

ALGORITMO PARA LA FOTOIDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS EN LEPIDÓPTEROS DIURNOS CUBANOS CON PATRONES DE MANCHAS

Dennis DENIS ÁVILA^{1*} y Daryl CRUZ FLORES²

¹Dpto. Biología Animal y Humana Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 25 y J No. 455, Vedado, La Habana, Cuba

²Instituto de Ecología y Sistemática. Carretera Varona No. 11835 e/ Oriente y Lindero, Boyeros, La Habana, Cuba.

* Autor para correspondencia: dda@fbio.uh.cu

RESUMEN: La identificación de los individuos es una herramienta importante en estudios poblacionales y es la base de los métodos de captura, marcaje y recaptura. Estos, generalmente requieren de capturar y manipular los animales, lo que además de trabajoso puede ser dañino, interrumpir sus actividades o alterar sus interacciones con otros individuos, invalidando estudios conductuales o aun afectando su supervivencia. Como alternativa, la fotoidentificación ha probado ser un método eficiente y barato, que evita estos problemas en grupos con patrones de marcas polimórficas en su coloración. En este trabajo se propone un algoritmo para utilizar la fotoidentificación como alternativa para la estimación de tamaños poblacionales y estudios conductuales en especies de lepidópteros diurnos, a partir de fotografías de sus alas. Se establece un sistema de coordenadas con origen en el centro del mesotórax, y se hallan las coordenadas del centroide de cada mancha y su área relativa. A partir de estos datos se calculan 18 variables derivadas que se emplean para entrenar redes neurales de clasificación, con diferentes subconjuntos de variables. El algoritmo se valida en una muestra de 65 individuos de *Heliconius charitonia* (Lepidoptera: Heliconiidae) mediante el patrón distal de manchas de las alas posteriores. Con este procedimiento se logró una identificación positiva de más del 90 % de los ejemplares. Se brindan las bases para el desarrollo de este método en otras especies con características similares.

PALABRAS CLAVE: identificación individual, fotografías digitales, mariposas, patrón de coloración, redes neurales

ABSTRACT: *ALGORITHM FOR INDIVIDUAL PHOTOIDENTIFICATION IN DIURNAL CUBAN BUTTERFLIES WITH DISTINCTIVE SPOT WING PATTERNS.* Individual identification is an important tool for population studies and base of capture-recapture methods. Those methods usually require the capture and handling animals' which can be difficult, harmful, stressful, interrupting their activities or altering their interactions to other individuals, invalidating behavioral studies or even affecting their survival. As an alternative, the use of photoidentification has proven to be an efficient and cost-free method that avoids all those

troubles in groups with polymorphic coloration patterns. In this paper, we propose an algorithm to use photoidentification in diurnal butterflies species, using pictures of their fore wings. Using the metathorax center as origin we establish a relative coordinate system and locate centroid position of each spot and calculate its relative area. Using this primary data we calculated 18 secondary variables that were used, in different subsets, to train classification neural networks. The algorithm is presented and validated using a sample of 65 pictures of *Heliconius charitonia* individuals (Lepidoptera: Nymphalidae), using the distal spot pattern in their fore wings. The procedure was able to identify more than 90 % of individuals. The backgrounds for the development of the methods in other butterfly species are given.

KEYWORDS: individual identification, digital photography, butterflies, coloration pattern, neural network

INTRODUCCIÓN

La habilidad de identificar de forma individual a los animales de una población en estudios de campo ha sido una herramienta muy importante para el conocimiento de la biología y dinámica de las poblaciones, ya que permite la obtención de una amplia serie de variables (*ej.* número total de individuos, salidas reproductivas, longevidad y tasas de supervivencia, patrones de movimiento, etc.). Sin embargo, algunas complicaciones pueden surgir del empleo de marcas artificiales en animales silvestres: el propio proceso de captura es disruptivo (Bateson, 1977) por el estrés de la captura, manipulación y restricción del animal durante el marcaje (Mowat *et al.*, 1994; Ogotu, *et al.*, 2006). Además, puede interrumpir las actividades e interacciones sociales (Cuthill, 1991), modificar su conducta y fisiología (Hindell *et al.*, 1996), generar problemas de salud en los individuos (Wilson y McMahon, 2006; McMahon *et al.*, 2006), afectar su supervivencia (Daly *et al.*, 1992), y no es práctica con poblaciones muy grandes.

La pérdida de las marcas con el tiempo (Bradshaw *et al.*, 2000) y el registro inadecuado o ausente de las marcas recuperadas (Schwarz y Seber, 1999) pueden comprometer los parámetros estimados.

Como alternativa, es posible identificar a los animales individuales a partir de la variación de sus características biométricas. Entre estos sistemas de individualización está el reconocimiento del iris, desarrollado originalmente para uso en humanos, pero también evaluado en caballos de carrera (Masahiko *et al.*, 2001). Las imperfecciones granulares en la periferia de la pupila proporcionan diferencias únicas para cada ojo y son codificadas para ser almacenadas en bases de datos que son utilizadas para las comparaciones. Otro método alternativo está basado en las características únicas e irrepetibles del sistema vascular de la retina, que se establece desde el nacimiento y no cambia durante la vida del animal. También, es teóricamente posible el principio de la identificación genética (DNA *fingerprinting*), que se basa en el empleo de marcadores microsatelitales para establecer las diferencias individuales (Papanicolaou *et al.*, 2005). Estos métodos, sin embargo, son demasiado caros y requieren de equipamiento costoso y tiempo.

En muchas especies es posible emplear en la identificación individual las marcas naturales y/o patrones de coloración polimórficos (Frisch y Hobbs, 2007) que pueden ser obtenidos a partir de fotografías, lo que evita la mayor parte de los problemas asociados a los estudios con marcas físicas artificiales. Sobre todo, evita la necesidad de capturar y manipular los animales por lo que es particularmente ventajoso en especies frágiles o amenazadas (Forcada y Aguilar, 2000). La fotoidentificación es un método rápido, barato y también es confiable durante un mayor periodo de tiempo (Van Tienhoven *et al.*, 2007).

Las marcas naturales identificatorias han sido empleadas en una amplia gama de especies, tanto terrestres como acuáticas. Existen trabajos en gansos (Lorzenz, 1937), cebras (Peterson, 1972), jirafas (Foster, 1966), elefantes africanos (Douglas-Hamilton, 1973), leones (Schaller, 1972), chimpancés (Goodall, 1986), perros silvestres (Frame *et al.*, 1979) y guepardos (Caro, 1994). La fotoidentificación es un método estándar en el estudio de los grandes vertebrados marinos: tiburones (Anderson y Goldman, 1996; Van Tienhoven *et al.*, 2007), sirenios (Beck y Reid, 1995; Langtimm *et al.*, 1998), pinnípedos (Hiby y Lovell, 1990; Forcada y Aguilar, 2000) y en más de 27 especies de cetáceos (ej.: Wursig y Wursig, 1977; Jones, 1990; Wursig y Jefferson 1990).

En los lepidópteros no son frecuentes los estudios de captura, marcaje y recaptura, en parte por el propio rechazo a estudios a largo plazo, pero también por las dificultades logísticas que estos implican y por la incertidumbre de los efectos adversos del método (Singer y Wedlake, 1981; Mallet *et al.*, 1987). Sin embargo, se han desarrollado en casos de especies migratorias de interés conservacionista como la mariposa monarca (Rogg *et al.*, 1999) y para algunos pocos estudios demográficos (Ehrlich y Gilbert, 1973). En estos estudios se empleaba el marcado de las alas con plumones indelebles de punta suave y un código de puntos o números, visibles a distancia (Craig, 1953).

En Cuba, los lepidópteros incluyen 1557 especies de 56 familias, con siete géneros endémicos y 292 especies endémicas (Barro y Núñez, 2013). Estos insectos han sido objeto de numerosos estudios, pero con un enfoque marcado hacia las listas de especies por localidades y a temas taxonómicos (ej. Alayo y Valdés, 1982; Núñez, 2003; 2010; Núñez *et al.*, 2012, Torre 1947; 1949). Su distribución y biogeografía ha recibido también gran atención (ej.: Fontenla, 1987; Fontenla y Cruz, 1986), sin embargo, estudios sobre su ecología básica y la dinámica de sus poblaciones y comunidades son menos frecuentes (ej.: Núñez y Barro, 2003; Fontenla y Rodríguez, 1990; Fontenla, 1989) y los que existen no son de larga duración o solo estiman algunos parámetros muy básicos como composición, abundancias relativas e índices de heterogeneidad.

El presente trabajo tiene como objetivo la presentación de un algoritmo para identificar individuos de lepidópteros diurnos con patrones distintivos de manchas en las alas a partir de fotografías digitales y programas de procesamiento de imágenes. Se describe la secuencia de pasos estandarizados que debe hacerse para obtener los datos numéricos a partir de las imágenes y se valida a través de la aplicación a un estudio de caso concreto con ejemplares de la especie *Heliconius charitonia* Comstock y Brown, 1950 (Lepidoptera: Heliconiidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del algoritmo

El algoritmo para la fotoidentificación consta de tres fases: la toma y preprocesamiento de las imágenes, la obtención de los datos primarios y su almacenamiento y utilización (Fig. 1). El primer paso es obtener fotografías digitales de las alas por su lado dorsal o ventral, en dependencia del lugar donde se encuentre el patrón de manchas con posible valor identificatorio. Las fotografías deben realizarse en un plano horizontal y deben estar bien enfocadas para lograr una mayor precisión en el delineado de las manchas. Como el color no es relevante como variable, no importa la cantidad de bits de imagen (4, 8 o 16 bits) ni su formato (JPG, BMP, PNG, RAW) pero su resolución y tamaño se recomienda que sea superior a los 200 dpi, y de más de 600 píxeles por su lado mayor. Todas las imágenes de un mismo estudio deben ser obtenidas con las mismas propiedades, ya que de estas dependerá el error que se cometa en las mediciones que sobre ellas se realicen. La iluminación debe ser lo más constante posible, aunque está claro que en condiciones de campo el control de las condiciones de las fotografías será mucho más complejo, y estudios posteriores habrán de realizarse para evaluar el efecto de los errores por estos conceptos.

