

A MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DE ASAS E A IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE ESPÉCIES DE ABELHAS

Tiago Mauricio Franco^{1,*} & Vera Lucia Imperatriz Fonseca²

¹ Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo. Av. Arlindo Bétio, 1000, Ermelino Matarazzo. São Paulo, SP, Brasil. CEP: 03828-000.

² Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Travessa 14, 321, Butantã. São Paulo, SP, Brasil. CEP: 05508-900.
E-mails: tfranco@usp.br, vlifonse@ib.usp.br

RESUMO

Em todo o mundo, programas de proteção aos polinizadores estão sendo lançados. Entretanto, um problema largamente enfrentado em praticamente todos os grupos estudados é a falta de taxonomistas treinados para a identificação das espécies existentes nas diversas áreas. Aqui, realizamos uma revisão dos trabalhos envolvendo a aplicação de técnicas de morfometria geométrica de asas na identificação de espécies de abelhas. A técnica se mostra como uma alternativa eficiente, rápida e de baixo custo para a identificação de espécies de abelhas sem ferrão, abrindo uma nova oportunidade de desenvolvimento de ferramentas para diminuir o impedimento taxonômico.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão; impedimento taxonômico; conservação; polinizadores.

ABSTRACT

WINGS GEOMETRICAL MORPHOMETRY AND THE AUTOMATIC IDENTIFICATION OF BEES SPECIES. Throughout the world, programs for the protection of pollinators are being launched. However, a problem widely faced in almost all studied groups is the lack of trained taxonomists to species identification in the various areas. Here, we conducted a review of studies involving the application of geometrical morphometrics of wings on the identification of species of bees. The technique is shown as an efficient, fast and low cost for the identification of species of stingless bees, opening a new opportunity to develop tools to reduce the taxonomic impediment.

Key-words: Stingless bees; taxonomic impediment; conservation; pollinators.

RESUMEN

LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DE ALAS Y LA IDENTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE ESPECIES DE ABEJAS. En todo el mundo, programas de protección a los polinizadores están siendo lanzados. Entre tanto, un problema ampliamente enfrentado en prácticamente todos los grupos estudiados es la falta de taxónomos entrenados para la identificación de las especies existentes en las diversas áreas. Aquí, realizamos una revisión de los trabajos que involucran la aplicación de técnicas de morfometría geométrica de alas a la identificación de especies de abejas. La técnica se muestra como una alternativa eficiente, rápida y de bajo costo para la identificación de especies de abejas sin aguijón, abriendo una nueva oportunidad de desarrollo de herramientas para disminuir el impedimento taxonómico.

Palabras clave: Abejas sin aguijón; impedimento taxonómico; conservación; polinizadores.

INTRODUÇÃO

A importância das abelhas como polinizadores no âmbito agrícola e para a manutenção da biodiversidade foi reconhecida pela Convenção da Diversidade Biológica e pelos países signatários da mesma, através da aprovação, em 2000, da Iniciativa Internacional de Polinizadores. Atualmente, no mundo todo, vários esforços têm sido feitos no sentido de reunir informações sobre estas espécies, considerações sobre suas distribuições geográficas e *checklists*, sendo o impedimento taxonômico um dos maiores problemas para a avaliação da diversidade de abelhas (Silveira *et al.* 2006). Até o momento, foram descritas cerca de 20000 espécies nominais de abelhas, sendo que 391 destas correspondem a espécies de Meliponini, de acordo com o catálogo de Abelhas Neotropicais (Camargo & Pedro 2007).

