BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

Descripción morfológica y funcional de las estructuras que producen color iridiscente en los peces *Xenotoca variata*

Tesis presentada para obtener el título de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

Biol. Natalie Sesteffany Olmos Santiago

Asesor de tesis:

Dr. Alejandro Clemente Moyaho Martínez

Octubre, 2018

Resumen

La coloración estructural es una característica de muchas especies animales. La interacción física entre la luz y nanoestructuras, localizadas sobre el integumento, es responsable de tal coloración. Ésta resulta de la interferencia, refracción o dispersión de un haz de luz incidente que sintoniza a la luz reflejada en un color o subconjunto de colores. De acuerdo con la conformación espacial que exhiben, las nanoestructuras que producen coloración estructural se han clasificado en i) interferencia de capas finas, ii) reflectores multicapas, iii) rejillas de difracción, iv) arreglos multidimensionales y v) de dispersión incoherente. Las cuatro primeras conformaciones producen iridiscencia, fenómeno definido como el cambio de color de una superficie como resultado de la variación del ángulo de observación o de la luz incidente. Espectralmente, una superficie iridiscente se caracteriza por tener uno o varios picos de reflectancia máxima. En este trabajo estudié las propiedades ópticas y físicas de las escamas iridiscentes del pez *Xenotoca variata*. Puse a prueba algunas de las predicciones que se derivan de la clasificación mencionada arriba con el objetivo de identificar la estructura responsable de generar la iridiscencia que muestran estos peces, y el ángulo óptimo de su reflectancia máxima. Con este propósito usé un espectroradiómetro en un arreglo experimental en el que varié el ángulo de incidencia de un haz de luz emitido por una fuente luminosa a través de una fibra óptica. La misma fibra envía la reflectancia capturada en cada escama iridiscente a una computadora donde la reflectancia máxima y el brillo de las escamas son analizados. Utilicé una muestra de 16 hembras y 16 machos y seleccioné aleatoriamente dos escamas iridiscentes de cada pez. Los resultados que obtuve indican que los machos y las hembras no difieren en la reflectancia máxima y el brillo de las escamas iridiscentes, aunque los machos mostraron mucha más variación en las dos mediciones que la mostrada por las hembras. La longitud de onda de la reflectancia máxima

($\lambda_{máx}$) alcanzada y el brillo capturados a 90 grados difirieron de los otros ángulos. Así mismo, el pico máximo de reflectancia se sintonizó a diferentes longitudes de onda al variar el ángulo de incidencia de la luz, lo cual coincide con la definición de iridiscencia. Además, encontré que $\lambda_{máx}$ se sintoniza entre 300 y 400 nm cuando la luz incide sobre las escamas a 25°, 35° y 45°, lo cual sugiere la existencia de un sistema de señales basado en el uso de luz ultravioleta (UV). También encontré que $\lambda_{máx}$ crece con el ángulo de incidencia de la luz, como se espera que ocurra cuando las nanoestructuras funcionan como reflectores multicapa. Finalmente, analicé las escamas brillantes de *X. variata* bajo el microscopio confocal, con lo cual logré determinar el tipo de escama que presentan. También encontré que las escamas brillantes muestran autofluorescencia bajo diferentes longitudes de onda (408, 488 y 561 nm). Sin embargo, no realicé el análisis bajo el microscopio electrónico lo que me ha impedido determinar el tipo de nanoestructura responsable del color iridiscente de estas escamas. No obstante, con base en el análisis de los espectros de reflectancia obtenidos puedo anticipar que la nanoestructura es un reflector multicapa, y no otro tipo.

Índice

1. INTRODUCCIÓN 1
   1.1. El color 1
   1.2. Mecanismos que producen color estructural 2
      a) Capas finas 2
      b) Reflector multicapa 4
      c) Rejillas de difracción 5
      d) Arreglos multidimensionales 6
      e) Dispersión difusa 7
   1.3. Integumento en peces 9
   1.4. Células que producen color 12
   1.5. Iridiscencia 14
      1.5.1. Iridiscencia en Xenotoca variata 15
2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 16
3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES 16
4. OBJETIVOS 17
   4.1. Objetivos generales 17
   4.2. Objetivos particulares 18
5. MATERIAL Y MÉTODO 18
   5.1. Peces de estudio 18
   5.2. Diseño experimental 18
   5.3. Procedimiento experimental 20
      5.3.1. Medición de la reflectancia 20
      a) Anestesia 20
      b) Arreglo experimental para la medición de la reflectancia 22
      c) Series experimentales 23
      5.3.2. Microscopía 25
   5.4. Análisis estadístico 26

6. RESULTADOS 27

6.1. Medición de la reflectancia 27

6.1.1. Análisis de la reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes 31

6.1.2. Análisis de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes alcanzan su reflectancia máxima 33

6.1.3. Análisis del brillo de las escamas brillantes 37

6.2. Microscopía 40

7. DISCUSIÓN 43

7.1. Medición de la reflectancia 44

7.2. Microscopía 53

8. CONCLUSIÓN 57

9. BIBLIOGRAFÍA 58

10. APÉNDICE 62

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El color

En la naturaleza existen patrones complejos de color cuya función en los animales que los poseen es comunicar un mensaje a conespecíficos (i.e. animales de la misma especie) y/o a los individuos de otras especies. Los colores exhibidos por tales animales pueden ser de tres tipos: pigmentarios, fluorescentes y estructurales.

Los colores pigmentarios se originan porque hay compuestos químicos cuyas moléculas ocasionan una absorción y reflexión selectiva de las longitudes de onda de la porción visible de la radiación electromagnética (Bradbury y Vehrencamp, 2011). La fluorescencia ocurre cuando una substancia absorbe selectivamente radiación electromagnética de energía elevada y longitud de onda corta (e.g., luz UV, invisible al ojo humano), y emite radiación electromagnética de energía baja y longitud de onda larga. Este tipo de radiación electromagnética puede percibirse en el espectro visible como luz brillante. La diferencia de energía resultante entre la radiación excitadora y la emitida es disipada en forma de calor (Arnold *et al*., 2002).

La coloración estructural ocurre por la reflexión selectiva de longitudes de onda del espectro visible de la radiación electromagnética. Este fenómeno es producido por estructuras biológicas cuyo tamaño se ubica en el orden de los nanómetros localizadas en el integumento –la cobertura más externa del epitelio de los animales. Dichas estructuras están conformadas por láminas de materiales con una estructura cristalina, intercaladas con citoplasma, material extracelular o aire, lo cual genera arreglos con diferentes índices de refracción (i.e. el grado de deflexión que un medio produce a un rayo de luz que ingresa en

él; Osorio y Ham, 2002). El color se percibe cuando un haz de luz incide en un ángulo para el cual el arreglo de la nanoestructura produce una reflectancia óptima determinada por sus propiedades físicas, y al ser reflejada la luz se sintoniza en una longitud de onda particular. La variación en el ángulo de incidencia de la luz o del ángulo de observación produce un cambio en el color que se percibe, ya sea como reflejo especular –fenómeno producido cundo el ángulo de la luz incidente es igual al reflejado–o iridiscencia (Parker, 1998). En ambos casos se puede identificar el matiz y brillo, cualidades del color que se refieren a la variación del tono y a la cantidad de luz emitida y reflejada, respectivamente (Bradbury y Vehrencamp, 2011).

1.2. Mecanismos que producen color estructural

Las diferentes configuraciones espaciales de las nanoestructuras que generan coloración estructural han sido descritas usando técnicas de microscopía electrónica. A continuación describo los distintos tipos de arreglos espaciales identificados hasta el momento.

a) Capas finas

Este tipo de arreglo, posiblemente el más sencillo, se refiere a una estructura iridiscente que consiste en una lámina delgada de material transparente, con un índice de refracción diferente al del substrato subyacente (Kinoshita y Yoshioka, 2005; Prum, 2006). Cuando un haz de luz es proyectado a un medio con un índice de refracción mayor, el movimiento de la luz es ralentizado, sus ondas se vuelven más pequeñas en su longitud y la distancia recorrida a lo largo de la lámina crece. La luz se refleja y regresa al mismo ritmo lento al tocar el borde inferior de la lámina. Cuando la luz finalmente se reincorpora con la luz reflejada en la superficie,

estará fuera de fase (**Figura 1**). El grado de desfase dependerá del grosor de la lámina y el ángulo de la luz al chocar contra la superficie (Simon, 1971).

Si la diferencia de fases entre los haces reflejados alcanza una longitud de onda completa o un múltiplo de una longitud de onda en particular, ésta será reforzada y el color será más puro. El refuerzo será mayor si las ondas tienen la misma amplitud mientras que las longitudes de onda restantes quedarán eliminadas. Esto resultará en la sintonización de un solo color. Pero, si la diferencia de fases entre los haces reflejados de este color en particular es uno o la mitad de esta longitud de onda, se neutralizarán y serán invisibles. Como resultado, las ondas se sintonizarán en otro color. Cabe destacar que este hecho ocurre solo para colores compuestos, es decir aquellos que no sean monocromáticos (Kinoshita y Yoshioka, 2005; Prum, 2006; Kinoshita *et al*., 2008; Simon, 1971).