Pre-procesamiento de las imágenes

El preprocesamiento de las imágenes tiene el objetivo de estandarizarlas para hacer comparables las estimaciones de las variables que se tomarán. Se puede realizar en los programas Photoshop de Adobe (<http://www.adobe.com/photoshop>), Photopaint de Corel (<http://www.corel.com/photopaint>) o cualquier otro procesador de imágenes especializado. El primer paso es la estandarización del tamaño y orientación de todas las imágenes, para lo cual se seleccionará una imagen de base y todas las demás se ajustarán

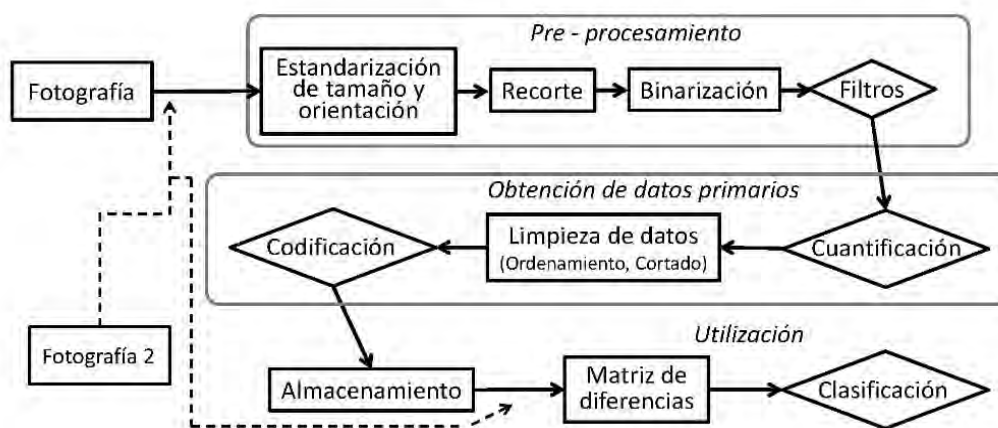


FIGURA 1. Diagrama de flujo representando los pasos del algoritmo para realizar un trabajo de fotoidentificación en animales con manchas naturales de posible valor identificatorio. Los rombos representan pasos donde varias opciones son posibles.

FIGURE 1. Flux diagram representing algorithm steps to conduct a fotoidentification program in animals with natural spots of possible identificative value. The rhombus represents steps where several options are available to choose.

a esta a través de rotación y re-escalados isométricos, tomando como referencia el centro del cuerpo de la mariposa y el extremo más alejado del ala, o algún otro elemento morfológico que sea constante y fácilmente identificable en todas. Esta acción puede realizarse ubicando una imagen como capa, encima de la otra, con la opción de transparencia o creando una máscara con la línea base de la primera imagen a la cual se ajustarán las otras. Luego de esta estandarización las imágenes se recortarán, eliminando los bordes innecesarios, para dejar solo la parte del ala con la información que se tomará. Además, a cada imagen se le debe dibujar un punto o pequeño círculo de tamaño proporcional y relleno de un color semejante a las manchas de las alas- en el centro del mesotórax y cuyo centro servirá como coordenadas de origen del sistema de coordenadas relativas para establecer las ubicaciones de las manchas.

El resto del pre-procesamiento se puede realizar en el programa *ImageJ* v.1.48 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) en el cual, además, se puede automatizar la obtención de los datos para la identificación. *ImageJ* es un programa público de procesamiento de imágenes en lenguaje *Java*, diseñado para extraer información científica de imágenes digitales (Sheffield, 2007). Contiene rutinas básicas para procesamiento estándar de imágenes y otras para calcular áreas, distancias, ángulos, volúmenes, contar objetos, medir intensidades de color, calcular estadísticas. Las calibraciones espaciales y en escalas de tonos permiten obtener mediciones en dimensiones con unidades reales. Este programa se ha empleado en investigaciones para contar objetos biológicos, medir sus tallas, cuantificar su distribución, describir patrones de movimiento de partículas y muchas otras aplicaciones en varias ciencias naturales (una muestra de estas se brinda en Ferreira y Rasband, 2012). Numerosos trabajos sobre las aplicaciones y potencialidades de estos programas pueden encontrarse también en el número especial de julio de 2012 de la revista *Nature Methods* (Ej.: Eliceiri et al., 2012).

Para eliminar la información de color y mantener la máxima precisión en la ubicación de las manchas se deben separar los canales de color de las imágenes y seleccionar el

que muestre la mejor precisión y contraste en cada especie, que en las experiencias realizadas generalmente es el verde, con lo cual la imagen queda en tonos de grises. Posteriormente, se manipula el brillo y contraste de una forma estándar para todas las imágenes, para lo cual es aconsejable emplear como referencia el propio histograma. Como las imágenes resultantes pudieran tener algunos píxeles aislados se limpian con la opción de eliminar ruido y se procede a binarizarlas, o sea, cambiar los colores de forma que el fondo quede blanco y las manchas en negro. Opcionalmente, en dependencia de la precisión con que resulten los bordes de las imágenes puede ser aplicado algún filtro de erosión / dilución, cuidando que sus intensidades sean las mismas en todas las imágenes ya que estos filtros pueden alterar los estimados de áreas –aunque no en magnitudes significativas si las manchas son grandes. En este mismo programa o en cualquier otro procesador se procede a limpiar las imágenes borrando todo lo que pueda haber quedado que no sean las manchas de interés (Fig. 2).

Obtención de los datos primarios

Los datos que se toman del patrón de manchas son el número de manchas, sus ubicaciones relativas y sus áreas proporcionales, que son las variables que se utilizarán. Para ello, el programa *ImageJ* cuenta con la opción “Analizar partículas”, previo a lo cual se predeterminan las variables que se desean analizar por cada mancha, que en este caso son las coordenadas del centroide de cada mancha y sus áreas (en píxeles). El resultado se guarda como fichero de texto y posteriormente es trasladado a una hoja de cálculo de MS Excel. Posiblemente, el programa identifique y evalúe algunas otras pequeñas manchas o píxeles aislados de la imagen que no sean las de interés y que generalmente quedan luego del preprocesamiento. Estas deben ser filtradas y eliminadas de la tabla con los valores resultantes.

Codificación de los datos y análisis comparativo

Para poder utilizar la información de la ubicación relativa de las manchas y hacerlas comparables entre individuos,

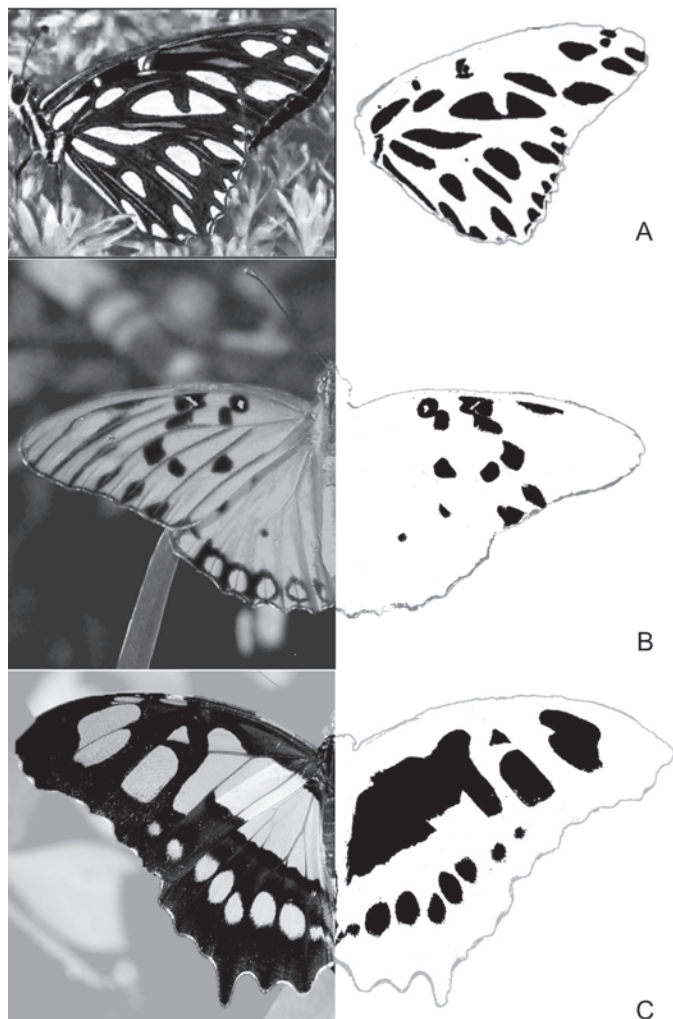


FIGURA 2. Ejemplo de pre-procesamientos de las imágenes de las alas de lepidópteros diurnos con patrones de manchas distintivos para la extracción de las variables que permitan su identificación individual. La línea de silueta del ala se mantuvo solo con propósitos ilustrativos. A) *Agraulis vanillae*, B) *Dryas iulia*, C) *Siproeta stelene*.

FIGURE 2. Example of picture pre-processing of the posterior right wing images in diurnal butterflies with distinctive spot patterns, for the extraction of variables used to individual identification. The wing outline was kept only for illustration. A) *Agraulis vanillae*, B) *Dryas iulia*, C) *Siproeta stelene*.

se debe estandarizar el sistema de coordenadas ubicando el centro del mesotórax como origen del eje de coordenadas y el centro de una mancha de referencia como coordenadas (1,0). Esta mancha de referencia puede ser la más alejada del centro del cuerpo, la de ubicación más superior o la de mayor área, lo cual es equivalente a realizar un registro de línea base o registro de Bookstein (Bookstein, 1978) con ambos centroides.

Para el análisis las manchas deben tener un identificador único que permita comparaciones por pares análogos para lo cual, si las manchas son pocas y en ubicaciones relativamente constantes e identificables, pueden asignárseles letras. De lo contrario se puede establecer un orden automático siguiendo su ubicación a lo largo de un eje (X, Y o diagonal). La propia información posicional de las manchas puede ser presentada en dos formatos: se pueden

utilizar directamente las coordenadas del centroide o pueden emplearse sus vectores partiendo del centro de coordenadas (ángulo y longitud). Estas variantes pueden ser seleccionadas en función de la disposición espacial de las manchas: si hay una superposición marcada entre las proyecciones en los ejes X o Y entre varias manchas, posiblemente los vectores sean la mejor opción y para calcularlos se debe aplicar las fórmulas trigonométricas apropiadas (teorema de Pitágoras y ley del seno).