Entretanto, uma das dificuldades atuais é a identificação de espécies de abelhas por pesquisadores e/ou apicultores não familiarizados com a taxonomia do grupo, nesse ponto, a morfometria sempre foi uma ferramenta importante para a definição e separação de espécies, subespécies e ecotipos (Ruttner *et al.* 1978, Ruttner 1988, Francoy *et al.* 2006). Com o desenvolvimento da informática aplicada à morfometria, sistemas automáticos de identificação de espécies já descritas surgiram, como por exemplo, o ABIS - *Automatic Bee Identification System* (Schröder *et al.* 1995). Este sistema usa características extraídas

do padrão de venação das asas para identificação das espécies. Através de um complexo mecanismo de reconhecimento de padrões de imagens, são extraídas mais de 300 variáveis das asas anteriores de espécies de abelhas, que são utilizadas em análises discriminantes não lineares e fornecem taxas de classificações corretas superiores a 99% para espécies europeias dos gêneros *Bombus*, *Colletes* e *Andrena* (Schröder *et al.* 2006). Outros trabalhos realizados com as metodologias de análise dos padrões de venação alares nos mostram resultados extremamente promissores para *Apis mellifera* e também para outros gêneros de abelhas solitárias (Francoy *et al.* 2006, 2008, Drauschke *et al.* 2007). Entretanto, o uso do software ABIS se restringe a espécies que apresentam os padrões completos de venação de asa, com seis ou sete células completamente fechadas. Desta maneira, as abelhas sem ferrão não podem ser identificadas por esse sistema, uma vez que apresentam redução das nervuras da asa anterior como sinapomorfia do grupo (Ruttner 1988) (Figura 1). Além disso, o ABIS não é um software de livre acesso, sendo que existem apenas duas cópias funcionais fora do *Institut für Informatik III (Universität Bonn – Alemanha)*, responsável pelo desenvolvimento do referido software (Schröder *et al.* 2006). Uma destas cópias está sendo utilizada para cadastro da coleção de abelhas dos laboratórios do USDA em Logan (EUA) e a outra está sob nossa responsabilidade (Laboratório de Genética, Biologia e Conservação de Abelhas – EACH – USP), sendo

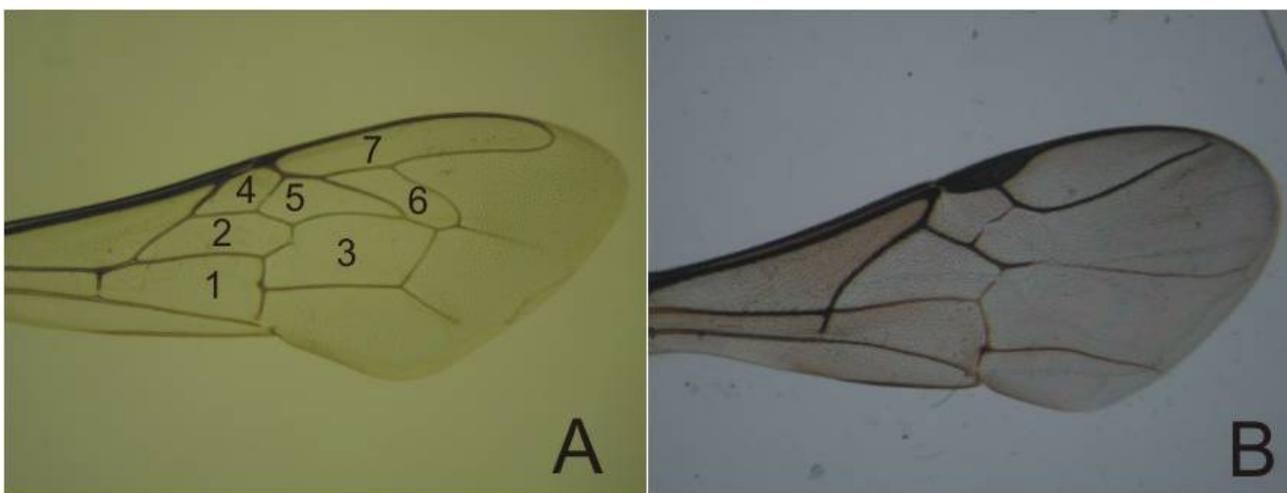


Figura 1. Diferenças nos padrões de venação de asa entre espécies (A) com padrão de venação completo, como *Apis mellifera* e (B) com padrão de venação incompleto, como *Plebeia remota*. Os números presentes na asa de *Apis mellifera* (A) representam a ordem de identificação das células pelo software ABIS.