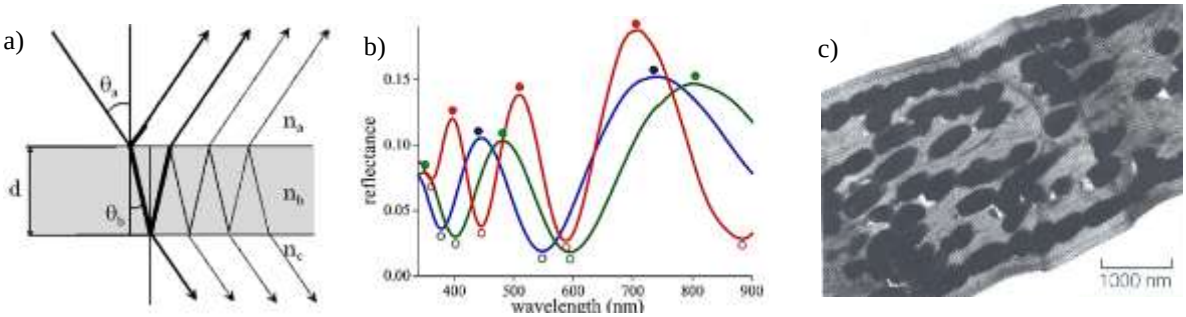

Figura 1. a) Configuración de interferencia de capas finas. En la figura se muestran el ángulo con el que la luz incide en la superficie θ_a; el ángulo resultante de la refracción θ_b el grosor de la lámina d y los diferentes índices de refracción que intervienen en la descomposición de la luz: η_a, η_b y η_c. Esquema tomado de Kinoshita y Yoshioka (2005). b) Espectro de reflectancia producido por un arreglo de capa fina en tres puntos diferentes (indicado con los colores) de un ala iridiscente de mosquito. Imagen tomada de Stavenga (2014). c) Micrografía de una pluma del ave *Sturnus vulgaris*, donde se puede observar la estructura de capa fina. Figura tomada de Bradbury y Vehrencamp (2011).

b) Reflector multicapa

Este mecanismo resulta de la formación de pilas de láminas intercaladas entre sí con materiales de diferentes índices de refracción. El espesor de las láminas y la separación entre ellas debe ser uniforme para que se produzca una dispersión coherente y como consecuencia se aprecie iridiscente (**Figura 2**). Para producir colores dorados, el grosor de las láminas debe disminuir cuanto más profundas en la pila estén. En cambio, para generar una reflectancia plateada, lo cual ocurre en muchos peces, se ha reportado que el arreglo debe consistir en varias series de pilas regulares. Cada serie estará sintonizada a una frecuencia diferente, logrando un espectro amplio que resulta en la producción de una reflectividad elevada en todos los ángulos de observación (Simon, 1971; Kinoshita y Yoshioka, 2005).

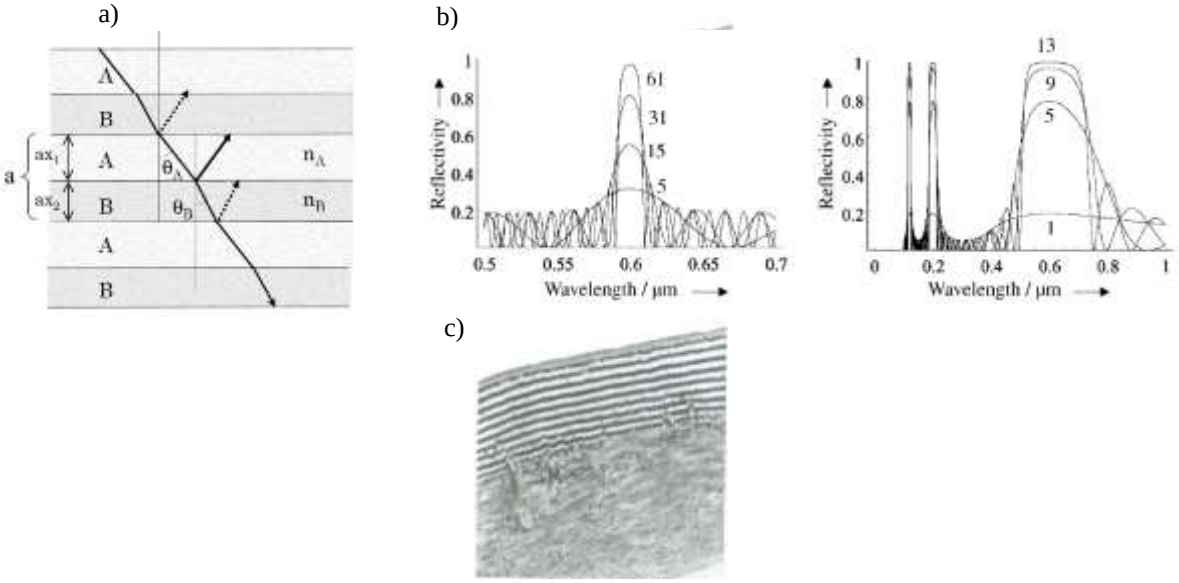

Figura 2. a) Configuración de reflectores multicapa. Este arreglo consiste de una pila de láminas A y B con grosor ax_1 y ax_2 e índice de refracción η_A y η_B, del espacio incidente y transmisor, respectivamente. θ_a y θ_b son los ángulos de refracción. b) Espectro de reflectancia resultante de un arreglo multicapa con una diferencia pequeña entre ellos (a la izquierda) y una diferencia grande entre los índices de refracción grande (derecha). Figuras tomadas de Kinoshita y Yoshioka (2005). c) Micrografía del integumento del escarabajo *Chrysochroa fulgidissima*, donde se muestra una nanoestructura reflector multicapa. Imagen tomada de Kinoshita y Yoshioka (2005).

Los reflectores multicapa varían en el número de láminas, las cuales suelen tener un espesor óptico–el grosor de cada lámina multiplicado por su índice de refracción–de un cuarto de longitud de onda. En su espectro de reflectancia se apreciarán picos de magnitud menor que los que aparecen en el arreglo de capas finas (Parker, 2000; Prum, 2006; Bradbury y Vehrencamp, 2011). En los peces se ha encontrado que dichas pilas están formadas de láminas de guanina y citoplasma con índices de refacción de Ƞ=1.83 y Ƞ=1.33 respectivamente (Schartl *et al*., 2016).

c) Rejillas de difracción

Este es un arreglo periódico de hendiduras o surcos que refracta y divide la luz en varios haces que viajan en diferentes direcciones. Así, la luz se dispersa formando un espectro de varios colores. La característica física fundamental de una rejilla de difracción es la modulación espacial del índice de refracción. La interferencia constructiva–superposición de dos o más ondas de frecuencias iguales que al interferir superponen sus crestas y generan un nuevo patrón donde sus efectos sumados originan una onda de mayor amplitud–ocasiona un espectro de primer y segundo orden, cuando las longitudes de onda dispersas en las superficies de las crestas y los surcos se encuentran en fase (**Figura 3**). El color reflejado depende de la distancia entre las crestas, cuando ésta sea igual a una longitud de onda particular o algún múltiplo integral de la misma la luz de las ranuras adyacentes estará en fase produciendo una interferencia constructiva. En todos los otros ángulos las ondas que se originan del surco interferirán de manera destructiva. En el espectro de reflectancia se observan picos de magnitud más pequeña que los generados por el arreglo de capas finas (Parker, 2000; Lowen, 2005; Prum, 2006; Bradbury y Vehrencamp, 2011).

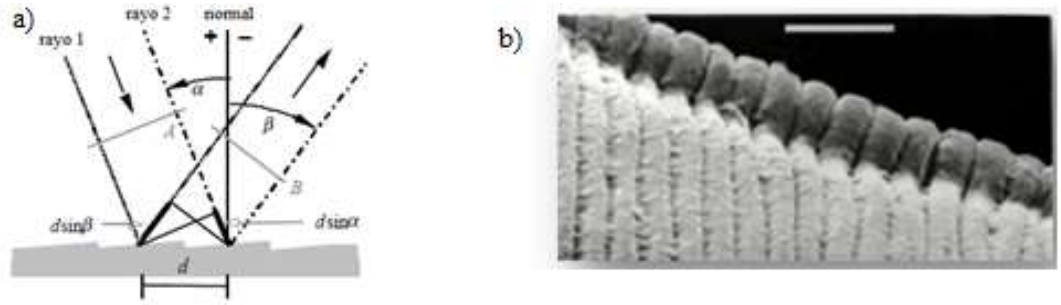

Figura 3. a) Representación de la reflexión por rejillas de difracción. En el esquema se muestran rayos de luz incidentes a una ranura de separación determinada (d) y los ángulos de incidencia y dispersión. Figura tomada de Lowen (2005). b) Micrografia de una antena del crustáceo *Azygocypiridina lowryi* donde se muestra la nanoestrcutura típica de las rejillas de difracción. Figura tomada de Parker (1996).

d) Arreglos multidimensionales

Este tipo de arreglo genera una dispersión coherente de la luz en varias direcciones. Lo consigue con base en matrices de dos o tres dimensiones con niveles o planos equidistantes formando estructuras tipo esponja o un espacio de rejilla. Generalmente no producen colores iridiscentes, aunque si especulares o difusos (Bradbury y Vehrencamp, 2011). La variación en el ángulo de luz incidente o en la distancia entre los planos puede producir cambios en el color apreciado. Esto sucede cuando la luz choca con este tipo de estructuras y una porción es reflejada por la superficie y otra es refractada a través de las capas subyacentes donde es refractada y reflejada nuevamente, siguiendo este comportamiento una y otra vez. Cuantos más niveles haya, más pura y monocromática será la luz reflejada por la estructura. Así, el factor más importante en la producción del color mediante este mecanismo es el mantenimiento de distancias iguales entre los niveles, más que la posición de las partículas que la formen (Simon, 1971). Se ha observado que las plumas de algunas aves presentan arreglos unidimensionales o bidimensionales de pilas de laminillas de melanina o varillas de queratina, sólidas o rellenas de aire. Éstas

pueden aumentar la reflectancia total por capa produciendo dispersión coherente, lo que resulta en una iridiscencia muy brillante (Prum, 2006). En la naturaleza este arreglo genera a menudo despliegues de destellos de luz. Generalmente el ángulo al que se puede apreciar el color es muy estrecho (menos de 40°). En el caso de los arreglos bidimensionales el color se puede percibir en un rango de ángulos más amplio los cuales generalmente producen iridiscencia metálica como la encontrada en la cola de los pavorreales (**Figura 4**) (Parker, 2000; Bradbury y Vehrencamp, 2011).