La información que caracteriza a cada mancha se puede almacenar en dos formatos: como variables relativizadas de posición y área de cada mancha para cada individuo, o en forma de matrices de distancias euclidianas y de diferencias relativas entre áreas de manchas para cada individuo. La identificación automatizada de nuevas fotografías por comparación con los individuos cuyos datos se han almacenado se puede desarrollar a través de varios algoritmos estadísticos, que dependerán de la manera en que se hayan codificado los datos. Si estos se mantuvieron como coordenadas de los centroides de las manchas individuales, luego de un registro de procrustes generalizado de las coordenadas del nuevo individuo, se pueden calcular las medias procrustes entre esta configuración por clasificar y las de referencia de la base de datos: las mínimas distancias corresponden con las máximas similitudes.

La clasificación automatizada puede hacerse a través de una red neural entrenada para ello, o por medio de métodos multidimensionales de ordenamiento, como el Análisis de Función Discriminante lineal. Pueden emplearse, de manera exploratoria métodos como el Escalado multidimensional no métrico o análisis de agrupamiento adicionando el nuevo registro a todos los datos de la base, aunque en estos casos debe tenerse cuidado porque la inclusión de nuevos registros puede alterar la configuración de distancias en la base primaria. Otra variante puede ser obteniendo y almacenando las matrices de distancias euclidianas que incluyan las diferencias en los datos posicionales y el área entre todas las parejas de manchas para cada individuo y luego, para la identificación, desarrollar pruebas de Mantel.

Estudio de caso

Para poder ejemplificar el uso del método y ponerlo a prueba se desarrolló un estudio de caso con la especie *Heliconius charithonia ramsdeni*, de la familia Nymphalidae. Esta familia, contiene un grupo bien conocido de mariposas neotropicales, con seis géneros y otras tantas especies. Se reconocen por tener las alas anteriores muy alargadas y estrechas, y las posteriores relativamente pequeñas y redondeadas, que les da un aspecto ancho y corto.

Heliconius charithonia ramsdeni tiene las alas negras con bandas amarillas llamativas y una hilera de manchas en el ala posterior, una coloración de tipo aposemática que advierte a los depredadores de su mal sabor, ya que acumulan sustancias de las plantas en las que se alimentan las orugas (especies de *Passiflora*). Tiene un vuelo lento y llamativo, y habita en un amplio rango de ecosistemas, desde jardines en las ciudades hasta bosques, entre los cuales se mueve según la disponibilidad de fuentes de alimento, como son el néctar y polen. Esta especie duerme comunalmente con cierto grado de filopatría a los sitios (Young,

1984). Habita desde Texas hasta Ecuador, incluyendo las Antillas, pero es una especie sedentaria, sin movimientos migratorios descritos. Numerosas subespecies han sido descritas a lo largo de su rango de distribución, especialmente en las islas del Caribe ya que muestra una notable variabilidad, tanto geográfica (Comstock y Brown, 1950) como intrapoblacional (Brown y Comstock, 1952; Beebe, 1955), que incluso ha motivado a algunos autores a buscar evidencias de especies crípticas (ej.: Kaye, 1931; Jiggins y Davies, 1998; Mavárez *et al.*, 2006).

El género ha sido objeto de numerosas investigaciones enfocados en su biología general (Brown, 1981; Scott, 1986, Chumpitasi, 1997), estructura y dinámica de sus poblaciones (Cook *et al.*, 1976; Young, 1977; Quintero, 1989; Andrade y Lucci, 2005) y estudios genéticos relacionados con los patrones de coloración (Emsley, 1964; Davies y Bermingham, 2002, Mavárez y González, 2006), entre otros. También se han realizado numerosos estudios genéticos, muchas veces relacionados con los patrones de coloración (Jiggins y McMillan, 1997; Davies y Bermingham, 2002; Mavárez y González, 2006) y métodos tradicionales, incluidos de marcaje, han sido utilizados para estimar su ciclo de vida (Ehrlich y Gilbert, 1973) ubicándolo en un rango de seis meses.

Métodos

Se obtuvieron fotografías de 65 individuos de *Heliconius charitonias ramsdeni*, depositadas en las colecciones del Museo de Historia Natural Felipe Poey, de la Universidad de La Habana, y del Instituto de Ecología y Sistemática. Las fotos se recortaron, manteniendo solo el área del borde distal de las alas posteriores, que, en este caso, contenía el patrón de manchas con posible valor identificatorio. Luego se estandarizaron en tamaño y orientación tomando como referencia el centro del mesotórax, donde a cada imagen se le incorporó un pequeño círculo como centro del sistema de coordenadas (0,0) para hallar la ubicación relativa de las manchas cuerpo de la mariposa. La mancha más alejada del eje central del cuerpo se tomó como coordenada (1,0). Se llevaron las imágenes a escala de grises, aislando el canal de color verde, y se binarizaron llevando el fondo a color blanco y las manchas negras (Fig. 3).

Las variables primarias tomadas del patrón de manchas fueron las áreas proporcionales de manchas (en porcentaje del área total manchada) y sus ubicaciones relativas (coordenadas del centroide) (Fig. 4). A partir de estas se calcularon otras variables derivadas de posible valor discriminatorio: la distancia del mesotórax a las manchas (relativizada usando la primera distancia) y su variabilidad (desviación estándar - DE), variabilidad de las áreas de las manchas (DE); Áreas máxima y mínima y su razón (Área máxima/Área mínima). Además, se calcularon las distancias entre manchas consecutivas, con su variabilidad (DE) y extremos (máximo y mínimo) por individuo; y lo mismo se hizo para los ángulos entre manchas consecutivas. Para describir el grado de curvatura del patrón de manchas en cada individuo se calculó un índice dado por la razón entre la distancia entre las manchas primera y última, y la distancia perpendicular del centroide de cada mancha a esta línea. El valor máximo de este índice por individuo fue llamado índice de curvatura.

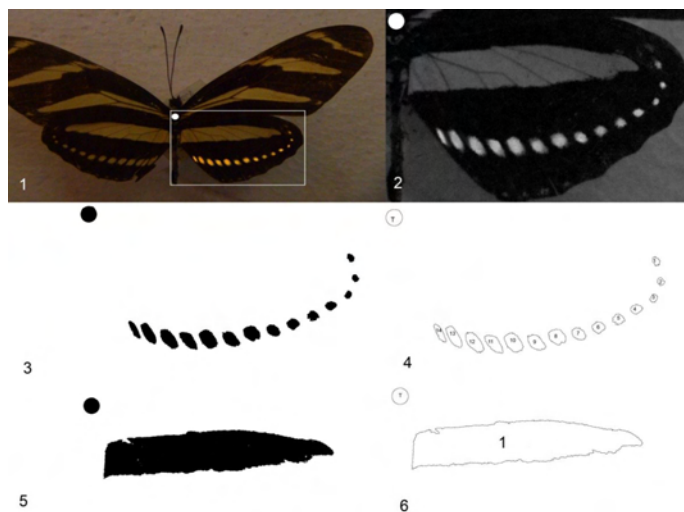


FIGURA 3. Procesamiento de las imágenes de las alas posteriores derechas de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) para la extracción de las variables de las manchas que permitan su identificación individual. 1) Recortado del ala posterior derecha, 2) Separación del canal de color verde; 3) Binarización, inversión y aislado del patrón de manchas pequeñas del ala; 4) Identificación de las manchas pequeñas y cálculo del área y coordenadas del centroide.

FIGURE 3. Processing of the posterior right wing images of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) for the extraction of variables of the spots used to individual identification. 1) Clip of the posterior right wing; 2) Channels splits and selection of green color; 3) Binarization, inversion and isolation of the spots pattern; 4) Identification of the small spots and calculation of area and centroid coordinates.

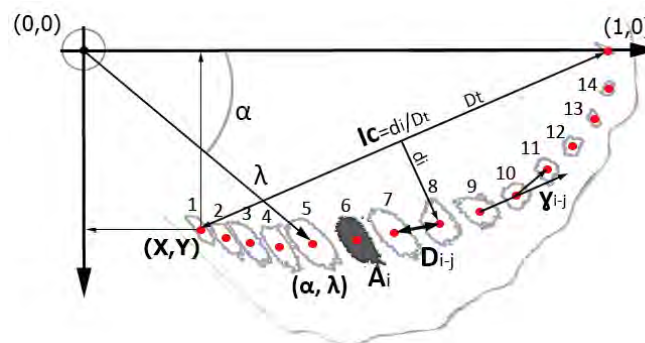


FIGURA 4. Representación esquemática de las variables de las manchas y de la codificación de la información de posición de sus centroides a partir de las coordenadas y de los vectores λ , en las alas posteriores derechas de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) (D_{i-j} : distancia entre manchas consecutivas, A_i : área relativa de la mancha, γ_{i-j} : ángulo entre manchas consecutivas, I_c : índice de curvatura).

FIGURE 4. Schematic representation of spot variables and the coding of position information of centroid from its coordinates and λ vectors, in right posterior wings of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera). (D_{i-j} : distance between consecutive spots, A_i : relative area of the spot, γ_{i-j} : angle among consecutive spots, I_c : curvature index).

Para evaluar el grado de error del procedimiento propuesto se tomaron tres individuos al azar y se les realizó la toma de datos, de forma independiente, cinco veces. La variabilidad entre réplicas fue evaluada a través de los coeficientes de variación, exceptuando los descriptores de Fourier de la mancha central por incluir valores negativos. Para la validación se empleó un conjunto de datos diferente, obtenido por la repetición del algoritmo de procesamiento de las imágenes y la obtención de las variables primarias y derivadas, en 50 de las imágenes originales (más del 70 % de la muestra), por tres personas independientemente y a ciegas (sin conocer el número verdadero del individuo). Esto asegura una representatividad de las posibles fuentes de error del procedimiento, excepto los de la toma de fotografías.