Figure 1. Differences in the wing patterns between species with (A) closed wing cells, like *Apis mellifera* and (B) with opened wing cells, like *Plebeia remota*. The numbers in (A) indicate the order of identification of the cells in ABIS software.

que o cadastro dos espécimes de nossas coleções já está planejado.

Devido à impossibilidade de se utilizar o software ABIS para analisar as asas de abelhas sem ferrão, devido à redução das nervuras das asas anteriores (Figura 1B), novas alternativas metodológicas têm sido testadas. Dentre as metodologias de Morfometria Geométrica, as análises de deformações parciais (*partial warps*) e relativas (*relative warps*) (Bookstein 1991) têm se mostrado eficientes na diferenciação de unidades taxonomicamente operacionais (Mendes *et al.* 2007, Francoy *et al.* 2008, 2009). O teste baseado nas deformações consiste na utilização de marcos anatômicos (Rohlf & Marcus 1993). Esses marcos anatômicos são pontos nos quais as estruturas biológicas são analisadas e que permitem identificar as variações de forma entre estruturas morfológicas homólogas nos diferentes exemplares em estudo. Tais análises geram variáveis que são independentes do tamanho das estruturas, o que elimina parte da influência ambiental que afeta o desenvolvimento dos organismos, principalmente de insetos.

Esta metodologia utiliza uma série de técnicas que visam descrever e representar a geometria das formas estudadas. Enquanto nas abordagens tradicionais a variação da forma é estudada através da covariação entre pares de medidas lineares, a morfometria geométrica é capaz de descrever e localizar mais claramente as regiões de mudanças na forma e, sobretudo de reconstruir e reconstituir graficamente estas diferenças (Bookstein 1991), uma vez que trabalha com as posições relativas (coordenadas cartesianas) dos marcos anatômicos.

Uma vez que estas características são extraídas, elas são utilizadas em análises multivariadas, como análises de componentes principais e análises discriminantes para a verificação da formação ou não de grupos homogêneos envolvendo os indivíduos analisados. Nas análises discriminantes, são geradas equações de reposicionamento dos pontos nos gráficos e os indivíduos são classificados como pertencentes aos grupos de acordo com a menor distância entre os indivíduos e os centróides dos grupos. Neste ponto, as análises de validação cruzada são extremamente importantes para a verificação da eficiência das equações geradas a partir das características extraídas em classificar corretamente os indivíduos dentro de seus respectivos grupos. Para tanto, nos testes

de validação cruzada geralmente é excluída uma quantidade determinada de indivíduos da amostra e as equações são geradas novamente. Feito isso, estes indivíduos excluídos têm suas características aplicadas nas equações e suas classificações são verificadas. Assim, é obtida uma resposta sobre a efetividade das medidas extraídas na classificação de novos indivíduos que por ventura venham a ser coletados (Stone 1978).

Os primeiros trabalhos utilizando morfometria geométrica e os padrões de venação de asas anteriores para diferenciação de grupos de abelhas foram realizados com as abelhas africanizadas e suas subespécies parentais. A análise de deformações relativas dos padrões de nervura de asa atingiu uma taxa de 85% de classificações corretas nas análises subespecíficas de *Apis mellifera*, sendo que as menores taxas de acerto foram encontradas em subespécie pertencentes à uma mesma linhagem evolutiva, sendo que estas dificilmente são distinguidas, mesmo pelos métodos tradicionais já estabelecidos (Francoy *et al.* 2006, 2008). Nestes trabalhos, os autores puderam checar a proximidade morfológica dos grupos estudados e compará-los com dados genéticos descritos na literatura, confirmando a maior proximidade genética e morfológica das abelhas africanizadas com a subespécie africana *A. m. scutellata*, com pouca influência das subespécies européias. Tais resultados indicam ainda que as abelhas africanizadas apresentam um padrão de venação de asas distinto das suas subespécies parentais, podendo ser facilmente identificada por tal característica, com taxas de acerto de aproximadamente 99%. Adicionalmente, a utilização de metodologias de Morfometria Geométrica para a identificação de espécimes de *Apis mellifera* permite um aumento na produtividade do trabalho, uma vez que através dessas metodologias é possível identificar os indivíduos de uma colméia em poucos minutos (Francoy *et al.* 2008), enquanto que o mesmo trabalho pode durar algumas horas quando se utiliza análises baseadas em morfometria tradicional (S. Fuchs, comunicação pessoal).