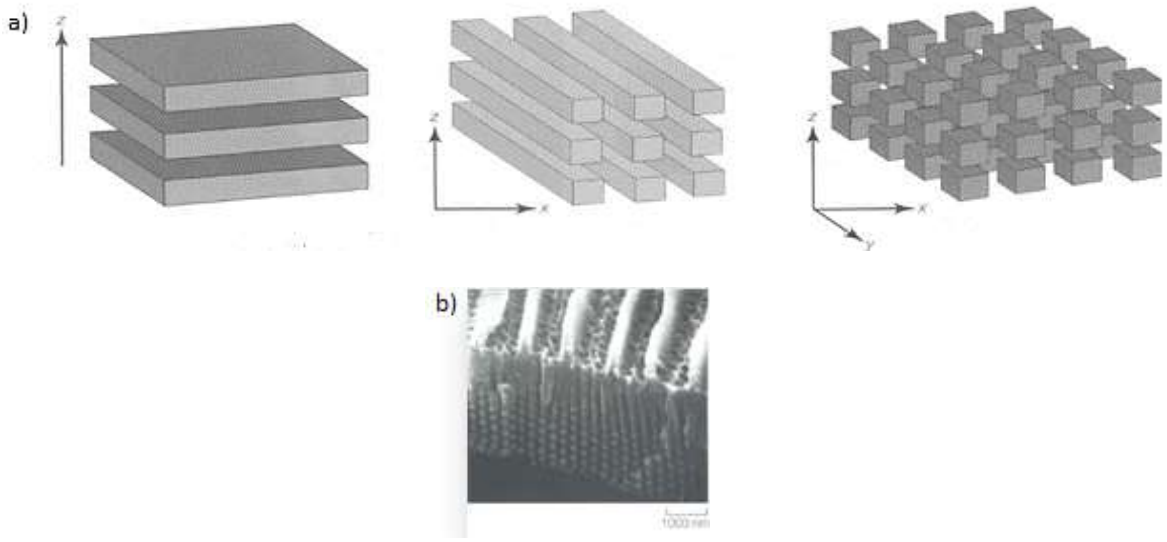

Figura 4. a) Esquema que muestra los arreglos uni, bi y tridimensional que pueden producir coloración estructural. Las flechas indican la dirección del vector con variación periódica. Esquema tomado de Bradbury y Vehrencamp (2011). b) Micrografía que muestra la nanoestructura tridimensional encontrada en las escamas de las alas de la mariposa *Teinopalpus imperialis*. Imagen tomada de Bradbury y Vehrencamp (2011).

e) Dispersión difusa

Ésta se logra con cualquier arreglo desorganizado de material coloidal disperso en forma de laminillas con diferentes índices de refracción. También es posible que la dispersión ocurra con capas desordenadas de material incoloro relativamente gruesas, lo que producirá una coloración brillante blanca. En un sistema coloidal,

las partículas son más grandes que la longitud de onda de la luz, y entonces pueden ser consideradas como espejos orientados en todas las direcciones (**Figura 5**) (Parker, 2000; Bradbury y Vehrencamp, 2011).

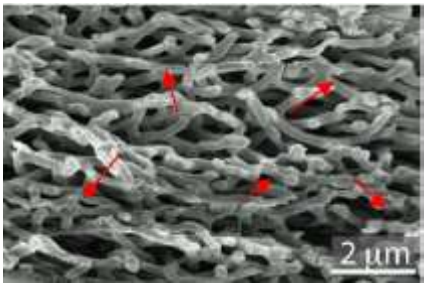

Figura 5. Micrografía del exoesqueleto del escarabajo *Lepidiota stigma* donde se muestra una nanoestructura sin un orden aparente. Las flechas rojas indican la dispersión de la luz en direcciones múltiples. Imagen tomada y modificada de Burresi *et al*., 2014.

Las características de los espectros de reflectancia pueden sugerir el tipo de la nanoestructura que los origina. Las estructuras laminares generalmente producen coloración direccional (i.e. espectros con picos de reflectancia estrechos), mientras que las estructuras tipo esponja producen coloración difusa originando espectros con picos de reflectancia amplios (Osorio y Ham, 2002; Prum, 2006). Cuando la luz incide sobre las nanoestructuras el color que originan puede ser producido por 1) dispersión de la luz por partículas con alto índice de reflectancia, 2) reflexión de la luz por una superficie delgada que actúa como una rejilla de difracción e, 3) interferencia ocasionada por estructuras hechas de materiales de alto y bajo índice de refracción (Land, 1972). En el caso de la iridiscencia se espera que sea producida por interferencia ya que su sintonización espectral es dependiente de la manera en la que la luz es reflejada después de atravesar el espacio de las estructuras laminares, lo cual varía con el ángulo de incidencia de la luz (Land, 1972; Osorio y Ham, 2002).

1.3. Integumento en peces

El integumento o el sistema tegumentario es la capa más externa de los animales, incluye la piel y todas las estructuras derivadas o asociadas a ella como el pelo, las setas, plumas, escamas o los cuernos. En la mayoría de los animales es flexible y resistente, y entre sus funciones se encuentran la protección mecánica contra las abrasiones y la protección bacteriana. En los vertebrados el integumento está compuesto de la epidermis, derivada del ectodermo, y subyacente a ésta, se encuentra la dermis que es de origen mesodérmico (Hickman *et al*., 2001). En los peces el integumento recubre a todo el pez incluyendo las aletas, provee comunicación con el ambiente y debido a todos los procesos que se llevan a cabo en el sistema integumentario, ayuda a mantener la homeostasis de los peces. El integumento además proporciona protección mecánica y contra agentes externos, y posee una gran capacidad de regeneración y cicatrización (Noguera *et al*., 2015).

La primera barrera de protección que poseen los peces teleósteos y primera porción del integumento es la capa cutánea o cutícula, de aproximadamente 1 µm de espesor. La cutícula está constituida por mucopolisacáridos y es secretada por células mucosas y algunas células protoplasmáticas. Subyacente a la cutícula se encuentra la epidermis, ésta varía su grosor entre especies, y en la misma cambia en función de factores como la edad, el sexo, la maduración y época del año. Se compone de dos capas: una externa formada principalmente por células de Malpighi, y otra basal. La capa basal se denomina generatriz ya que produce células epiteliales que reemplazan a las de la capa superficial. Además, en la epidermis pueden encontrase células mucosas, quimio-sensoriales y macrófagos. Por debajo de la epidermis hay una capa basal acelular que la separa de la dermis (**Figura 6;** Sierra *et al.,* 2011; Noguera *et al*., 2015).

La dermis está compuesta por dos capas: i) *stratum espongiosum*, formada por fibras de colágeno y reticulares. Contiene células pigmentarias, leucocitos polimorfonucleares basófilos, células cebadas y escamas y, ii) *stratum compactum*, de menor tamaño que la capa suprayacente. Está formado por fibras que generan una matriz colágena que dan un soporte firme y flexible al integumento (**Figura 6;** Sierra *et al.*, 2011).

Las escamas son estructuras óseas dérmicas flexibles, calcificadas, que se encuentran orientadas hacia la parte posterior del cuerpo y que pueden actuar como una fuente de calcio. Algunos peces carecen de escamas y otros pueden solo presentarlas modificadas (Hickman *et al*., 2001; Noguera *et al*., 2015). Las escamas de los peces teleósteos pueden presentar dos formas: i) cicloides, con el margen posterior liso, de gran espesor, y con forma elíptica o de rombo. Tienen una cubierta de esmalte brillante y suelen presentarlas los peces más primitivos, ii) cicloideas, escamas delgadas con forma