Procesamiento de los datos

Para identificar cuales variables tienen mayor valor identificatorio, se entrenaron seis redes neurales de tipo perceptrón multicapa, cada una con un conjunto distinto de variables predictoras (Tabla 1).

Las redes neurales (de tipo perceptrón multicapa) se obtuvieron por el procedimiento de búsqueda automática

del programa Statistica v8.0. Se entrenaron 40 redes para cada conjunto de datos, reteniendo las mejores 10, entre las cuales se seleccionó la mejor para cada conjunto de datos en dependencia de los errores de validación.

Para representar las diferencias individuales con cada conjunto de variables se confeccionaron escalados multidimensionales no métricos con distancias euclidianas y se representaron las relaciones de similitud entre individuos por un análisis de agrupamientos, empleando el método de Ward. Los estadísticos descriptivos de cada variable fueron obtenidos, empleando como tendencia central las medias y el error estándar y los límites de confianza al 95 % como medidas de precisión y variabilidad, respectivamente.

RESULTADOS

El comportamiento de los estadísticos descriptivos generales de las variables evaluadas en las manchas del patrón del borde de las alas posteriores en *H. charitonia ramsdeni* se muestran en la figura 5 (tabla en Anexo 1). Las manchas de mayor área se ubicaron generalmente entre las posiciones 8 y 10, aunque el mayor valor promedio de esta variable se encontró en la posición 10. Los valores obtenidos en el índice de curvatura indican que el patrón de

TABLA 1. Subconjuntos de variables seleccionadas en cada red neural en su entrenamiento para la fotoidentificación de los individuos de *Heliconius charitonia ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) por sus patrones de manchas alares.

TABLE 1. Subset of selected variables to train each neural networks for photoidentification of individual of *Heliconius charitonia ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) by its wing spot patterns.

Variables	Redes neurales					
	1	2	3	4	5	6
Área de las manchas	X		X	X		X
Coordenadas del centroide				X		X
Dist. del mesotórax a las manchas	X					X
SD de las Áreas		X				X
Área máxima		X				X
Área mínima		X				X
Área máxima/Área mínima		X			X	X
Índice de curvatura			X			X
Índice de curvatura máximo					X	X
SD de distancias mesotórax - mancha						X
Dist. e/ manchas	X				X	X
SD de las dist. e/ manchas		X				X
Dist. máxima e/ manchas		X				X
Dist. mínima e/ manchas		X				X
Dist. máxima/mínima e/ manchas		X				X
Ángulo e/ manchas	X		X			X
SD de los ángulos e/ manchas		X				X
Ángulo máximo manchas		X				X
Ángulo mínimo manchas		X				X
Ángulo máximo/mínimo e/ manchas		X				X

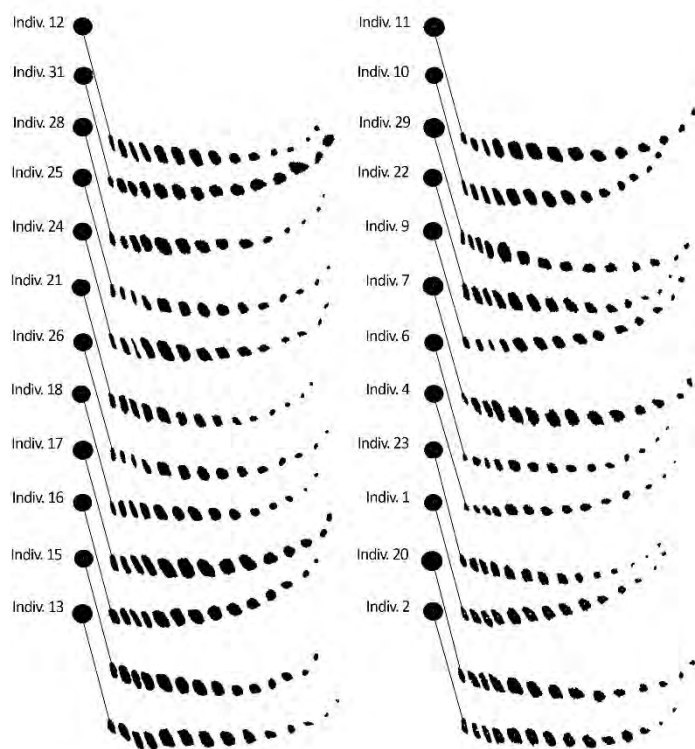


FIGURA 6. Variabilidad en los patrones de manchas (áreas, formas y distribuciones) en el borde de las alas posteriores en 24 individuos seleccionados de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera). El círculo negro indica la posición del centro del mesotorax, tomado como centro de origen del sistema de coordenadas en el cual se ubicaron las manchas.

FIGURE 6. Spot patterns variability (areas, shapes and distribution) in the lower back wing of 24 selected specimens of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera). Black circle indicate position of the mesothorax center, used as origin of coordinate system in which spots were located.

manchas sigue una distribución leptocúrtica, siendo los puntos en las posiciones de la 5 a la 7 los más alejados de la recta que une los centroides de las manchas 1 y 14. El promedio de la distancia al mesotorax en las manchas más alejadas se encontró en las posiciones 7 y 8. Las separaciones entre las manchas 7-8 y 8-9 fueron las que presentan una mayor variabilidad. Los ángulos de mayor amplitud entre manchas consecutivas se encontraron entre las posiciones 7-8, 8-9 y 9-10. El área de las manchas disminuye con la distancia al mesotórax, con un patrón monotónico decreciente.

La caracterización de estas variables de manera individual muestra las tendencias generales en la especie y en análisis multiespecíficos posiblemente sean elementos que permitan su identificación automatizada. A nivel de fotoidentificación de individuos permite identificar algunas variables con mayor probabilidad de servir como elementos individualizantes, sobre todo aquellas que presentan mayores variabilidades. Sin embargo, es poco probable que una única variable pueda servir a este efecto, sino más bien sea la combinación de los valores de cada una quien identifique al individuo, lo cual hace del problema de fotoidentificación un análisis intrínsecamente multidimensional (Fig. 6).

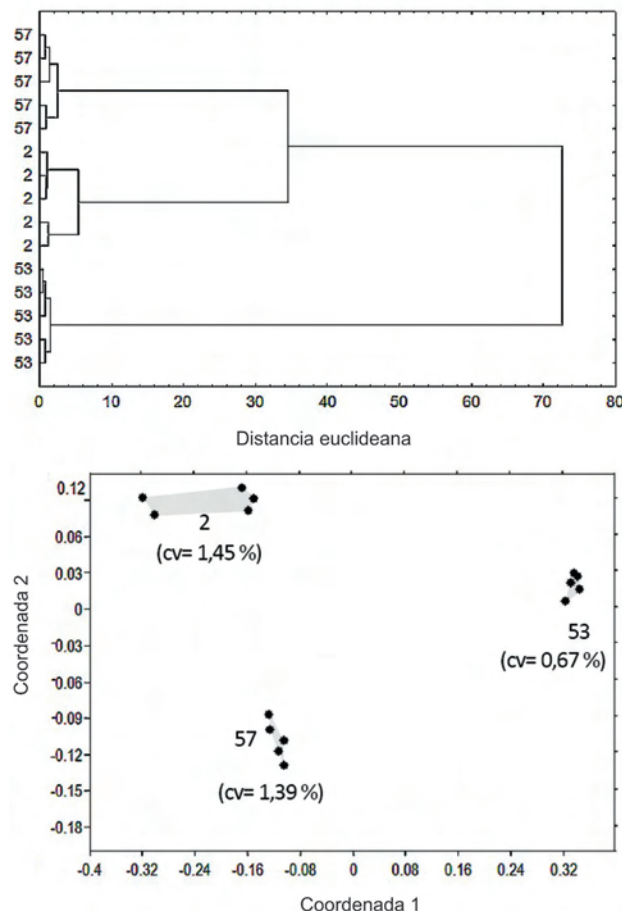


FIGURA 7. Repetibilidad en la toma de datos del patrón de manchas de las alas en tres individuos tomados al azar de la muestra de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) por diferentes personas. Se muestra el análisis de agrupamiento de los resultados y el escalado multidimensional no métrico donde, además, se incluye el coeficiente de variación promedio (cv) de todas las variables.

FIGURE 7. Repeatability in data acquisition on the wing spot pattern in three randomly chosen individuals of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera) by different persons. Cluster analysis of replications and non-metric multidimensional scaling are presented, including mean variation coefficient (cv) of all variables.

Los niveles de error durante el procedimiento propuesto fueron bajos. La repetición de los procedimientos de las fotografías y toma de datos primarios de los mismos individuos de mariposas por personas diferentes dio resultados con coeficientes de variación promedios entre 0,67 % y 1,4 % (Fig. 7). Las variables con menor repetitividad fueron las de áreas de las manchas (entre 9 % y 12,6 %), cuyos errores de transmitieron al índice entre áreas máxima y mínima (que llegó al 13,9 % en uno de los individuos). Los coeficientes de variación en las distancias entre manchas estuvieron en todos los casos por debajo del 5 % (máximo de 4,4 %), así como en los ángulos (máximo de 2,7 %).

