



МЕТОДЫ МОРФОМЕТРИИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОРОДНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЕДОНОСНЫХ ПЧЁЛ

Березин А. С.

ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства», 391110, Россия, Рязанская область,
г. Рыбное, ул. Почтовая, д. 22; e-mail: mellifera@yandex.ru

Резюме

Статья совмещает в себе краткий обзор по вопросу морфометрии пчёл и проект обобщённых методических рекомендаций. В статье проанализированы имеющиеся доступные литературные данные, касающиеся методов морфометрии и измерения экстерьерных признаков медоносных пчёл и анализа полученных результатов в России и за рубежом. Проведена систематизация и анализ программного обеспечения, используемого для классической и геометрической морфометрии. Для экстерьерных признаков, используемых в настоящее время в ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» (Россия), описана методика их измерения и дан иллюстративный материал.

Ключевые слова: геометрическая морфометрия; классическая морфометрия; медоносная пчела; «Банк пород и типов»; *Apis mellifera*

Цитирование: Березин А. С. Методы морфометрии в определении породной принадлежности медоносных пчёл // Биомика. 2019. Т.11(2). С. 167 - 189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-16

METHODS OF MORPHOMETRY IN DETERMINING THE BREED OF HONEY BEES

Berezin A.S.

Federal Beekeeping Research Centre, 391110, Russia, Rybnoe, Ryazan region,
Pochtovaya street, 22; e-mail: mellifera@yandex.ru

Resume

The article combines a brief overview on the morphometry of bees and a draft of generalized guidelines. The available literature data concerning methods for measuring the exterior features of honey bees and analyzing the results obtained in Russia and abroad are analyzed. The systematization and analysis of the software used for classic and geometric morphometry have been carried out. For exterior features currently used at Federal Beekeeping Research Center (Russia), a technique for their measurement is described and illustrations are provided.

Keywords: geometric morphometry; classic morphometry; honey bee; «Bank of breeds and types»; *Apis mellifera*

Citation: Berezin A.S. Methods of morphometry in determining the breed of honey bees. *Biomics*. 2019. T.11(2). С. 167 - 189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-16 (In Russian)

Введение

Измерение экстерьерных признаков медоносных пчёл необходимо для изучения их систематики, определения породной принадлежности и в процессе селекционной работы. *Apis mellifera* Linnaeus 1758 имеет естественное распространение в странах Африки и Евразии, а также этот вид завезён на все другие континенты, кроме Антарктиды, и интенсивно используется в производстве мёда и опылении энтомофильных сельскохозяйственных культур. Медоносные пчёлы имеют значительное

географическое разнообразие, являющееся результатом адаптации к местным условиям внешней среды, которое под влиянием антропогенных факторов исчезает. Бесконтрольный импорт пчелиных маток, а также неконтролируемая торговля матками, пакетами и пчелиными семьями внутри страны ставят под угрозу региональные подвиды и экотипы, способствуя гибридизации. Не меньшее беспокойство вызывает преднамеренная замена местных подвидов в некоторых регионах завезёнными пчёлами с более предпочтительными признаками и большей

коммерческой выгодой. Так Кожевников (Kozhevnikov) [1900a] сообщает, что ещё в 50-х годах 19 века у немецких пчеловодов было увлечение итальянской пчелой «и дело приняло даже характер какой-то эпидемии». В России в конце 19 века было увлечение кавказской пчелой. По данным Алпатова (Alpatov) [1927] перевозка южных пород на север привела к большим смещениям в естественном распределении пород, но в России этот процесс имел меньшие последствия. Хотя с распадом СССР ситуация с завозом импортных пород сильно изменилась. Недостатком этих процессов, обусловленных финансовой составляющей, является тенденция к снижению генетического разнообразия популяций медоносных пчёл, что может повлиять на способность популяций медоносных пчёл адаптироваться к новым угрозам. Тем не менее, на территории Норвегии, Швеции, Дании [Ruottinen et al., 2014] и Ирландии [Hassett et al., 2018] сохранилась крупная популяция темной лесной пчелы. Сохранение местных пчёл в этих странах при поддержке государства осуществляется научными учреждениями и пчеловодческими организациями. В России также сохранились не гибридизированные популяции *A. m. mellifera* (Красноярский край и Томская область) [Островеерхова и др. (Ostroverkhova et al.), 2015; 2015a; 2016; в печати]. Охраняемые популяции *A. m. mellifera* есть в ряде стран Европы (Дании, Нидерландах, острове Колонсей (Шотландия), Франции, Бельгии, Норвегии и Швейцарии) [Pinto et al., 2014]. В Норвегии существуют национальные программы по разведению пчёл *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*, спаривание происходит на изолированных случайных пунктах, вокруг стационарных пасек существует площадь около 3500 км², где пчеловодам разрешено держать только *A. m. carnica* или *A. m. mellifera* [Vouga et al., 2011].

Эталонные образцы имеют первостепенное значение не только для определения новых экотипов, но и для определения места неизвестных образцов в существующей структуре. При этом эталон должен отражать естественную изменчивость медоносных пчёл и не нести в себе прилитой «неместной» крови. Однако наблюдается отсутствие сопоставимости между используемыми эталонными образцами, имеющими только общую информацию о месте выборки, без уточнения происхождения образцов или указания метода их проверки [Meixner et al., 2013]. В настоящее время существует острая необходимость (как для России, так и для Европы) разработать и принять общий стандарт для определения понятия «эталонного образца» и правилах его оформления с организацией хранения эталонов и данных по ним в свободном доступе [Meixner et al., 2013]. Банк данных измерений и эталонных образцов Института пчеловодства (Оберурсель, Германия) [Ruttner, 1988;

Meixner et al., 2013] пока не находится в свободном доступе, но имеется возможность его получить при реализации совместных проектов [Kandemir et al., 2011; Nawrocka et al., 2018]. Также внутри подвидов наблюдается разнообразие, подразделяющее подвиды на отдельные популяции, но при этом эти популяции не имеют официального названия. Концепция популяции может включать в себя любой региональный естественный тип пчелы, достаточно отличающийся, чтобы дать ему название. В 2018 году в ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» начато формирование «Банка пород и типов» пчёл, в него, по возможности, планируется включать образцы всех видов общественных пчёл.

По мнению зарубежных авторов, научное описание и признание разнообразия медоносных пчёл в Европе не может считаться полным, так как обширные территории, преимущественно в восточной части континента, ещё не изучены систематически. Теми же авторами, обобщено современное состояние знания о подвидах медоносной пчелы и популяционной изменчивости в Европе [Meixner et al., 2013].

Сегодня монография Ruttner [1988] содержит наиболее полную и хорошо представленную базу данных по морфометрическим признакам для большинства подвидов медоносных пчёл, основана на применении числовой таксономии с использованием признаков "классической морфометрии", которая дополняется рядом последующих исследований различных авторов. Но, т. к. данные получены разными методами, то результаты часто не совпадают.

Цель данной статьи в том, чтобы дать рекомендации и описания для различных морфометрических методов, чтобы облегчить получение данных, пригодных для сравнения с данными полученными другими исследователями в целях более согласованного отражения разнообразия медоносных пчёл.

1. Отбор и хранение образцов пчёл

1.1. Объём выборки – количество семей

Объём любой выборки во многом зависит от целей исследования. В случае определения породной принадлежности, он должен включать интересующие образцы, например, от исследуемой пасеки или линии пчёл. Ввиду различий между семьями, пробы отбирают не менее чем от трёх семей пчёл с пасеки или линии. Если требуется исследовать всю популяцию, занимающую определённую область, чтобы обнаружить региональные различия, то пробы отбирают не менее чем от 5 семей в расчёте на область, чтобы ошибки выборки оставались в допустимых пределах [Radloff, Hepburn, 1998; Radloff et al., 2003; 2010].

1.2. Объём выборки – количество особей в пробе

Для анализа экстерьера отбирают пробы особей:

- пчёл;
- неплодных и плодных маток;
- трутней.

Пчёлы – отбирают особей в возрасте 2-3 суток [Goetze, 1964] или идущих в зиму. Необходимо отобрать такое количество особей, которое обеспечит анализ образца с помощью используемого метода или комбинации методов. Европейские авторы обращают внимание, что это количество зависит от степени внутрисемейной изменчивости (коэффициент вариации, C_v) и считают правильной выборку в 30-40 рабочих особей от семьи (Meixner M. D., et al., 2013). В отечественной литературе можно найти расчёт необходимого количества особей в выборке [Меркурьева (Merkur'eva), 1970; Лакин (Lakin), 1980].

При отборе материала для исследований нужно учитывать сезонную изменчивость пчёл. Так Михайлов (Mikhailov) [1927], изучив сезонную изменчивость экстерьерных признаков (длина хоботка, длину и ширину правого переднего крыла, число зацепов на правом заднем крыле, сумму длин 3 и 4 тергитов), установил, что признаком, обладающим наименьшей изменчивостью стало число зацепов (не дало достоверных различий между поколениями), а наибольшую изменчивость дала длина правого крыла. Им также установлено, что в течение сезона, в той или иной степени меняются все измеренные показатели. Михайлов (Mikhailov) [1927] рекомендует брать материал для исследования одного сезонного возраста, предпочитая вторую половину лета (вылупляющиеся пчёлы с рамки) или осень-зиму, а также касательно вопроса сезонной изменчивости экстерьерных признаков пчёл исследование требуется повторить, так как он считает этот вопрос ещё не до конца исследованным.

Мы рекомендуем, с учётом того что проба будет использована только для морфологического анализа, а также необходимого запаса материала («Банк образцов») для различных дополнительных целей (включая возможный обмен материалом с другими исследователями), отбирать 100-125 особей рабочих пчёл. А в случае особо ценного с научной точки зрения чистопородного материала – 200-250 особей от семьи. Неплодных и плодных маток – в количестве необходимом для научных целей (учитывая их ограниченное количество). По трутням - учитывая, что коэффициенты вариации по экстерьерным признакам трутней имеют более высокие показатели, их количество в пробе можно увеличить в два раза, по сравнению с количеством пчёл.

1.3. Методика отбора

Одна проба должна содержать особей, отобранных только из одной пчелиной семьи [Meixner et al., 2013].

Отбор проводят из:

а) генерации пчёл, идущих в зимовку, начиная с третьей декады сентября, после подкормки сахарным сиропом в отсутствие расплода с крайней рамки (*необходимо исключить попадание матки в пробу*). Одновременно с этим данную пробу можно использовать для определения поражения варроозом после обработки лекарственными препаратами. Эти сроки приняты в ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» и ориентировочны для средней полосы и могут меняться от географического положения местности и погодно-климатических условий;

б) в случае, если требуется провести отбор в период наличия расплода – то из зоны расплода [Meixner et al., 2013];

в) особей в возрасте 2-3 суток [Goetze, 1964] можно получить помещением сотовой рамки с выходящими пчёлами в сетчатый изолятор на 2-3 суток;

г) отбор проб трутней более сложен, поскольку они доступны только сезонно и более склонны к блужданию, чем рабочие особи [Jay, 1969; Currie and Jay, 1988; Neumann et al., 2000]. Как один из вариантов для контролируемого отбора проб трутней от конкретной пчелиной семьи можно использовать трутнёвый сот, который перед выходом трутней помещают в изолятор из ганемановской решётки. Далее можно пометить трутней маркером для мечения маток (если требуются более зрелые трутни) и убрать изолятор или отбирать 2-3 суточных трутней;

д) неплодных маток отбирают из клеточек через 2-3 суток после выхода из маточника.

Отбор проб можно проводить в любую тару, из которой их легко можно будет вытряхнуть в ёмкость с водой, нагретой до 100 °С (если не предполагается везти их живыми). Для этих целей подойдут алюминиевые бьюксы или небольшие пластиковые баночки с широким горлышком с крышкой.

1.4. Фиксирование

Пробы живых рабочих пчёл, маток, трутней необходимо фиксировать, обваривая их питьевой водой нагретой до 100 °С или подвергая воздействию паров серного эфира, чтобы они выбросили хоботки. В противном случае, хоботки останутся изогнутыми, и их невозможно будет измерить [Алпатов (Alpatov), 1945, 1948; Билаш, Кривцов (Bilash, Krivtsov), 1983; Meixner et al., 2013].

1.5. Упаковка

После фиксации, каждую пробу необходимо упаковать отдельно в ёмкость-тару (например,

хорошо отмытую пластиковую бутылку с широким горлышком, пластмассовую баночку (например, от «муравьишки»), стеклянную банку или любую другую подходящую ёмкость) или марлевый узелок (изготавливается из марли бытовой хлопчатобумажной или бинта марлевого медицинского), которые сложить в общую ёмкость-тару. Для больших объёмов рекомендуется ручная установка для закатки пенициллиновых флаконов, что собственно предполагает упаковку проб в эти флаконы, а их уже можно упаковать в любую подходящую тару.