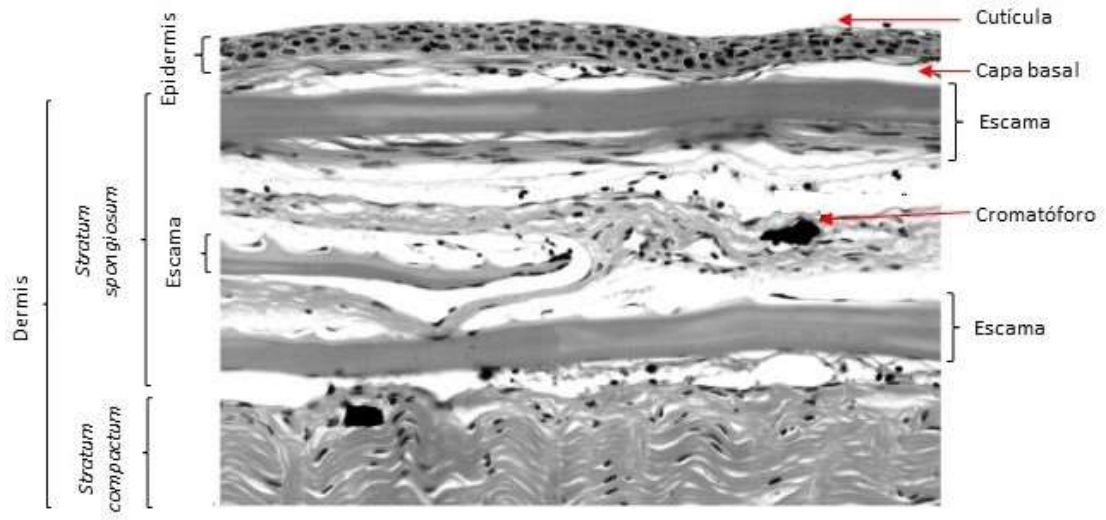

Figura 6. Micrografía del integumento de un pez teleósteo donde se muestran las diferentes partes que componen al integumento. Con flechas rojas se muestran la cutícula, la capa basal y un cromatóforo. Además, se señalan escamas y diferentes partes del *stratum spongiosum* donde pueden encontrarse. Imagen tomada y modificada de Noguera *et al*. (2015).

elíptica que presentan el margen posterior con proyecciones en forma de espina o peine; suelen encontrarse en peces menos primitivos (**Figura 7**; Hickman *et al*., 2001; Sierra *et al.*, 2011; Noguera *et al*., 2015).

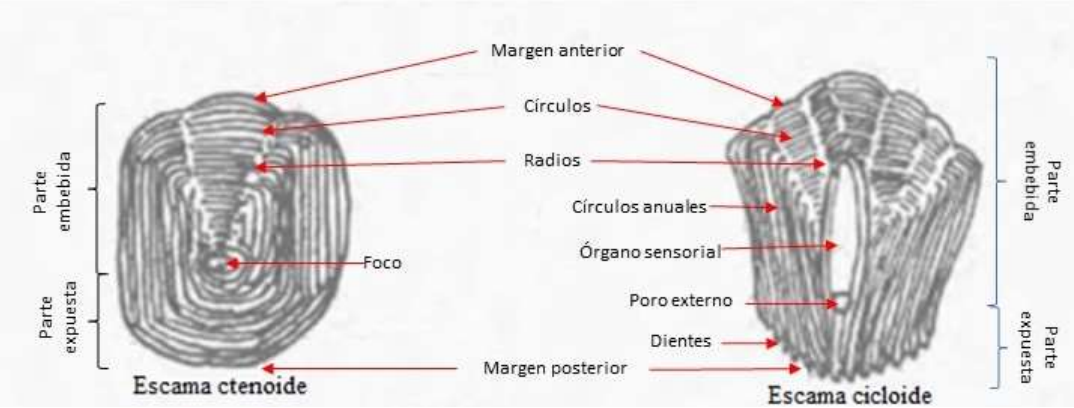

Figura 7. Tipos de escamas en peces. La imagen muestra los tipos de escama que los peces teleósteos pueden presentar: ctenoide (izquierda) y cicloideas (derecha). Con flechas rojas se señalan sus partes y con llaves las partes que se encuentran embebidas en la dermis y expuestas. Imagen tomada y modificada de Pandey y Mathur (2018).

Además de las escamas, los cromatóforos son otros de los componentes importantes en el sistema integumentario. Los cromatóforos y en algunos casos, su cambio como respuesta a estímulos ambientales o internos, son responsables del patrón de coloración de los peces (Noguera *et al*., 2015). El color integumentario puede ser producido por pigmentos o por la modulación de la reflexión y absorción de la luz (i.e. coloración estrcuctural; Hickman *et al*., 2001). Con base en esta clasificación se pueden encontrar diferentes tipos de células en la dermis de los peces que generan los patrones de color: i) células pigmentarias como los melanóforos, xantóforos, eritróforos y cianóforos; ii) células que reflejan luz como los irodóforos y leucóforos y iii) células dicromáticas, que son los eritro-iridóforos y los eritro-cianóforos (Schartl *et al.* 2016). Esta clasificación se explica a detalle a continuación.

1.4. Células que producen color

De acuerdo a Schartl *et al.* (2016) una célula pigmentaria es aquella que genera organelos unidos a la membrana, los cuales producen color por medio de sustancias o estructuras. Una célula pigmentaria primaria es aquella que sintetiza pigmentos (e.g. melanina) o ensambla estructuras (e.g. cristales de guanina), mientras que, una célula pigmentaria secundaria es la que adquiere pigmentos por transferencia de organelos pigmentarios desde otra célula (e.g. queratinocitos).

A raíz de las discusiones sobre la falta de definiciones y caracterizaciones claras de las células pigmentarias surgidas en la 7ª reunión de la Sociedad Europea de Investigación de Células Pigmentarias en Ginebra en 2012, Schartl *et al.* (2016) propusieron usar la siguiente clasificación:

Melanocitos. Son el tipo de célula pigmentaria más común en la naturaleza. Se caracterizan por la presencia de eumelanina negra o feomelanina amarillenta. Pueden clasificarse con base en su capacidad de transferir o no transferir melanina. Así, los melanocitos que transfieren melanina pueden encontrarse en la piel de las aves y los mamíferos. Estos grupos de animales secretan melanocitos, los cuales son tomados por queratinocitos vecinos que generan el color. Los melanocitos que no secretan melanina se encuentran en la dermis y en partes no cutáneas de los mamíferos, las aves, los reptiles, anfibios y peces. Existe un tipo especial de transferencia de melanina en los vertebrados inferiores que es parte de una respuesta adaptativa a la luz del sol. Sucede cuando los melanosomas son dirigidos hacia la periferia del melanocito o cuando son concentrados perinuclearmente, lo que permite una absorción de la luz más extensa o reducida (**Tabla 1**).

Células pigmentarias sin melanina. Este tipo de células son encontradas comúnmente en animales poiquilotermos. Se clasifican en células que reflejan la luz y en las que la absorben. En la primera categoría se encuentran los iridóforos (iridiscentes o blancos) y los leucóforos (láminas reflectantes o leucosomas). Los iridóforos contienen láminas reflectantes de cristales de purinas y se aprecian iridiscentes cuando las láminas forman arreglos organizados o blancos cuando presentan un arreglo desorganizado. Los leucóforos contienen ácido úrico empaquetado en organelos redondos y pequeños denominados leucosomas. Respecto a la segunda categoría, las células pigmentarias sin melanina que absorben la luz son del tipo de los xantóforos, eritróforos (amarillos y rojos respectivamente, debido a pterinosomas y/o carotenoides contenidos en vesículas) y cianóforos (azul intenso, debido a cianosomas que contienen un pigmento azul desconocido). Este tipo de células se encuentran en zonas cutáneas y no cutáneas y están involucradas en cambios de color, debido al movimiento de los organelos en el citoesqueleto a lo largo del citoplasma (**Tabla 1**).

Células pigmentarias policromáticas. En esta categoría se encuentran aquellas células de algunas especies de peces (*Pseudochromis diadema* y *Synchiropus splendidus*) que no encajan en la clasificación anterior. Son: i) eritro-iridóforos que contienen láminas reflectoras de la luz y carotenoides, y ii) eritro-cianóforos, cromatóforos policrómaticos que absorben la luz y que contienen cianosomas, pterinosomas y carotenoides (**Tabla 1**)

Tabla 1. Clasificación y características de las células pigmentarias. Tabla tomada y modificada de Schartl *et al*., 2015.

Célula pigmentaria	Precursor	Pigmento	Organelo contenedor de pigmento	Distribución en la naturaleza
Absorbe luz				
Melanocito	Melanoblasto	Eumelanina, Feomelanina	Melanosoma	Todos los vertebrados
Xantóforo	Xantoblasto	Pteridinas, carotenoides	Pterinosoma, gránulos de carotenoide	Aves, reptiles, anfibios, peces
Eritróforo	Eritoblasto	Pteridinas, carotenoides	Pterinosoma, gránulos de carotenoide	Reptiles, anfibios, peces
Cianóforo	Cianoblasto	Desconocido	Cianosoma	Peces
Refleja luz				
Iridóforo	Iridoblasto	Cristales de purinas o pteridinas	Láminas reflectantes	Aves, reptiles, anfibios, peces
Leucóforo	Leucoblasto	Cristales de purinas o pteridinas	Leucosoma (Pterinosoma, otros)	Aves?, reptiles, anfibios, peces
Dicromática				
Eritro-iridóforo	Eritro-iridoblasto	Cristales de purinas o carotenoides?	Láminas reflectantes (otros?)	Peces
Eritro-cianóforo	Eritro-cianoblasto	Pteridinas, carotenoides, desconocido	Pterinosomas, gránulos de carotenoides, cianosomas	Peces

1.5. Iridiscencia

De acuerdo a Prum (2006) la iridiscencia es un subconjunto de colores estructurales producidos por la organización estratificada o cristalina de estructuras ópticas de tamaño pequeño (nanómetros). Dicha organización hace que las longitudes de onda de la luz que interfieren constructivamente varíen con la geometría de la visualización. Es decir, está

determinada por la relación espacial entre la luz incidente, el espectador y el objeto iridiscente. Por eso, los aspectos de la coloración percibida, incluido el tono y el brillo, son modificables.