El escalado multidimensional no métrico con todos los conjuntos seleccionados de variables predictoras (Fig. 8) permite caracterizar los niveles de similitud o diferencias individuales teniendo en cuenta todas las variables analizadas. Como era de esperar, existen grupos más similares que

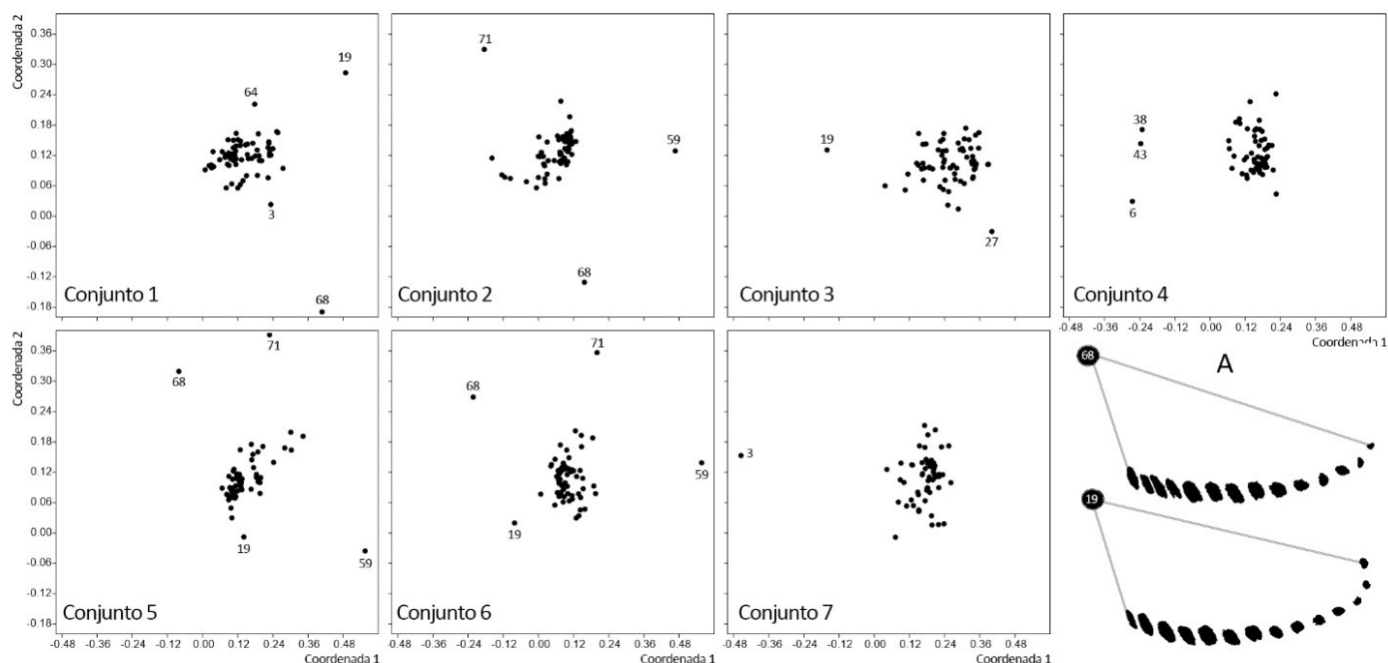


FIGURA 8. Escalados multidimensionales no métricos desarrollados con las combinaciones de variables empleadas como predictoras para la identificación individual de los ejemplares seleccionados de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera). A) Patrones de manchas de los ejemplares 68 y 19, que fueron los más frecuentemente diferenciados.

FIGURE 8. Non metric multidimensional scaling with all variables combinations used as predictors for the individual identification of the specimens of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera). A) Spot patterns of individuals 68 and 19, that were the most frequently differentiated.

otros evidenciando la factibilidad de identificar aquellos individuos de características más atípicas (Fig. 7). Otros individuos, por la cercanía de sus valores posiblemente conlleven a errores de clasificación. Los individuos 59, 68 y 71 fueron los más diferentes del resto de la muestra en muchos de estos gráficos.

Los escalados multidimensionales pueden mostrar la distribución general de las diferencias entre los individuos y permiten la identificación de los que presentan características más distintos, que el resto de la muestra. Sin embargo, este no es un método eficiente de representación si se quiere ubicar individuos que son más consistentes con las características generales, ya que suelen quedar superpuestos o muy cercanos entre sí en medio de una densa nube de puntos. Para el análisis de las diferencias entre estos individuos y sus patrones de relación, es preferible realizar un análisis de agrupamiento y representarlo con un dendrograma de distancias euclidianas (Fig. 9).

El entrenamiento de las redes neurales con los distintos conjuntos de variables predictoras obtuvo en todos los casos valores de rendimiento de entrenamiento del 100 %, excepto en la red 5 (construida con los componentes principales de los descriptores de Fourier de la mancha central, las distancias entre manchas consecutivas, el Índice de curvatura máximo y la tasa entre áreas máxima y mínima), en la cual fue del 98,5 % (Tabla 2). El algoritmo de optimización más frecuente entre las redes entrenadas fue la suma de cuadrados (SOS), siendo seleccionada la Entropía cruzada solo en tres casos (redes 2, 3 y 4). Las funciones de activación de las capas oculta y de salida fueron indis-

tintamente la Logística, Identidad, Tangente, Softmax y Exponencial.

La Red construida con todas las variables, primarias y derivadas (Red 6) no fue la más eficiente en la identificación de los individuos, logrando solo un 80 % de clasificación correcta con los datos de validación, lo cual indica que algunas variables carecen de valor discriminatorio.

La red con un mejor rendimiento de la validación fue la Red 1, obtenida con las variables primarias de áreas de manchas, ángulos y distancias. Esta red logró un 94 % de rendimiento de la validación y función de activación Logística tanto en la capa oculta (de 34 neuronas), como en la de salida. La Red 4, obtenida exclusivamente con los descriptores de la forma de la mancha central del ala, mostró un caso claro de sobre-entrenamiento. En esta con los datos de entrenamiento se obtuvo un rendimiento del 100 % pero con los de validación fue apenas de un 4 %. La red de peor comportamiento, además de esta última, fue la quinta, que también empleaba los descriptores de la forma de la mancha central del ala, indicando con ello que esta mancha tiene muy poco valor identificatorio individual.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que los individuos de *H. charitonias ramsdeni*, por muy similares que sean a la vista desnuda, si pueden ser identificados con alta precisión a partir del procedimiento descrito, aplicado a las imágenes digitales de las alas posteriores y considerando el patrón de manchas como un carácter identificatorio. La efectividad

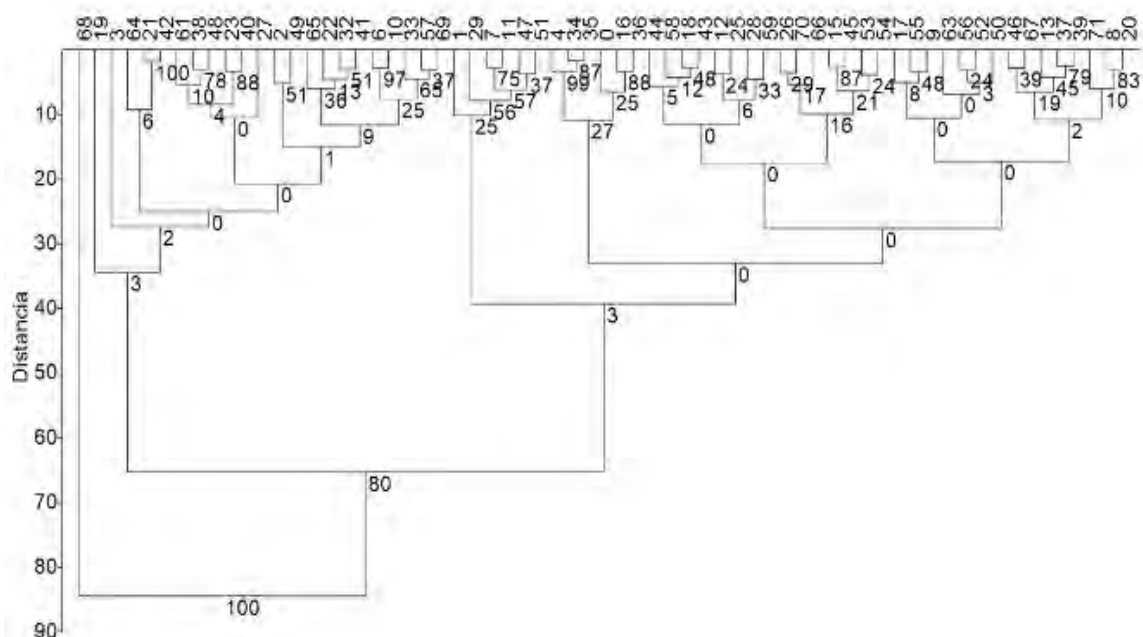


FIGURA 9. Análisis de agrupamientos con la combinación de variables correspondientes a la red neural de mejor comportamiento predictivo (Red 1) para la identificación individual de los ejemplares seleccionados de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera).

FIGURE 9. Cluster analysis with the variable combination corresponding to the neural network with the best predictive behavior (Network 1) for the individual identification of the specimens of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera).

de las redes entrenadas fue similar a las desarrolladas para la identificación de otros objetos biológicos. Por ejemplo, el sistema desarrollado por Yang *et al.* (2001) para identificar la especie a partir de los huevos de helmintos en heces fecales humanas, con imágenes digitales y redes neurales, obtuvo una tasa de clasificación correcta del 90,3%. Para desarrollar el *Leafview*, Sean *et al.* (2006) entrenaron una red neural para clasificar las hojas de 32 especies de plantas a partir de 12 variables extraídas automáticamente de las imágenes, ortogonalizadas en 5 componentes principales, y 1800 datos de entrenamiento, y también obtuvieron precisiones superiores al 90 %. Todos estos trabajos previos han servido para fundamentar la importancia del

análisis de imágenes digitales como fuentes de información para investigaciones biológicas (Myers, 2012).

El algoritmo propuesto puede ser aplicado manualmente en estudios específicos, no solo con mariposas, sino con otros grupos animales con patrones de manchas. Lo ideal, sin embargo, sería su automatización a partir de la implementación de un software que fuera alimentado con las imágenes y mantuviese la base de datos actualizada, a la vez que contara con una interfase que posibilitara la identificación de nuevos ejemplares. Con dispositivos móviles capaces de ejecutar el programa a la vez que se captan las imágenes, el tiempo de respuesta se incrementaría (estilo *Leafsnap*, que se ejecuta en teléfonos celulares).

TABLA 2. Resultados del entrenamiento y validación de seis redes neurales con distintos conjuntos de variables predictoras para la identificación de los individuos de *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera).

TABLE 2. Results of the training and validation of six neural network with different sets of variables to identify individuals of *Heliconius charitonias ramsdeni* (Nymphalidae: Lepidoptera).