1.6. Маркировка

Если пробы от разных семей помещаются в общую ёмкость, каждая проба должна иметь этикетку из плотной писчей бумаги, на которой карандашом только с чёрным грифелем чётко записывают номер пчелиной семьи, от которой была отобрана проба пчёл, и дату отбора пробы. Делать надписи другими средствами письма нельзя, так как в этом случае надписи растворятся в консервирующем растворе.

На этикетке общей ёмкости или в сопроводительной документации указывается: номера пчелиных семей, даты отбора проб, названия места расположения пасеки (населённый пункт, район, область страна), географические координаты пасеки, происхождение матки и где получена, при наличии документов, подтверждающих породную принадлежность пчелиных семей, прикладываются копии этих документов.

1.7. Хранение

Узелки с пробами заливают доверху 70% раствором этилового спирта; в нём хитин остаётся достаточно мягким для препарирования (можно хранить и в 95% этаноле), тщательно закупоривают и хранят до препарирования. Если предполагается длительное хранение, как в случае создания коллекции образцов, лучше хранить в стеклянной таре, а не пластике, т. к. через стенки пластиковых бутылок спирт постепенно испаряется. Лучше использовать стеклянные банки различного объёма с горлышком под винтовую крышку.

1.8. Пересылка

Если морфометрический анализ будет проводиться силами сторонней лаборатории, то пробы пчёл отправляют любым доступным способом, при котором не запрещается перевозка спиртосодержащих жидкостей и биоматериала или доставляют сами.

При отправлении проб пчёл, не рекомендуется пользоваться обычной почтой.

2. Основные измеряемые признаки

Подвиды, экотипы (расы) часто лишь незначительно отличаются по средним значениям

нескольких промеров, поэтому для разделения групп необходимы дополнительные статистические методы. Понятие числовой таксономии было введено в систематику медоносной пчелы DuPrav [1964; 1965; 1965a] и далее разработано Ruttner et al. [1978].

Основы методики изучения и измерения отдельных хитиновых частей пчёл заложил ещё Кожевников (Kozhevnikov) [1900]. В своей работе монографического плана «Материалы по естественной истории пчелы (*Apis mellifera* L.) [1900; 1905] Кожевников (Kozhevnikov) тщательно проанализировал имеющиеся литературные данные в энтомологической и пчеловодческой литературе по роду *Apis* и в частности по *Apis mellifera* L., проведя множество различных морфо-анатомических исследований сделал ряд выводов, касающихся систематики рода, морфологии и анатомии пчёл. Дальнейшее развитие работы Кожевникова, касающиеся морфометрии, получили в исследованиях Алпатова, который являлся его учеником, а также Михайлова.

В исследованиях по морфометрии используют, начиная с работ Кожевникова (Kozhevnikov) [1900], разные типы признаков. Например, признаки окраски, линейные и угловые промеры, а также отдельная группа вычисляемых признаков – индексы и суммы. В последние годы к ним добавился признак «Форма крыла», используемый в «геометрической морфометрии».

Наиболее часто используемые признаки, приведены в статье Meixner et al. [2013]. Основной набор из 36 признаков, описанных Ruttner [1988], содержит признанные в «классической морфометрии» большинства стран признаки. Группы признаков, к оценке которых прибегают различные исследователи, существенно изменяются по количеству признаков из «основного набора» описанного Ruttner. Иногда вводятся другие признаки, но их выбор в значительной степени произвольный. Так как при сравнении между исследованиями или со справочными данными сравниваются группы признаков с разным составом, эти различия затрудняют анализ. При проведении исследований по изучению неизвестных вариаций рекомендуется использовать 25 признаков в сочетании с анализом формы крыла (19 меток). Этот минимум измерений обеспечит:

а) обширную базу для сопоставления исследуемой изменчивости с известными распределениями признаков;

б) точный, надёжный учёт характеристик, представляющих численное описание морфологической изменчивости пчёл [Meixner et al., 2013].

Переднее крыло пчелы занимает первое место по количеству промеров и индексов, которые

можно получить с этого органа. Однако существуют расхождения в измерении и анализе морфометрических признаков крыла, схема жилкования которого, представляет особый интерес в систематике насекомых в целом. В настоящее время используются различные подходы морфологического анализа переднего крыла.

2.1. Классическая морфометрия крыла

Классическая морфометрия (КМ) крыла включает изменчивость в размерах крыла (длина и ширина) [Алпатов (Alpatov), 1927] и жилковании: длины отрезков «А» и «В» медиальной жилки 3-й радиомедиальной (3-й кубитальной) ячейки и различные индексы [Алпатов (Alpatov), 1935; Goetze, 1964] и углы. Впервые, измерение углов, ввёл в морфометрию пчёл DuPraw [1964], он предложил измерять 17 углов между соединениями жилок крыла, а Ruttner уменьшил это количество до 11 углов [Ruttner et al., 1978; Ruttner, 1988] (рисунок 1.)

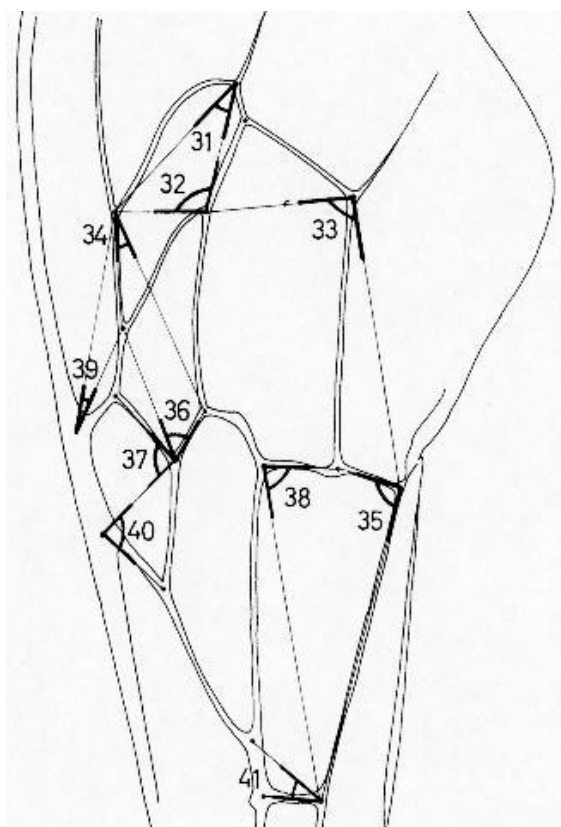


Рис. 1. Углы между центрами пересечениями жилок правого переднего крыла по Ruttner et al. [1978] с авторскими номерами 31-41.

Fig. 1. The angles between the centers of the intersections of the veins of the right front wing according to Ruttner et al. [1978] with author's numbers 31-41.

2.2. Геометрическая морфометрия крыла

В последнее время вместо характерных для пчелиного крыла морфометрических методов в ряде исследований используется "геометрическая морфометрия" (ГМ), основанная на теории формы. ГМ использует координаты меток, расположенных на пересечениях жилок крыла пчёл [Tofilski, 2004, 2008; Baylac et al., 2008]. Кожевников (Kozhevnikov) [1900] изучал жилкование крыльев пчёл, т. е. форму отдельных ячеек и места отхождения отдельных жилок, как возможный видовой признак. ГМ появилась как "технический инструмент" аналитического решения геометрических задач, сформулированных Thompson d'Arcy [1992]. Главным её достоинством являются геометрические образы, в которые могут быть воплощены числовые данные [Павлинов, Микешина (Pavlinov, Mikeshina), 2002].

Процедура ГМ начинается с того, что исследуемые объекты совмещаются своими центроидами в точке пересечения осей пространства. Затем их центроидные размеры приводятся к единице, благодаря чему достигается их выравнивание (alignment) относительно эталона: тем самым из последующего анализа исключается «размерный фактор». Выравнивание каждого из экземпляров идет за счёт такого его изометрического изменения, при котором между ним и эталоном минимизируется разница значений центроидов, вычисленных по всем меткам (прокрустов метод, Procrustes method) или по определённой паре меток (метод базовой линии, baseline method). После этого происходит изометрическое «вращение» выровненных объектов относительно эталона таким образом, чтобы минимизировать суммарную разницу значений координат по всем меткам [цит. по Павлинов (Pavlinov), 2001]. Подробнее о ГМ можно прочитать в работах на русском [Павлинов (Pavlinov), 2001; Павлинов, Микешина (Pavlinov, Mikeshina), 2002; Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018] и английском (Bookstein, 1992, 1996; Rohlf, Marcus, 1993; Rohlf, 1993, 1996; Zelditch et al., 2004; 2004a и др.] языках.

Данные, а именно координаты меток, получают при помощи «экранных дигитайзеров», например, с помощью последовательного применения двух программ tpsUtil и tpsDig2 (или tpsDig) с предварительно оцифрованного изображения объекта [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018]. Это и другое программное обеспечение (ПО), связанное с ГМ, статьи по теме ГМ и другое можно найти на сайте по адресу <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

Полученные данные затем анализируются с помощью различных методов многомерного

статистического анализа (метод главных компонент (PCA), методы канонического (CVA) и дискриминантного анализа и другие [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018]. Для этого применяется различное программное обеспечение, такое как: MorphoJ (разработчик С.Р.Klingenberg, сайт http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm) [Klingenberg, 2011], IMP (разработчик Н.Д.Sheets, сайт <http://www3.canisius.edu/~sheets/>) [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018] и другое.

Метод ГМ использован для разделения подвидов медоносных пчёл и их гибридов в Бразилии [Francoy et al., 2006; 2008] Польше [Tofilski, 2004; 2008] и других странах, а также для анализа распределения подвидов *A. mellifera* по эволюционным линиям (ветвям) и связи между ними [Miguel et al., 2011; Kandemir et al., 2011].

Одними авторами установлено незначительное превосходство ГМ над КМ [Tofilski, 2008], другими указывается, что ГМ более подходящая, чем КМ при идентификации процесса африканизации [Miguel et al., 2011], а Kandemir et al. [2011] считают ГМ надежным инструментом для разделения подвидов пчелы, имеющим преимущества перед КМ.

Разработано различного рода ПО для автоматической идентификации подвидов медоносных пчёл с использованием ГМ: DrawWing [Tofilski, 2004; 2007 (глава в книге MacLeod); 2008], Apiclass онлайн-система [Baylac et al., 2008].

2.3. Метод DAWINO

Этот метод применяют на коммерческой основе в Чешской Республике. Аббревиатура «DAWINO» расшифровывается как «дискриминантный анализ с числовым выходом». По сути это красиво названный обычный дискриминантный анализ, выполняемый с помощью лицензированного Научно-Исследовательским институтом пчёл в Доле ПО Veewings 1.20. Краткое описание этого метода можно найти на сайте <http://www.beedol.cz> (в английской версии), также он упоминается в статьях [Cermák, Kaspar, 2000; Satta, Floris, Pigliaru, 2004; Floris et al., 2007; Bouga et al., 2011; Meixner et al., 2013]. Этот метод и/или полученные с помощью него данные использовался в Норвегии, Швейцарии, Словакии и Македонии. В настоящий момент это ПО больше не доступно на рынке, а авторы не идут на контакт. Но судя по информации, представленной на их сайте, этот метод комбинирует в себе получение координат меток с помощью ПО для ГМ и расчёт на их основе показателей КМ: 17 углов (все углы DuPrav [1964]), 7 линейных промеров, 5 индексов и одной области. Все эти углы и другие параметры имеют метрические единицы измерения признаков и в дальнейшем

анализе могут быть объединены с другими признаками тела. По отзывам македонских коллег [Uzunov (личное сообщение)] в ходе их работы были обнаружены некоторые неточности по 9 признакам, которые были исключены из дальнейшего анализа, по остальным 21 признаку это ПО прекрасно работает.

2.4. Классическая и геометрическая морфометрия медоносных пчёл

Главной проблемой, связанной с увеличением количества основных измеряемых признаков - это отсутствие обратной совместимости. То есть результаты исследований, основанные на ГМ, нельзя сравнить со справочными данными, полученными с помощью КМ крыла, накопленными в предыдущих работах различных авторов (в том числе с описаниями эталонных подвидов в монографии Ruttner [1988]).

