total protein content percentage for the plants discussed in this work are presented in Table 1.

Table 1. The amount of pollen produced and the percentage of total protein content

Taxon	Pollen production	Total Protein Content [%]	References
<i>Corylus</i> sp.	0.17 kg/bush	no literature data available	[23]
<i>Brassica napus</i> L.	9.3 kg pollen per ha per day	27.27	[24]
<i>Pinus</i> sp.	100-1000 kg/ha	11.7-13.7	[25,26]
<i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth	180 kg/ha	27.44	[20]
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	25 kg/ha	9-11.4	[27]
<i>Solidago canadensis</i> L.	30.7 kg/ha	29.22	[28]
<i>Solidago gigantea</i> Aiton	6.5 kg/ha	23.61	

Hunger and malnutrition are serious problems facing the present-day world, affecting not only humans but also animals. Little is known about the impact of hunger and malnutrition on insect physiology [29]. As a result of anthropogenic threats related to climate change, honeybees are being increasingly exposed to nutritional stress [30,31]. Moreover, there is a link between nutritional stress and microbial infections of the insect digestive tract, which impair digestion and nutrient absorption, causing energy stress [32,33]. From a physiological perspective, a pollen-based diet conditions the development of hypopharyngeal glands, influencing jelly production, midgut histology, and the quantity and types of hemocytes in hemolymph. It also impacts hormone production, immunity peptide synthesis, gene expression, bee mass, energy metabolism and ultimately, longevity [10,11,22,34-39]. A properly balanced diet ensures homeostasis between the honeybee digestive tract, hemolymph, and fat body. Hemolymph serves as a reservoir of nutrients that are rapidly utilized, for example, during the flight [40]. In honeybees, the open circulatory system causes the fat body cells to be washed by the hemolymph, facilitating nutrient exchange. The fat body acts as the primary storage site for nutrients, such as protein, glycogen and triglycerides, derived from a pollen-based diet. Besides their storage function, fat body trophocytes secrete and detoxify organic substances [41-43]. The metabolic activity of oenocyte nuclei depends on the nutrients provided from a pollen diet [10]. Moreover, a pollen diet influences the

synthesis of antimicrobial peptides (AMP) such as apidaecin, abaecin, defensin, and hymenoptaecin in the fat body [11]. AMP are short peptides that inhibit the viability of Gram-positive and Gram-negative bacteria, viruses and fungi [44,45].

Nutritional stress triggers the activation of the insect's innate immune system. Honeybee innate immunity comprises cellular and humoral responses. Cellular immunity involves the action of hemocytes in the hemolymph, facilitating processes such as nodulation, encapsulation, and phagocytosis [46-48]. Humoral immunity involves the production of proteins that protect against pathogen invasion and development. This response includes the proteolytic system (proteases and protease inhibitors), the antioxidant system, and biochemical markers [47]. Proteolytic enzymes indirectly influence the activation of the phenoloxidase cascade [49]. The proteolytic system in honeybees consists of proteases (endo- and exoproteases) and protease inhibitors [50]. Proteases exhibit relative specificity depending on the pH. The activities of these enzymes are influenced by factors such as individual development, caste (queen, worker, drone), environmental pollution levels, physiological state, stress factors, pathogens like bacteria, viruses, fungi, exposure to substances, such as acaricides and biostimulants, and even the size of the comb cell as a factor within the bee environment [6,48,50-54]. Given the multitude of factors affecting proteases and their inhibitor activities, it is highly probable that the proteolytic system of honeybees is also shaped by pollen-based diets.

Therefore, we decided to investigate how the main pollens from Central and Eastern Europe and other regions, particularly in the context of a mono-diet, affect the proteolytic system of honeybees as one of their immunity mechanisms. We hypothesized that (Hypothesis 1) different types of pollen would affect proteolytic enzyme activities in the fat body and hemolymph in distinct ways, (Hypothesis 2) pollen from insect-pollinated plants would have a greater impact on increasing protease and protease inhibitor activities than pollen from wind-pollinated plants, and (Hypothesis 3) a diet based on sugar candy only may disturb the balance of proteases and their inhibitors in the fat body and hemolymph and be more harmful than a monodiet. The aim of the study was to determine the effects of pollen from wind-pollinated plants: hazel (*Corylus* sp.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) and insect-pollinated ones: rapeseed (*Brassica napus* L.), phacelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth), buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), and goldenrod (*Solidago* sp.) on the activities of the proteolytic system in the tergite 3, tergite 5 or sternite fat bodies and in the hemolymph.

Material and methods

Pollen loads collection and microscopic pollen analysis

Monofloral pollen diets were chosen to reflect the most frequently occurring plant pollen types in Central and Eastern Europe and other parts of the world. Fresh pollen loads were collected from hives using pollen traps at various times throughout the flowering season, spanning the period from May 2022 to October 2023. The colonies were subject only to minimal disturbance due to pollen collection, and all other experimental conditions were carefully controlled to ensure their undisturbed development. The areas in Poland from which the pollen loads were sourced are considered unpolluted and free from heavy metal and pesticide contamination. A manual colour sorting process was implemented to isolate the dominant pollen type from each pollen load. Microscopic preparations were then made and analyzed using the methods described by Filipiak et al. [16] to confirm the botanical origin of the pollen. In this way, pollens were obtained from wind-pollinated plants: hazel (*Corylus* sp.) and pine (*Pinus sylvestris* L) and insect-pollinated ones: rapeseed (*Brassica napus* L.), phacelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth), buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), and goldenrod (*Solidago* sp.). The percentage of the dominant pollen in the sample of pollen loads was at least 80%. The sorted pollen was maintained at a temperature of -25°C until it was utilized for the preparation of sugar candy.

Experimental Design

Studies were conducted on bees from the apiary of the University of Life Sciences in Lublin, Poland (51.224039N–22.634649E), originating from colonies of similar strength and age, which were not subjected to any treatment with antibiotics or fungicides. In this way, it was assumed that the bees' immune system functioned naturally, without the influence of harmful external factors, as well as without the action of stimulants. The experiment began with obtaining 1-day-old worker honey bees (*A. mellifera carnica*) according to the method of Bryś et al. 2025 [22]. Freshly emerged worker bees were placed in 12 cages per the group (40 workers in each cage), with a division into 7 groups: a control group fed with sugar candy and six groups fed from the first day with sugar candy with the addition of 10% of the given pollen: hazel, rapeseed, pine, phacelia, buckwheat, and goldenrod (Fig. 1). We did not record any spores of *Vairimorpha/Nosema* in the cage test bees during the experiment (each group of sample worker bees was checked when 7 days old and 14 days old). Every two days, dead

workers were removed from the cages and food and water were supplemented ad libitum. When the workers were 7 and 14 days old, 2 of them were collected from each cage (n=24 workers per group, the exception group fed rapseed where n=12 workers per group) and laboratory analyzes were performed. This produced the following dataset: 24 one-day-old workers + (24 worker bees × 7 feeding groups) × 2 age groups (7- and 14-day-old).

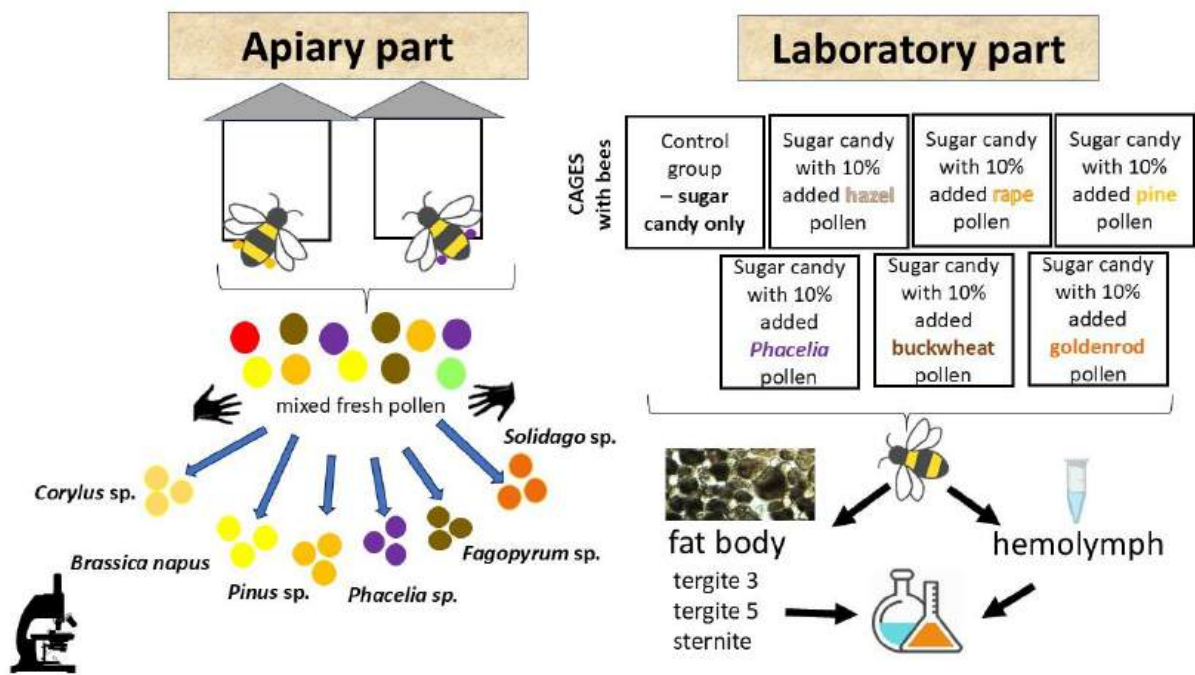


Figure 1. Schematic overview of the experiment design

Hemolymph, Fat Body Collection and Determination of Proteolytic System Activities

Hemolymph samples were collected from living bees using a glass capillary (20 µl; ‘end to end’ type; without an anticoagulant; Medlab Products, Raszyn, Poland) according to the Łoś and Strachecka’s [55] method into a sterile Eppendorf tube containing 200 µL of 0.6% *natrium chloratum* (concentration dedicated for honeybees) and immediately frozen at -23°C. Using a stereomicroscope, the fat body from tergite 3, tergite 5 and sternite was prepared [42]. The proteolytic system activity was determined in fat body homogenates and hemolymph samples:

- activities of acidic (pH 2.4), neutral (pH 7.0) and alkaline (pH 11.2) proteases according to the Anson method [56] modified by Strachecka et al. [50]

- activities of natural inhibitors of acidic (pH 2.4), neutral (pH 7.0) and alkaline (pH 11.2) proteases according to the Lee and Lin method [57].

The supernatants were analyzed spectrophotometrically (Synergy HTX (SILFA); Warsaw, Poland) to measure absorbance at 280 nm.

Statistics

Statistical analyses were performed using Statistica formulas (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA), 13.3 (2017) version for Windows — StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Data distribution was checked using the Shapiro-Wilk test. Proteolytic enzyme activities in different tissues / fat body locations (tergite 3, tergite 5, sternite and hemolymph) in the 1-day-old workers (n = 24 bees) were compared using the Mann-Whitney U test. For each type of pollen, the effect of tissue / fat body locations (tergite 3, tergite 5, sternite and hemolymph) on the activities of acidic, neutral and alkaline proteases and their inhibitors was assessed in the 7- and 14-day-old workers (n = 24 bees per group, with the exception of the group receiving sugar candy with rapeseed where n = 12). Normally distributed data were analysed with ANOVA and the Kruskal–Wallis test was employed for non-normally distributed data. Proteolytic enzymes activities for hazel, rape, pine, phacelia, buckwheat and goldenrod pollen were compared inside the tissue/location of fat body (fat body from tergite 3, tergite 5, sternite) and hemolymph. A comparison was made with a control group within the age group for the 7- and 14-day-old insects, respectively. The t-Student test was used for normally distributed data and the Mann-Whitney U test was employed for non-normally distributed data. According to the above model, a comparison was also made between the influence of pollen from wind-pollinated plants (hazel and pine) and that from insect-pollinated ones (rapeseed, phacelia, buckwheat, goldenrod) on the enzyme activities.