Muchos animales poseen colores iridiscentes que muestran comúnmente con más intensidad durante las interacciones sociales (e.g. cortejo). El reporte más antiguo que se tiene de la presencia de este tipo de coloración data del Eoceno. Vinther *et al.* (2010) documentaron el hallazgo de fósiles de plumas que aparentemente presentaban una nanoestructura con un arreglo de capas finas de queratina. En la actualidad la presencia de iridiscencia se puede encontrar en diferentes animales como las aves, los insectos, cefalópodos y peces (Meadows *et al.,* 2009). La exhibición de iridiscencia en los animales tiene diferentes funciones que varían de especie a especie. Sin embargo, su función principal parece estar asociada con despliegues de cortejo (Keyser y Hill, 2000).

1.5.1. Iridiscencia en *Xenotoca variata*

Xenotoca variata (Bean, 1887) es un ejemplo de una especie animal que posee colores estructurales, y que posiblemente sean iridiscentes. *X. variata* es una especie de pez dulceacuícola perteneciente a la subfamilia Goodeinae, nativa de México y endémica de la meseta central. Las hembras son de color marrón grisáceo, ligeramente más oscuro en la parte posterior del cuerpo y manchas obscuras distribuidas en una banda medio lateral a los lados; las manchas difieren en forma, tamaño y número. Los machos se distinguen por tener un número mayor de escamas brillantes que las hembras. Estas últimas tabién presentan escamas brillantes, aunque en cantidad menor que los machos y aparentemente poca

variación en color. Estas escamas reflejan colores que parecen variar del plata, al verde y violeta (Fitzsimons, 1972).

Se ha reportado que las escamas iridiscentes en *X. variata* podrían tener para los machos una función en el cortejo, pues parece que las ocupan como reflectores durante los movimientos elaborados que hacen para llamar la atención de la hembra y conseguir cópulas (Moyaho, 2002; Moyaho *et al*., 2004), o bien para amedrentar a machos rivales (Bautista, 2016). También se sabe que el brillo es la característica colorimétrica de las escamas brillantes que atrae la atención de las hembras (Juárez, 2015).

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Aun cuando se ha reportado que las escamas iridiscentes son utilizadas por los machos de *X. variata* para cortejar, y que las hembras prefieren a los machos más brillantes, entender la morfología física de las escamas iridiscentes de *X. variata* es esencial para un análisis completo de su función. Las siguientes son preguntas cuyas respuestas ayudarían a conseguir este objetivo.

¿Las escamas brillantes en el pez *Xenotoca variata* son iridiscentes?

¿Cuál es el ángulo óptimo de la luz incidente para alcanzar la reflectancia máxima de las escamas iridiscentes de *Xenotoca variata*?

¿Cuál es la composición estructural probable que produce iridiscencia en las escamas de los machos de *Xenotoca variata*?

3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Como describí anteriormente, se han encontrado diferentes conformaciones espaciales de materiales alternados cuya variedad de formas y arreglos podría incluir y explicar la

presencia del color estructural iridiscente en los machos de *X. variata*. Con la obtención de espectros de reflectancia se puede corroborar la existencia de picos de reflectancia únicos o múltiples que pueden asociarse al tipo de arreglo de la estructura que los produce. Con base en la información que presento arriba y lo que se puede inferir a partir de la apariencia visual de las escamas brillantes, propongo poner a prueba experimental las siguientes hipótesis:

HIPÓTESIS 1. Coloración direccional. Este tipo de coloración es producida por estructuras laminares.

Si esta hipótesis fuese correcta, se esperaría observar:

1. Un espectro estrecho de reflectancia con un solo pico;
2. Un espectro de reflectancia estrecho con múltiples picos.

HIPÓTESIS 2. Coloración difusa. Este tipo de coloración es producido por estructuras tipo esponja.

De ser cierta esta hipótesis, se esperaría obtener:

1. Un espectro de reflectancia amplio con un solo pico;
2. Un espectro de reflectancia amplio con un pico máximo y uno o más picos cortos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

1. Determinar el ángulo al cual las escamas iridiscentes producen una reflectancia máxima;
2. Describir algunos aspectos de la morfología de las estructuras que producen la coloración estructural y el efecto de iridiscencia de las escamas de *Xenotoca variata*.

4.2. Objetivos particulares

1. Obtener muestras viables de las escamas iridiscentes de *X. variata* para medir su reflectancia;
2. Variar el ángulo de luz incidente sobre las muestras de las escamas iridiscentes y realizar mediciones de su espectro de reflectancia;
3. Realizar observaciones de las escamas iridiscentes de *X. variata* bajo el microscopio estereoscópico y óptico;
4. Obtener micrografías de las escamas iridiscentes de *X. variata* por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Peces de estudio

Para medir la reflectancia de las escamas brillantes usé 32 peces adultos, 16 hembras y 16 machos, elegidos aleatoriamente de una población establecida en el Instituto de Fisiología. Los peces provinieron de una población originaria de la laguna de Yuriria, Guanajuato. Los peces fueron mantenidos en el laboratorio de Ecología de la Conducta en peceras de 51 x 26 x 30 cm. Los peces fueron alimentados con alimento comercial dos veces al día. Las peceras con los peces se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 horas (las luces del acuario se encienden a las 7 horas) y una temperatura ambiental promedio de 21 °C aproximadamente.

5.2. Diseño experimental

Para los experimentos utilicé un diseño de efectos anidados con 4 bloques. Los tratamientos (i.e. variación de la geometría de la luz a 5 ángulos diferentes) están anidados en cada una

de dos escamas. Cada par de escamas a su vez proviene de cada uno de los 32 peces. Éstos a su vez están divididos en 16 machos y 16 hembras anidados en el factor sexo. Elegí aleatoriamente 8 peces (4 machos y 4 hembras) cada semana (bloque).

Elegí aleatoriamente a las dos escamas brillantes de las partes laterales de cada pez. Cada escama fue sometida a un tratamiento que consistió en variar el ángulo de la luz incidente 10 grados a la vez (i.e. 25°, 35°, 45°, 55°) más un ángulo que sirvió como control (90°). La variación del ángulo se realizó con respecto a la horizontal. El orden de la variación de los ángulos fue establecido aleatoriamente y cada medición se repitió 3 veces. Solo se aplicó un tratamiento por día a todos los peces de cada bloque, lo que tomaba cinco días. El orden en el que los peces fueron sometidos a tratamiento dentro de cada bloque fue aleatorio (**Tabla 2**).

Tabla 2. Diseño experimental para medir la reflectancia de las escamas iridiscentes.

Género	Pez	Escama	Ángulo de incidencia	Repeticiones
Machos	1	1	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
		2	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
	…			
	16	1	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
		2	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
Hembras	1	1	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
		2	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
	…			
	16	1	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3
		2	25°, 35, 45°, 55°, 90°	1,2,3

5.3. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental se dividió en dos partes: 1. La medición de la reflectancia de las escamas iridiscentes; 2. Las observaciones de las escamas iridiscentes bajo el microscopio.

5.3.1. Medición de la reflectancia

a) Anestesia

Con base en la literatura acerca de los procedimientos de anestesia para peces de agua dulce (Keene *et al*., 1998; Sladky *et al.,* 2001; Jayathilake *et al*., 2003; Cooke *et al*., 2004; Vázquez *et al*., 2013) decidí usar anestesia por inmersión en agua con aceite esencial de clavo, ya que según los reportes proporciona a los peces una recuperación rápida y no tiene efectos secundarios. Puse a prueba el efecto de varias dosis en machos y hembras con la finalidad de hallar una dosis óptima para cada sexo, pues el efecto podría depender del tamaño y peso corporal de los peces. Elegí de manera arbitraria 3 hembras y 3 machos, aunque el orden en el que serían sometidos a la anestesia se eligió de manera aleatoria. Preparé por día una solución *stock* 2:1 de etanol: aceite esencial de clavo (1 ml de etanol al 99%:500 μl de aceite esencial de clavo). Posteriormente calculé concentraciones por litro recomendadas para peces pequeños y ajusté las dosis para 300 ml.

Primero usé aceite de clavo disponible en el laboratorio. Las concentraciones que usé para las hembras fueron 30, 40 y 50 μL/L. Ninguna hembra alcanzó la fase 5 de la anestesia en una escala de 0 a 6 **(Tabla 3)** sugerida por Cooke *et al*. (2004). Posteriormente probé concentraciones de 60, 70 y 80 μL/L; nuevamente ninguna de las hembras alcanzó el estado de anestesia deseado. Finalmente utilicé las concentraciones 200, 210 y 220 μL/L y

tampoco alguna hembra llegó a tener pérdida de reflejos, por lo que decidí usar aceite esencial de clavo. Las mismas hembras usadas en el experimento previo fueron sometidas a concentraciones de 90, 100, 110 y 120 μL/L. Esta vez las tres hembras alcanzaron la fase 5 de anestesia en cinco minutos y luego tuvieron una recuperación completa (nado normal, cierre y apertura de opérculos). Decidí utilizar la concentración mínima con la cual las hembras alcanzaban el estado de sedación deseado: 90 μL/L. Cuando probé el efecto de las mismas dosis con los tres machos, éstos presentaron una actividad motriz mayor, menor tiempo de recuperación y no alcanzaron pérdida de reflejos por lo que probé concentraciones mayores: 140, 150 y 160 μL/. Con las últimas dos concentraciones los machos alcanzaron la fase 5 de anestesia en cinco minutos, por lo tanto, decidí que la concentración que se utilizaría para anestesiarlos sería de 150 μL/L. Aun así, ponía anestesia en la tina anodizada donde colocaba a los peces para la medición de la reflectancia como describo más adelante. Esto con la finalidad de mantener la inmovilidad de los peces durante los tratamientos.