В настоящее время существует определённая несогласованность относительно последовательности и количества точек маркировки у различных авторов при анализе формы крыла. Одни авторы используют для ГМ только одну ячейку крыла [Francoy et al., 2006], другие, в разных своих работах, меняют количество промаркированных точек [Tofilski, 2008; <http://drawwing.org>; Nawrocka et al., 2018], либо количество точек меняется у разных авторов от 18 до 20 [Tofilski, 2008; Miguel et al., 2011; Baylac et al., 2008, ApiClass; Kandemir et al., 2011], либо начинают маркировку кто с «0», а кто с «1» [Tofilski, 2008; <http://drawwing.org>; Nawrocka et al., 2018; Miguel et al., 2011; Baylac et al., 2008, ApiClass; DAWINO <http://www.beedol.cz>]. Существует несколько схем последовательности маркировки точек на изображении [Tofilski, 2008; Nawrocka et al., 2018; Miguel et al., 2011; Baylac et al., 2008, ApiClass; DAWINO <http://www.beedol.cz>; Kandemir et al., 2011]. Некоторыми авторами не указывается, какое они брали переднее крыло: правое или левое [Nawrocka et al., 2018; Miguel et al., 2011 и Baylac et al., 2008; ApiClass; Kandemir et al., 2011], другие берут левое переднее [Tofilski, 2008], третьи правое переднее [DAWINO <http://www.beedol.cz>].

Чтобы исключить дальнейшее параллельное развитие несовместимых баз данных в морфометрии медоносных пчёл, Meixner et al. [2013] вносят ряд предложений по стандартизации измерений крыла. Эти предложения заключаются в следующем:

- 1) хранить все будущие данные в виде координат меток (вместо формата производных признаков, таких как углы) для облегчения обмена данными между различными исследованиями и исследовательскими группами;
- 2) использовать схему расположения меток, проиллюстрированную в примере Apiclass (<http://apiclass.mnhn.fr>) и показанную на рисунке 2.

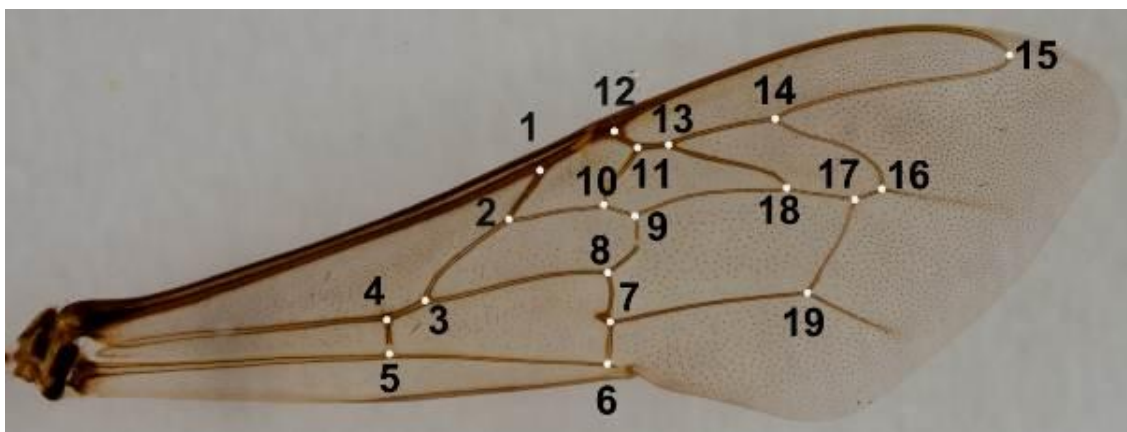


Рис. 2. Расположение точек используемых в системе Apiclass.

Fig. 2. Location points used in the system Apiclass.

Из этих координат, используемых в большинстве геометрических исследований, можно вычислить все 30 признаков метода DAWINO, в т. ч. углы предложенные DuPraw [1964]. Сохранение координат точек вместо вычисляемых признаков позволит сохранить данные доступными при развитии методов анализа.

Вычисление метрических параметров по координатам меток возможно при использовании ПО IMP (Integrated Morphometrics Package) [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018].

Как уже отмечалось выше, ввиду отсутствия обратной совместимости, координаты меток нельзя получить из признаков КМ крыла, но уже предпринят ряд попыток, чтобы связать ГМ с подвидовыми признаками, полученными при использовании КМ. Для этого имеющиеся эталонные образцы банка данных (Oberursel, Germany) были измерены методом ГМ [Kandemir et al., 2011; Nawrocka et al., 2018]. Meixner et al. [2013] ставят вопрос, должна ли «Геометрическая морфометрия» навсегда заменить «Классическую морфометрию», т. е. точный, мощный и эффективный анализ формы, основанный только на геометрии крыла, должен заменить полный набор признаков КМ.

Для филогенетики ГМ более пригодна по сравнению с признаками КМ и представляет собой метод, сопоставимый в определённой степени с молекулярными методами. Так Miguel et al. [2011] сравнили данные полученные с помощью ГМ и микросателлитным анализом и установили их сопоставимость. Эти же авторы считают, что ГМ больше подходит, чем митохондриальный анализ ДНК или КМ при скрининге и идентификации процесса африканизации. В подтверждение предыдущих авторов, Oleksa, Tofilski [2015] в результате сравнения трёх методов идентификации

подвидов, основанных на использовании микросателлитных локусов, митотипах COI-COII и ГМ переднего крыла, установили, что выделение семей в одни и те же группы одинаково у микросателлитного анализа и ГМ. Авторы считают, что ГМ может использоваться для обнаружения гибридов между *Apis mellifera mellifera* и *Apis mellifera carnica* [Oleksa, Tofilski, 2015].

ГМ должна применяться для изучения филогенетических связей между популяциями, экотипами, подвидами, где использование КМ может привести к ошибочным выводам. Группой авторов, на основе ранее проведенных исследований и имеющихся эталонов создано бесплатное программное обеспечение для идентификации подвидов и эволюционных линий пчёл [Nawrocka et al., 2018].

Как считают Meixner et al. [2013], с целью учёта изменчивости медоносных пчёл как числовой записи морфологии подвидов и экотипов, представляется необходимым использовать КМ с большим набором признаков для демонстрации существующих в настоящий момент особенностей подвидов или экотипов, помимо и в дополнение к вопросу об их филогенетики. ГМ жилкования может заменить метрические признаки крыла даже в рамках КМ, но до сих пор не было предпринято никаких попыток, чтобы объединить эти методы [Meixner et al., 2013].

3. Подготовка пробы пчёл для измерения

3.1. Оборудование и материалы

Пинцет глазной (или пинцет эпиляционный или любой другой подобный, если концы (клещи) бранши (рычагов) слишком широкие и толстые, то их можно сточить, также стачиваются зубцы с внутренней стороны клещей), игла препаровальная,

стёкла предметные (чётное количество), глицерин, стеклянная палочка, две чашки Петри.

Персональный компьютер, слайд-сканер или планшетный сканер или фотоаппарат со съёмным объективом на штативе, программное обеспечение.

3.2. Препарирование

Пробу пчёл извлекают из спирта, дают ему стечь, помещают в чашку Петри, где и разворачивают. Извлекают этикетку и кладут её на планшетку, куда затем будет помещено первое предметное стекло с препаратом. Берут пчелу и сразу закрывают чашку Петри, чтобы спирт не испарялся и проба не высохла. Вторую чашку Петри используют для сбора отходов препарирования.

А. Препарирование хоботка.

Сдавливают голову пчелы пинцетом спереди и сзади таким образом, чтобы хоботок как бы выдвинулся вперёд, захватывают его пинцетом вместе с уздечками, стволиками и наружными лопастями максилл и препарируют. Если захват произвести за подбородок, то при неудачном препарировании подподбородок может остаться прикреплённым к уздечкам в голове пчелы. Если всё же это произошло, то надо извлечь подподбородок и поместить его на стекло рядом с хоботком.

В. Препарирование переднего и заднего крыльев.

Переднее крыло препарируется следующим образом – пинцетом берутся за основание крыла и препарируют его. Аналогичным образом препарируется заднее крыло (иногда удаётся за один раз провести препарирование двух крыльев).

С. Первый членик лапки правой задней ножки.

Затем препарируют первый членик лапки правой задней ножки, отрывая его пинцетом.

Д. Третий тергит и третий стернит.

Их препарируют, ведя отсчёт от груди, если необходимо препарируют 2, 4, и т. д. Пинцетом отрывают брюшко от груди, удаляют первый тергит и стернит. Концы (клещи) пинцета вводят внутрь брюшка, отпускают бранши (рычаги). Если не хватает собственной разрывной силы пинцета, пальцем раздвигают бранши (рычаги) и разделяют тергиты и стерниты, очищают их от биомассы.

3.3. Размещение частей хитинового скелета на предметном стекле.

3.3.1. При измерении через стереомикроскоп МБС-9 (или подобный).

Отдельные части хитинового скелета пчелы погружают в глицерин, удаляют лишний глицерин и укладывают на предметное стекло последовательно, по мере препарирования. Либо укладка производится по принципу однотипные части хитинового скелета на отдельном стекле, при этом сохраняется

последовательность по препарированным пчёлам. Далее препарируется следующая пчела, затем другая, пока не заполнится всё стекло (или стёкла). Не следует, особенно вначале освоения методики, увлекаться слишком плотной укладкой частей пчёл, это в дальнейшем может затруднить их измерение.

После заполнения, берут стекло двумя пальцами снизу по длине и сверху, стараясь не сместить препарат, накрывают вторым, взятым по ширине. Слегка сдавливают, затем взяв оба двумя пальцами по длине и держа вертикально стеклянной палочкой сверху по капле, проливают глицерином, чтобы все части пчелы были в глицерине, с минимальным количеством пузырьков воздуха.

3.3.2. При измерении по изображению, полученному с планшетного сканера

Препарирование отдельных частей хитинового скелета пчелы для получения изображения через планшетный сканер, проводится аналогично препарированию при измерении через МБС-9 с некоторыми отличиями. При этом самым тщательным образом надо уделять внимание технике подготовки препаратов. Ввиду того, что после сканирования, изменить, что-либо в изображении, а именно раздвинуть наплывшие друг на друга препарированные отдельные части хитинового скелета пчелы невозможно, размещение их на предметном стекле проводят с таким расчётом и количеством глицерина, чтобы минимизировать возможность смещения элементов препарата. Для подготовки препаратов используется только одно предметное стекло, на котором размещают объекты сканирования. После заполнения стекла, оно быстро переворачивается и кладётся стороной с объектом на стекло сканера.

4. Методы измерения

На сегодняшний день доступен широкий диапазон методов измерения (в том числе стереомикроскоп с окулярной шкалой, измерение по видео в реальном времени, фотографирование или сканирование и анализ в коммерческих и бесплатных программах анализа изображения). Выбор метода измерения не имеет значения, только при одном условии - устройства измерения должны быть тщательно откалиброваны и проверены на наличие оптических искажений (в случае дешёвой оптики). Калибровка, является важной основой правильного представления всех измерений связанных с размером и её нельзя игнорировать.

Чтобы в разных лабораториях получать совместимые данные необходимо всегда проводить измерения или анализ одним способом, единым для всех лабораторий. Это важно, так как личные привычки или "местные методики" в разных лабораториях могут вносить искажения, которые

могут вызвать проблемы и привести к несопоставимости наборов данных. Перед началом работы неопытным исследователям необходимо обратиться за консультацией и использовать перекрестную проверку, измеряя одни и те же образцы. Также между лабораториями, занимающимися определением породной принадлежности пчёл морфометрическим методом, необходимо проводить перекрестную проверку, особенно при освоении новых методов [Meixner et al., 2013].

4.1. Инструментальные измерения

Измерения производят под стереоскопическим микроскопом МБС-9 (или другим подобным, но в настоящих методических рекомендациях речь идет про МБС-9, более подробно по настройке данного микроскопа и по работе с ним см. паспорт данного микроскопа) с помощью окуляра с диоптрийной наводкой со сменной шкалой. Цена деления шкалы 0,1 мм. Это позволяет провести приближённую оценку линейных размеров. Чтобы определить линейные размеры объекта надо подсчитать число делений шкалы, которое укладывается в измеряемый участок объекта, и это число умножить на число, указанное в переводной таблице, соответствующее тому увеличению микроскопа, при котором производится измерение (см. паспорт МБС-9).

Длину крыла измеряют под увеличением $\times 8,21$, а все остальные признаки под увеличением $\times 16,35$. Линейные промеры, выполненные в делениях окулярной шкалы, переводят затем в миллиметры, а индексы выражают в процентах.

При описании признаков использование слов "длина" и "ширина" из-за различного смысла при использовании в зоологии ("длина" по отношению к оси тела) и в разговорном языке ("длина" по отношению к пропорциям объекта). Поэтому, когда смысл не совсем ясен, применяются термины "продольный" и "поперечный" [Ruttner, 1988].

При описании промеров на крыле – берутся точки в местах пересечения мнимых срединных линий жилок [Ruttner, 1988].

В настоящих рекомендациях каждый промер имеет порядковый номер виде арабской цифры, точки взятия промеров (если требуется их размещение) обозначены буквами латинского алфавита.

4.1.1. Используемые в ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства» экстерьерные признаки

Подробное описание дано для тех признаков, которые использовались до настоящего времени в ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства». По остальным признакам, рекомендуемым Meixner et al. [2013], методику измерений можно изучить по Ruttner et al. [1978] и Ruttner [1988]. Признаки, которые находятся на парных органах (крылья, лапки) или на сегментах брюшка (тергиты, стерниты), измеряются аналогично приведённым.