Results

In the one-day-old worker bees, the tissue location (hemolymph or fat body from tergite 3, tergite 5 or sternite) had a statistically significant effect on the activities of proteases and their inhibitors (Table 2). The statistically significant highest activities of proteases were identified in the hemolymph and the lowest in tergite 3 of 1-day-old honeybee workers ($p \leq 0.01$). The same trends were observed for protease inhibitors. The activities of protease inhibitors in the 1-day-old workers were statistically significant in the comparison between the hemolymph

and different fat body locations at $p \leq 0.05$ (Table 2). At both 7 and 14 days of age, in each of the feeding groups, the tissue / fat body locations (tergite 3, tergite 5, sternite fat body or hemolymph) had a statistically significant effect on the activities of proteases and their inhibitors (Table 3).

Table 2 Activities of the proteolytic system in the hemolymph and fat body (tergite 3, tergite 5 or sternite) of 1-day-old *A. mellifera* L. workers

Tissue/location	Protease Activities (U/mg)			Protease Inhibitor Activities (U/mg)		
	Acidic	Neutral	Alkaline	Acidic	Neutral	Alkaline
Hemolymph	0.13 (± 0.02) ^A	0.19 (± 0.02) ^A	2.32 (± 0.29) ^A	2.91 (± 0.37) ^A	0.58 (± 0.07) ^A	1.12 (± 0.14) ^A
Tergite 3	0.07 (± 0.01) ^{BD}	0.11 (± 0.01) ^B	1.24 (± 0.08) ^{Bd}	1.53 (± 0.10) ^{BDa}	0.31 (± 0.02) ^{BD}	0.61 (± 0.04) ^{BD}
Tergite 5	0.08 (± 0.01) ^{BC}	0.12 (± 0.01) ^C	1.45 (± 0.05) ^{BC}	1.79 (± 0.07) ^{BC}	0.31 (± 0.02) ^{BC}	0.61 (± 0.03) ^{BC}
Sternite	0.07 (± 0.01) ^{BD}	0.10 (± 0.01) ^D	1.21 (± 0.02) ^{BD}	1.64 (± 0.02) ^{BDb}	0.34 (± 0.01) ^{BD}	0.79 (± 0.01) ^{BD}

The average protease activities and their inhibitors in a bee organism. Standard deviation is shown in round brackets. Different uppercase letters A, B, C, D indicate statistical differences between the tissue / fat body location (in columns) at the $p \leq 0.01$ significance level; different lowercase letters a and b at the $p \leq 0.05$ significance level.

Except for the acid protease activities in tergite 5 of the rapeseed-fed 14-day-old workers, protease activities in the hemolymph and the tergite 3, tergite 5, and the sternite apian fat bodies were statistically significant ($p \leq 0.01$) in the 7- and 14-day-old workers consuming rapeseed, phacelia, buckwheat, and goldenrod compared to those fed sugar candy only (Fig. 2, Fig. 3).

228 **Table 3.** Effect of tissue (fat body, hemolymph) / fat body location (tergite 3, tergite 5,
 229 sternite) in the different age groups of workers (7 and 14 days) on the activities of proteases
 230 and their inhibitors in the *A. mellifera* workers fed sugar candy only (control group) and in
 231 those receiving sugar candy with a pollen addition

Groups	Age of workers											
	7-day-old						14-day-old					
	Acidic proteases	Neutral proteases	Alkaline proteases	Acidic proteases inhibitors	Neutral proteases inhibitors	Alkaline proteases inhibitors	Acidic proteases	Neutral proteases	Alkaline proteases	Acidic protease inhibitors	Neutral protease inhibitors	Alkaline protease inhibitors
Control gr.	H = 89.07 p = 0.000	F = 89.07 p = 0.000	F = 89.07 p = 0.000	F = 80.23 p = 0.000	F = 75.52 p = 0.000	F = 80.18 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000
Hazel	H = 89.72 p = 0.000	H = 89.72 p = 0.000	H = 89.72 p = 0.000	H = 86.51 p = 0.000	H = 89.72 p = 0.000	H = 65.90 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000
Rapseed	H = 44.08 p = 0.000	H = 44.08 p = 0.000	H = 44.08 p = 0.000	H = 44.08 p = 0.000	H = 44.08 p = 0.000	H = 43.61 p = 0.000	H = 44.08 p = 0.000	H = 44.09 p = 0.000	H = 44.09 p = 0.000	H = 44.09 p = 0.000	H = 44.09 p = 0.000	H = 44.09 p = 0.000
Pine	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	F = 88.95 p = 0.000	F = 89.07 p = 0.000	H = 87.09 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000
Phacelia	H = 88.13 p = 0.000	H = 88.13 p = 0.000	H = 88.13 p = 0.000	H = 88.14 p = 0.000	H = 88.14 p = 0.000	H = 81.96 p = 0.000	H = 87.17 p = 0.000	H = 87.16 p = 0.000	H = 87.17 p = 0.000	H = 87.18 p = 0.000	H = 87.18 p = 0.000	H = 87.18 p = 0.000
Buckwheat	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.013	H = 88.05 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000
Goldenrod	H = 89.06 p = 0.000	H = 89.09 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	F = 84.95 p = 0.000	F = 89.08 p = 0.000	H = 86.88 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.08 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000	H = 89.07 p = 0.000

232 H – statistical value in the Kruskal–Wallis test; F – value of Fisher’s test in ANOVA; p – probability value.

233 Protease activities in the hemolymph increased with the age of the (1-, 7- and 14-day-
 234 old) workers on all the pollen monodiets and in the control group (Fig. 2, Fig. 3).

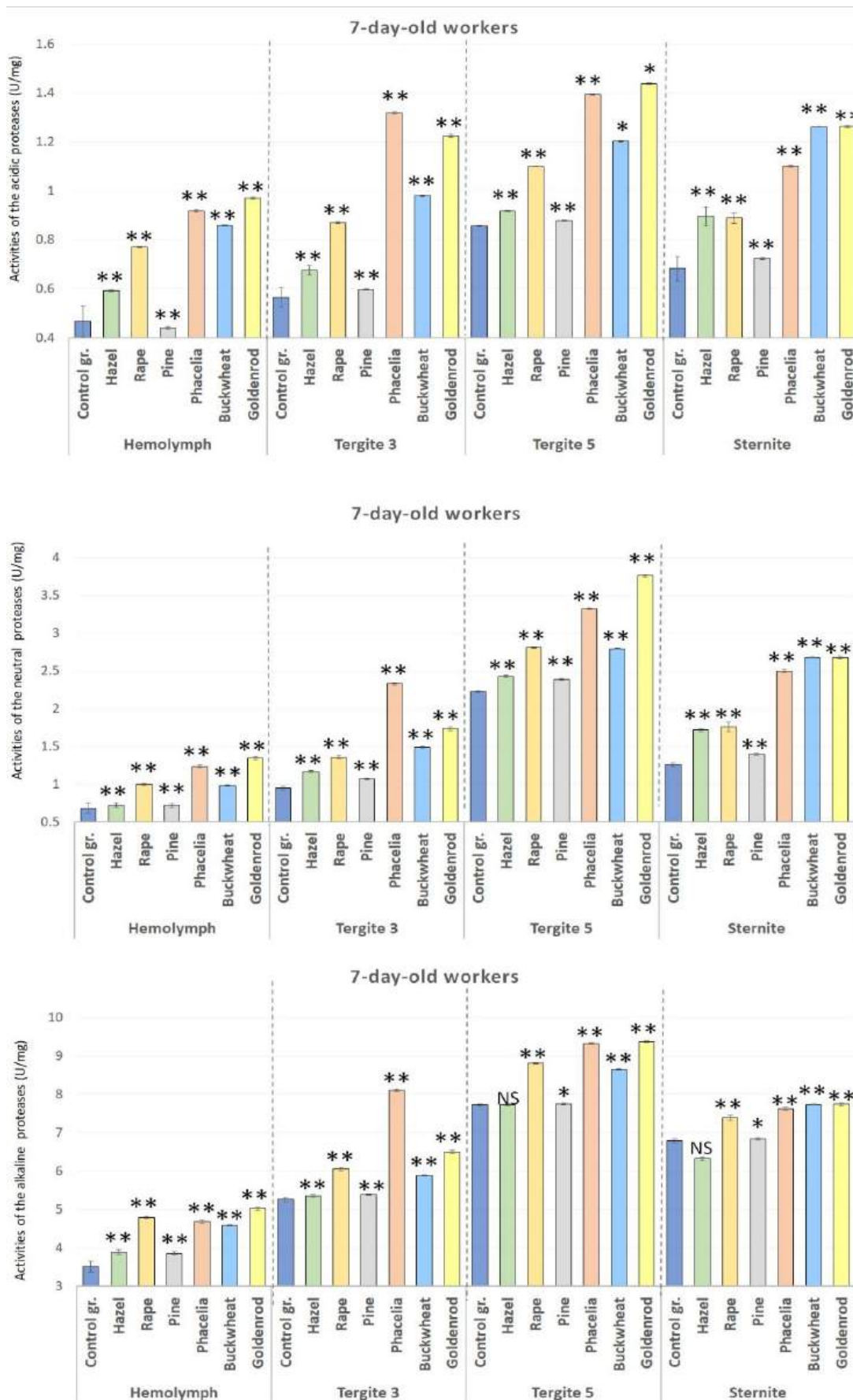


Figure 2. The activities of acidic, neutral, and alkaline proteases in the hemolymph and in the tergite 3, tergite 5 and sternite fat body in the 7-day-old workers fed sugar candy only and in those receiving sugar candy with various pollen additions; * – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.05$; ** – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.01$; n=24 (with the exception of the group fed rapeseed where n=12); NS – not significant; vertical bars indicate standard deviation.

As compared to the control group, the acid, neutral and alkaline protease activities were statistically significantly higher in the 7- and 14-day-old workers fed with a 10% pollen supplement (except for alkaline protease in tergite 5 and sternite in the 7-day-old-workers) (Fig. 2).