El procedimiento de anestesia consistió primero en tomar a cada pez su ritmo opercular (i.e. apertura y cierre de opérculo por minuto), medida que sirve como una indicación del estado basal de alerta en condiciones de agua “normal”. Después, cada pez era puesto en un vaso de precipitado con 300 ml de agua de garrafón y la dosis de anestesia diluida a probar. Luego medía el tiempo que el pez pasaba por las diferentes fases de anestesia hasta alcanzar la fase 5 (**Tabla 3**). Finalmente pasaba a cada pez a una pecera de recuperación (solo contenía agua purificada y un difusor) y volvía a medirle el ritmo opercular al inicio y término del periodo de recuperación. Cada pez tuvo un seguimiento continuo para descartar efectos secundarios que pudieran surgir en días posteriores a la aplicación de la anestesia;

ningún pez resultó muerto o con algún tipo de daño físico o fisiológico aparente (i.e. no presentaron heridas ni síntomas de enfermedad).

Tabla 3. Estados de inducción de anestesia. Tabla tomada y modificada de Cooke *et al*., 2004.

Fase	Estado de anestesia	Descripción
0	Normal	Reactivo a estímulos externos; ritmo opercular y tono muscular normales.
1	Sedación ligera	Ligera pérdida de la respuesta a estímulos; ligera disminución del ritmo opercular; equilibrio normal.
2	Sedación profunda	Pérdida total de reactividad a estímulos externos; ligera disminución del ritmo opercular; equilibrio normal.
3	Pérdida parcial del equilibrio	Pérdida parcial de tono muscular; nado errático; incremento en el ritmo opercular; reactivo solo a estímulos táctiles o vibratorio.
4	Pérdida total del equilibrio	Pérdida total del tono muscular y equilibrio; ritmo opercular lento.
5	Pérdida de reflejos	Pérdida total de respuesta a estímulos; ritmo opercular lento e irregular; pérdida de todos los reflejos.
6	Colapso medular	Cese del ritmo opercular.

b) Arreglo experimental para la medición de la reflectancia

El arreglo (**Figura 8**) consistió en un sensor óptico (fibra óptica de 400 µm de diámetro, que registra la reflectancia) que era sujetado a una pinza colocada en un soporte universal a una altura de 20 cm. La pinza era desplazada hasta ajustar la fibra óptica al ángulo deseado (25°, 35°, 45°, 55° o 90°). La fibra óptica utilizada es bifurcada: una punta se conecta a la fuente de luz (lámpara de halógeno y deuterio DT-MINI-2 GS) y la otra a un espectroradiómetro (HR4000) cuyo rango espectral es de 300 a 800 nm. El espectroradiómetro envía la señal a una computadora (MacBookPro A1278) donde los registros son grabados usando el programa *Spectra Suit*. El espectroradiómetro fue colocado en una caja estabilizadora del ambiente (SteadiQ-UV) para mantener la temperatura constante y evitar alteraciones que pudieran ser introducidas al registro.

Una vez anestesiado, el pez era colocado en una tina anodizada que contenía anestesia más diluida (10 ml de agua de garrafón: 10 ml de anestesia preparada), para prolongar el estado de sedación del pez mientras tomaba las mediciones de reflectancia. Esta tina fue colocada en un gato mecánico que la elevaba hasta que la luz iluminaba la escama a medir sin mover alguna otra parte del arreglo; de esta manera se evitaban alteraciones a los registros que pudieran ser introducidas por el movimiento.

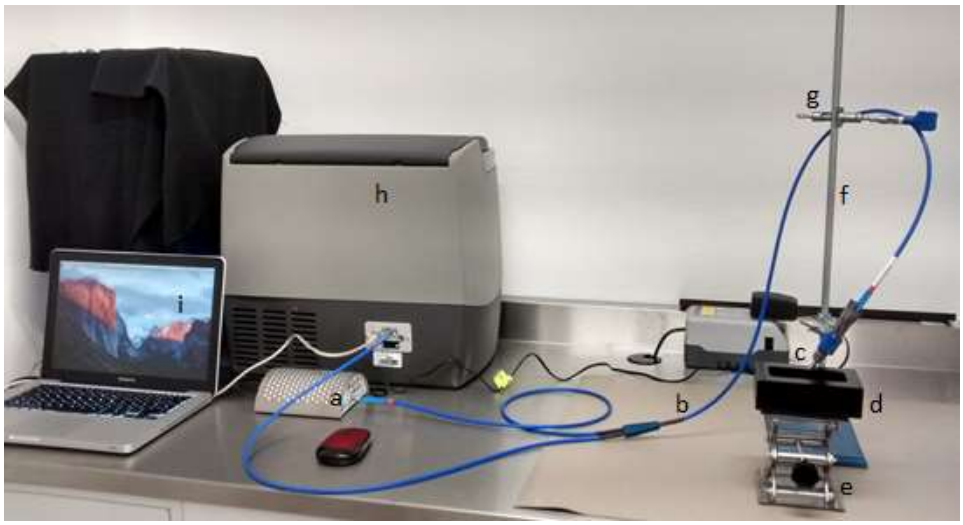

Figura 8. Arreglo experimental que muestra la disposición espacial del equipo para la medición de la reflectancia de las escamas iridiscentes de *X. variata*. a) Lámpara de halógeno y deuterio DT-MINI-2 GS. b) Fibra óptica bifurcada. c) Sensor de la fibra óptica. d) Tina anodizada. e) Gato mecánico. f) Soporte universal. g) Pinzas. h) Caja estabilizadora de ambiente que contiene al espectroradiómetro (HR4000), sensible en un rango espectral de 300 a 800 nm. i) Computadora MacBookPro.

c) Series experimentales

Medí la reflectancia de cada escama brillante (seleccionada aleatoriamente) variando el ángulo de luz incidente. Los ocho peces de cada semana fueron sometidos a un tratamiento por día (i.e. incidencia de la luz a alguno de los ángulos: 25°, 35°, 45°, 55° ó 90°); el orden de la aplicación de los cinco tratamientos se eligió de manera aleatoria para cada bloque. Procedí de esta

manera (i.e. un ángulo por día para todos los peces) con la finalidad de que cada pez fuera anestesiado solo una vez por día y así la medición fuera más práctica.

Tres días antes de empezar el bloque correspondiente, cada pez era anestesiado y fotografiado con una cámara Reflex Nikon modelo D200 con una lente adaptada para tal fin (AF Micro-Nikkor 105mm f/2.8 D). En las fotografías digitalizadas cada escama era numerada usando el programa Adobe Photoshop CS6 versión 13.0 x 64. Elegí aleatoriamente dos escamas brillantes, una de cada lado de cada pez para medirles la reflectancia. Las hembras presentan un número mucho menor de escamas brillantes que los machos; algunas veces solo una. Cuando esta situación se presentaba la hembra era descartada y se elegía a la siguiente en la lista inicial (las 16 hembras disponibles por bloque). Cuando una hembra presentaba suficientes escamas brillantes (al menos una por lado) era incluida en el bloque y se medía la reflectancia a las escamas disponibles.

Hice las mediciones de la reflectancia en un cuarto que fue obscurecido para tal fin. En el cuarto colocaba en una mesa una pecera con un difusor para poner a los peces después de la medición para su recuperación, dos vasos de precipitado de 500 ml con la anestesia para los machos y las hembras respectivamente y una lámpara que proveía iluminación al pez antes de anestesiarlo. La luz de la computadora y lámpara era bloqueada hasta donde era posible hacerlo para evitar que interfirieran con la medición. Usé como referencia para la medición de la reflectancia un estándar blanco de Spectralon Ocean Optics (WS-1-SL).

Cada pez era sacado de su pecera habitual y llevado al cuarto obscuro. Las condiciones de experimentación eran preparadas y el pez pasado al vaso con la anestesia (anestesia por inmersión). Cuando el pez presentaba la pérdida de sus reflejos y reactividad a estímulos táctiles era trasladado a la tina anodizada, previamente colocada en el gato mecánico. El gato

era elevado y la tina acomodada hasta que el sensor iluminaba la escama elegida. Una persona ajena al propósito del estudio tomaba tres registros de la reflectancia de cada escama. Luego el pez era volteado y acomodado para que el sensor entonces iluminara la escama elegida de ese lado, y nuevamente se tomaban tres registros de la reflectancia de la escama previamente seleccionada. Cada registro se guardó en la computadora. Posteriormente el pez era cambiado a la pecera de recuperación donde permanecía al menos 10 minutos. Finalmente, el pez era regresado a su pecera habitual en una bolsa con agua donde permanecía por 30 minutos para que se acostumbrara a la temperatura del agua de la pecera antes de ser liberado.

5.3.2. Microscopía

Aprovechando la muerte casual de un pez macho de *X. variata* realicé el análisis de su integumento. Retiré la superficie (ya fragmentada en escamas) más externa del integumento, la cual tiene una consistencia rígida. Con ayuda de una lupa separé aquellas escamas que presentaban brillo e iridiscencia de las que no los presentaban y las puse en frascos con etanol al 70% para su posterior análisis. Cabe destacar que, al retirar esta capa, el brillo y color iridiscente metálico presentes en algunas de las escamas desaparecieron.