Признак 1 – «Длина хоботка». Методика промера предложена Алпатовым (Alpatov) [1927] (здесь и далее год даётся по источнику, где показан впервые на рисунке промер данного признака), общую длину хоботка он получал путём сложения четырёх последовательных промеров. В настоящее время, если хоботок расправлен, используется один общий промер (рисунок 3).

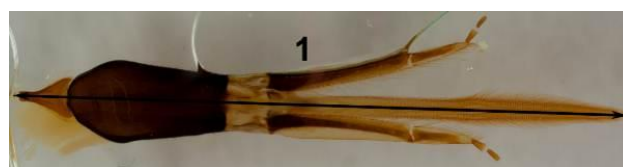


Рис. 3. Признак 1 – «Длина хоботка».

Fig. 3. Feature 1 - "Length of the proboscis".

Признак 2 – «Длина правого переднего крыла» [Алпатов (Alpatov), 1927]. В настоящее время делается один промер общей длины крыла от наивысшей точки на его основании до противоположного края по наибольшему расстоянию (рисунок 4).



Рис. 4. Признак 2-3 – «Правое переднее крыло».

Fig. 4. Feature 2-3 – "Right forewing".

Признак 3 – «Ширина правого переднего крыла» [Алпатов (Alpatov), 1927] измеряется перпендикулярно длине крыла в наиболее широкой его части (рисунок 4).

Признаки 4 и 5 – «Длины отрезков «медиальной жилки»» (M) – «А» и «В» [Goetze, 1964a; Ruttner, 1988] измеряются как расстояние между точками: x – в месте пересечения «медиальной

жилки» (M) с «2-ой радиомедиальной» (2r-m), y – «медиальной жилки» (M) с «2-ой возвратной» (2m-cu), а z – «медиальной жилки» (M) с «3-ей радиомедиальной» (3r-m) (рисунок 5) (здесь и далее, даны названия жилок и ячеек принятые в «Определителе насекомых Дальнего Востока России» [1995] (по Gauld et al. [1988] с изменениями), а морфологическое обозначение их по Richards [1956]).

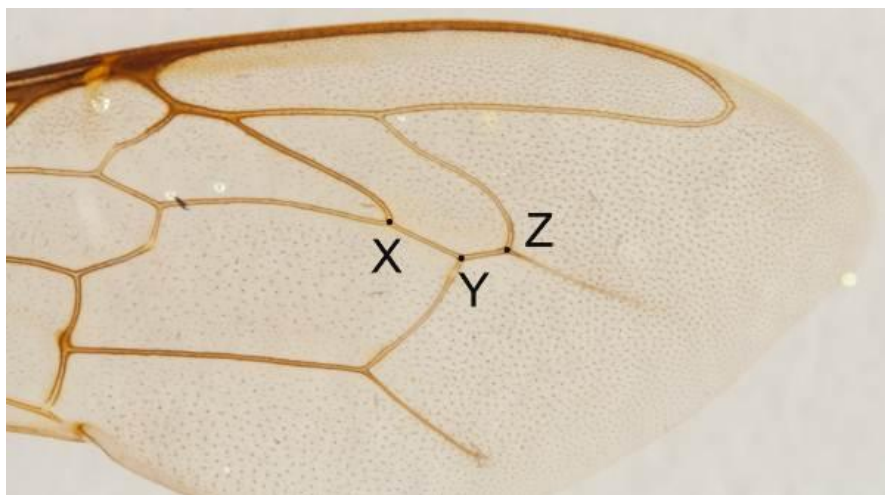


Рис. 5. Признак 4-5 – «Длины отрезков «медиальной жилки»».
Fig. 5. Feature 4-5 – «The lengths of the «media vein»».

Признак 6 – «Дискоидальное смещение» [Goetze, 1964a] определяется путём проведения линии через две максимально удалённые друг от друга точки «2-й радиальной ячейки» (3R₁) и построения перпендикуляра к этой линии, который должен пройти через центр пересечения жилки «радиального сектора» (Rs) и жилки «3-ей радиомедиальной» (3r-m). Знак «0» ставится если данный перпендикуляр

пройдёт через центр пересечений жилок «кубитальной» (Cu) и «2-ой возвратной» (2m-cu), соответственно «+» если слева от этого пересечения, а «-» если пройдет справа. Использование измерения цифрового изображения позволит перейти от «-» «+» к числовой характеристике, т. е. измерять угол дискоидального смещения (рисунок 6).

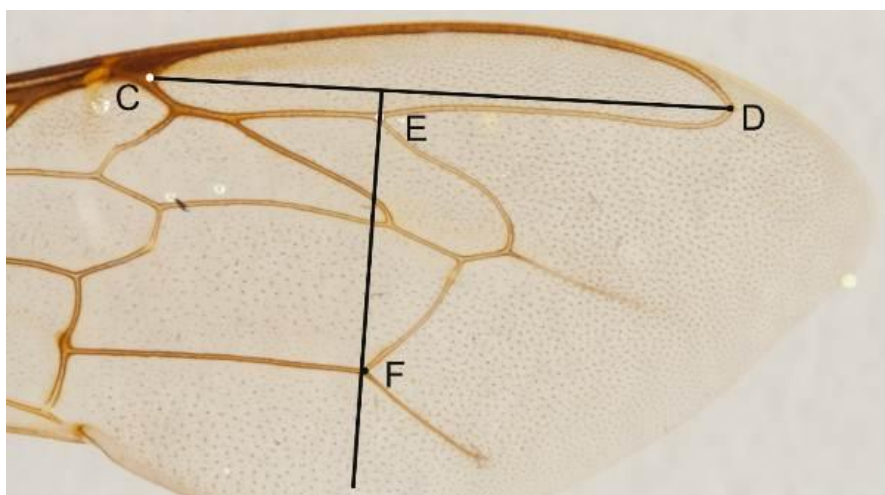


Рис. 6 - Признак 6 – «Дискоидальное смещение» [Goetze, 1964a].
Fig. 6 - Feature 6 – “The discoïd shift” [Goetze, 1964a].

Признак 7 – «Длина третьего тергита – расстояние продольное» [Алпатов (Alpatov), 1927] принято брать по оси тела пчелы, в связи с чем она

оказывается меньше ширины. Можно измерить длины 2 и 4 тергитов (рисунок 7).

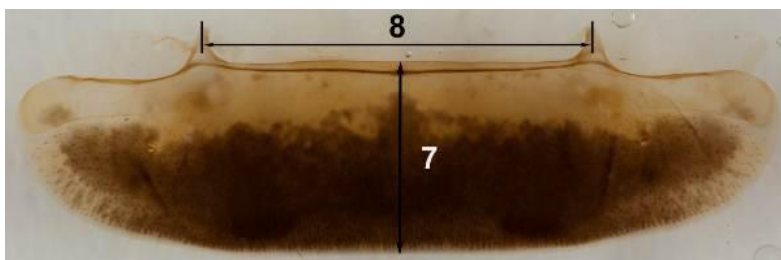


Рис. 7. – Признаки 7-8 на третьем тергите.
Fig. 7. – Features 7-8 on the third tergite.

Признак 8 – «Условная ширина (поперечная) третьего тергита» [Билаш, Кривцов (Bilash, Krivtsov), 1983] - измеряется между центрами выступов тергита, называемыми ародеме (рисунок 6).

Признак 9 – «Длина третьего стернита – расстояние продольное» [Алпатов (Alpatov), 1927] (рисунок 8).

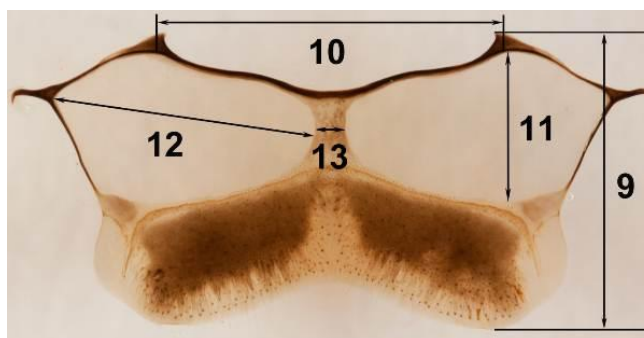


Рис. 8. – Признаки 9-13 на третьем стерните.
Fig. 8. – Features 9-13 on the third sternite.

Признак 10 – «Условная ширина (поперечная) третьего стернита [Билаш, Кривцов (Bilash, Krivtsov), 1983] измеряется между центрами выступов стернита, называемыми ародеме (рисунок 8).

Признак 11 – «Длина воскового зеркальца на третьем стерните» (продольное расстояние) – меньшее расстояние [Ruttner et al., 1978] (рисунок 8)

Признак 12. - Ширина воскового зеркальца на третьем стерните [Алпатов (Alpatov), 1927] (поперечное расстояние) – наибольший диаметр зеркальца. При этом толщина окаймляющей зеркальце кромки не должна учитываться - точки отсчета необходимо брать на внутренней ее стороне, чтобы определить "чистые" размеры зеркальца (рисунок 8).

Признак 13 – «Расстояние между восковыми зеркальцами» [Ruttner et al., 1978] (рисунок 8).

Признак 14 – «Длина первого членика лапки правой задней ножки» [Алпатов (Alpatov), 1927] (рисунок 9).

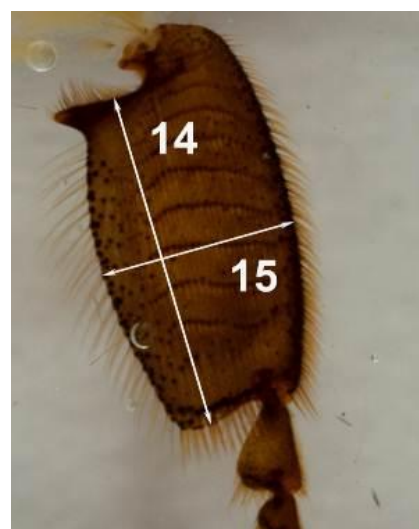


Рис. 9 – Признаки 14-15 на первом членике лапки правой задней ножки.
Fig. 9 – Features 14-15 on the first segment of the right hind tarsus.

Признак 15 – «Ширина первого членика лапки правой задней ножки» [Алпатов (Alpatov), 1927] (рисунок 9).

4.1.2. Вычисляемые индексы

Признак 16 – «Кубитальный индекс» – в настоящее время существует два метода его расчёта:

а) по Алпатову (Alpatov) [1935] - определяется отношением длины меньшего отрезка "А" к длине большего "В" и выражается в процентах.

б) по Goetze [1964a, p. 54, t. II] - определяется отношением длины большего отрезка "В" к длине меньшего "А".

Признак 17 – «Тарзальный индекс» [Алпатову (Alpatov), 1948] (индекс "широколапости"). Этот признак определяется отношением ширины первого членика лапки правой задней ножки к его длине и выражается в процентах.

Признак 18 - «Индекс линейной грузоподъемности (ИЛГ)». Рагим-Заде (Ragim-Zade) [1975] предложил использовать для характеристики потенциальной способности пчёл к сбору корма ИЛГ,

выражающийся отношением длины крыла к суммарной длине 3 и 4 тергитов (в настоящее время не применяется).

4.1.3. Счётные и качественные признаки

Признак 19 – «Количество зацепок на заднем крыле». Кожевников (Kozhevnikov) [1900] отметил, что признак «количество зацепок на заднем крыле» не имеет видового значения, он не даёт диагноза, но может служить для видовой характеристики (искл. *Apis florea Fabricius 1787*). Он так же отметил, что никакого значения для разделения пород этот признак не имеет. Goetze [1964; с. 91-92] указывает, что если виды рода *Apis* и имеют различия в количестве зацепок, которое можно связать с размерами их тела, то среди подвидов и рас *A. mellifera* такую закономерность вывести труднее и что этот признак не гарантирует точную расовую характеристику. Ruttner [1988, стр. 41] считает этот признак непригодным для таксономического разделения и исключает его из группы основных используемых признаков (рисунок 10).

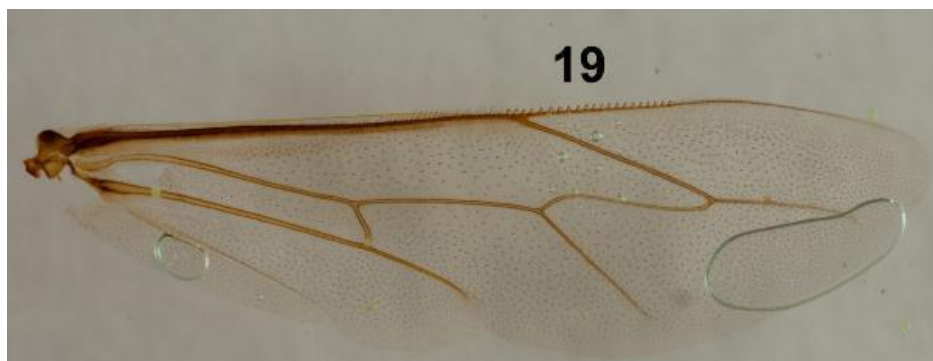


Рис. 10. - Признак 19 Количество зацепок на заднем крыле.
Fig. 10. – Features 19 - "The hamuli number on the hind wing".