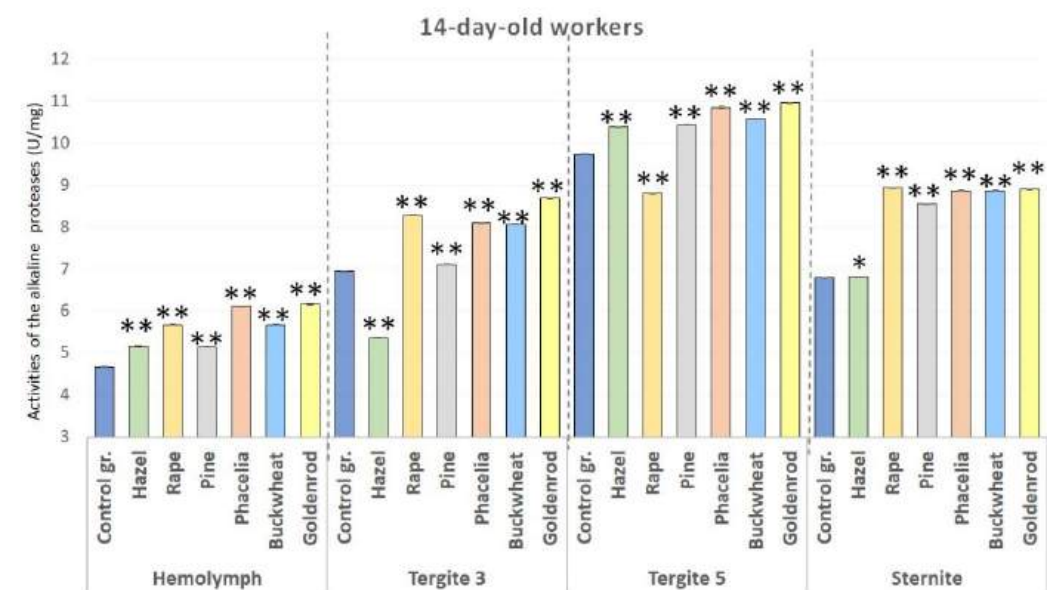
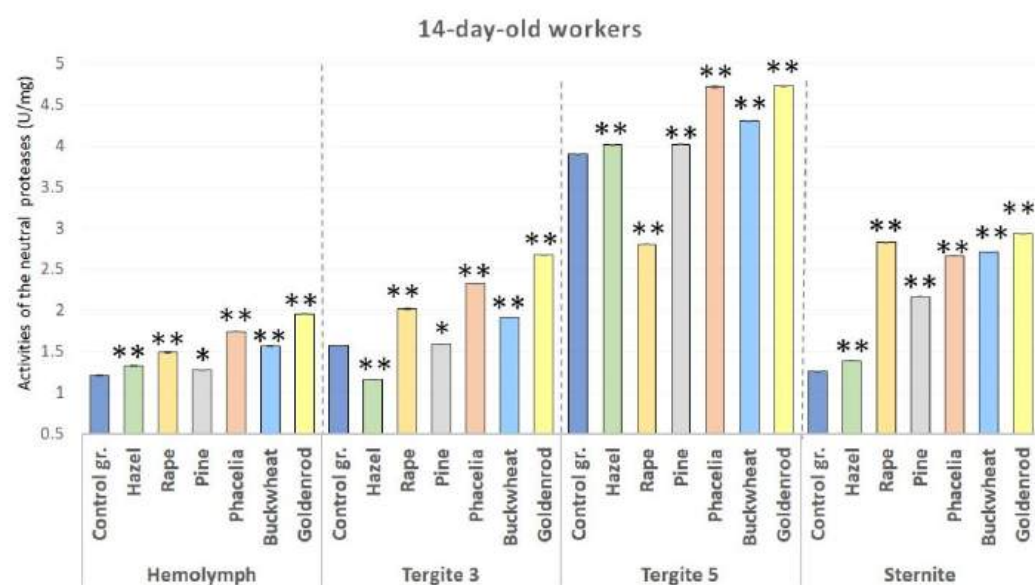
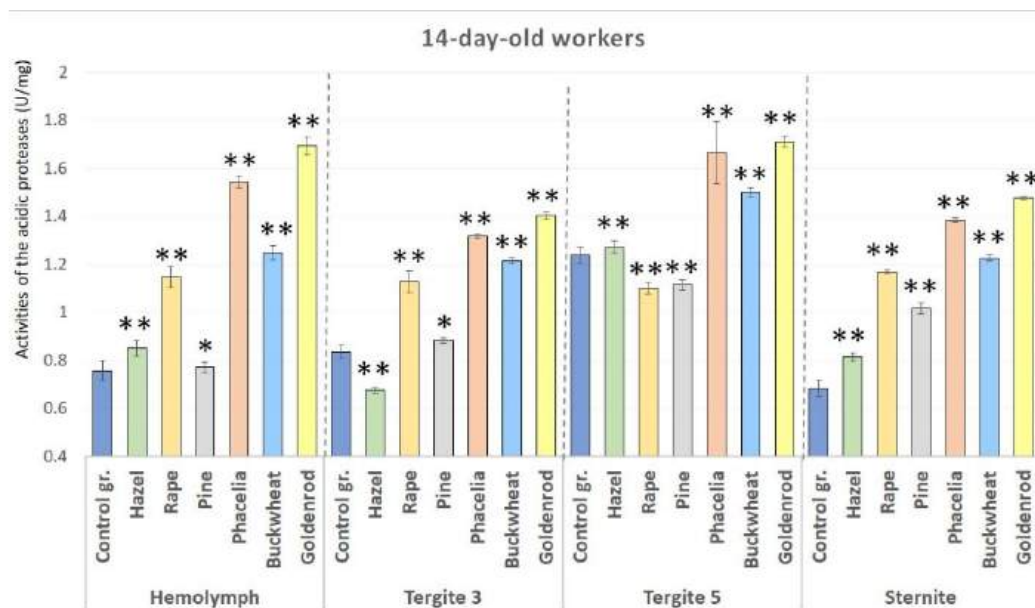


Figure 3. The activities of acidic, neutral, and alkaline proteases in the hemolymph and the fat body from tergite 3, tergite 5 and sternite in the 14-day-old workers fed sugar candy only and in those receiving sugar candy with various pollen additions; * – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.05$; ** – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.01$; $n=24$ (except for the group fed rapseed where $n=12$); vertical bars indicate standard deviation.

The activities of acidic, neutral and alkaline protease inhibitors in the hemolymph increased with age regardless of the group (Table 2, Fig. 4, Fig. 5). In the tergite 3, tergite 5, and sternite fat bodies and also in the hemolymph, the activities of acid and alkaline protease inhibitors in the bees fed sugar candy only (control group) at 7 and 14 days of age were significantly lower as compared to all the pollen monodiets ($p \leq 0.01$) (Fig. 5) even in those receiving hazel pollen or pine pollen candy ($p \leq 0.05$) (Fig. 4, Fig. 5).

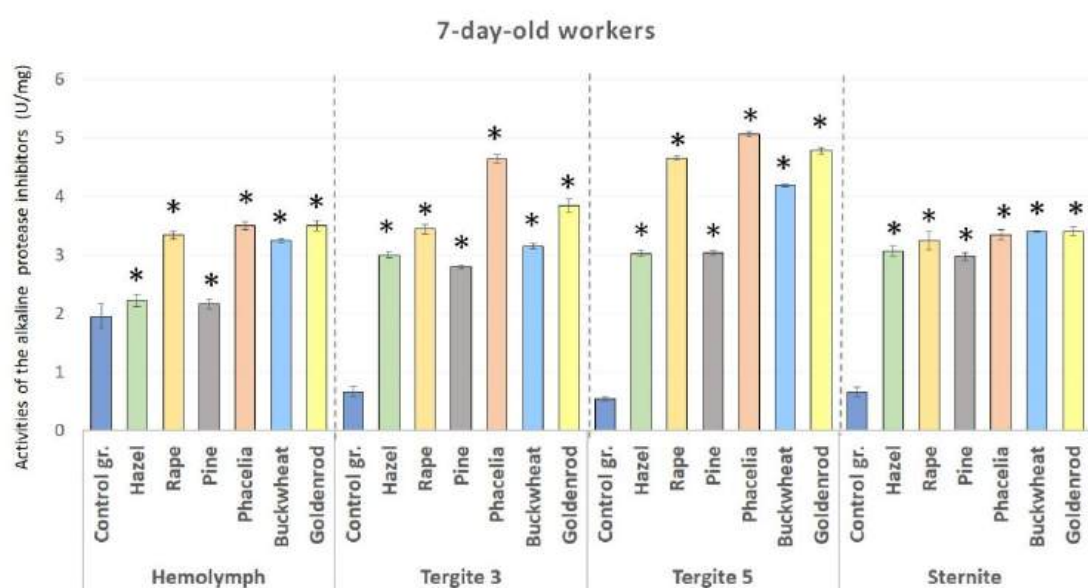
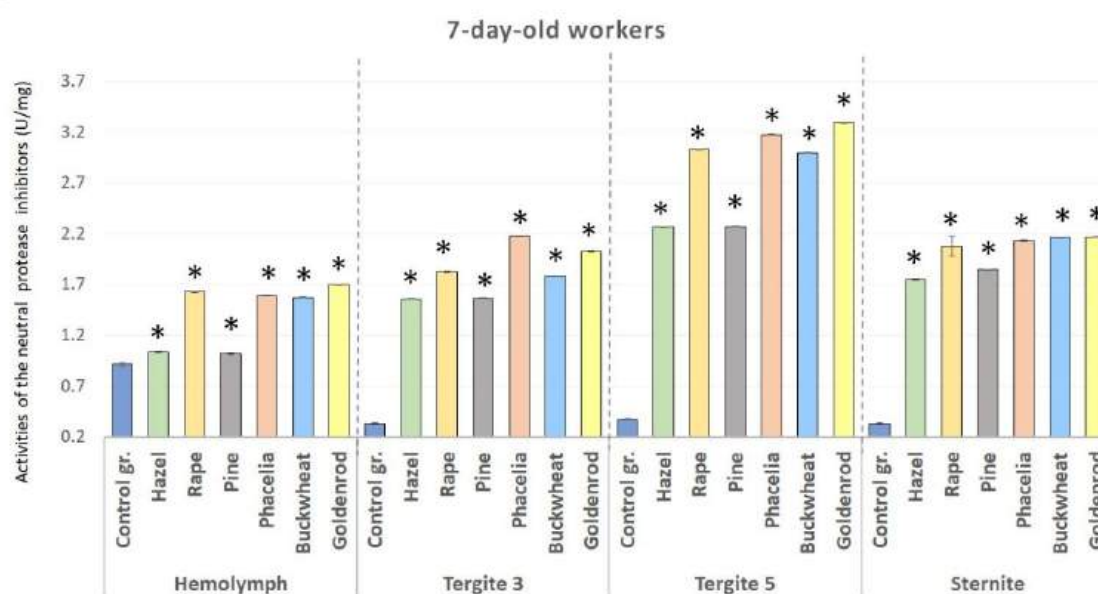
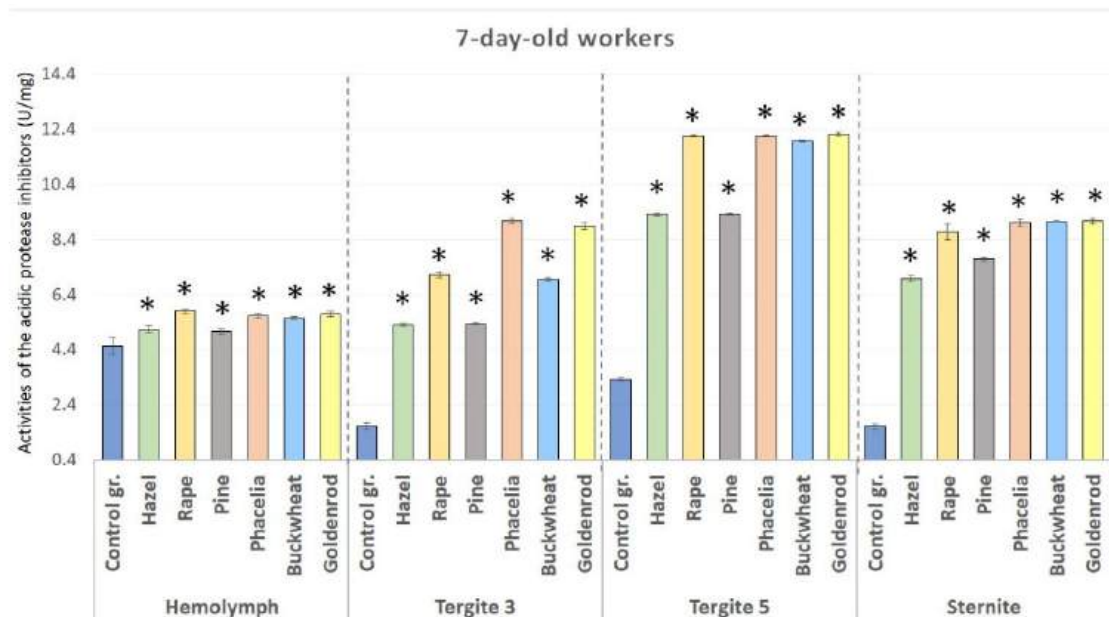


Figure 4. The activities of acidic, neutral, and alkaline protease inhibitors in the hemolymph and the tergite 3, tergite 5 and sternite fat bodies in the 7-day-old workers fed sugar candy only and in those receiving sugar candy with various pollen additions; * – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.01$; n=24 (with the exception of the group fed rapeseed where n=12); vertical bars indicate standard deviation.