Red	Número de variables	Neuronas de la capa oculta	Rendimiento de la validación	Algoritmo de entrenamiento	Algoritmo de optimización	Función de activación	
						Capa oculta	Capa de salida
1	53	34	94,00	BFGS 46	SOS	Logística	Logística
2	14	33	82,00	BFGS 29	Entropía	Logística	Softmax
3	25	12	86,00	BFGS 32	Entropía	Identidad	Softmax
4	6	22	4,00	BFGS 22	Entropía	Tangente	Softmax
5	21	35	44,00	BFGS 59	SOS	Identidad	Identidad
6	85	13	80,00	BFGS 82	SOS	Logística	Exponencial
7	14	13	78,00	BFGS 123	SOS	Tangente	Exponencial

En cualquier caso, antes de aplicar este método a otras especies se debe pasar por la fase inicial de su operacionalización y estandarización. Esto incluye identificar, en cada caso específico, cuál o cuáles son las variables derivadas del patrón de manchas con mayor capacidad discriminatoria, para la identificación individual. Por ejemplo, el índice de curvatura empleado en el estudio de caso con *Heliconius* responde a la forma particular de distribución de las manchas analizadas, pero en otras especies debiera analizarse otros indicadores que pudieran ser más informativos acerca de su distribución espacial. Como sucedió en el caso de *Heliconius*, el empleo de demasiadas variables –algunas de las cuales tenían poca capacidad de separación– disminuye drásticamente la eficiencia discriminante independientemente del método estadístico que se emplee.

Las estandarizaciones de los parámetros de brillo, contraste y filtros de las imágenes también son importantes por cuanto pueden resultar en variaciones artificiales, sobre todo de las áreas de las manchas. Estos parámetros del procesamiento deben variar entre especies, en dependencia del patrón de coloración de las alas, aunque el empleo de porcentajes del área total manchada en lugar de las áreas absolutas tiende a disminuir estos errores.

Uno de los puntos más débiles de este método en el grupo específico de las mariposas es la dificultad relativa para tomar las fotos adecuadas, dada la alta movilidad de los ejemplares. Una estrategia para sobrellevar este problema pudiera ser la captura de videos de alta resolución, más que de fotografías. En el video se puede luego identificar los cuadros de mejor calidad en términos de posición del ala y resolución de las imágenes. Las distorsiones que pueden quedar por variaciones ligeras del ángulo de la imagen son solucionables por la superposición Procustes, que elimina las variaciones afines de las formas.

Son múltiples los estudios tradicionales que pueden verse beneficiados por el empleo de este método de fotoidentificación. Por ejemplo, estudios de conductas territoriales y de dominancia (ej. Benson *et al.*, 1989), o el estudio de patrones conductuales durante el forrajeo (Cardoso, 2001). El método propuesto puede complementar estudios morfológicos y de variación geográfica o las comparaciones entre subespecies (ej.: Comstock y Brown, 1950). La identificación de los individuos también puede ser útil para estudios experimentales con individuos en cautiverio, donde deban ser mantenidos en grupos, pero los datos se necesiten a nivel individual, por ejemplo, en estudios de conducta reproductiva, patrones de selección de recursos, etc. Este método propuesto puede ser aplicado al estudio de la dinámica, estabilidad y fidelidad a los sitios de dormideros comunales, como los descritos por Young y Thomason (1975), Young y Carolan (1976) y Waller y Gilbert (1982). También pueden ser aplicados en estudios de filopatría a las plantas de reproducción o en la descripción del rango de hogar, lo cual ha sido comprobado en algunas especies a través del marcaje físico. En Cuba existen muy pocas aplicaciones previas de métodos de fotoidentificación, apareciendo tan solo en estudios de dinámica poblacional de delfines (López *et al.*, 2013) y para la individualización en la población de cebras en cautiverio del Zoológico Nacional (Testé y Denis, 2013).

Aunque los estudios poblacionales en los lepidópteros son menos frecuentes que en otros grupos de animales, existen varios antecedentes de trabajos que emplean los métodos de captura, marcaje y recaptura. Por ejemplo, Ehrlich y Gilbert (1973) estudiaron la estructura y dinámica de una población de *Heliconius ethilla* a través de un intenso programa de marcaje entre 1969 y 1972 que logró marcar de forma individual a 1000 individuos y obtener 2600 recapturas. Algunos individuos fueron recapturados hasta 10 veces en un periodo de 162 días, con lo cual se pudieron obtener estimados confiables del tamaño poblacional y la supervivencia diaria.

Los estudios de variabilidad en las manchas alares, no solo permiten la inferencia de parámetros poblacionales sino también profundizar en los estudios sobre las zonas de hibridización, que en el género *Heliconius*, en particular han recibido una notable atención (ej.: Benson, 1973; Beltrán *et al.*, 2002; Blum, 2002; Gilbert 2003). Los patrones alares en lepidópteros han sido estudiados de forma intensiva desde el punto de vista taxonómico (ej.: Nijhout y Wray, 1988; Munroe, 1982; Nijhout, 1981), evolutivo (ej. Nijhout, 1991; 2001a y b; Mullen, 2006; Jeron *et al.*, 2006; Reed y Serfas, 2004), ontogenético (ej. Nijhout, 1985), genético (ej. Reed y Gilbert, 2004; Nijhout *et al.*, 1990), entre otros. La adición de la fotoidentificación como método de análisis puede constituir una mejora significativa a los estudios ecológicos en los lepidópteros. Un método similar puede además ser empleado en ayuda a la identificación, no ya de los individuos sino de las propias especies, lo cual es un recurso importante en apoyo a la taxonomía (Procaccini y Marks, 1968).

AGRADECIMIENTOS: Los autores desean agradecer a las direcciones de las instituciones científicas que permitieron el acceso a las colecciones para la toma de muestras. Se agradece la participación de Angel Ramón Torres Mc Cook, Alejandro J. Gómez García, Abel Gil Ley, Laura Reina Taño y Sayris Peña Alcolea en el procesamiento de las imágenes y la toma de datos durante sus prácticas estudiantiles de segundo año. También se agradece a los revisores anónimos cuyos señalamientos contribuyeron mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS

- Alayo, P y E. Valdés. 1982. *Lista anotada de los microlepidópteros de Cuba*. Academia de Ciencias de Cuba, La Habana. 122 pp.
- Anderson, S.D. y K.J. Goldman. 1996. Photographic evidence of white shark movements in California waters. *California Fish and Game* 82: 182-186.
- Andrade, R y A. V. Lucci. 2005. Population biology of two species of *Heliconius* (Nymphalidae: Heliconiinae) in a semi-deciduous forest in southeastern Brazil. *Journal of the Lepidopterists Society* 59(4): 223-228.
- Bateson, P.P.G. 1977. Testing an observer's ability to identify individual animals. *Animal Behavior* 25: 247-248.
- Beebe, C. W. 1955. Polymorphism in reared broods of *Heliconius* butterflies from Surinam and Trinidad. *Zoologica* 40(3): 139-143.
- Beck, C.A. y P. Reid. 1995. An automated photo-identification catalog for studies of the life history of the Florida manatee. Pp. 120-134. En: *Population biology of*