Posteriormente, las escamas guardadas fueron analizadas sin ningún tratamiento o tinción previos bajo un microscopio confocal Nikon C2 Plus invertido. Se tomaron micrografías de dos de las escamas con los lentes 10x, 20x y 60x. Se realizaron 82 cortes en el plano focal de 2.5 µm de grosor, en campo claro con el lente 20x, a una de las escamas con la finalidad de reconstruir su forma tridimensional. Durante este proceso la escama se dañó y tuvo que ser reemplazada. A la segunda escama se le realizaron 148 cortes de 1.5 µm de grosor cada uno en campo claro con el lente 10x. Además, se obtuvieron micrografías en campo claro con el lente 60x, y bajo longitudes de onda de excitación de

405, 488 y 561 nm con los lentes 20x y 60x. Para todos los casos las muestras de las escamas fueron puestas en una caja Petri con fondo 0.17 mm y fueron hidratadas con agua.

5.4. Análisis estadístico

Una persona voluntaria y ajena al estudio realizó lo registros de los espectros de reflectancia durante todos los experimentos. Se instruyó a la persona en el manejo del programa *Spectra Suit*. La persona desconoció en todo momento el objetivo de la aplicación de los tratamientos.

Las variables independientes ángulo de incidencia de la luz y sexo de los peces fueron consideradas como variables de efectos fijos en los modelos estadísticos, y el bloque como de efectos aleatorios. Las variables dependientes manipuladas fueron: i) El pico de reflectancia máxima medida respecto a un material estándar, ii) La longitud de onda a la cual se alcanzaba la reflectancia máxima y iii) El brillo de las escamas al alcanzar su reflectancia máxima. Éste fue medido como el área bajo la curva de la distribución de reflectancia utilizando la ecuación:

$$B_1 = \int_{\lambda mín}^{\lambda máx} Ri = \sum_{\lambda mín}^{\lambda máx} Ri \qquad (1)$$

Para el análisis estadístico de los datos utilicé modelos lineales mixtos (LMM por sus siglas en inglés) en las tres variables dependientes ya que sus distribuciones se ajustaron a una log-normal. En los tres casos una parte de las variables explicativas se consideraron como de efectos fijos y otra como de efectos aleatorios. Utilicé el procedimiento conocido como simplificación del modelo de acuerdo con el principio de parsimonia (Crawley, 2002). El procedimiento consiste en obtener el modelo mínimo adecuado a través de ir removiendo sucesivamente términos del modelo que no contribuyen significativamente a la

explicación de la varianza. La determinación de conservar o no un modelo con un número menor de términos se consiguió aplicando pruebas de máxima verosimilitud. Es decir, la prueba indica si el modelo reducido modifica o no la cantidad de varianza explicada por el modelo completo. Además, realicé una regresión lineal entre el logaritmo de la longitud de onda a la cual se sintoniza $\lambda_{máx}$ en función a los ángulos de incidencia de la luz. También apliqué una prueba F para comparar la varianza de las 3 variables dependientes entre los machos y las hembras.

Los análisis se realizaron con el programa R Versión 3.3.1 (2016-06-21).

6. RESULTADOS

6.1. Medición de la reflectancia

A continuación, presento un análisis estadístico cualitativo de los datos obtenidos en los experimentos. Posteriormente, describo el análisis estadístico que usé para poner a prueba hipótesis estadísticas específicas. Utilicé un rango espectral de 300 a 750 nm para hacer el análisis de las distribuciones espectrales a los diferentes ángulos de incidencia de la luz. Este rango espectral incluyó una parte del espectro UV (300 a 400 nm). Los espectros de reflectancia obtenidos de las escamas brillantes de *X. variata* presentan en la mayoría de los casos un pico estrecho en el rango UV y uno amplio en el rango del espectro visible, el cual parece estar formado por la combinación de todas las longitudes de onda. También puede observarse que la reflectancia tendió a disminuir a longitudes de onda mayores, aproximadamente a partir de 600 nm (**Figura 9**).

Este patrón de la distribución espectral lo compartieron machos y hembras. En el rango espectral UV las similitudes entre machos y hembras son más evidentes ya que

comparten un pico de reflectancia estrecho. Sin embargo, los machos mostraron consistentemente un pico amplio de reflectancia entre 500 y 600 nm (**Figura 10**). Este resultado sugiere que las características colorimétricas de las escamas brillantes difieren, al menos cualitativamente, entre machos y hembras. Una de esas características es el brillo que resultó en promedio 30.13% más intenso en los machos que en las hembras.

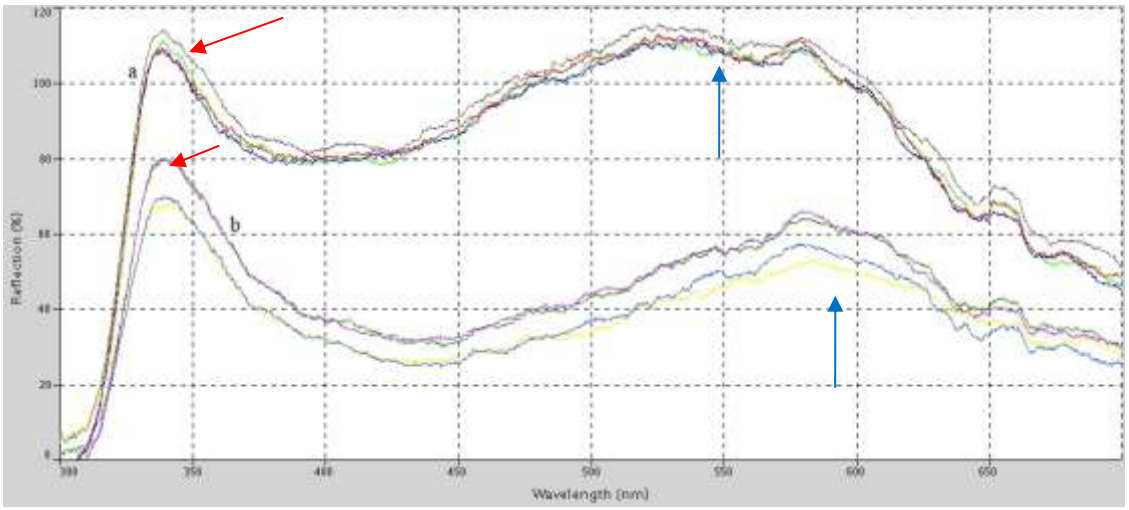

Figura 9. Espectro típico de la reflectancia medida a 90°en dos escamas brillantes de un macho de *X. variata*. Se muestran los porcentajes de reflectancia de 3 registros tomados en cada una de las dos escamas brillantes, una de cada lado del pez (a y b) en función de la longitud de onda. Las dos escamas presentaron una distribución espectral similar, aunque con intensidades de reflectancia diferentes en los dos picos: 1) aproximadamente en 345 nm (UV, flechas rojas); 2) aproximadamente entre 500 y 600 nm (espectro visible, flechas azules). Como puede observarse, este segundo pico está ligeramente desfasado entre las dos escamas.

Los datos de las reflectancias máximas alcanzadas a los diferentes ángulos de incidencia de la luz, así como los del brillo y la longitud de onda a la cual las escamas sintonizaron su $\lambda_{máx}$ podrían seguir una distribución gamma, ya que son una variable continua y presentan un sesgo positivo. Sin embargo, fue suficiente transformar los datos a una escala logarítmica para que los datos de la reflectancia máxima se pudieran tratar como

una distribución log-normal. Confirmé este hecho a través de un procedimiento gráfico usando el paquete car (Fox y Weisberg, 2011). Aunque los datos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes alcanzan su reflectancia máxima y del brillo no siguieron fielmente el mismo patrón de distribución (**Ver apéndice A. Figuras A1-A12**), la evaluación de los modelos estadísticos aplicados muestra que el ajuste usando una distribución log-normal seguía siendo una opción válida (**Ver Apéndice A. Figuras A13, A14 y A15**). Por lo tano usé una distribución log-normal para las 3 variables de predicción (i.e. variables independientes).

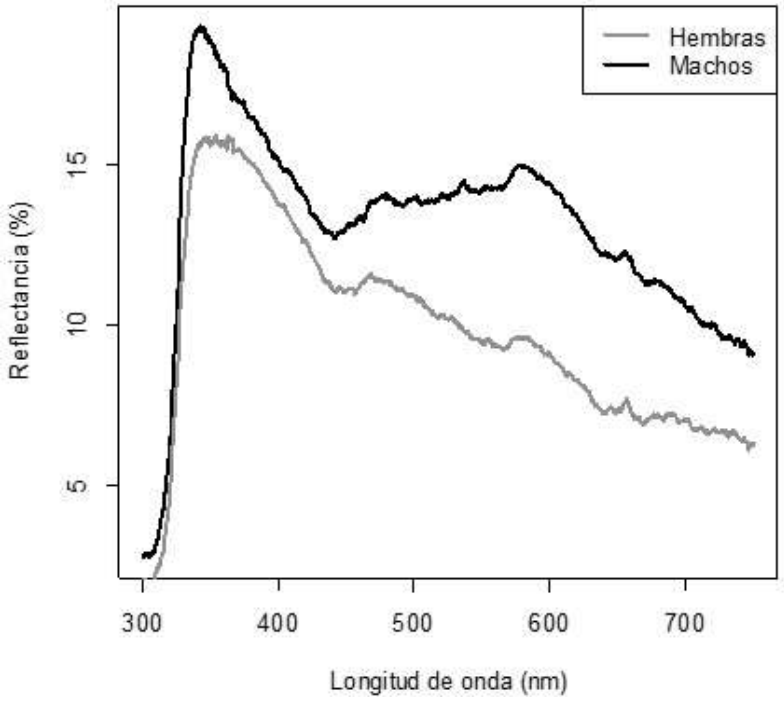

Figura 10. La figura muestra los espectros promedio de la reflectancia de las escamas brillantes de machos (negro) y hembras (gris) de *X. variata* en función de las longitudes de onda. Aun cuando en ambas distribuciones pueden observarse picos idénticos en el rango UV, los dos sexos muestran porcentajes diferentes en el rango de 450 a 700 nm, siendo mayor en los machos que en las hembras.