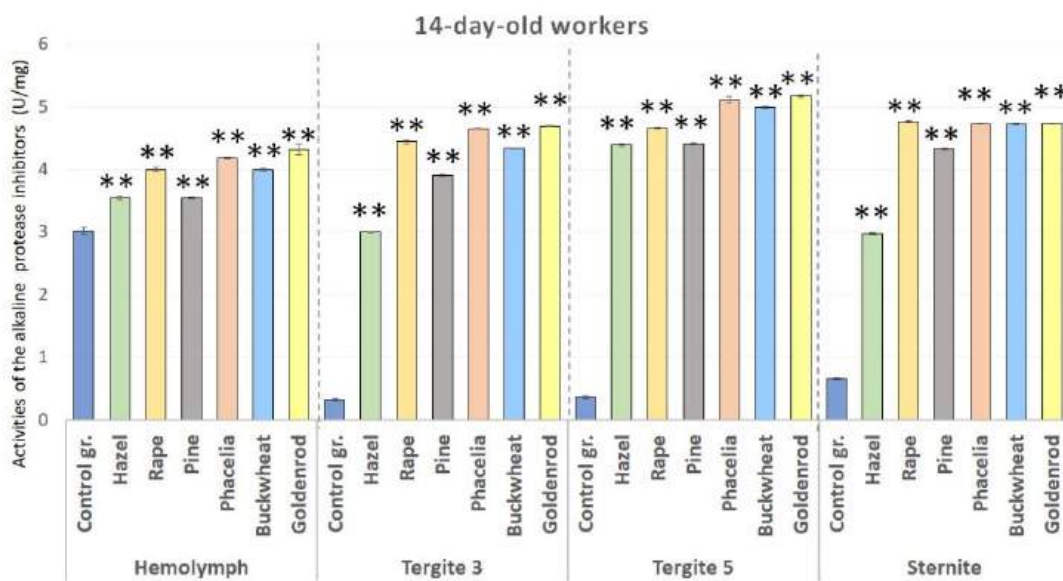
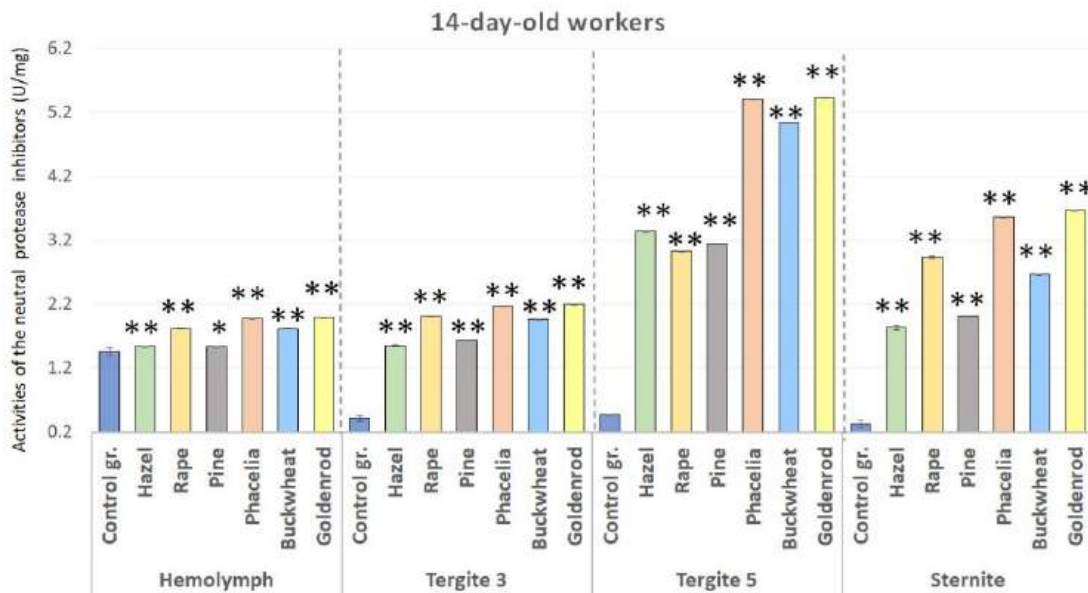
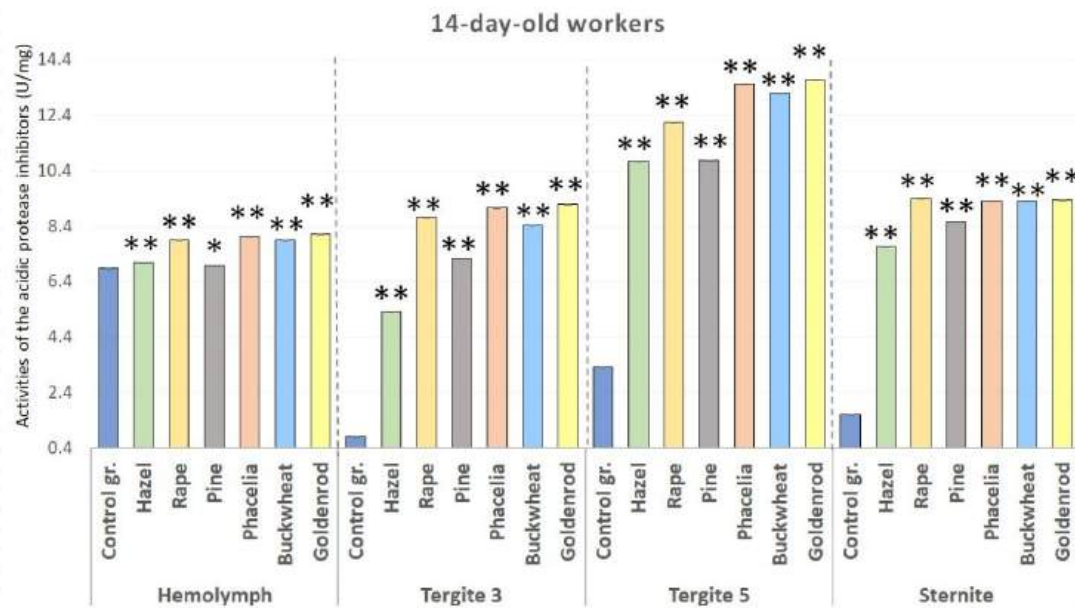


Figure 5. The activities of acidic, neutral, and alkaline protease inhibitors in the hemolymph and the tergite 3, tergite 5 and sternite fat bodies in the 7-day-old workers fed sugar candy only and in those receiving sugar candy with various pollen additions; * – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.05$; ** – discrepancies between the workers administered pollen and the control ones in identical tissues/sites are meaningful at $p \leq 0.01$; $n=24$ (except for the group fed rapeseed where $n=12$); vertical bars indicate standard deviation.

No significant differences between the bees fed hazel and pine pollen were found for the activities of proteases or protease inhibitors in the hemolymph between the 7- and 14-day-old workers ($p > 0.05$). Proteolytic activities in the fat body (tergite 3, tergite 5 and sternite) of the 7- and 14-day-old workers fed with pollen produced by insect-pollinated plants (rape, phacelia, buckwheat and goldenrod) were significantly higher than those determined for the bees fed with candy containing hazel or pine pollen ($p = 0.01$).

Discussion

It is widely recognized that the expression of the immune system in vertebrates and invertebrates, including pollinating insects, depends closely on their nutritional status [58-63]. In an era of anthropopressure, the growth of large-scale farms and monocultures, bee dietetics is a rapidly developing field [64]. Most publications focus on the quality of pollen (its biochemical composition) [58,65], omitting aspects related to the impact of this food on the physiology and immunity of honeybees. Therefore, our publication fits into this scientific discourse and complements the available knowledge with these aspects. In our study, we utilized pollens from plants commonly consumed by bees throughout Europe, including hazel, rapeseed, pine, *Phacelia*, buckwheat, and goldenrod.

We have shown that the activity of the proteolytic system in bees fed with one type of pollen is higher than in those fed with sugar candy only (Hypothesis 3). This leads to the conclusion that although a monodiet is a stress factor for bees, in comparison to feeding bees with only sugar, its influence on the physiology of the bee organism can be considered beneficial. As indicated by [66], in order to build the protein potential of a bee organism, pollen cell walls are dismantled in the digestive tract by various mechanisms (e.g. enzymes or osmotic shock) to get to the nutrient-rich cytoplasm. These compounds enter the fat body

through the hemolymph, where they participate in the synthesis of proteins, including those that are part of the proteolytic system. The differences in the activities of the proteolytic system compounds in workers fed with different types of pollen may result firstly from different concentrations of total proteins in each of the analyzed pollens, cf. Table 1. Secondly, the compounds can be digested and absorbed into the organism in different degrees [67,68]. It is worth adding that the contents of proteins, carbohydrates, lipids and other biological compounds in pollen are determined by various geographical factors (plant origin and environmental conditions) [69], and the question arises whether the differences in the biochemical composition of pollen within the same species are significant enough to affect the proteolytic system of bees. This issue requires clarification in further studies. Basulado et al. [70] also noted that the type of pollen consumed influenced the total protein concentrations in the fat body of bees. Moreover, Alaux et al. [35] showed a correlation between the crude protein contents of pollens and insect immunity. Also, Danihlik et al. [11] and Negri et al. [60] showed that, by providing exogenous amino acids, bee pollen affects peptide synthesis and the regulation of immune gene expression. As our studies have shown, the activities of proteases and their inhibitors depend on the type of pollen and were always higher in the bees fed with candy supplemented with rapeseed, phacelia, buckwheat and goldenrod pollen as compared to those fed with hazel and pine candy (Hypothesis 1 and 2). These results are consistent with our previous observations [10], in which we showed that the protein concentrations in the hemolymph and fat body are higher after bees have consumed food supplemented with pollen from entomophilous plants rather than from anemophilous plants. The wind-pollinated plants produce pollen that is low in crude protein. In many areas of Central and Eastern Europe, hazel is the primary pollen source in early spring, and honey bees are almost entirely reliant on it. The results of this paper clearly confirm that hazel and pine pollen are very good food for bees after winter or during periods without nectar production and provide them with a large dose of sugars necessary for energy production to rear brood [10] and also for metabolic processes related to cellular and humoral immune responses [58]. This is important at a time of climate change, which results in accelerated flowering of plants, modifications in the availability of floral resources [71,72] and temperature changes, especially in autumn and winter [73]. Therefore, diets based on late summer and early autumn pollens, such as *Phacelia*, buckwheat and goldenrod, by moderating the activity of the proteolytic system, consequently influence the vitality, longevity and successful overwintering of bees. Particularly high activities of proteases and protease inhibitors were observed in the bees fed with phacelia pollen candy. Beekeepers frequently sow *Phacelia* in the summer

(between June and July/August) to provide bees with a consistent supply of pollen and nectar. The rapid growth and flowering of this plant make it ideal for agricultural areas, offering protein-rich pollen, especially when bee food sources are scarce.

We have shown that the activity of the proteolytic system increased with the age of the workers, both in the hemolymph and in the fat body. On the first day of life, higher activities of these compounds were observed in the bee hemolymph as compared to the different fat body locations. However, on the following days, the opposite is usually the case. It can therefore be assumed that a newly emerged bee has reserves of active proteases and their inhibitors synthesized during the preimaginal period. In order for this system to perform its function efficiently, it requires the additional synthesis and activation of individual proteases and protease inhibitors, for which protein from pollen is necessary (Fig. 6). It is worth noting here that the activity of the proteolytic system has so far been described only in the hemolymph and no relationship has been demonstrated between this tissue and the fat body, especially using the segmental approach, in older bees. Performing studies of only 1-day-old bees, Strachecka et al. ⁵⁰ observed that the activities of these compounds were the highest in the fat body of tergite 3. The differences in the results between these two experiments may stem from the season in which they were conducted, the conditions that prevailed in the colonies, and other factors (e.g. stressors). Strachecka et al. [50] do not provide any information about the health condition of the bees in their publication. The bees for our experiment came from strong and healthy colonies. Undoubtedly, an innovative aspect of the present study is to determine the effect of the particular types of pollen on the activity of the proteolytic system in different tissues (hemolymph vs. fat body) and different fat body locations (tergite 3 vs. tergite 5 vs. sternite). When comparing the activities of the proteolytic system between the respective fat body locations/segments, we observed the highest values in tergite 5, regardless of the age of the bees fed with pollen-supplemented candy. In line with Bryś et al.'s [22] studies, this suggests that tergite 5 performs detoxification and neutralization functions, and these two (proteolytic and antioxidant) systems cooperate to eliminate the negative effects of active threats (e.g. pathogens, pesticides, etc.). Proteolytic enzymes “cut” the pathogen’s proteins into smaller units [51]. Increased activities of protease inhibitors provide protection for the bee organism against proteases produced by the pathogens, preventing them from penetrating body cavities and developing [49]. Strachecka et al. [50] demonstrated that acidic protease inhibitors target pathogenic fungi, basic inhibitors target bacteria and viruses, and neutral inhibitors target other stressors. Thus, a diet solely based on sugar candy, without access to protein, makes bees more susceptible to diseases and

parasities. The associated reactions generate reactive oxygen species, which are removed by antioxidants [74]. Moreover, intercellular proteolytic enzymes can recognize and preferentially degrade oxidatively damaged proteins to amino acids [50]. The differentiation of the activities of proteases and their inhibitors in different fat body locations/segments, thus, corroborates the segmented organization of the subcuticular fat body, as proposed by Strachecka et al. [42]. The segmented structure of the fat body underlies the varying activities of proteolytic and antioxidant enzymes (particularly in tergite 5) and energy compounds (in tergite 3 and the sternite), implying distinct physiological functions of the individual fat body segments [10,22,50]. Moreover, higher activities of proteases and their inhibitors generated by a pollen diet will constitute a kind of barrier against other harmful factors such as *Vairimorpha/Nosema*, *Varroa*, etc. Interestingly, if the bees did not have access to pollen (a protein-free diet; control group), then it was not in the fat body but in the hemolymph of the 7- and 14-day-old workers that the highest activities of proteases and protease inhibitors were identified, just like in 1-day-old bees. We can therefore conclude that the lack of pollen in the diet limits the synthesis and activation of the compounds of the proteolytic system. This observation clearly verifies our hypothesis that a diet based on sugar candy only may disturb the proteolytic system activity and pose a potential risk of exposure to other stressors.