- the Florida manatee* (T.J. O'Shea, B.B. Ackerman y H.F. Percival, Eds). National Biological Service Information and Technology report, Washington, DC.
- Beltrán, M., C. D. Jiggins, V. Bull, M. Linares, J. L. Borlase Mallet, W. O. McMillan y E. P. Bermingham. 2002. Phylogenetic discordance at the species boundary: Comparative gene genealogies among rapidly radiating *Heliconius* butterflies. *Molecular Biology and Evolution* 19(12): 2176-2190
- Benson, W. W. (1973) Zonas de hibridização entre raças de *Heliconius* (Lepidoptera, Nymphalidae): Implicações ecológicas. *Ciência e Cultura* (São Paulo) 25 (suplemento 6): 371 pp.
- Benson, W. W., C. F. B. Haddad y M. Zikán. 1989. Territorial behavior and dominance in some heliconiine butterflies (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 43(1): 33-49
- Blum, M. J. 2002. Rapid movement of a *Heliconius* hybrid zone: Evidence for phase III of Wright's Shifting Balance theory? *Evolution* 56 (10): 1992-1998
- Bookstein, F. L. 1978. *The Measurement of Biological Shape and Shape Change*. Lecture Notes in Biomathematics 24. Berlin, Springer.
- Bradshaw, C.J. A.; R. J. Barker y L. S. Davis. 2000. Modeling tag loss in New Zealand fur seal pups. *Journal of Agricultural Biological Environment Stat* 5: 475-485.
- Brown, F. M. y W. P. Comstock. 1952. Some biometrics of *Heliconius charitonia* (Linnaeus) (Lepidoptera, Nymphalidae). *American Museum Novitates* 1574: 1-53
- Brown, K. S. Jr. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 26: 427-456
- Cardoso, M. Z. 2001. Patterns of pollen collection and flower visitation by *Heliconius* butterflies in southeastern Mexico. *Journal of tropical Ecology* 17(5): 763-768
- Caro, T.M. 1994. *Cheetahs of the Serengeti Plains: group living in an asocial species*. The University of Chicago, Press. Chicago, Illinois.
- Chumpitazi, M. E. 1997. Life history of *Heliconius charitonia* (L.) at San Jose, Costa Rica. *News of the Lepidopterists' Society* 39(5): 98.
- Comstock, W.P. y F. M. Brown. 1950. Geographical variation and subspeciation in *Heliconius charitonia* Linnaeus (Lepidoptera, Nymphalidae). *American Museum Novitates* 1467: 1-21.
- Cook, L. M., E. W. Thomason y A. M. Young. 1976. Population structure, dynamics and dispersal of the tropical butterfly *Heliconius charitonia*. *Animal Ecology* 45: 851-863.
- Craig C. C. 1953. On the utilization of marked specimens in estimating populations of flying insects. *Biometrika* 40: 170-176
- Cuthill, I. 1991. Field experiments in animal behavior, methods, and ethics. *Animal Behavior* 42: 1007-1014.
- Daly, M., M.I. Wilson, P.R. Behrends, y L.F. Jacobs. 1992. Sexually differentiated effects of radio transmitters on predation risk and behavior in kangaroo rats *Dipodomys merriami*. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1851-1855.
- Davies, N. y E. P. Bermingham. 2002. The historical biogeography of two Caribbean butterflies (Lepidoptera: Heliconiidae) as inferred from genetic variation at multiple loci. *Evolution* 56(3): 573-589
- Douglas-Hamilton, I. 1973. On the ecology and behavior of the Lake Manyara elephants. *East African Wildlife Journal* 11: 401-403.
- Ehrlich, P. R. y L. E. Gilbert. 1973. Population structure and dynamics of the tropical butterfly, *Heliconius ethilla*. *Biotropica* 5: 69-83.
- Eliceiri, K. E., M. R. Berthold, I. G. Goldberg, L. Ibáñez, B. S. Manjunath, M. E. Martone, R. F. Murphy, H. Peng, A. L. Plant, B. Roysam, N. Stuurmann, J. R. Swedlow, P. Tomancak, y A. E. Carpenter. 2012. Biological imaging software tools. *Nature Methods* 9(7):697-710
- Emsley, M. G. 1964. The geographical distribution of the color-pattern components of *Heliconius erato* and *Heliconius melpomene* with genetical evidence for the systematic relationship between the two species. *Zoologica* (New York) 49(3): 245-286.
- Ferreira, T. y W. Rasband. 2012. ImageJ. User Guide. IJ 1.46r
- Fontenla, J.L. y Cruz, J. de la. 1986. Análisis zoogeográfico de las mariposas antillanas (Lepidoptera, Rhopalocera) a nivel subespecífico. *Ciencias Biológicas* 15: 107-122.
- Fontenla, J.L. y R. Rodríguez. 1990. Sistema de poblaciones de *Calisto sibylla* Bates, 1934 (Lepidoptera, Satyridae) en Cuba. *Poeyana* 395: 1-13.
- Fontenla, J.L. 1987 Aspectos comparativos estructurales de tres comunidades de mariposas (Lepidoptera, Rhopalocera) en Cuba. *Poeyana* 337: 1-20.
- Fontenla, J.L. 1989. Partición de recursos en una comunidad de mariposas (Lepidoptera, Rhopalocera). *Poeyana* 385: 1-26.
- Forcada, J. y A. Aguilar. 2000. Use of photographic identification in capture-recapture studies of Mediterranean monk seals. *Marine Mammal Science* 16: 767-793.
- Foster, J.B. 1966. The giraffe of Nairobi National Park: home range, sex ratios, the herd, and food. *East African Wildlife Journal* 4: 139-148.
- Frame, L.H., J.R. Malcolm, G.W. Frame, y H. Van Lawick. 1979. Social organization of African wild dogs (*Lycacon pictus*) on the Serengeti Plains, Tanzania 1967-1978. *Seitschrift fur Tierpsychologie* 50: 225-249.
- Frisch, A.J. y J-P. A. Hobbs. 2007. Photographic identification based on unique, polymorphic color patterns: a novel method for tracking a marine crustacean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 351: 294-299
- Gilbert, L. E. 2003. Adaptive novelty through introgression in *Heliconius* wing patterns: Evidence for a shared genetic "toolbox" from synthetic hybrid zones and a theory of diversification. Pp. 281-318. En: *Butterflies. Ecology and Evolution taking flight* (Boggs, C. L., W. B. Watt y P.R. Ehrlich, Eds.). Chicago, The University of Chicago Press.
- Goodall, J. 1986. *The chimpanzees of Gombe; patterns of behavior*. The Belknap Press of Harvard University Press. Boston, Massachusetts.
- Hiby, L. y P. Lovell. 1990. Computer aided matching of natural markings: a prototype system for grey seals. *Reports of the International Whaling Commission*, Special Issue 12: 57-61.
- Hindell, M.A., M.A. Lea, y C.L. Hull. 1996. The effects of flipper bands on adult survival rate and reproduction in the royal penguin *Eudyptes schlegeli*. *Ibis* 138: 557-560.

- Jiggins, C. D. y N. Davies. 1998. Genetic evidence for a sibling species of *Heliconius charithonia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 64(1): 57-67
- Jiggins, C. D. y W. O. McMillan. 1997. The genetic basis of an adaptive radiation: warning colour in two *Heliconius* species. *Proceedings of the royal Society of London* 264(1385): 1167-1175.
- Jones, M.L. 1990. The reproductive cycle of gray whales based on photographic resightings of females in the breeding grounds from 1977-82. *Report of the International Whaling Committee* 12: 177-182.
- Joron, M.; C. D. Jiggins, A. Papanicolaou y W.O. McMillan. 2006. *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* 97(3): 157-167
- Kaye, W.J. 1931. *Heliconius charithonia* and its mimics in Colombia, Venezuela, Costa Rica, Cuba and Haiti. *Proceedings of the Entomological Society of London* 5 (3): 89-90.
- Langtimm, C.A., T.J. O'Shea, R. Pradel, y C.A. Beck. 1998. Estimates of annual survival probabilities for adult Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Ecology* 79: 981-997.
- López, N., R. López y M. Blanco. 2013. Distribución, abundancia y composición etaria de los grupos de *Tursiops truncatus* (Cetacea: Delphinidae) en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 2(3): 39-47
- Mallet, J. L. B., J. T. Longino, D. A. Murawski, A. Murawski y A. S. de Gamboa. 1987. Handling effects in *Heliconius*: where do all the butterflies go? *Journal of animal Ecology* 56: 377-386
- Mavárez, J y M. González. 2006. A set of microsatellite markers for *Heliconius melpomene* and closely related species. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 20-23.
- Mavárez, J., C. A. Salazar, E. Bermingham, C. Salcedo, C. D. Jiggins y M. Linares. 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature* 441(7095): 868-871
- McMahon, C.R., C. J. A. Bradshaw y G. C. Hays. 2006.) Branding can be justified in vital research conservation. *Nature* 439: 392.
- Mowat, G., B. G. Slough y R. Rivard. 1994. A comparison of three live capturing devices for lynx, capture efficiency and injuries. *Wildlife Society Bulletin* 22: 644-650.
- Mullen, S. P. (2006) Wing pattern evolution and the origins of mimicry among North American admiral butterflies (Nymphalidae: *Limenitis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39(3):747-758
- Munroe, E. G. 1982. Wing patterns in the Lepidoptera. *Bulletin of the Entomological Society of Canada* 14(4): 103-112
- Myers, G. 2012. Why bioimage informatics matters. *Nat Meth* 9(7): 659-660
- Nijhout, H. F. 1981. The colour patterns of butterflies and moths. *Scientific American* 245(5): 140-151
- Nijhout, H. F. 1985. Independent development of homologous pattern elements in the wing patterns of butterflies. *Developmental Biology* 108(1): 146-151
- Nijhout, H. F. 1991. *The development and evolution of butterfly wing patterns*. Washington, D.C., Smithsonian Institution Press.
- Nijhout, H. F. 2001a. Elements of butterfly wing patterns. *Journal of experimental Zoology* 291(3): 213-225
- Nijhout, H. F. 2001b. *Origin of butterfly wing patterns*. Pp. 511-529. En: *The character concept in evolutionary biology* (G. P. Wagner, Ed.). San Diego, Academic Press.
- Nijhout, H. F. y G. A. Wray. 1988. Homologies in the colour patterns of the genus *Heliconius* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 33(4): 345-365
- Nijhout, H. F., G.A. Wray y L. E. Gilbert. 1990. An analysis of the phenotypic effects of certain colour pattern genes in *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 40(4): 357-372
- Núñez, R. 2003. Nuevos registros de polillas (Lepidoptera) para Cuba. *Avicennia* 16: 83-90.
- Núñez, R. 2010. Especies del orden Lepidoptera (Insecta) en el área protegida de recursos manejados "Mil Cumbres", Pinar del Río, Cuba. *Poeyana* 498: 31-38.
- Núñez, R. y A. Barro. 2003. Composición y estructura de dos comunidades de mariposas (Lepidoptera, Papilionoidea) en Boca de Canasí, La Habana, Cuba. *Biología* 17(1): 8-17.
- Núñez, R. y A. Barro. 2012. A list of Cuban Lepidoptera (Arthropoda: Insecta). *Zootaxa* 3384: 1-59
- Núñez, R., E. Oliva, P. F. Matos-Maravi y N. Wahlberg. 2012.) Cuban Calisto (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae), a review based on morphological and DNA data. *ZooKeys* 165: 57-105.
- Ogutu, J. O., H. P. Piepho, H. T. Dublin, R. S. Reid y N. Bhola. 2006. Application of mark-recapture methods to lions: satisfying assumptions by using covariates to explain heterogeneity. *Journal of Zoology* 269: 161-174.
- Papanicolaou, A., M. Joron, W. O. McMillan, M. L. Blaxter y C. D. Jiggins. 2005. Genomic tools and cDNA derived markers for butterflies. *Molecular Ecology* 14(9): 2883-2897
- Peterson, J.C.B. 1972. An identification system for zebra (*Equus burchelli* Gray). *East African Wildlife Journal* 10: 59-63.
- Procaccini, D. J. y L. S. Marks. 1968. Computer analysis of morphological pattern as an aid in taxonomic discrimination, pp. 223-233. En: *Proceedings of the 1966 Rochester Conference on Data Acquisition and Processing in Biology and Medicine* (K. Enslein, Ed.). New York, Pergamon Press.
- Quintero, H. E. 1989. Population dynamics of the butterfly *Heliconius charithonia* L. in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 24(3/4): 155-160.
- Reed, R. D. y M. S. Serfas. 2004. Butterfly wing pattern evolution is associated with changes in a Notch/Distal-less temporal pattern formation process. *Current Biology* 14(13): 1159-1166
- Reed, R. D. y L. E. Gilbert. 2004. Wing venation and distal-less expression in *Heliconius* butterfly wing pattern development. *Development Genes and Evolution* 214(12): 628-634
- Rogg, K. A., O. R. Taylor y D. L. Gibo. 1999. Mark and recapture during the monarch migration: Preliminary analysis. Pp. 133-138. En: *1997 North American Conference on the Monarch Butterfly* (Hoth, J., L. Merino, K. S. Oberhauser, I. Pisanty, S. Price y T. Wilkinson, Eds.). Montréal, Commission for Environmental Cooperation.