Em abelhas sem ferrão, o primeiro trabalho realizado com este tipo de análise demonstrou elevada diferenciação morfológica entre duas colônias nominalmente descritas como *Plebeia remota*. Estas colônias são representativas de diferentes populações naturais e estão mantidas em simpatria, em cativeiro,

por mais de 10 anos. Neste contexto, a diferenciação morfológica encontrada entre elas sugere ausência de fluxo gênico e coloca dúvidas com relação a identidade taxonômica das mesmas (Francisco *et al.* 2008). Dados moleculares adicionais, como marcadores de DNA mitocondrial e hidrocarbonetos de quitina, aplicados à indivíduos das mesmas colônias, também indicaram pronunciada diferenciação entre elas, fortalecendo a idéia de que estas colônias são representativas de diferentes linhagens evolutivas, possivelmente pertencendo a duas espécies distintas (Francisco *et al.* 2008).

Análises preliminares realizadas dentro do gênero *Plebeia* com seis espécies diferentes mostraram uma grande divergência dentro dos grupos, sendo possível a diferenciação correta de 93,4% dos indivíduos nos testes de validação cruzada (Silva 2006). A técnica se mostrou também muito eficiente na discriminação de indivíduos de diferentes populações de *Nannotrigona testaceicornis*, atingindo um acerto de até 74% na classificação dos indivíduos dentro de seus respectivos grupos de origem (Mendes *et al.* 2007). Além disso, já foram também caracterizadas operárias de *Melipona beecheii* provenientes do México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, sendo que as abelhas das diferentes localidades puderam ser diferenciadas, resultados estes que abrem a possibilidade de rastreamento da origem geográfica das abelhas (Francoy *et al.* dados não publicados).

Além da possibilidade de rastreamento geográfico demonstrada da origem das amostras, Bischoff *et al.* (2009) demonstraram também que é possível traçar, através da metodologia de morfometria geométrica, rotas de colonização e expansão de territórios ocupados pelas espécies.

Já foram também testadas diferenças entre os padrões de venação de asa de machos e operárias de cinco diferentes espécies de abelhas sem ferrão, com vistas para o seu uso no reconhecimento automático de espécies. Desta maneira, 100 machos e 100 operárias de *Plebeia remota*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Frieseomelitta varia*, *Melipona quadrifasciata* e *Scaptotrigona aff depilis* tiveram suas asas anteriores caracterizadas quanto ao seu padrão de diferenciação, sendo que foi possível a discriminação de 100% dos indivíduos dentro de suas respectivas espécies, e que machos e fêmeas de uma mesma espécie são mais parecidos entre si do que

quando comparados com indivíduos do mesmo sexo de outros gêneros. Foi ainda possível a constatação de que tanto machos quanto operárias apresentavam uma perfeita discriminação entre os grupos, mas com melhor separação estatística dos grupos de operárias (Francoy *et al.* 2009).

A morfometria geométrica das asas anteriores também tem se mostrado muito útil no reconhecimento de espécies crípticas do gênero *Eubazus* (Villemant *et al.* 2007) e *Bombus* (Aytekin *et al.* 2007), indicando a sensibilidade da técnica em reconhecer espécies mesmo quando estas são morfologicamente similares.

Todos estes resultados se mostram muito promissores quanto ao uso da técnica de análises de deformações parciais e relativas na discriminação das espécies de abelhas. Esta é uma técnica rápida e de baixo custo, o que a torna bastante adequada para tal propósito de reconhecimento das espécies, demandando, porém mais estudos e um maior número de espécies a ser estudado, para alimentação do banco de dados que permitirá as identificações. Entretanto, fica como uma boa opção para a realização de trabalhos, em uma época em que a biologia molecular é tida como a resposta para todos os problemas.