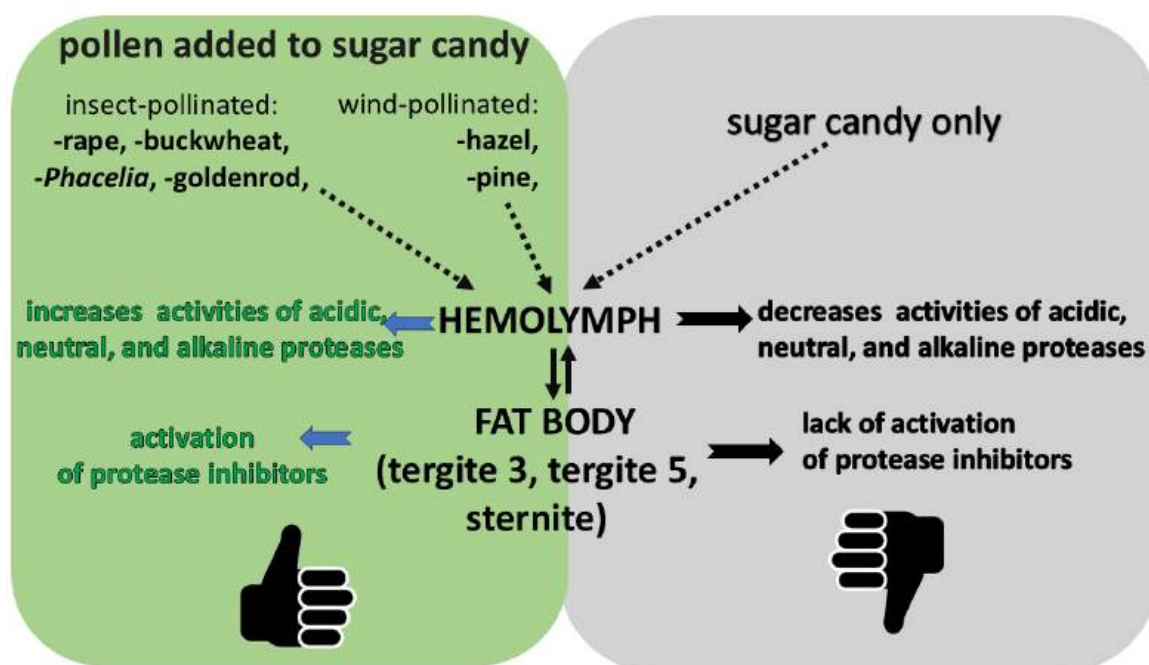


Figure 6 The effect of the pollen monodiets on protease and protease inhibitor activities in the *A. mellifera* workers fed sugar candy only (control group) and in those receiving sugar candy with a pollen addition.

391

392 Various stressors, such as *Varroa destructor*, pesticides like imidacloprid,
393 electromagnetic fields, and beekeeping practices (e.g. the comb cell size, formic acid use)
394 affect the proteolytic system [6,52,54,75]. For example, exposing bees to a 50 Hz electric
395 field at different intensities for 12 hours increased protease activities [75]. Paleolog et al. [6]
396 showed that imidacloprid destabilizes the hemolymph proteolytic system of bees and impairs
397 the cuticular proteolytic layer. In our study, the monodiet, considered an environmental
398 stressor, did not significantly stress the hemolymph proteolytic system but performed better
399 than a sugar-only diet. To counteract biotic, abiotic, and anthropogenic stressors, natural
400 biostimulants such as caffeine, coenzyme Q10, curcumin, and the hemp extract are
401 recommended, as they enhance protease and protease inhibitor activities in honeybee
402 hemolymph [48,53,76,77]. However, although biostimulants have a positive effect, we believe
403 that pollen-based diets are more desirable for stimulating the proteolytic system, as they
404 provide protection against other stressors. We confirmed that a balanced diet is essential for
405 the proper functioning of the immune system. Hence, further studies are needed to establish
406 the relationship between nutrition and immunity in the face of other stressors.

407

408 **Conclusion**

409 Large-scale cultivation of oilseed plants, multi-hectare cereal crops, and the expansion
410 of invasive plants lead to honey bees subsisting on monodiets. That is why our research fits
411 into the current trend and scientific discourse. Understanding the associated biochemical
412 mechanisms, also in terms of the immune system, is the starting point for attempting to stop
413 the decline in the numbers of pollinating insects. To our knowledge, our research is the first to
414 show the effect of the main pollen-producing plants (hazel, rapeseed, pine, phacelia,
415 buckwheat and goldenrod) that constitute the basic source of pollen from spring to autumn in
416 many European countries on the immune system, in relation to the hemolymph and the
417 segmental structure of the subcuticular fat body in *A. mellifera*.

418 We have proven that the activity of the proteolytic system in bees fed with one type of
419 pollen is higher than in those receiving sugar candy only. Although a monodiet is a stress
420 factor for bees, its effect on the physiology of a bee's body can be considered beneficial in
421 comparison with feeding the insects exclusively with sugar candy. The activities of proteases

and their inhibitors depend on the type of pollen and were always higher in the bees fed with candy supplemented with rapeseed, *Phacelia*, buckwheat and goldenrod pollen (insect-pollinated plants) compared to those fed with hazel and pine (wind-pollinated plants). The highest activities of proteases and protease inhibitors were observed in the bees fed with candy enriched with phacelia pollen. In practical terms for beekeepers, a 10% addition of pollen to sugar candy will be a viable and economical solution during the spring development or periodic gaps in the availability of pollen sources. A multi-pollen diet is always more beneficial for the bee's body than a mono-pollen diet, but in order to understand the mechanisms in action here, the feeding regimen should be considered in the context of a monodiet.

Funding

This study was funded, in part, with the National Science Centre, Poland (NCN); PRELUDIUM Grant No. 2022/45/N/NZ9/01333 and with the research projects of the Doctoral School at the University of Life Sciences in Lublin, No. SD/286/176/2022 and SD/72/NB/2023. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright license to any author-accepted manuscript (AAM) version arising from this submission.

Data availability

The raw data is available from the corresponding author. Anyone can access the raw data after sending a query. Moreover, the raw data is stored in the repository of the University of Life Sciences in Lublin (link URL: <https://doi.org/10.18150/XUGLGS>)

Author contributions

Conceptualization, M.S.B. and A.S.; methodology, M.S.B., K.O. and A.S.; software, M.S.B.; validation, M.S.B.; formal analysis, M.S.B.; resources, M.S.B. and K.O.; data curation, M.S.B.; writing—original draft preparation, M.S.B.; writing—review and editing, M.S.B.,

K.O. and A.S.; visualization, M.S.B.; supervision, A.S.; project administration, M.S.B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. Roffet-Salque M, Regert M, Evershed RP, Outram AK, Cramp LJE, Decavallas O, et al. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature*. 2015;527: 226–230. doi:10.1038/nature15757
2. Migdał P, Bieńkowski P, Cebrat M, Berbeć E, Plotnik M, Murawska A, et al. Exposure to a 900 MHz electromagnetic field induces a response of the honey bee organism on the level of enzyme activity and the expression of stress-related genes. *PLoS ONE*. 2023; 18(5), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285522>
3. Tahir F, Goblirsch M, Adamczyk J, Karim S, Alburaki M. Honey bee *Apis mellifera* L. responses to oxidative stress induced by pharmacological and pesticidal compounds. *Front. Bee Sci.*. 2023;1. doi:10.3389/frbee.2023.1275862
4. Dong ZX, Tang QH, Li WLI, Wang ZW, Li XJ, Fu CM, et al. Honeybee (*Apis mellifera*) resistance to deltamethrin exposure by Modulating the gut microbiota and improving immunity. *Env. Pol.* 2022;314: 120340. doi:10.1016/J.ENVPOL.2022.120340
5. Vázquez DE, Ilina N, Pagano EA, Zavala JA, Farina WM. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One*. 2018;13: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0205074
6. 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. doi:10.1007/s13592-020-00747-4
7. Chęć M, Olszewski K, Dziechciarz P, Skowronek P, Pietrow M, Borsuk G, et al. Effect of stearin and paraffin adulteration of beeswax on brood survival. *Apidologie*. 2021;52: 432–446. doi:10.1007/s13592-020-00833-7
8. Jachuła J, Denisow B, Wrzesień M, Ziółkowska E. The need for weeds: Man-made, non-cropped habitats complement crops and natural habitats in providing honey bees and bumble bees with pollen resources. *Sci. Total Environ.* 2022;840. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.156551
9. Yazlovytska LS, Karavan V V., Domaciuk M, Panchuk II, Borsuk G, Volkov RA. Increased survival of honey bees consuming pollen and beebread is associated with elevated biomarkers of oxidative stress. *Front. Ecol. Evol.* 2023;11. doi:10.3389/fevo.2023.1098350

10. Bryś MS, Staniec B, Strachecka A. The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers. *Sci Rep.* 2024;14. doi:10.1038/s41598-024-64598-0
11. Danihlík J, Škrabišová M, Lenobel R, Šebela M, Omar E, Petřivalský M, et al. Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in individual honey bees? *Insects.* 2018;9: 1–12. doi:10.3390/insects9030079
12. Bryś MS, Strachecka A. The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review. *Molecules.* 2024;29. doi:10.3390/molecules29112605
13. Bryś MS, Skowronek P, Strachecka A. Pollen diet—properties and impact on a bee colony. *Insects.* MDPI; 2021. doi:10.3390/insects12090798
14. Dufour C, Fournier V, Giovenazzo P. Diversity and nutritional value of pollen harvested by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies during lowbush blueberry and cranberry (Ericaceae) pollination. *Canadian Entomol.* 2020. doi:10.4039/tce.2020.29
15. de Groot, A.P. (1951). Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia.* 1952. 1951; 192–194
16. Filipiak M, Kuszewska K, Asselman M, Denisow B, Stawiarz E, Woyciechowski M, et al. Ecological stoichiometry of the honeybee: Pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *PLoS ONE.* 2017. doi:10.1371/journal.pone.0183236
17. Saunders ME. Insect pollinators collect pollen from wind-pollinated plants: implications for pollination ecology and sustainable agriculture. *Insect Conserv Divers.* 2018;11: 13–31. doi:10.1111/icad.12243
18. Moroń D, Marjańska E, Skórka P, Lenda M, Woyciechowski M. Invader–pollinator paradox: Invasive goldenrods benefit from large size pollinators. *Divers Distrib.* 2021;27: 632–641. doi:10.1111/ddi.13221
19. Lenda M, Skórka P, Kuszewska K, Moroń D, Bełcik M, Baczek Kwinta R, et al. Misinformation, internet honey trading and beekeepers drive a plant invasion. *Ecol. Lett.* 2021;24: 165–169. doi:10.1111/ele.13645
20. Vergun O. Nutritional Composition of *Phacelia tanacetifolia* Benth. Bee Pollen and Inflorescences. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality.* 2023;7. doi:10.15414/ainhlq.2023.0011
21. Owayss AA, Shebl MA, Iqbal J, Awad AM, Raweh HS, Alqarni AS. *Phacelia tanacetifolia* can enhance conservation of honey bees and wild bees in the drastic hot-arid subtropical Central Arabia. *J. Apic. Res.* 2020;59: 569–582. doi:10.1080/00218839.2020.1735731
22. Bryś MS, Olszewski K, Bartoń M, Strachecka A. Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes in the Fat Body and Hemolymph of *Apis mellifera* L. Due to Pollen Monodiets. *Antioxidants.* 2025;14. doi:10.3390/antiox14010069
23. Sulborska A. Rośliny pożytkowe. Poland: BEE & Honey Sp. z o.o.; 2019.