Признак 20 – «Класс окраски по Goetze» [Goetze 1964; с. 81, рис. 35, t I] определяется на втором и третьем тергитах по площади заполнения желтым пигментом его поверхности с использованием девяти бальной шкалы. Ruttner et al. [1978, с. 368, рис.4] приводит 10-ти бальную шкалу и оценивает по ней окраску 2-4 тергитов. На наш взгляд, оценка данного признака, носит довольно субъективный характер и, особенно для неопытного сотрудника, довольно затруднительна.

4.2. Измерение на компьютере с использованием программного обеспечения (ПО)

В основном, особенно первыми исследователями [Кожевников (Kozhevnikov), 1900; Алпатов (Alpatov), 1927; Михайлов (Michailov), 1927; и др.], измерения делались вручную, затем стали использовать различные комбинации аналогового, цифрового оборудования и ПО [Daly, 1982; McMullan

J. B., Brown M. J. F., 2006; Tan K. et al., 2007; Meixner M. D. et al., 2007; Quezada-Euán J. J. G. et al., 2007]. Использование ПО значительно повысило точность [по данным Meixner et al., 2013].

4.2.1. Получение оцифрованного изображения объекта

Используемые для получения цифрового изображения системы можно разделить на следующие группы:

1) системы, базирующиеся на штативах микроскопов, макроскопов, стереомикроскопов и других подобных и использующие в качестве устройств захвата изображения различные цифровые видео (исключая окулярные) и фотокамеры (зеркальные и без зеркальные) без объектива. Камеры устанавливаются на микроскопы и т. д. через различные адаптеры. Микроскопы и т. д. перед началом использования необходимо проверить на отсутствие оптических искажений.

2) сканеры:

а) сканеры для слайдов дают изображение с высокой резкостью и хорошим контрастом, т. к. имеют встроенный объектив, а также по сравнению с предыдущими системами, относительно дешевле;

б) планшетные сканеры – не рекомендуются для некоторых автоматических систем (<http://apiclass.mnhn.fr>) из-за плохого контраста и низкой резкости изображения, но по причине их доступности, возможно, их использование, если предполагается ручная расстановка точек (примечание автора. Для сканирования необходимо использовать планшетный сканер, имеющий сенсор типа CCD, так как этот тип сенсора обеспечивает лучшее качество сканирования, т. е. большую глубину резкости по сравнению со сканерами, имеющими сенсор типа CIS).

3) цифровые зеркальные и без зеркальные фотокамеры, установленные на специальных штативах, оснащённые макрообъективами и кольцевыми или макровспышками. В данных системах необходимо, чтобы плоскость препарата была параллельна плоскости матрицы. Не рекомендуется использовать цифровые фотокамеры типа «мост» («мыльница») из-за оптических деформаций, даваемых используемыми в них объективами.

При использовании планшетного сканера, сканирование проводят практически сразу после подготовки препарата, так как глицерин впитывает влагу из воздуха, разжижается и вытекает, вследствие чего ухудшается качество полученного изображения и затрудняется измерение препаратов. Сканирование лучше проводить через подложку из прозрачной плёнки (это предохранит стекло сканера от царапин и ускорит сканирование, избавив от необходимости протирать стекло сканера). Вначале на стекло сканера кладут пленку и на неё помещают подготовленный на предметном стекле препарат. Сверху всё накрывают куском бумаги. Дополнительно можно использовать небольшой груз, чтобы лучше прижать стекло и обеспечить хорошую видимость препарата. Сканирование проводят с разрешением, достаточным для измерения объектов на экране монитора, но не менее 1200 т/дюйм (чем больше разрешение сканирования, тем лучшего качества изображение можно получить, но тем больше времени будет затрачено).

4.2.2. ПО, используемое для проведения измерений

Измерение на компьютере проводят в ПО, предназначенном для анализа изображения, которое позволяет делать требуемые промеры и проводить измерения в нужных единицах, и обладающим достаточной точностью (то есть предоставляющим выходные данные с определённым количеством знаков после запятой). В отличие от измерений,

проводимых с помощью МБС-9, использование ПО позволит измерять ломаные линии, углы, площади и т.д. На схеме (рисунок 11) показано группирование ПО для работы с изображениями, применяемое в изучении медоносных пчёл по его использованию. Существует группа ПО, не показанная на схеме, это макросы написанные для MS Excel, которые используют координаты меток полученные с помощью tpsDig. С помощью этих макросов вычисляют кубитальный индекс, угол дискоидального смещения и гантельный индекс.

ПО можно получить бесплатно: скачав из интернета (бесплатное ПО) или как бонус при покупке какого-либо оборудования (например, окулярной камеры). ПО можно также купить отдельно. При измерении используют промеры описанные выше. При получении показателей КМ, перед измерением необходимо провести калибровку программы по цифровому изображению шкалы, имеющей деления необходимой точности и полученному при таких же условиях что и изображению хитиновых частей пчёл. Инструкции по калибровке см. в справке к соответствующему ПО.

В ГМ, для расстановки меток вручную, используется программа tpsDig Rohlf [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018]. Наряду с этим создаются и используются ПО, работающее в полуавтоматическом [Quezada-Euán et al., 2003; Steinhage et al., 1997] и автоматическом [Steinhage et al., 2007; DrawWing - Tofilski, 2004; Apiclass - Baylac et al., 2008] режимах измерений. Эти режимы позволили сократить время анализа и повысить точность идентификации видов пчёл. Но для работы в этих режимах, часто необходимо иметь изображения высокого качества.

5. Математическая обработка результатов

При математической обработке полученных данных на компьютере, в зависимости от уровня сложности, используется различное ПО (MS Excel[®], Statistica[®] и др.). Для анализа используются только измеряемые первичные признаки, а не суммы или индексы. При измерении на МБС-9 данные записывают в специальную тетрадь, а затем заносят в компьютер в соответствующую программу, например в MS Excel[®] или подобную, имеющую возможность математической обработки данных. При измерении на компьютере, данные сразу передаются в подобное ПО. Также ранее данные обрабатывались с использованием калькулятора, по формулам, приведённым в соответствующей литературе [Плохинский (Plokhinskii), 1969; 1970 и другие]. Ввиду того, что существует несколько школ по биометрической обработке, необходимо проверять полученные данные математической обработки на соответствие с результатами, которые получаются при расчётах на калькуляторе по формулам, изложенным у Плохинского.

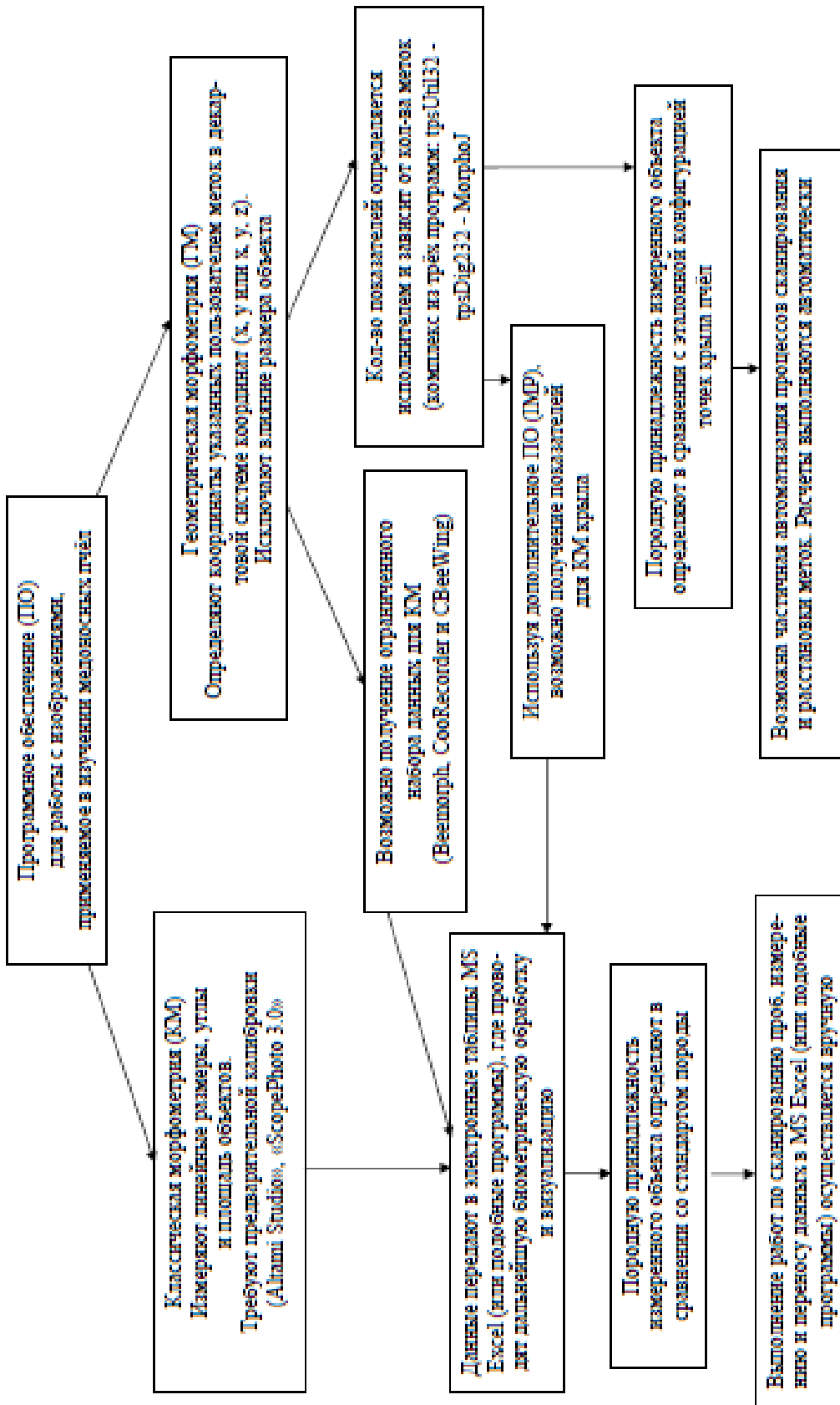


Рис. 11. – ПО применяемое в изучении медоносных пчёл.
Fig. 11. - Software used in study of honeybees.

Для более сложных методов многомерного статистического анализа (метод главных компонент (PCA), методы канонического (CVA) и дискриминантного анализа и другие) используется ПО Statistica[®] или подобное. Также отдельные элементы математического анализа присутствуют в ПО для ГМ (например в MorphoJ и других).

Два основных метода (метод главных компонент (PCA), группирование кластеризаций k-средних) используются для определения того, представляют ли исследуемые образцы одну или несколько групп. Если эти два метода привели к чёткому определению группы, то дальше полученные данные обрабатываются дискриминантным анализом (ДА), который определяет значимость групповых различий и точность, с которой образцы перераспределяются в группы.

Следует обратить внимание на то, что пробелы в структуре выборки могут создать впечатление, что существуют две или более различных групп, которые проверяются статистически, но различие исчезнет при более равномерной выборке диапазона [Radloff, Hepburn, 1998]. В тоже время, истинные группы характеризуются внезапными морфологическими изменениями в зависимости от их географического происхождения, что может быть подтверждено географическими участками и отношениями к физиогеографии [Meixner et al., 2013].

Более подробно о методах анализа и применяемом для этого ПО можно прочитать в соответствующей литературе [Васильев и др. (Vasil'ev et al.), 2018; Zelditch et al., 2004; 2004a].

6. Определение подвидовой, расовой (породной) принадлежности исследуемой пчелиной семьи

Если известно происхождение анализируемых образцов, то для причисления образца к конкретной породе (расе) достаточно нескольких признаков, что позволит значительно сократить время, затраченное на анализ. Например, признаки, получаемые путём различных математических действий с измеряемыми признаками пригодны для упрощенного разделения групп, которое годится для применения пчеловодами.

Большинство стран Европы используют собственные независимые требования к идентификации подвидов с ограниченным числом признаков, а в некоторых странах лаборатории проходят официальную аттестацию для идентификации пород (рас) [см. Vouga et al., 2011]. В настоящий момент, по данным Meixner et al. [2013], отсутствует полный каталог морфометрических изменений медоносных пчёл в Европе, нет единой утверждённой системы идентификации европейских

пчёл и существует необходимость экономии затрат труда и времени. Автоматизированный геометрический анализ крыла может оказаться наиболее эффективным методом идентификации в будущем, но пока не установлена достоверность разделения с помощью только ГМ всех европейских подвидов и известных экотипов друг от друга. Вероятно, надо будет включить дополнительные признаки КМ в такую предполагаемую общеевропейскую систему, которая еще не разработана [Meixner et al., 2013].