- Schaller, G. B. 1972. *The Serengeti lion*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Schwarz, C. J. y G. A. F. Seber. 1999. Estimating animal abundance: Review III. *Statistical Science* 1(4): 427-456.
- Sean, M., W. Dominic, M. Marino y S. K. Feiner. 2006. Leaf View: a user interface for automated botanical species identification and data collection. [Inédito]. ACM UIST 2006 Conference Companion, Montreux, Switzerland, October 15-18.
- Sheffield, J. B. 2007. *ImageJ*, a useful tool for biological image processing and analysis. *Microsc Microanal* 13: 200-201.
- Singer M.C. y P. Wedlake. 1981. Capture does affect probability of recapture in a butterfly species. *Ecological Entomology* 6:2 15-216.
- Testé, E. y D. Denis. 2013. Bases para la fotoidentificación de las cebras (*Equus burchellii*) del Parque Zoológico Nacional de Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 2(2): 50-68
- Torre, S.L. de la. 1947. Revisión de las especies cubanas del género *Danaus*, con la adición de dos nuevas subespecies para Cuba (Lepidópteros Ropalóceros). *Memorias de la Sociedad cubana de Historia natural* 19 (1): 17-21.
- Torre, S.L. de la. 1949. Géneros y especies de la subfamilia Heliconiinae hallados en Cuba (Lepidoptera. Nymphalidae) (Adiciones y correcciones al catálogo de Cuba). *Memorias de la Sociedad cubana de Historia natural* 19 (2): 191-194.
- Van Tienhoven, A.M., J.E. Den Hartog, R.A. Reijns, y V.M. Peddemors. 2007. A computer- aided program for pattern-matching of natural marks on the spotted ragged tooth shark *Carcharias taurus*. *Journal of Applied Ecology* 44: 273-280.
- Waller, D. A., y L. E. Gilbert. 1982. Roost recruitment and resource utilization: observations on a *Heliconius charitonia* L. roost in Mexico (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 36(3): 178-184
- Wilson, R.P., y C. R. McMahon. 2006. Measuring devices on wild animals: what constitutes acceptable practice? *Frontiers in Ecology and the Environment* 4: 147-154.
- Wursig, B. y T. A. Jefferson. 1990. Methods of photoidentification for small cetaceans. Rep. Int. Whal Comm. (Special Issue)12: 43-52.
- Wursig, B., y M. Wursig. 1977. The photographic determination of group size, composition, and stability of coastal porpoises (*Tursiops truncatus*). *Science* 198:755-756.
- Yang, Y. S.; D. K. Park, H. Chan Kim, Min-Ho Choi *et al.* 2001. Automatic identification of human helminth eggs on microscopic fecal specimens using digital image processing and an artificial neural network. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 48(6): 718-730.
- Young, A. M. 1977. Studies on the biology of *Heliconius charitonia* L. in Costa Rica. *Pan-Pacific Entomologist* 52(4): 291-303.
- Young, A. M. y J. H. Thomason. 1975. Note on Communal roosting of *Heliconius charitonus* (Nymphalidae) in Costa Rica. *Journal of the Lepidopterists' Society* 29: 243-255
- Young, A. M. 1984. Communal roost fidelity in *Heliconius charitonia*: comments on a paper by Drs. D. A. Waller and L. E. Gilbert. *Journal of the Lepidopterists' Society* 38(2): 141-142
- Young, A. M. y M. E. Carolan. 1976. Daily instability of communal roosting in the Neotropical butterfly *Heliconius charitonia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 49(3): 346-359

Recibido: 27 de marzo, aceptado: 1 de junio
Editor Asociado: Maike Hernández Quinta

ANEXO 1. Estadísticos descriptivos para las variables relativizadas (%) descritas para las manchas del patrón en las alas posteriores de *Heliconius charitonia* (Nymphalidae: Lepidoptera). Se presenta la media \pm error estándar, valores extremos (mínimo - máximo) y límites de confianza al 95 %.

APENDIX 1. Descriptive statistics for the relative variables (%) described for the spots in the edge of the posterior wings pattern in *Heliconius charitonia* (Nymphalidae: Lepidoptera). It contains mean \pm standard error, extreme values (minimum - maximum) and confidence limits at 95 %.

No. de mancha	Área relativa	Distancia al mesotórax	Índice de curvatura	de Distancia con la siguiente	Ángulo con la siguiente
1	1,27 \pm 0,06 1,15 - 1,40 0,09 - 2,44	-	-	8,27 \pm 0,10 8,06 - 8,47 6,30 - 9,97	0,08 \pm 0,00 0,08 - 0,08 0,05 - 0,10
2	1,36 \pm 0,07 1,23 - 1,50 0,13 - 2,81	98,26 \pm 0,11 98,03 - 98,48 96,24 - 103,05	5,96 \pm 0,13 5,71 - 6,22 1,82 - 9,18	9,07 \pm 0,08 8,91 - 9,23 7,54 - 10,46	0,08 \pm 0,00 0,08 - 0,08 0,07 - 0,10
3	2,59 \pm 0,09 2,40 - 2,77 0,87 - 4,02	93,78 \pm 0,17 93,44 - 94,12 90,97 - 101,97	9,23 \pm 0,17 8,90 - 9,56 3,60 - 14,99	9,12 \pm 0,17 8,78 - 9,47 6,73 - 18,05	0,08 \pm 0,00 0,08 - 0,09 0,07 - 0,17
4	3,44 \pm 0,11 3,22 - 3,66 1,39 - 7,42	88,95 \pm 0,20 88,54 - 89,35 84,87 - 97	11,51 \pm 0,18 11,16 - 11,86 7,09 - 17,19	9,65 \pm 0,08 9,49 - 9,80 8,41 - 11,78	0,09 \pm 0,00 0,09 - 0,10 0,08 - 0,11

ANEXO 1. Continuación. Estadísticos descriptivos para las variables relativizadas (%) descritas para las manchas del patrón en las alas posteriores de *Heliconius charitonia* (Nymphalidae: Lepidoptera). Se presenta la media \pm error estándar, valores extremos (mínimo - máximo) y límites de confianza al 95 %.

APENDIX 1. Continuation. Descriptive statistics for the relative variables (%) described for the spots in the edge of the posterior wings pattern in *Heliconius charitonia* (Nymphalidae: Lepidoptera). It contains mean \pm standard error, extreme values (minimum - maximum) and confidence limits at 95 %.

No. de mancha	Área relativa	Distancia al mesotórax	Índice de curvatura	Distancia con la siguiente	Ángulo con la siguiente
5	4,54 \pm 0,09	83,67 \pm 0,24	13,07 \pm 0,19	9,48 \pm 0,06	0,09 \pm 0,00
	4,35 - 4,72	83,19 - 84,15	12,68 - 13,45	9,35 - 9,61	0,09 - 0,10
	2,94 - 7,02	79,24 - 92,11	9,94 - 18,89	8,36 - 10,49	0,08 - 0,11
6	6,30 \pm 0,12	78,09 \pm 0,25	13,29 \pm 0,19	9,40 \pm 0,08	0,10 \pm 0,00
	6,05 - 6,54	77,59 - 78,59	12,90 - 13,67	9,24 - 9,55	0,10 - 0,10
	3,91 - 8,80	73,68 - 86,5	10,30 - 19,40	8,16 - 12,04	0,09 - 0,13
7	7,08 \pm 0,15	72,30 \pm 0,27	12,40 \pm 0,21	9,70 \pm 0,44	0,11 \pm 0,00
	6,78 - 7,38	71,77 - 72,84	11,98 - 12,82	8,83 - 10,58	0,10 - 0,12
	0,70 - 9,56	68,75 - 81,19	10,03 - 19,46	6,59 - 37,30	0,08 - 0,39
8	8,54 \pm 0,18	67,25 \pm 0,44	11,32 \pm 0,22	9,39 \pm 0,57	0,12 \pm 0,01
	8,19 - 8,89	66,36 - 68,14	10,89 - 11,76	8,25 - 10,53	0,10 - 0,13
	3,10 - 11,70	62,95 - 90,15	8,78 - 17,62	7,67 - 45,79	0,10 - 0,50
9	8,48 \pm 0,11	61,66 \pm 0,28	9,49 \pm 0,22	8,75 \pm 0,07	0,12 \pm 0,00
	8,26 - 8,70	61,09 - 62,22	9,04 - 9,93	8,62 - 8,89	0,12 - 0,13
	6,30 - 10,71	57,16 - 70,08	6,43 - 17,23	7,62 - 10,38	0,11 - 0,14
10	9,89 \pm 0,11	56,93 \pm 0,27	7,73 \pm 0,20	7,59 \pm 0,06	0,12 \pm 0,00
	9,66 - 10,11	56,40 - 57,47	7,34 - 8,13	7,48 - 7,71	0,12 - 0,12
	7,71 - 12,33	52,25 - 63,7	5,19 - 14,01	6,58 - 8,63	0,11 - 0,13
11	7,13 \pm 0,12	53,23 \pm 0,27	6,12 \pm 0,18	5,72 \pm 0,08	0,10 \pm 0,00
	6,89 - 7,38	52,70 - 53,76	5,75 - 6,49		0,09 - 0,10
	5,22 - 9,62	49,02 - 59,04	3,91 - 11,75	5,56 - 5,88 4,47 - 8,58	0,08 - 0,13
12	5,87 \pm 0,14	50,44 \pm 0,26	4,44 \pm 0,16	5,34 \pm 0,09	0,09 \pm 0,00
	5,58 - 6,16	49,93 - 50,96	4,12 - 4,75	5,15 - 5,53	0,09 - 0,10
	3,26 - 9,15	46,05 - 54,87	1,95 - 8,40	3,92 - 9,21	0,07 - 0,14
13	5,58 \pm 0,14	47,78 \pm 0,25	2,42 \pm 0,09	5,51 \pm 0,08	0,10 \pm 0,00
	5,29 - 5,86	47,28 - 48,29	2,23 - 2,61	5,36 - 5,66	0,10 - 0,11
	3,26 - 8,11	44,04 - 52,91	0,99 - 4,02	4,19 - 6,73	0,08 - 0,12
14	4,44 \pm 0,13	45,06 \pm 0,28	-	-	-
	4,18 - 4,69	44,51 - 45,62			
	1,79 - 7,40	40,93 - 50,62			