24. Yang K, Wu D, Ye X, Liu D, Chen J, Sun P. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61: 708–718. doi:10.1021/jf304056b
25. Fernández-González M, Lara B, González-Fernández E, Rojo J, Pérez-Badía R, Rodríguez-Rajo FJ. Pinus pollen emission patterns in different bioclimatic areas of the iberian peninsula. *Forests.* 2021;12. doi:10.3390/f12060688
26. Somerville DC, Nicol HI. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Aust J. Exp. Agric.* 2006;46: 141–149. doi:10.1071/EA03188
27. Lipiński Z. Żywnienie pszczoł miodnych. 2 ed. Żywnienie pszczoł miodnych. 2 ed. Sąddecki Bartnik; Stróże, 2024. pp. 28–31.
28. Jachula J, Denisow B, Strzałkowska-Abramek M. Does an invader have a bright side? Floral reward in two *Solidago* species. *J. Apic. Res.* 2020;59: 599–608. doi:10.1080/00218839.2019.1703086
29. Schilcher F, Hilsmann L, Ankenbrand MJ, Krischke M, Mueller MJ, Steffan-Dewenter I, et al. Honeybees are buffered against undernourishment during larval stages. *Frontiers in Insect Science.* 2022;2. doi:10.3389/finsc.2022.951317
30. Corona M, Branchiccela B, Madella S, Chen Y, Evans J. Decoupling the effects of nutrition, age and behavioral caste on honey bee physiology and immunity. *bioRxiv.* 2019. doi:10.1101/667931
31. Raderschall CA, Bommarco R, Lindström SAM, Lundin O. Landscape crop diversity and semi-natural habitat affect crop pollinators, pollination benefit and yield. *Agric Ecosyst Environ.* 2021;306. doi:10.1016/j.agee.2020.107189
32. Jack CJ, Uppala SS, Lucas HM, Sagili RR. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *J. Insect. Physiol.* 2016;87: 12–19. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.01.004
33. Huang Q, Evans JD. Targeting the honey bee gut parasite *Nosema ceranae* with siRNA positively affects gut bacteria. *BMC Microbiol.* 2020;20. doi:10.1186/s12866-020-01939-9
34. Frias BED, Barbosa CD, Lourenço AP. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie.* 2016;47: 15–25. doi:10.1007/s13592-015-0373-y
35. Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett.* 2010;6: 562–565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986
36. Al-Ghamdi AAK, Al-Khaibari AM, Omar MO. Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honeybee workers. *Saudi J. Biol. Sci.* 2011;18: 73–77. doi:10.1016/j.sjbs.2010.10.001
37. Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, et al. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One.* 2013;8: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0072016

38. Omar E, Abd-Ella AA, Khodairy MM, Moosbeckhofer R, Crailsheim K, Brodschneider R. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2017;48: 425–436. doi:10.1007/s13592-016-0487-x
39. Szymaś B, Łangowska A, Kazimierzczak-Baryczko M. Obraz histologiczny jelita środkowego pszczoł (*Apis mellifera* L.) żywionych namiastkami pyłku kwiatowego wzbogaconymi probiotykami. *J. Apic. Sci.* 2012;56: 5–12. doi:10.2478/v10289-012-0001-2
40. Mohandes; E. Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged worker. 2010;3: 213–220.
41. Skowronek P, Wójcik Ł, Strachecka A. Fat body—multifunctional insect tissue. *Insects*. 2021;12. doi:10.3390/insects12060547
42. Strachecka A, Olszewski K, Kuszewska K, Chobotow J, Wójcik Ł, Paleolog J, et al. Segmentation of the subcuticular fat body in *Apis mellifera* females with different reproductive potentials. *Sci Rep*. 2021;11: 1–12. doi:10.1038/s41598-021-93357-8
43. Jaremek M, Olszewski K, Chobotow J, Strachecka A. The Morphological Image of Fat Body and Tergal Gland Cells in Uninseminated *Apis mellifera* Queen Bees. *Insects*. 2024;15. doi:10.3390/insects15040244
44. Wu Y, Liu Q, Weiss B, Kaltenpoth M, Kadowaki T. Honey Bee Suppresses the Parasitic Mite Vitellogenin by Antimicrobial Peptide. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.01037
45. Depta J, Małkowska P, Wysokińska M, Todorska K, Sierawska O, Hryniewicz R, et al. Therapeutic Role of Antimicrobial Peptides in Diabetes Mellitus. *Biologics*. 2022;2: 92–106. doi:10.3390/biologics2010008
46. Al-Ghamdi AA, Al-Ghamdi MS, Ahmed AM, Mohamed ASA, Shaker GH, Ansari MJ, et al. Immune investigation of the honeybee *Apis mellifera jemenitica* broods: A step toward production of a bee-derived antibiotic against the American foulbrood. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021;28: 1528–1538. doi:10.1016/j.sjbs.2020.12.026
47. Strachecka A, Migdał P, Kuszewska K, Skowronek P, Grabowski M, Paleolog J, et al. Humoral and cellular defense mechanisms in rebel workers of *Apis mellifera*. *Biology (Basel)*. 2021;10: 1–12. doi:10.3390/biology10111146
48. Skowronek P, Wójcik Ł, Strachecka A. CBD Supplementation Has a Positive Effect on the Activity of the Proteolytic System and Biochemical Markers of Honey Bees (*Apis mellifera*) in the Apiary. *Animals*. 2022;12. doi:10.3390/ani12182313
49. Gliński Z, Buczek K, Marć M. Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia. *Życie weterynaryjne*. 2011;86(9).
50. Strachecka A, Kuszewska K, Olszewski K, Skowronek P, Grzybek M, Grabowski M, et al. Activities of Antioxidant and Proteolytic Systems and Biomarkers in the Fat Body and Hemolymph of Young *Apis mellifera* Females. *Animals*. 2022;12. doi:10.3390/ani12091121

51. Grzywnowicz K, Ciołek A, Tabor A, Jaszek M. Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie*. 2009;40: 4–19. doi:10.1051/apido:2008057
52. Strachecka A, Borsuk G, Olszewski K, Paleolog J, Lipiński Z. Proteolysis on the body surface of pyrethroid-sensitive and resistant *Varroa destructor*. *Acta Parasitol*. 2013;58: 64–69. doi:10.2478/s11686-013-0109-y
53. Strachecka A, Krauze M, Olszewski K, Borsuk G, Paleolog J, Merska M, et al. Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Moscow)*. 2014;79: 1192–1201. doi:10.1134/S0006297914110066
54. 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. doi:10.3390/ani12080978
55. Łoś A, Strachecka A. Fast and cost-effective biochemical spectrophotometric analysis of solution of insect “blood” and body surface elution. *Sensors (Switzerland)*. 2018;18. doi:10.3390/s18051494
56. Anson M. L. The Estimation of Pepsin, Trypsin, Papain, and Cathepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol*. 1938, 22.1
57. Lee T-M, Lin Y-H. Trypsin inhibitor and trypsin-like protease activity in air-or submergence-grown rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. *CiENCE Plant Sci*. 1995.
58. Degrandi-Hoffman G, Eckholm B, Huang M. Methods for comparing nutrients in beebread made by Africanized and European honey bees and the effects on hemolymph protein titers. *J. Vis. Exp*. 2015, 1–8. doi:10.3791/52448
59. Sordillo LM. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J. Dairy. Sci*. 2016;99: 4967–4982. doi:10.3168/jds.2015-10354
60. Negri P, Ramirez L, Quintana S, Szawarski N, Maggi M, Conte Y Le, et al. Dietary supplementation of honey bee larvae with arginine and abscisic acid enhances nitric oxide and granulocyte immune responses after trauma. *Insects*. 2017;8. doi:10.3390/insects8030085
61. Ognik K, Mikulski D, Konieczka P, Tykałowski B, Krauze M, Stępniewska A, et al. The immune status, oxidative and epigenetic changes in tissues of turkeys fed diets with different ratios of arginine and lysine. *Sci Rep*. 2021;11. doi:10.1038/s41598-021-95529-y
62. Dolezal AG, Toth AL. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc.; 2018. pp. 114–119. doi:10.1016/j.cois.2018.02.006
63. Alwarawrah Y, Kiernan K, MacIver NJ. Changes in nutritional status impact immune cell metabolism and function. *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*; 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.01055

64. Wright GA, Nicolson SW, Shafir S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu Rev Entomol.* 2018;63: 327–344. doi:10.1146/annurev-ento-020117-043423
65. Kim H, Frunze O, Lee JH, Kwon HW. Enhancing Honey Bee Health: Evaluating Pollen Substitute Diets in Field and Cage Experiments. *Insects.* 2024;15. doi:10.3390/insects15050361
66. Koubová J, Sábová M, Brejcha M, Kodrík D, Čapková Frydrychová R. Seasonality in telomerase activity in relation to cell size, DNA replication, and nutrients in the fat body of *Apis mellifera*. *Sci Rep.* 2021;11. doi:10.1038/s41598-020-79912-9
67. Bayram NE, Gercek YC, Çelik S, Mayda N, Kostić A, Dramićanin AM, et al. Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin – similarities and differences. *Arab. J. Chem.* 2021;14. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103004
68. Alshallash KS, Abolaban G, Elhamamsy SM, Zaghlool A, Nasr A, Nagib A, et al. Bee Pollen as a Functional Product – Chemical Constituents and Nutritional Properties. *J. Ecol. Eng.* 2023;24: 173–183. doi:10.12911/22998993/156611
69. Thakur M, Nanda V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology.* Elsevier Ltd; 2020. pp. 82–106. doi:10.1016/j.tifs.2020.02.001
70. Basualdo M, Barragán S, Vanagas L, García C, Solana H, Rodríguez E, et al. Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2013;106: 1553–1558. doi:10.1603/EC12466
71. Scaven VL, Rafferty NE. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. 2013.
72. Romanovskaja D, Baksienė E, Razukas A. Impact of Climate Change on Phenology of Entomophilous Plants and Honey Bee *Apis mellifera* L. 2023. doi:10.20944/preprints202305.0787.v1
73. Rajagopalan K, DeGrandi-Hoffman G, Pruett M, Jones VP, Corby-Harris V, Pireaud J, et al. Warmer autumns and winters could reduce honey bee overwintering survival with potential risks for pollination services. *Sci Rep.* 2024;14. doi:10.1038/s41598-024-55327-8
74. Paleolog J, Wilde J, Miszczak A, Gancarz M, Strachecka A. Antioxidation defenses of *Apis mellifera* queens and workers respond to imidacloprid in different age-dependent ways: Old queens are resistant, foragers are not. *Animals.* 2021;11. doi:10.3390/ani11051246
75. 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: 1–12. doi:10.3390/ani11030863
76. Strachecka AJ, 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. doi:10.1515/jas-2015-0014

682 77. Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J, Borsuk G, Bajda M, Krauze M, et al.
683 Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems
684 in the honeybee, *Apis mellifera*. Arch Insect Biochem Physiol. 2014;86: 165–179.
685 doi:10.1002/arch.21159

10. Aneks

Powstanie niniejszej dysertacji doktorskiej było rezultatem oddziaływania wielu czynników, w tym tych związanych z doskonaleniem metod analitycznych, poznaniem technik mikroskopowania, a także rezultatem odbytych międzynarodowych i krajowych staży naukowych oraz konferencji – zarówno naukowych, jak i branżowych (z otoczenia społeczno-gospodarczego i pszczelarskich). Przedstawiony poniżej dorobek naukowy, stanowi pośredni przyczynek kształtujący moją postawę do napisania i przedłożenia rozprawy doktorskiej.