Определение потенциальной материнской семьи как свободной от африканских генов - особый случай идентификации образцов, когда для достижения быстрого результата использовано или разработано специальное ПО, основанное только на нескольких морфометрических признаках медоносных пчёл африканского и европейского происхождения [Rinderer et al., 1986; 1987; FABIS (быстрая система распознавания африканизации пчёл)]. Так Rinderer et al. [1986] использовали метод компьютерного измерения по Daly et al. [1982] и ПО SAS[®], а в 1987 году ещё и ПО SPSS[®] для разделения африканских и европейских пчёл. Но т. к. цель метода это проведение разделения между «африканскими» и «европейскими» пчёлами, чёткость разделения является довольно низкой и не подходит для дальнейшего разделения подвидов [Meixner et al., 2013]. В Carl Hayden исследовательском центре пчеловодства лаборатории USDA-ARS используется FABIS для предварительного определения «африканизации», а затем полный морфометрический анализ, если она будет обнаружена (дата обращения 28.01.2019). (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=11053>)

ДА, основанный на полном наборе признаков, является основным методом исследования для определения распределения изучаемых выборок среди эталонных групп. Процесс ДА проводят в два этапа. Этап 1 - используется максимально возможный набор эталонных образцов, для подтверждения их правильного перераспределения по группам. Вводя измеряемые признаки один за другим, можно определить группу признаков, подтверждающих разделение эталонных групп, и для дальнейшей работы учитывать только эти признаки. Этап 2 - включение в анализ изучаемой выборки и определение вероятности попадания в каждую из эталонных групп. Однако ДА непригоден для обнаружения новых разновидностей или экотипов, т. к. выбор проводится между ограниченным и определённым числом эталонных групп. Новые типы не могут быть отнесены ни к одному из них, а

гибриды не могут быть отделены от действительно новых типов [Meixner et al., 2013].

Заключение

1. В России при поддержке государства, учитывая опыт стран Европы (например, Норвегии) необходимо вокруг пасек, занимающихся разведением чистопородного материала, создавать охраняемые территории, т. е. изолировать их от попадания генов других пород (рас) *A. mellifera*.

2. Требуется создать базу эталонных образцов для выявления разновидностей и популяций, которые будут использоваться для селекции.

3. В настоящее время в России существует необходимость разработки и принятия общего стандарта для определения понятия «эталонного образца» и правил его оформления с организацией хранения эталонов и данных по ним в свободном доступе.

4. Необходимо объединить базы данных по подвидам и популяциям, полученные с помощью различных методов в единую базу, которая станет ориентиром для будущих исследовательских проектов по идентификации подвидов и популяций; перевести справочные данные в свободный доступ; соединить различные лаборатории, имеющие в своем хранении независимые эталонные образцы, в единую сеть.

5. Необходимо объединить имеющиеся методы морфометрии и создать единую методику для обеспечения сопоставимости получаемых данных.

6. Дополнительно, к этим 19 меткам можно добавить ещё четыре (рисунок 12):

- метка, помеченная зелёным (20), добавлена Kandemir et al. [2011];

- три метки, помеченные красным (21-23), предлагаются нами, они находятся на хорошо локализуемых участках крыла.

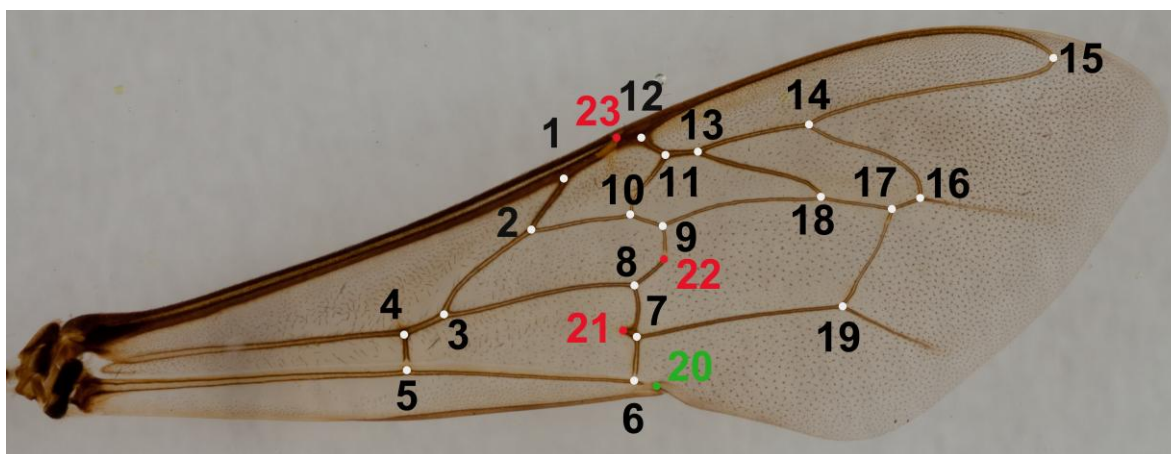


Рис. 12. Расположение точек, используемых в системе Apiclass, включая добавленные.

Fig. 12. Location of points used in the system Apiclass, including added.

Литература

1. Алпатов В.В. Биометрическая характеристика среднерусской и украинской пчелы. *Revue Zoologique Russe*. 1927. - Т. VII(4). С. 31-74.
2. Алпатов В.В. К познанию изменчивости медоносной пчелы. III. Кубитальная ячейка на крыльях видов рода *Apis* и её диагностическое и эволюционное значение. *Revue Zoologique*. 1935. Т. 14(4). С. 664-673.
3. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы как основа её племенного разведения. М.: Издание МГУ. 1945. 56 с.
4. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. М.: Изд-во МОИП. 1948. 183 с.

5. Биладш Г.Д., Кривцов Н.И. Измерение экстерьера пчел. Методические рекомендации. Рыбное. 1983. 11 с.
6. Васильев А.Г., Васильева И.А., Шкурихин А.О. Геометрическая морфометрия: от теории к практике. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2018. 471 с.
7. Кожевников Г.А. Материалы по естественной истории пчелы (*Apis mellifera* L.), вып. I, Известия императорского общества любителей естественного знания, антропологии и этнографии. Т. 49. Труды зоол. отд., Т. 14, 1900. 144 с. с ил.
8. Кожевников Г.А. Породы кавказских пчел. Бесплатное приложение к *Vestniku Russkago Obshchestva Pchelovodstva* за 1900. С.-Петербург. 1900а. 24 с.

9. Кожевников Г.А. Материалы по естественной истории пчелы (*Apis mellifera* L.), вып. II, Известия императорского общества любителей естествознания, антропологии и этнографии. Т. 49. Труды зоол. отд., Т. 14. 1905. 181 с. с ил.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во Высш. школа. 1980. 293 с., ил.
11. Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетики сельскохозяйственных животных. Уч-ки и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений. М.: «Колос». 1970. 423 с. с илл.
12. Михайлов А.С. Сезонная изменчивость пчел. *Opitnaya paseka*. 1927. Т. 2(6). С. 180-183.
13. Определитель насекомых Дальнего Востока России в 6 томах. Т. 4. Сетчатокрылообразные, скорпионницы, перепончатокрылые. Ч. 1, под общ. ред. член.-кор. РАН П.А. Лера. СПб.: Наука. 1995. 606 с.
14. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Киреева Т.Н., Воротов А.А., Белых Е.А. Генетическое разнообразие локуса COI-COII мтДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области. *Russian Journal of Genetics*. 2015. Т. 51(1). С. 89-100.
15. Павлинов И.Я. Геометрическая морфометрия – новый аналитический подход к сравнению компьютерных образов. В кн.: Информационные и телекоммуникационные ресурсы в зоологии и ботанике. СПб. 2001. С. 65-90.
16. Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии. *Zhurnal Obshchei biologii*. 2002. Т. 63(6). С. 473-493.
17. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников. М.: Колос. 1969. 256 с. илл.
18. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Московского университета. 1970. 368 с.
19. Рагим-Заде М.С. ИЛГ в пчеловодстве. *Pchelovodstvo*. 1975. № 2. С. 14-17.
20. Baylac M., Garnery L., Tharavy D., Pedraza-Acosta J., Rortais A., Arnold G. ApiClass, an automatic wing morphometric expert system for honey bee identification [online]. 2008. <http://apiclass.mnhn.fr>
21. Bookstein F.L. Morphometric tools for landmark data. *Geometry and biology*. Cambridge University Press; New York, USA. 1992. 435 p. doi: 10.1017/CBO9780511573064
22. Bookstein F.L. Combining the tools of geometric morphometrics. pp. 131-151. In: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. [eds.]. *Advances in morphometrics*. Plenum Press, NY, L. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 284. Springer, Boston, MA. 1996. Print ISBN 978-1-4757-9085-6. doi: 10.1007/978-1-4757-9083-2_12
23. Bouga M., Alaux C., Bienkowska M., Büchler R., Carreck N.L., Cauia E., Chlebo R., Dahle B., Dall'Olio R., De la Rúa P., Gregorc A., Ivanova E., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kozmus P., Kryger P., Le Conte Y., Lodesani M., Murilhas A. M., Siceanu A., Soland G., Uzunov A., Wilde J. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*. 2011. V. 50(1) P. 51-84. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.06
24. Cermák K., Kaspar F. A method of classifying honey bee races by their body characters. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 2000. 2: P. 81-85.
25. Cermák K., Kaspar F., [online] www.beedol.cz
26. Currie R. W., Jay S. C. The influence of a colony's queen state, time of the year, and drifting behaviour, on the acceptance and longevity of adult drone honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*. 1988. V. 27(4). P. 219–226. doi: 10.1080/00218839.1988.11100806
27. Daly H.V., Hoelmer K., Norman P., Allen T. Computer assisted measurement and identification of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 1982. V. 75(6). P. 591–594. doi: 10.1093/aesa/75.6.591
28. DuPraw E.J. Non-Linnean taxonomy. *Nature*. 1964. V. 202(4935). P. 849-852. doi: 10.1038/202849a0
29. DuPraw E.J. Non-Linnean taxonomy and the systematics of honey bees. *Systematic Zoology*. 1965. V. 14(1) P. 1-24. doi: 10.2307/2411899
30. DuPraw E.J. The recognition and handling of honeybee specimens in non-Linnean taxonomy. *Journal of Apicultural Research*. 1965a. V. 4(2). P. 71-84. doi: 10.1080/00218839.1965.11100107
31. FABIS (Fast Africanized Bee Identification System), USDA-ARS laboratory (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=11053>) (дата обращения 28.01.2019).
32. Floris I., Satta A., Ruiu L., Buffa F. Searching for the origin of sardinian honeybees. Morphometric comparison between samples from Sardinia and northern Tunisia. *Redia*. 2007. V.40. P. 105-108.
33. Francoy T.M., Prado P.R.R., Gonçalves L.S., Da Fontoura Costa L., De Jong D. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*. 2006. V. 37(1). P. 91-97. doi: 10.1051/apido:2005062
34. Francoy T.M., Wittmann D., Drauschke S., Müller S., Steinhage V., Bezerra-Laure M.A.F., De Jong D., Gonçalves L.S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*. 2008. V. 39(5). P. 488-494. doi: 10.1051/apido:2008028
35. Gauld I.D., Bolton B., Huddleston T., Fitton M.G., Shaw M.R., Noyes J.S., Day M.C., Else G.R.,