AGRADECIMENTOS: Os autores gostariam de dedicar este trabalho ao Prof. Dr. Paulo Nogueira Neto, por sua dedicação e incansável luta pela conservação da biodiversidade brasileira.

REFERÊNCIAS

- AYTEKIN, A.M.; TERZO, M.; RASMONT, P. & ÇAGATAY, N. 2007. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société Entomologique de France*, 43: 95-102.
- BISCHOFF, I.; SCHROEDER, S. & MISOF, B. 2009. Differentiation and range expansion of North American squash bees *Peponapis pruinosa* (Apidae: Apiformes) populations assessed by geometric wing morphometry. *Annals of the Entomological Society of America*, 102: 60-69.
- BOOKSTEIN, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press, Cambridge. 460p.

- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. 2007. Meliponini, Lepeletier, 1836. Pp. 272-578. In: J.S. MOURE, D. URBAN, & G.A.R. MELO (eds.). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. 1072p.
- DRAUSCHKE, M.; STEINHAGE, V.; POGODA, A.; MÜLLER, S.; FRANCOY, T.M. & WITTMANN, D. 2007. Reliable Biometrical Analysis in Biodiversity Information Systems. Pp. 25-36. In: Proceedings of the 7th International Workshop on Pattern Recognition in Information Systems, Funchal, Portugal.
- FRANCISCO, F.O.; NUNES-SILVA, P.; FRANCOY, T.M.; WITTMANN, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ARIAS, M.C. & MORGAN, E.D. 2008. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903)(Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 55: 231-237.
- FRANCOY, T.M.; GONÇALVES, L.S. & WITTMANN, D. 2006. Changes in the patterns of wing venation of Africanized honey bees over time. Pp. 173-177. In: Anais do VII Encontro sobre Abelhas.
- FRANCOY, T.M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; STEINHAGE, V.; BEZERRA-LAURE, M.A.F.; DE JONG, D. & GONÇALVES L.S. 2008. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*, 39: 488- 494.
- FRANCOY, T.M.; SILVA, R.A.O.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2009 Gender Identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. *Genetics and Molecular Research* 8: 207-214.
- MENDES, M.F.M.; FRANCOY, T.M.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2007. Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal*, 23: 147-152.
- ROHLF, F.J. & MARCUS L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 129-132.
- RUTTNER F.; TASSENCOURT L. & LOUVEAUX J. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9: 363-381.
- RUTTNER F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer Verlag, Berlin, Germany. 284p.
- SILVA, R.A.O. 2006. A morfometria geométrica e as espécies do gênero *Plebeia* (Apidae, Meliponini). *Monografia*. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 42p.
- SILVEIRA, F.A.; PINHEIRO-MACHADO, C.; ALVES-DOS-SANTOS, I.; KLEINERT, A.M.P. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2006. Taxonomic constraints for the conservation and sustainable use of wild pollinators – the Brazilian wild bees. Pp. 47-56. In: P. Kevan & V.L. Imperatriz-Fonseca (eds.). Pollinating Bees. The conservation link between agriculture and nature. Segunda Edição. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF. 313p.
- SCHRÖDER, S.; DRESCHER, W.; STEINHAGE, V. & KASTENHOLZ, B. 1995. An Automated Method for the Identification of Bee Species (Hymenoptera: Apoidea). Pp. 6-7. In: Proceedings of the International Symposium on Conserving Europe's Bees. Londres, Reino Unido.
- SCHRÖDER, S.; WITTMANN, D.; DRESCHER, W.; ROTH, V.; STEINHAGE, V. & CREMERS, A.B. 2006. The new key to bees: Automated Identification by image analysis of wings. Pp. 229-236. In: P. Kevan & V.L. Imperatriz-Fonseca (eds.). Pollinating Bees. The conservation link between agriculture and nature. Segunda Edição. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF. 313p.
- STONE, M. 1978. Cross-validation: a review. *Statistics* 9: 127-139.
- VILLEMANT, C.; SIMBOLOTTI, G. & KENIS, M. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, 32: 625-634.

Submetido em 25/08/2009

Aceito em 15/12/2009