I. Wykaz osiągnięć naukowych

A. Przed rozpoczęciem kształcenia w Szkole Doktorskiej

Wykaz publikacji naukowych	IF	Pkt. MNiSW
Bryś M.S. , Kunat M., Ptaszyńska A.A. (2019) The influence of bee pollen on animals. European Journal of Medical Technologies, 4(25): 33–37.	-	5
Bryś M.S. , Kunat M., Stawiarz E., Ptaszyńska A. (2021) Physicochemical characteristics and melissopalynological analysis of commercial buckwheat honeys from Poland. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 9(2):200-205; DOI: 10.18006/2021.9(2).200.205	-	20
Bryś M.S. , Skowronek P., Strachecka A. (2021) Pollen diet—properties and impact on a bee colony. Insects 12(9): 798; DOI: 10.3390/insects12090798	3,139	100
Sumarycznie	3,139	125

Wykaz rozdziałów w monografiach naukowych	Pkt. MNiSW
Cholewińska E., Ognik K., Krasucka M., Bryś M. , Czubak I. (2017) Zagrożenia występujące wśród pracowników salonów fryzjerskich. W: Nyckowiak J., Leśny J. (red.) Młodzi Naukowcy, UPP, Poznań, 42–48.	5
Cholewińska E., Stępniewski D., Wodyk T., Wojewoda A., Ognik K., Stępniewska A., Bryś M. (2018) Prozdrowotne właściwości czystka. W: Nyckowiak J., Leśny J. (red.) Młodzi Naukowcy, UPP, Poznań, 26–30.	5
Sumarycznie	10

B. W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej

Publikacje naukowe	IF	Pkt. MNIŚW
Strachecka A., Chobotow J., Kuszewska K., Olszewski K., Skowronek P., Bryś M. , Paleolog J., Woyciechowski M. (2022) Morphology of Nasonov and tergal glands in <i>Apis mellifera</i> rebels. <i>Insects</i> 13(5): 401; DOI: 10.3390/insects13050401	3,0	100
Kunat-Budzyńska M., Rysiak A., Wiater A., Grąż M., Andrejko M., Budzyński M., Bryś M.S. , Sudziński M., Tomeczyk M., Gancarz M., Rusinek R., Ptaszyńska A.A. (2023) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of New Honey Varietals, <i>International Journal Environmental. Research. Public Health</i> , 20(3), 2458; DOI: 10.3390/ijerph20032458	5,4	140
Bryś M.S. , Strachecka A. (2024) The Key Role of Amino Acids in Pollen Quality and Honey Bee Physiology—A Review, <i>Molecules</i> , 29(11), 2605; https://doi.org/10.3390/molecules29112605	4,2	140
Bryś M.S. , Staniec B., Strachecka A. (2024) The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of <i>Apis mellifera</i> L. workers, <i>Scientific Reports</i> , 14:15177; DOI: 10.1038/s41598-024-64598-0	3,8	140
Bryś M.S. , Olszewski K., Bartoń M., Strachecka A. (2025) Changes in the Activities of Antioxidant Enzymes in the Fat Body and Hemolymph of <i>Apis mellifera</i> L. Due to Pollen Monodiets, <i>Antioxidants</i> , 14(1), 69; https://doi.org/10.3390/antiox14010069	6,0	100
Sumarycznie	22,4	620

II. Wykaz doniesień konferencyjnych

A. Przed rozpoczęciem kształcenia w Szkole Doktorskiej

Doniesienia konferencyjne
Bryś M. , Stawiarz E. (2017) Źródła pożytku pyłkowego pszczoły Buckfast na terenie gminy Domaradz w świetle analizy mikroskopowej obnóży pszczelich. Międzynarodowa Konferencja Nauk Przyrodniczych i Medycznych, Lublin, 01–03.12.2017, 165–166.
Wodyk T., Czubak I., Bryś M. (2017) Ceruloplazmina – wskaźnik przydatny w obrazowaniu statusu immunologicznego oraz oksydoredukcyjnego organizmu. XIV Międzynarodowe Seminarium Studenckich Kół Naukowych, Środowisko – Zwierzę – Produkt, Lublin, 04.04.2017.
Stawiarz E., Bryś M. (2018) Spektrum pyłkowe obnóży pszczelich pozyskanych od mieszańca pszczoły miodnej „Jugo”. 55 Konferencja Pszczelarska, Kazimierz Dolny, 06–07.03.2018, 78.

Kunat M., Siemińska-Kuczek A., Bryś M. , Andrejko M., Ptaszyńska A. (2019) Antifungal activity of <i>Galleria mellonella</i> larvae hemolymph infected with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteria. Ogólnopolska konferencja mykologiczna dla studentów i doktorantów, Młodzi w mykologii, MycoRise UP!, Polskie Towarzystwo Mykologiczne, Spała, 12-13.04.2019, 104-105.
Kunat M., Bryś M. , Wydrych J., Andrejko M., Ptaszyńska A. (2019) Nosemosis development can damage the honeybee intestine. Conference Ecology in a Changing World – ECHO 2019, Warsaw, 23–24.03.2019
Kunat M., Bryś M. , Andrejko M., Ptaszyńska A. (2019) Właściwości przeciwbakteryjne miodu spadziowego i wierzbowego. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2019, Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju, Lublin, 23-25.03.2019, 278–279.
Bryś M. , Stawiarz E., Denisow B. (2019) Flora pożytkowa gminy Domaradz na podstawie analizy pyłkowej miodów. 56 Konferencja Pszczelarska, Kazimierz Dolny, 05–06.03.2019, 88–89.
Bryś M.S. , Stawiarz E., Kunat M., Sudziński M., Ptaszyńska A.A. (2019) Analiza mikroskopowa oraz wybrane właściwości fizykochemiczne miodów pozyskanych z pasieki miejskiej. Ogólnopolska Przyrodnicza Konferencja Naukowa „Mater naturae” – osiągnięcia, wyzwania i problemy nauk przyrodniczych, Lublin, 14.12.2019, 19–20.
Kunat M., Bryś M.S. , Sudziński M., Andrejko M., Ptaszyńska A.A. (2019) Właściwości przeciwgrzybowe miodów pozyskanych z terenów miejskich i czystych ekologicznie. Ogólnopolska Przyrodnicza Konferencja Naukowa „Mater naturae” – osiągnięcia, wyzwania i problemy nauk przyrodniczych, Lublin, 14.12.2019, 47–48.
Bryś M.S. , Kunat M., Ptaszyńska A.A. (2020) Porównanie miodów gryczanych z województw podkarpackiego i lubelskiego. Wirtualna Konferencja Młodych Przyrodników, 30.12–05.01.2020.
Kunat M., Bryś M.S. , Grąż M., Sudziński M., Ptaszyńska A. A. (2020) Zawartość związków fenolowych w miodach pozyskanych z Lubelskiej Pasieki Miejskiej oraz terenów czystych ekologicznie. 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12 marca 2020, 82.
Kunat M., Andrejko M., Rysiak A., Budzuński M., Bryś M.S. , Sudziński M., Ptaszyńska A.A. (2020) Właściwości przeciwbakteryjne miodów uzyskanych z terenów miejskich i podmiejskich. 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12 marca 2020, 74-75.
Kunat M., Bryś M.S. , Sudziński M., Ptaszyńska A. A. (2020) Analiza pyłkowa i właściwości fizykochemiczne miodów pozyskanych z terenów podmiejskich. 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12 marca 2020, 83.
Budzyński M., Kunat M., Andrejko M., Rysiak, Bryś M.S. , Sudziński M., Ptaszyńska A. A. (2020) Właściwości przeciwgrzybiczne wybranych odmian miodów. 57 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Cieszyn, 10-12 marca 2020, 73-74.

B. W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej

Doniesienia konferencyjne
Bryś M.S., Strachecka A. (2022) Phenoloxidase and lysozyme activities in hemolymph of <i>Apis mellifera</i> workers, rebels and queens. 1st International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin: Environment – Plant – Animal – Product, Lublin, 26.04.2022, 02.
Bryś M.S., Strachecka A. (2023) Praktyczne zastosowanie badań nad dietą pyłkową pszczoły miodnej. Naukowa Konferencja Pszczelarska dla otoczenia społeczno-gospodarczego „Nauka praktyce”, Lublin 19.01.2023, 35.
Bryś M.S., Staniec B., Strachecka A., Nowosad J. (2023) Wpływ monodiety na przykładzie pyłku facelii i nawłoci na wielkość <i>acini</i> gruczołów gardzielowych u pszczoły miodnej – badania wstępne. 60. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy, 14–15.03.2023, 29.
Bryś M.S., Strachecka A. (2023) Changes in the concentrations of proteins, glucoses and triglycerides in fat bodies of honeybees fed rapeseed and <i>Phacelia</i> pollens. 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT, Lublin 19.04.2023, 1.
Bryś M.S. (2023) Korzystny wpływ wybranych diet pyłkowych roślin wiatropylnych na liczbę i rodzaj hemocytów <i>Apis mellifera</i>. Nature 2023 Polish Scientific Conference. Book of Abstracts, Lublin, 27.05.2023, 19.
Bryś M.S., Strachecka A. (2023) Niedocenione właściwości pyłku pszczelego wartę uwagi seniorów, Lublin 18.11.2023, 37–38.
Bryś M.S., Staniec B., Strachecka A. (2023) Beneficial effect of a diet based on rapeseed and <i>Phacelia</i> pollen on selected morphological elements of the fat body in <i>Apis mellifera</i> L. International Conference. Biodiversity in agriculture. Abstracts. Lublin, 12–13.10.2023, 30.
Bryś M.S., Strachecka A. (2023) Wyzwania związane z zaspokojeniem potrzeb żywieniowych pszczoły miodnej. Nauki przyrodnicze i medyczne: X Forum Młodych Naukowców, Lublin 01–02.12.2023, 20.
Pędziwiatr A., Bryś M.S. (2024) Naturalne metody leczenia warrozy u pszczoły miodnej. II Naukowa Konferencja Pszczelarska dla otoczenia społeczno-gospodarczego „Nauka praktyce”, Lublin, 01.02.2024, 43.
Tomasik J., Bryś M.S. (2024) Rodzaje pokarmu stosowane przez pszczelarzy w kontekście zimowli. II Naukowa Konferencja Pszczelarska dla otoczenia społeczno-gospodarczego „Nauka praktyce”. Lublin, 01.02.2024, 54.
Bryś M.S., Strachecka A. (2024) Wpływ diety pyłkowej na metabolizm energetyczny pszczoły miodnej. W: II Naukowa Konferencja Pszczelarska dla otoczenia społeczno-gospodarczego „Nauka praktyce”, Lublin, 01.02.2024, 30.
Bryś M.S., Dziechciarz P., Olszewski K., Strachecka A. (2024) Immunity components of honey bees present in scientific research. W: 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT, Lublin-Janów Lubelski, 24-26.04.2024, 02.

Bryś M.S. (2024) Bioetyczne aspekty prowadzenia badań nad <i>Apis mellifera</i> L. Polish Scientific Conference, Nature 2024. Lublin, 27.05.2024, 17.
Nowosad J., Gryboś A., Huszcz W., Miecznikowska-Ziółek, Bryś M.S. (2024) Diapausis – a process essential for survival of most insects. Forum Młodych Naukowców, XI Forum Młodych Naukowców „Nauki przyrodnicze i medyczne”, Lublin, 6-7.12.2024, 20.
Jaremek M., Bryś M.S. (2025) Pyłek pszczeleli jako naturalny surowiec leczniczy i kosmetyczny. II Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej pt. Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne, Lublin 18-19.03.2025, 86.
Bryś M.S. , Gryboś A., Strachecka A. (2025) Effect of feeding Phacelia pollen monodiets on antioxidant activities in the hemolymph of worker honey bees. 4th International PhD Students' Conference: Environment-Plant-Animal-Product (I-SDUPL) together with the Information campaign on the Lublin Digital Union (LUC) – digital solutions and artificial intelligence in medical, natural and technical sciences, Lublin, 09.04.2025 r.

III. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane ze źródeł zewnętrznych:

- „Właściwości przeciwdrobnoustrojowe i fizykochemiczne miodów z województwa podkarpackiego”, projekt naukowy współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój poprzez udział w projekcie poza konkursowym o charakterze koncepcyjnym pn. „Najlepsi z najlepszych! 4.0.” okres trwania wrzesień 2019-czerwiec 2020, kierownik tematu;
- „Związane z procesem starzenia zmiany w systemach zaangażowanych w reakcje odpornościowe pszczół w kontekście monodiety pyłkowej jako kluczowego stresora środowiskowego”, Projekt Preludium nr UMO-2022/45/N/NZ9/01333, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, 2023 – obecnie, kierownik projektu;
- doktorant-stypendysta w konkursie NCN Opus realizowanego na Uniwersytecie Rolniczym im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pt.: „Wpływ emocji na kondycję zdrowotną pszczoły miodnej”, nr 2019/35/B/NZ8/00666, kierownik projektu dr hab. Karolina Kuszewska, czerwiec 2024 – obecnie, wykonawca w projekcie.