- Fergusson N.D.M., Ward S.L. The Hymenoptera. In Gauld I.D., Bolton B. [Eds.]. British Museum (Natural History) Oxford University Press, New York. 1988. 332 p. doi:10.1163/187631289X00410
36. Goetze G.K.L. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil I : Systematik, Zeugung und Vererbung. Monographien zur angewandten Entomologie, V. 19, 120 S. Parey, Hamburg. 1964. doi.org/10.1002/mmnd.19650120110
37. Goetze G.K.L. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil II : Beurteilung und züchterische Auslese von Bienenvölkern. Monographien zur angewandten Entomologie, V. 20, 92 S. 1964a. doi.org/10.1002/mmnd.19650120110
38. Hassett J., Browne K.A., McCormack G.P., Moore E., Native Irish Honey Bee Society, Soland G., Geary M. A significant pure population of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) remains in Ireland. *Journal of Apicultural Research*. 2018. V. 57(3). P. 337–350. doi: 10.1080/00218839.2018.1433949
39. Jay S.C. The problem of drifting in commercial apiaries. *American Bee Journal*. 1969. V. 109(5). P. 178–179.
40. Kandemir I., Özkan A., Fuchs S. Reevaluation of honey bee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie*. 2011. V. 42(5). P. 618–627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3
41. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 2011. V. 11(2). P. 353–357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
42. Marcus L.F., Bello R. E., Garcia-Valdesas A. (eds). Contributions to morphometrics. C.S.C.I., Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. 1993. doi: 10.5962/bhl.title.15368
43. McMullan J. B., Brown M. J. F. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2006. V. 37(6). P. 665–672. doi: 10.1051/apido:2006041
44. Meixner M. D., Worobik M., Wilde J., Fuchs S., Koeniger N. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe - morphometric variation and determination of range limits. *Apidologie*. 2007. V. 38(2). P. 191–197. doi: 10.1051/apido:2006068
45. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013. V. 52(4). P. 1–27. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
46. Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L., Estonba A. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*. 2011. V. 42(2). P. 150–161. doi: 10.1051/apido/2010048
47. Nawrocka A., Kandemir İ., Fuchs S., Tofilski A. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*. 2018. V. 49(2). P. 172–184. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
48. Neumann P., Moritz R. F. A., Mautz D. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honey bees (*Apis mellifera* L.) at a performance testing apiary. *Apidologie*. 2000. V. 31(1). P. 67–79. doi: 10.1051/apido:2000107
49. Oleksa A., Tofilski A. Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*. 2015. V. 46(1). P. 49–60. doi: 10.1007/s13592-014-0300-7
50. Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kucher A.N., Kireeva T.N., Vorotov A.A., Belikh E.A. Genetic diversity of the locus COI–COII of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk region. *Russian Journal of Genetics*. 2015a. V. 51(1). P. 80–90. doi: 10.1134/S102279541501010X
51. Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kucher A.N., Sharakhov I.V. A comprehensive characterization of the honeybees in Siberia (Russia). pp. 1–37. In: E.D. Chambó (ed.). Beekeeping and Bee Conservation – Advances in Research. InTech, Grotia. 2016. doi: 10.5772/62395
52. Ostroverkhova N., Kucher A., Badmazhapova E., GushchIna E., Kireeva T., Konusova O., Pogorelov Y., Yartsev V. Genetic diversity of honey bee *Apis mellifera* in Northern Asia. In: R. Ilyasov and H.W. Kwon [eds.]. Phylogenetics of Bees. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., USA (in press).
53. Pinto M.A., Henriques D., Chávez-Galarza J., Kryger P., Garnery L., van der Zee R., Dahle B., Soland-Reckeweg G., de la Rúa P., Dall' Olio R., Carreck N.L., Johnston J.S. Genetic integrity of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: A genome wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*. 2014. V. 53(2). P. 269–278. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.08
54. Quezada-Euán J. J.G., Pérez-Castro E.E., May-Itzá W. de J. Hybridization between European and African-derived honey bee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Peru. *Apidologie*. 2003. V. 34(3). P. 217–225. doi: 10.1051/apido:2003010
55. Quezada-Euán J. J. G., Paxton R. J., Palmer K. A., May Itzá W. de J., Tek Tay W., Oldroyd B. P. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (*Apidae: Meliponini*). *Apidologie*. 2007. V. 38(3). P. 247–258. doi: 10.1051/apido:2007006
56. Radloff S.E., Hepburn H.R. The matter of sampling distance and confidence levels in the subspecies classification of honey bees, *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1998. V. 29(6). P. 491–501. doi: 10.1051/apido:19980602

57. Radloff S.E., Hepburn H.R., Lindsey J.B. Quantitative analysis of intracolony and intercolony morphometric variance in honey bees, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Apidologie*. 2003. V. 34(4). P. 339-351. doi: 10.1051/apido:2003034
58. Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn H.R., Fuchs S., Hadisoeso S., Tan K., Engel M.S., Kuznetsov V. Population structure and classification of *Apis cerana*. *Apidologie*. 2010. V. 41(6). P. 589-601. doi: 10.1051/apido/2010008
59. Richards O.W. Hymenoptera. Introduction and key to families. Handbooks for the Identification of British Insects 6, 1. 1956. 94 pp.
60. Rinderer T.E., Sylvester H.A., Brown M.A., Villa J.D., Pesante D., Collins A.M., Spencer R., Kleinpeter S., Lancaster V. Field and simple techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1986. V. 17(1). P. 33-48. doi: 10.1051/apido:19860104
61. Rinderer T.E., Sylvester H.A., Bucu S.M., Lancaster V.A., Herbert E.W., Collins A.M., Hellmich R.L., Davis G.L., Winfrey D. Improved simple techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1987. V. 18(2). P. 179-196. doi: 10.1051/apido:19870208
62. Rohlf F.J. Relative warps analysis and example of its application to mosquito wings. pp. 131-160. In: Marcus L.F., Bello E., Garcia-Valdesas A. [eds.]. Contributions to morphometrics. C.S.C.I., Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. 1993. doi: 10.5962/bhl.title.15368
63. Rohlf F.J., Marcus L.F. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 1993. V. 8(4). P. 129-132. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J
64. Rohlf F.J. Morphometric spaces, shape components and the effect of linear transformations. pp. 131-152. In: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. [eds.]. Advances in morphometrics. Plenum Press, NY, L. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 284. Springer, Boston, MA. 1996. doi: 10.1007/978-1-4757-9083-2_12
65. Ruottinen L., Berg P., Kantanen J., Kristensen T.N., Præbel A. Status and Conservation of the Nordic Brown Bee: Final report. NordGen. Nordic Genetic resource center, Norway. 2014.
66. Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1978. V. 9(4). P. 363-381. doi: 10.1051/apido:19780408
67. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany. 1988. doi: 10.1007/978-3-642-72649-1
68. Satta A., Floris I., Pigliaru G. DataBees: uno strumento informatico per la gestione delle risorse Api e Mieli. *APOidea*. 2004. V. 1(1). P. 25-30.
69. Steinhage V., Kastenholz B., Schröder S., Drescher W. A hierarchical approach to classify solitary bees based on image analysis. Book Chapter. Mustererkennung 19. DAGM-Symposium, Braunschweig, Sept. 15-17, 1997, Informatik Aktuell; Springer, Germany. pp. 419-426. 1997. doi: 10.1007/978-3-642-60893-3_45
70. Steinhage V., Schröder S., Lampe K.H., Cremers A.B. Automated extraction and analysis of morphological features for species identification. pp. 115-129. In MacLeod N. (Ed.). Automated taxon identification in systematics: theory, approaches and applications. Natural History Museum, London, UK; CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL. 2007. doi: 10.1201/9781420008074.ch8
71. Tan K., Radloff S. E., Hepburn H. R., Yang M., Zhang L., Fan X. Environmentally-induced developmental effects on morphometric characters of workers in *Apis cerana* colonies. *Apidologie*. 2007. V. 38(3). P. 289-295. doi: 10.1051/apido:2007011
72. Thompson d'Arcy, W. On growth and form. Cambridge: University Press 1945. doi: 10.5962/bhl.title.6462
73. Tofilski A. DrawWing, a program for numerical description of insect wings. *Journal of Insect Science*. 2004. V. 4(17). P. 1-5. doi: 10.1673/031.004.1701
74. Tofilski A. Automatic Measurement of Honeybee Wings. pp. 289-298. In MacLeod N. (Ed.). Automated taxon identification in systematics: theory, approaches and applications. Natural History Museum, London, UK; CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL. 2007. doi: 10.1201/9781420008074.ch17
75. Tofilski A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honey bee subspecies. *Apidologie*. 2008. V. 39(5). P. 558-563. doi: 10.1051/apido:2008037
76. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic, New York, USA. 2004. 443 pp. doi: 10.1016/B978-012778460-1/50000-4
77. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. A Practical Companion to Geometric Morphometrics for Biologists: Running analyses in freely - available software. 2004a. 233 p.

References

- Alpatov W.W. Biometricheskaya kharakteristika srednerusskoi i ukrainskoi pchely. *Revue Zoologique Russe* 1927. V. VII(4). P. 31-74. (Biometrical study on bees of Middle and Southern Russia - in Russian, with English summary)
- Alpatov W.W. K poznaniyu izmenchivosti medonosnoi pchely. III. Kubital'naya yacheika na kryl'yakh vidov roda *Apis* i ee diagnosticheskoe i evolyutsionnoe znachenie. *Revue Zoologique*. 1935. V.

- XIV(4). P. 664-673. (Contribution to the study of variation in honey bee. III. The cubital cell on the wings of different forms of the genus *Apis* and its taxonomical and evolutionary significance - in Russian, with English summary)
3. Alpatov W.W. Porody medonosnoi pchely kak osnova ee plemennogo razvedeniya. MGU Press, Moscow. 1945. 183 p. (The races of honey bees as the basis of its breeding - in Russian)
 4. Alpatov W.W. Porody medonosnoi pchely i ikh ispol'zovanie v sel'skom khozyaistve. Sredi Prirodi, book 4. MOIP Press, Moscow. 1948. 183 p. (The races of honey bees and their use in agriculture - In Russian)
 5. Baylac M., Garnery L., Tharavy D., Pedraza-Acosta J., Rortais A., Arnold G. ApiClass, an automatic wing morphometric expert system for honey bee identification [online]. 2008. <http://apiclass.mnhn.fr>
 6. Bilash G.D., Krivtsov N.I. Izmerenie ekster'era pchel. Metodicheskie rekomendatsii. NIIP Press, Rybnoe. 1983. 11 p. (Measuring the exterior of bees. Methodical recommendation - In Russian)
 7. Bookstein F.L. Morphometric tools for landmark data. Geometry and biology. Cambridge University Press; New York, USA. 1992. 435 p. doi: 10.1017/CBO9780511573064
 8. Bookstein F.L. Combining the tools of geometric morphometrics. pp. 131-151. In: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. [eds.]. Advances in morphometrics. Plenum Press, NY, L. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 284. Springer, Boston, MA. 1996. Print ISBN 978-1-4757-9085-6. doi: 10.1007/978-1-4757-9083-2_12
 9. Bouga M., Alaux C., Bienkowska M., Büchler R., Carreck N.L., Cauia E., Chlebo R., Dahle B., Dall'Olio R., De la Rúa P., Gregorc A., Ivanova E., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kozmus P., Kryger P., Le Conte Y., Lodesani M., Murilhas A. M., Siceanu A., Soland G., Uzunov A., Wilde J. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*. 2011. V. 50(1) P. 51-84. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.06
 10. Cermák K., Kaspar F. A method of classifying honey bee races by their body characters. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 2000. 2: P. 81-85.
 11. Cermák K., Kaspar F., [online] www.beedol.cz
 12. Currie R.W., Jay S.C. The influence of a colony's queen state, time of the year, and drifting behaviour, on the acceptance and longevity of adult drone honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*. 1988. V. 27(4). P. 219-226. doi: 10.1080/00218839.1988.11100806
 13. Daly H.V., Hoelmer K., Norman P., Allen T. Computer assisted measurement and identification of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 1982. V. 75(6). P. 591-594. doi: 10.1093/aesa/75.6.591
 14. DuPrav E.J. Non-Linnean taxonomy. *Nature*. 1964. V. 202(4935). P. 849-852. doi: 10.1038/202849a0
 15. DuPrav E.J. Non-Linnean taxonomy and the systematics of honey bees. *Systematic Zoology*. 1965. V. 14(1) P. 1-24. doi: 10.2307/2411899
 16. DuPrav E.J. The recognition and handling of honeybee specimens in non-Linnean taxonomy. *Journal of Apicultural Research*. 1965a. V. 4(2). P. 71-84. doi: 10.1080/00218839.1965.11100107
 17. FABIS (Fast Africanized Bee Identification System), USDA-ARS laboratory (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=11053>) (дата обращения 28.01.2019).
 18. Floris I., Satta A., Ruiu L., Buffa F. Searching for the origin of sardinian honeybees. Morphometric comparison between samples from Sardinia and northern Tunisia. *Redia*. 2007. V.40. P. 105-108.
 19. Francoy T.M., Prado P.R.R., Gonçalves L.S., Da Fontoura Costa L., De Jong D. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*. 2006. V. 37(1). P. 91-97. doi: 10.1051/apido:2005062
 20. Francoy T.M., Wittmann D., Drauschke S., Müller S., Steinhage V., Bezerra-Laure M.A.F., De Jong D., Gonçalves L.S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*. 2008. V. 39(5). P. 488-494. doi: 10.1051/apido:2008028
 21. Gauld I.D., Bolton B., Huddleston T., Fitton M.G., Shaw M.R., Noyes J.S., Day M.C., Else G.R., Fergusson N.D.M., Ward S.L. The Hymenoptera. In: Gauld I.D., Bolton B. [Eds.]. *British Museum (Natural History) Oxford University Press, New York*. 1988. 332 p. doi:10.1163/187631289X00410
 22. Goetze G.K.L. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil I : Systematik, Zeugung und Vererbung. Monographien zur angewandten Entomologie, V. 19, 120 S. Parey, Hamburg. 1964. doi.org/10.1002/mmnd.19650120110
 23. Goetze G.K.L. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil II : Beurteilung und züchterische Auslese von Bienenvölkern. Monographien zur angewandten Entomologie, V. 20, 92 S. 1964a. doi.org/10.1002/mmnd.19650120110
 24. Hassett J., Browne K.A., McCormack G.P., Moore E., Native Irish Honey Bee Society, Soland G., Geary M. A significant pure population of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) remains in Ireland. *Journal of Apicultural Research*. 2018. V. 57(3). P. 337-350. doi: 10.1080/00218839.2018.1433949
 25. Jay S.C. The problem of drifting in commercial apiaries. *American Bee Journal*. 1969. V. 109(5). P. 178-179.