Wykonawca w projektach usługowych i badawczych

- (1) Wpływ bioekstraktów na witalność i odporność pszczół, Przedsiębiorstwo Pszczelarskie Tomasz Łysoń Spółka z o.o., nr projektu LKE.UBAD.23.195/BIO, okres realizacji 06.07-30.10.2023 r.;
- (2) Przedsiębiorstwo Pszczelarskie Tomasz Łysoń Spółka z o.o., nr projektu UBAD.WLE.24.036, okres realizacji 05.03-30.07.2024 r.;
- (3) Wykorzystanie urządzeń pomiarowych w monitorowaniu zdrowia pszczół, podmiot zlecający: Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica w Krakowie; Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, nr projektu UBAD.WLE.24.162, okres realizacji 10-31.07.2024 r.;
- (4) Monitoring stanu zdrowia pszczół w 100 rodzinach pszczelich w ramach projektu „ApiGuard - Ochrona pszczół i jakości produktów pszczelich” nr UBAD.WLE.24.213.BIO. 12.2024, okres realizacji 15.11-31.12.2024 r.

IV. Staże krajowe i zagraniczne:

- 09.08.2021–09.09.2021 r. staż krajowy w formie wolontariatu w Katedrze Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;
- 28.11.2022–27.01.2023 r. staż krajowy w europejskiej sieci laboratoriów GBA Polska Filia „Lublin”, Doświadczalna 50a, Lublin;
- 11.02.2024–11.03.2024 r. mobilność w ramach programu Ersusmus+ na Palacký University Olomouc, Faculty of Science , Department of Biochemistry, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czechy;
- 01–17.09.2024 r. mobilność w ramach programu Ersusmus+ na Freie Universität Berlin Institute of Veterinary Biochemistry, Oertzenweg 19b, Haus 12, 14163 Berlin, Niemcy;
- 22.11.2024–23.12.2024 r. staż naukowy w ramach programu NAWA STER – Umiejdzynarodowienie Szkół Doktorskich na University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Sciences, Pivola 10, 2311 Hoče, Słowenia;

V. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych i międzynarodowych

- Praca w komitecie organizacyjnym VI Forum Młodych Przyrodników, Lublin, 25.05.2019 r.
- Praca techniczno-organizacyjna podczas Naukowej Konferencji Pszczelarskiej dla otoczenia społeczno-gospodarczego „Nauka w Praktyce”, Lublin 19.01.2023 r.
- Praca w komitecie organizacyjnym, X Forum Młodych Naukowców Nauki Przyrodnicze i Medyczne, Lublin 1-2.12.2023 r.
- Praca w komitecie organizacyjnym, Polish Scentific Cnonference NATURE 2024, Lublin, 24.05.2024 r.
- Praca w komitecie organizacyjnym „Biodiversity in Agriculture”, 17.01.2022 r.
- Praca w komitecie naukowym i organizacyjnym „Biodiversity in Agriculture”, Lublin, 12-13.10.2023 r.

- Praca w Komitecie organizacyjnym, 2nd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT- PLANT-ANIMAL-PRODUCT (ICDSUPL), Lublin – Janów Lubelski, 19-20.04.2023 r.
- Praca w Komitecie organizacyjnym, 3rd International PhD Student's Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT- PLANT-ANIMAL-PRODUCT (ICDSUPL), Lublin – Janów Lubelski, 24-26.04.2024 r.
- Praca w Komitecie organizacyjnym, 4th International PhD Students' Conference: Environment-Plant-Animal-Product (I-SDUPL) together with the Information campaign on the Lublin Digital Union (LUC) – digital solutions and artificial intelligence in medical, natural and technical sciences, Lublin (format hybrydowy), 9.04.2025 r.,

VI. Wykaz ukończonych kursów i szkoleń

- uprawnienia do nauczania przyrody w szkole podstawowej oraz biologii w szkole podstawowej i ponadpodstawowej, we wszystkich typach szkół;
- ukończone szkolenie łączone dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych;
- ukończone szkolenie System zarządzania wg norm PN-EN ISO/IEC 17025 w laboratorium badawczym;
- ukończone szkolenie Audytor wewnętrzny Systemów zarządzania wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018 w laboratorium badawczym;
- szkolenie Podstawy psychologii, Niepubliczna Placówka Kształcenia Ustawicznego "Psychodia", Lubaczów, 45 godz.;
- szkolenie, Trening rozwoju osobistego, Centrum Rozwoju Personalnego we Wrocławiu, 30 godz.;
- szkolenie, Komunikacja interpersonalna, Centrum Rozwoju Personalnego we Wrocławiu, 30 godz.;
- kurs Zarządzanie danymi badawczymi dla naukowców – kurs podstawowy”, Narodowe Centrum Nauki;
- kurs Podstawy kryminalistyki z elementami psychologii zeznań, Niepubliczna Placówka Kształcenia Ustawicznego "Psychodia", Lubaczów, 15 godz.;
- kurs Planowanie Projektów B+R oraz Współpraca w projektach B+R , PFR Operacje Sp. z o.o. z siedzibą w Warszawie, przy ul. Kruczej 50, 00-025 Warszawa;

VII. Wykaz członkostwa organizacjach i towarzystwach naukowych

- 2018 – obecnie Członek Stowarzyszenia Młodych Naukowców;
- 2018 – obecnie Członek Polskiego Towarzystwa Entomologicznego, oddział w Lublinie;
- 2018-2020 – redaktor pomocniczy na portalu popularno-naukowym Biomist.pl;
- 2020 – obecnie Członek Pszczelniczego Towarzystwa Naukowego;
- 2022 – obecnie Biegły sądowy z zakresu pszczelarstwa przy Sądzie Okręgowym w Lublinie i Rzeszowie;
- 2024 – 2025 Członek zespołu ds. Popularyzacji nauki działającym przy Krajowej Reprezentacji Doktorantów;
- 2024 –2025 członek Rady Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,

VIII. Promocja i popularyzacja nauki

Wykaz artykułów popularnonaukowych:

- Miody miejskie okiem biologa, Pasieka, 1, 2021,
- Miody wiosenne okiem biologa, Pasieka, 2, 2021
- Pszczoły jako naturalne biofiltry, Pasieka, 3, 2021,
- Konsumencie- zapoznaj się z miodami, Zdowie bez leków, 3, 2021,
- Z dzienniczka pszczelarza – warunki przechowywania miodu, Zdowie bez leków, 3, 2021,
- Produkty pszczele w żywieniu zwierząt gospodarskich i laboratoryjnych, Pszczelarstwo, 4, 2021,
- Mechanizm działania i właściwości przeciwdrobnoustrojowe miodów krajowych i zagranicznych, Naturoterapia w praktyce, 2021
- Ciasto pyłkowe okiem biologa, Pasieka, 1, 2022,

- Barciak większy - szkodnik pszczoł i bezkręgowiec laboratoryjny, Pasieka, 4, 2022,

Organizacja i przeprowadzenie zajęć/warsztatów/szkoleń:

- organizator Lubelskiego Festiwalu Nauki (2016, 2017 i 2023) oraz Nocy Biologów (2019 i 2020);
- przeprowadzenie szkolenia w ramach sympozjum organizowanego przez Miejską Pasiekę Artystyczną Centrum Spotkań Kultur (CSK) w Lublinie, 28.11.2019 r.;
- prelegent podczas Webinaru organizowanego przez pasiekę Michałów, 9.01.2021 r. i 28.02.2021 r.;
- Rodzinny Ekopiknik w Pszczelnej Woli połączony z warsztatami na temat owadów zapylających, Pszczela Wola, 04.06.2023 r.;
- Letni Dzień Otwarty Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz współorganizowanie stoiska Wydziału Biologii Środowiskowej, Lublin, 01.07.2023 r.;
- kierownik projektu „I Ty możesz zostać pszczelarzem!”, warsztaty dla uczniów szkoły podstawowej, 19.09.2023 r.;
- przeprowadzenie warsztatów pszczelarskich dla dzieci: "Pszczółki nasze życie" realizowanego przez Stowarzyszenie LGD Krzemieny Kąg, 05.10.2023 r.;
- przeprowadzanie szkolenia dla pszczelarzy z Ziemi Mińskiej, 25.11.2023 r.
- przeprowadzenie 9 warsztatów dla szkół podstawowych m.in. w Janiku, Bodzechowie, Bałtowie, Pawłowicach, Lipsku, Siennie, Grabowcu, Brzostówce, Chotczy, 2024 r.;
- Warsztaty dla maturzystów w projekcie „Koleżeńskie korepetycje” i charytatywnie przygotowywałem maturzystów do matury z biologii, przyznane wyróżnienie „ambasador akademickiego Lublina”, maj 2024 r.;
- Wykład gościnny podczas I Edition of the School of Immunology "50 Shades of Immunology". Białystok, 18-21.05.2024 r.;
- Wykład gościnny dla Słuchaczy Lubelskiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku, pt.: „Jak prawidłowo powinniśmy stosować produkty pszczele?”; 24.05.2024 r.;
- Wykład gościnny dla Słuchaczy Gminnego Klubu Seniora z Konopnicy, Marynin, 28.02.2025 r.;

Aktywność medialna w zakresie popularyzacji biologii

- Udzielenie wywiadu radiowego na temat miejskich miodów odmianowych pozyskanych z Miejskiej Pasieki Artystycznej w Lublinie, Polskie Radio Lublin, https://www.radio.lublin.pl/news/miod-z-miejskiej-pasieki-artystycznej-csk-smaczny-i-zdrowy?fbclid=IwAR0SsaclDK20i1s_anppA56xiuY2EvI2UuOmKB3XJ7LwTfp8gGdZ8n tn3uk, 12.12.2019 r.;
- Udzielenie wywiadu radiowego dla Radia Lublin na temat znaczenia diety pyłkowej dla pszczoł (miodnych i dzikich) „Specjalna mieszanka dla pszczoł. Młodzi naukowcy prezentują swoje pomysły”, <https://radio.lublin.pl/2023/12/specjalna-mieszanka-dla-pszczol-mlodzi-naukowcy-prezentuja-swoje-pomysly-zdjecia/>, 02.12.2023 r.;
- reportaż dla telewizji Polsat News na temat monodiety pyłkowej pszczoł (miodnych), https://www.lepszapolska.pl/czysta-polska/czysta-polska-odcinek-153_16337/, 30.03.2024 r.;
- Udzielenie wywiadu radiowego dla Radia Lublin na temat znaczenia emocji u pszczoł. Realizacji badań związanych z wykonywaniem projektu „Wpływ emocji na kondycję zdrowotną pszczoły miodnej” <https://radio.lublin.pl/2024/06/pszczele-emocje-pod-lupa-lubelskich-naukowcow-wideo/>, 13.06.2024 r.

Współautorstwo materiałów edukacyjnych z biologii

- a) Biologia Zbiór zadań, Matura 2018, Mieszkowicz J., Ogiela M., **Bryś M.**, Wydawnictwo Biomedica, Rzeszów, 2018;
- b) Matura na cito, Biologia, Próbne arkusze egzaminacyjne, Mieszkowicz J., Ogiela M., **Bryś M.**, Wydawnictwo Biomedica, Rzeszów, 2017;
- c) Biologia zbiór zadań, Egzamin ósmoklasisty, Cichy D., Bąk B., **Bryś M.**, Grzywna M., Wydawnictwo Biomedica, Rzeszów, 2021;
- d) Biologia bez tajemnic, podręcznik dla klasy 5, Praca zbiorowa, Wydawnictwo WSIP, **Maciej Bryś** – współpraca redakcyjna, Warszawa 2024;
- e) współautor licznych zadań z biologii na egzaminie dojrzałości (matura i próbna matura).

IX. Nagrody i wyróżnienia

- laureat konkursu na artykuł popularnonaukowy dotyczący nauk przyrodniczych, czasopismo „Antocyjan”, redaktor prof. dr hab. Barbara Bednarczyk-Cwynar; 2020;
- nagroda za działalność naukową od Prorektora ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą oraz Dyrektora Szkoły Doktorskiej, Lublin 19.04.2023 r.;
- 4 wyróżnienia przyznane za wygłoszone referaty na konferencjach krajowych 2021-2025 r.

X. Wskaźniki bibliometryczne na dzień 15.04.2025 r.

Według bazy Scopus	
Liczba prac indeksowanych w bazie	7
Liczba cytowań opublikowanych prac	59
Liczba cytowań opublikowanych prac bez autocytowań	55
Indeks Hirsha	3