26. Kandemir I., Özkan A., Fuchs S. Reevaluation of honey bee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie*. 2011. V. 42(5). P. 618–627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3
27. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 2011. V. 11(2). P. 353–357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
28. Kozhevnikov G.A. Materialy po estestvennoi istorii pchely (*Apis mellifera* L.), vyp. I, Izvestiya imperatorskogo obshchestva lyubitelei estestvoznaniya, antropologii i etnografii. Vol. XCIX, Trudy zool. otd., V. 14. Moscow. 1900. 144 p. (Materials to the natural history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) Vol. I. Soc. des Amateurs des Sciences Naturalles. - in Russian)
29. Kozhevnikov G.A. Porody kavkazskikh pchel. Besplatnoe prilozhenie k Vestniku Russkago Obshchestva Pchelovodstva for 1900, S.-Peterburg. 1900a. 24 p. (Races of Caucasian bees - in Russian)
30. Kozhevnikov G.A. Materialy po estestvennoi istorii pchely (*Apis mellifera* L.), vyp. II, Izvestiya imperatorskogo obshchestva lyubitelei estestvoznaniya, antropologii i etnografii. Vol. XCIX, Moscow. 1905. 181 p. (Materials to the natural history of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Vol. II. Soc. des Amateurs des Sciences Naturalles - in Russian)
31. Lakin G.F. Biometriya: Ucheb. posobie dlya biologic. spets. vuzov. 3-e izd., pererab. i dop. M.: Izd-vo Vyssh. shkola. 1980. 293 p., il. (Biometrics - in Russian)
32. Marcus L.F., Bello R. E., Garcia-Valdesas A. (eds). Contributions to morphometrics. C.S.C.I., Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. 1993. doi: 10.5962/bhl.title.15368
33. McMullan J. B., Brown M. J. F. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2006. V. 37(6). P. 665–672. doi: 10.1051/apido:2006041
34. Meixner M. D., Worobik M., Wilde J., Fuchs S., Koeniger N. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe - morphometric variation and determination of range limits. *Apidologie*. 2007. V. 38(2). P. 191–197. doi: 10.1051/apido:2006068
35. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013. V. 52(4). P. 1–27. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
36. Merkur'eva E.K. Biometriya v seleksii i genetiki sel'skokhozyaistvennykh zivotnykh. Uch-ki I ucheb. posobiya dlya vyssh. s.-kh. ucheb. zavedenii. M.: Kolos. 1970. 423 p. s ill. (Biometrics in selection and genetics of agricultural animals - in Russian)
37. Miguel I., Baylac M., Iriando M., Manzano C., Garnery L., Estonba A. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*. 2011. V. 42(2). P. 150–161. doi: 10.1051/apido/2010048
38. Mikhailov A.S. Sezonnaya izmenchivost' pchel. *Opytnaja Paseca* 1927. No 6. P. 180–183. (Seasonal variability of bees - in Russian)
39. Nawrocka A., Kandemir İ., Fuchs S., Tofilski A. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*. 2018. V. 49(2). P. 172–184. doi: 10.1007/s13592-017-0538-y
40. Neumann P., Moritz R. F. A., Mautz D. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honey bees (*Apis mellifera* L.) at a performance testing apiary. *Apidologie*. 2000. V. 31(1). P. 67–79. doi: 10.1051/apido:2000107
41. Oleksa A., Tofilski A. Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie*. 2015. V. 46(1). P. 49–60. doi: 10.1007/s13592-014-0300-7
42. Opredelitel' nasekomykh Dal'nego Vostoka Rossii v 6 tomakh. T. 4. Setchatokryloobraznye, skorpionnitsy, pereponchatokrylye. Ch. 1, pod obshch. red. chlen.-kor. RAN P.A. Lera. SPb.: Nauka. 1995. 606 p. (The determinant of insects of the Far East of Russia in 6 volumes - in Russian)
43. Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kucher A.N., Kireeva T.N., Vorotov A.A., Belikh E.A. Geneticheskoe raznoobrazie lokusa COI-COII mt-DNK medonosnoi pchely *Apis mellifera* L. v Tomskoi oblasti. *Russian Journal of Genetics*. 2015. V. 51(1). P. 89–100. (Genetic diversity of the locus COI–COII of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk region - in Russian) doi: 10.7868/S0016675815010105
44. Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kucher A.N., Kireeva T.N., Vorotov A.A., Belikh E.A. Genetic diversity of the locus COI–COII of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk region. *Russian Journal of Genetics*. 2015a. V. 51(1). P. 80–90. doi: 10.1134/S102279541501010X
45. Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kucher A.N., Sharakhov I.V. A comprehensive characterization of the honeybees in Siberia (Russia). pp. 1–37. In: E.D. Chambó (ed.). *Beekeeping and Bee Conservation – Advances in Research*. InTech, Grotia. 2016. doi: 10.5772/62395
46. Ostroverkhova N., Kucher A., Badmazhapova E., GushchIna E., Kireeva T., Konusova O., Pogorelov Y., Yartsev V. Genetic diversity of honey bee *Apis mellifera* in Northern Asia. In: R. Ilyasov and H.W. Kwon [eds.]. *Phylogenetics of Bees*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., USA (in press).
47. Pavlinov L. Ya. Geometricheskaya morfometriya – novyi analiticheskii podkhod k sravneniyu komp'yuternykh obrazov. pp. 65–90. In the book: *Information and telecommunication resources in zoology*

- and botany. S.-Peterburg. 2001. (Geometric morphometry - a new analytical approach to the comparison of computer images - in Russian)
48. Pavlinov L. Ya., Mikesheina N. G. Printsipy i metody geometricheskoi morfometrii. *Journal Obshchei biologii* 2002. V. 63(6). P. 473-493. (Principles and Methods of Geometric Morphometrics - in Russian)
49. Pinto M.A., Henriques D., Chávez-Galarza J., Kryger P., Garnery L., van der Zee R., Dahle B., Soland-Reckeweg G., de la Rúa P., Dall' Olio R., Carreck N.L., Johnston J.S. Genetic integrity of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: A genome wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*. 2014. V. 53(2). P. 269–278. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.08
50. Plokhinskii N. A. Rukovodstvo po biometrii dlya zootekhnikov. Kolos Press, Moscow. 1969. 256 p. ill. (Guide to biometrics for livestock specialists - in Russian)
51. Plokhinskii N. A. Biometriya. MGU Press, Moscow. 1970. 368 p. (Biometrics - in Russian)
52. Quezada-Euán J. J.G., Pérez-Castro E.E., May-Itzá W. de J. Hybridization between European and African-derived honey bee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Peru. *Apidologie*. 2003. V. 34(3). P. 217-225. doi: 10.1051/apido:2003010
53. Quezada-Euán J. J. G., Paxton R. J., Palmer K. A., May Itzá W. de J., Tek Tay W., Oldroyd B. P. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*. 2007. V. 38(3). P. 247–258. doi: 10.1051/apido:2007006
54. Radloff S.E., Hepburn H.R. The matter of sampling distance and confidence levels in the subspecies classification of honey bees, *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1998. V. 29(6). P. 491-501. doi: 10.1051/apido:19980602
55. Radloff S.E., Hepburn H.R., Lindsey J.B. Quantitative analysis of intracolony and intercolony morphometric variance in honey bees, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Apidologie*. 2003. V. 34(4). P. 339-351. doi: 10.1051/apido:2003034
56. Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn H.R., Fuchs S., Hadisoelilo S., Tan K., Engel M.S., Kuznetsov V. Population structure and classification of *Apis cerana*. *Apidologie*. 2010. V. 41(6). P. 589–601. doi: 10.1051/apido/2010008
57. Ragim-Zade M.C. ILG v pishchedobyvatel'noi aktivnosti medonosnykh pchel. *Pchelovodstvo*. 1975. No 2. P. 14-17. (LLI in the food-producing activity of honey bees - in Russian)
58. Richards O.W. Hymenoptera. Introduction and key to families. *Handbooks for the Identification of British Insects* 6, 1. 1956. 94 pp.
59. Rinderer T.E., Sylvester H.A., Brown M.A., Villa J.D., Pesante D., Collins A.M., Spencer R., Kleinpeter S., Lancaster V. Field and simple techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1986. V. 17(1). P. 33-48. doi: 10.1051/apido:19860104
60. Rinderer T.E., Sylvester H.A., Buco S.M., Lancaster V.A., Herbert E.W., Collins A.M., Hellmich R.L., Davis G.L., Winfrey D. Improved simple techniques for identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 1987. V. 18(2). P. 179-196. doi: 10.1051/apido:19870208
61. Rohlf F.J. Relative warps analysis and example of its application to mosquito wings. pp. 131-160. In: Marcus L.F., Bello E., Garcia-Valdesas A. [eds.]. *Contributions to morphometrics*. C.S.C.I., Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. 1993. doi: 10.5962/bhl.title.15368
62. Rohlf F.J., Marcus L.F. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 1993. V. 8(4). P. 129-132. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J
63. Rohlf F.J. Morphometric spaces, shape components and the effect of linear transformations. pp. 131-152. In: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. [eds.]. *Advances in morphometrics*. Plenum Press, NY, L. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 284. Springer, Boston, MA. 1996. doi: 10.1007/978-1-4757-9083-2_12
64. Ruottinen L., Berg P., Kantanen J., Kristensen T.N., Præbel A. Status and Conservation of the Nordic Brown Bee: Final report. NordGen. Nordic Genetic resource center, Norway. 2014.
65. Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1978. V. 9(4). P. 363-381. doi: 10.1051/apido:19780408
66. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany. 1988. doi: 10.1007/978-3-642-72649-1
67. Satta A., Floris I., Pigliaru G. DataBees: uno strumento informatico per la gestione delle risorse Api e Mieli. *APOidea*. 2004. V. 1(1). P. 25-30.
68. Steinhage V., Kastenholz B., Schröder S., Drescher W. A hierarchical approach to classify solitary bees based on image analysis. Book Chapter. *Mustererkennung 19. DAGM-Symposium*, Braunschweig, Sept. 15–17, 1997, Informatik Aktuell; Springer, Germany. pp. 419-426. 1997. doi: 10.1007/978-3-642-60893-3_45
69. Steinhage V., Schröder S., Lampe K.H., Cremers A.B. Automated extraction and analysis of morphological features for species identification. pp. 115–129. In MacLeod N. (Ed.). *Automated taxon identification in systematics: theory, approaches and applications*. Natural History Museum, London, UK; CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL. 2007. doi: 10.1201/9781420008074.ch8

70. Tan K., Radloff S. E., Hepburn H. R., Yang M., Zhang L., Fan X. Environmentally-induced developmental effects on morphometric characters of workers in *Apis cerana* colonies. *Apidologie*. 2007. V. 38(3). P. 289–295. doi: 10.1051/apido:2007011
71. Thompson d'Arcy, W. On growth and form. Cambridge: University Press 1945. doi: 10.5962/bhl.title.6462
72. Tofilski A. DrawWing, a program for numerical description of insect wings. *Journal of Insect Science*. 2004. V. 4(17). P. 1-5. doi: 10.1673/031.004.1701
73. Tofilski A. Automatic Measurement of Honeybee Wings. pp. 289-298. In MacLeod N. (Ed.). Automated taxon identification in systematics: theory, approaches and applications. Natural History Museum, London, UK; CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton, FL. 2007. doi: 10.1201/9781420008074.ch17
74. Tofilski A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honey bee subspecies. *Apidologie*. 2008. V. 39(5). P. 558-563. doi: 10.1051/apido:2008037
75. Vasil'ev A.G., Vasil'eva I.A., Shkurikhin A.O. Geometricheskaya morfometriya: ot teorii k praktike. KMK Scientific Press, Moscow. 2018. 471 p. (Geometric morphometrics: from theory to practice - in Russian)
76. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic, New York, USA. 2004. 443 pp. doi: 10.1016/B978-012778460-1/50000-4
77. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. A Practical Companion to Geometric Morphometrics for Biologists: Running analyses in freely - available software. 2004a. 233 p.