Para hacer el análisis estadístico del comportamiento de las tres variables de predicción en función al ángulo de incidencia de la luz, primero calculé el promedio y error

estándar de los datos de cada variable para cada ángulo. Los cálculos fueron hechos tanto para todos los peces, independientemente de su sexo, como para machos y hembras por separado (**Tabla 4**). Puede observarse a partir del resumen en esta tabla que en general las mediciones de los machos variaron más que las de las hembras, sobre todo en el caso del brillo de las escamas.

Tabla 4. Resumen estadístico que muestra los promedios y la desviación estándar del promedio (±) de las variables dependientes: 1) reflectancia máxima ($\lambda_{máx}$) alcanzada por las escamas brillantes de *X. variata*, 2) la longitud de onda (nm) a la cual las escamas alcanzaron su reflectancia máxima y 3) el brillo total de las escamas (i.e. área bajo la curva del espectro de reflectancia), para cada ángulo de luz incidente. El análisis fue hecho para todos los individuos y para machos y hembras por separado.

	Ángulos de incidencia de la luz				
	25°	**35°**	**45°**	**55°**	**90°**
$\lambda_{máx}$ (%)					
Todos	17.54 ± 1.56	15.75 ± 1.01	15.55 ± 1.57	17.37 ± 1.74	44.43 ± 5.58
H	17.66 ± 2.57	15.97 ± 1.68	14.41 ± 1.66	16.01 ± 2.07	37.14 ± 7.31
M	17.43 ± 1.83	15.53 ± 1.17	16.68 ± 2.69	18.73 ± 2.82	51.72 ± 8.35
nm					
Todos	391.88 ± 12.26	355.12 ± 3.1	362.23 ± 7.17	406.45 ± 10.74	421.17 ± 11.78
H	384.91 ± 15.34	360.57 ± 5.68	367.69 ± 12.27	393.61 ± 12.18	402.24 ± 13.69
M	398.85 ± 19.31	349.68 ± 2.21	356.78 ± 7.51	419.28 ± 17.6	440.1 ± 18.8
Brillo					
Todos	2639.79 ± 248.5	2315.2 ± 233.96	3150.25 ± 385.7	4562.72 ± 538.97	13488 ± 1941.46
H	2549.75 ± 389.74	2308.15 ± 314.19	2994.27 ± 457.49	3906.64 ± 572.42	10971.88 ± 2474.74
M	2729.83 ± 313.96	2322.26 ± 351.8	3306.22 ± 627.54	5218.79 ± 908.45	16004.12 ± 2964.38

Los valores más altos de la reflectancia se registraron en 2 machos, cuando el ángulo de incidencia de la luz fue de 45° (69.04%) y 90° (246.33%). La longitud de onda a

la cual se alcanzaron estos valores fueron 385.82 nm y 641.09 nm, respectivamente. Los valores más elevados de brillo también fueron registrados en estos mismos peces: 18916.39 y 88889.73, respectivamente.

6.1.1. Análisis de la reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes

La aplicación del modelo lineal general mixto reveló la ausencia de una interacción significativa entre el sexo de los animales y el ángulo de incidencia de la luz en la reflectancia máxima ($\mathcal{L}$ = 2.88, g.l. = 4; p = 0.58). Tampoco hubo un efecto significativo del sexo de los animales ($\mathcal{L}$ = 2.11, g.l. = 1; p = 0.15). En contraste con estos resultados, la variación en el ángulo de incidencia de la luz si tuvo un efecto significativo ($\mathcal{L}$ = 50.86, g.l. = 4; $p < 0.001$). Por lo tanto, el modelo mínimo adecuado contiene al logaritmo de la reflectancia máxima en función del tratamiento (ángulos de incidencia de la luz) como efecto fijo; el bloque, los peces y las escamas formaron los efectos aleatorios (**Ver apéndice A. Tabla A1, Figura 13**). Con respecto a los efectos aleatorios, las cinco mediciones provenientes de la misma escama mostraron una correlación baja (0.17). La misma correlación ocurrió entre las mediciones provenientes de las escamas del mismo pez. La correlación de las mediciones de los peces provenientes del mismo bloque fue prácticamente nula (0.05). En suma, la posible dependencia (i.e. correlación) entre las mediciones obtenidas es insignificante.

Un análisis comparativo puntual de los efectos de la variación del ángulo de incidencia de la luz, indica que la reflectancia máxima disminuyó en promedio un 168.58% en los ángulos 25, 35, 45 y 55 grados en comparación con la alcanzada en la condición control (90°). Esta diferencia fue la única que resultó estadísticamente significativa (**Figura**

11; Tabla 5). En la figura se muestran los datos combinados de hembras y machos, ya que no hubo diferencias entre ellos que sugiriera presentarlos separados.

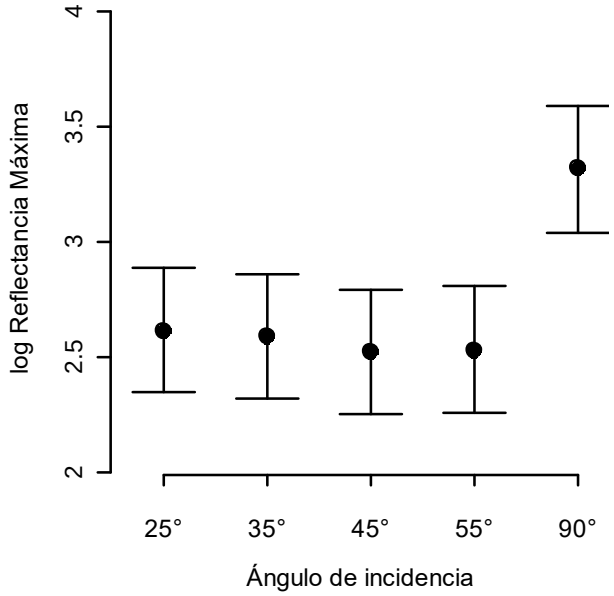

Figura 11. Logaritmo promedio de la reflectancia máxima promedio ± intervalos de confianza alcanzada por las escamas brillantes de los peces *X. variata* en función a la variación del ángulo de luz incidente.

Tabla 5. Modelo mínimo adecuado del efecto de la variación del ángulo de incidencia de la luz (efecto fijo) y también de la variación debida al bloque, a los peces y las escamas (efectos aleatorios) en la variación de la reflectancia máxima medida en las escamas brillantes de *X. variata*.

Efectos aleatorios	**Desviación estándar**				
Bloque	0.19				
Pez	0.13				
Escamas	0.1				
Efectos fijos					
Ángulos de incidencia	**Coeficiente**	**Error estándar**	**g.l.**	**Valor de t**	**Valor de *p***
90°	3.320671	0.14	284	23.64	< 0.001
25°	-0.70	0.13	284	-5.19	< 0.001
35°	-0.72	0.13	284	-5.39	< 0.001
45°	-0.79	0.13	284	-5.88	< 0.001
55°	-0.78	0.13	284	-5.78	< 0.001

Aun cuando no hubo diferencias entre machos y hembras en la reflectancia máxima, vale hacer notar que los machos mostraron porcentajes mayores de reflectancia, sobre todo en los ángulos de 45, 55 y 90 grados. Lo que sí difirió entre machos y hembras fue la variación que mostraron en la reflectancia máxima ($F_{159,159}$=0.68, p=0.01; **Figura 12**). La varianza de los machos (754.03) fue aproximadamente 0.5 veces más grande que la de las hembras (509.5).

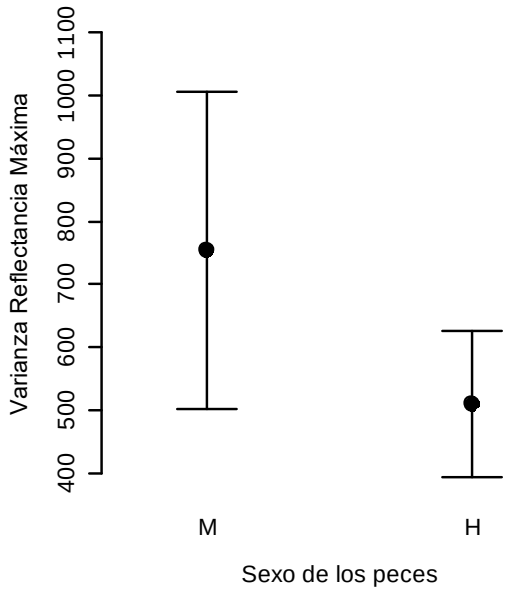

Figura 12. Varianza de los datos de la reflectancia máxima medida en las escamas brillantes de hembras (H) y machos (M) ± desviación estándar de la varianza.

6.1.2. Análisis de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes alcanzan su reflectancia máxima

La aplicación del modelo lineal general mixto no indicó una interacción entre el sexo de los peces y el ángulo de incidencia de la luz que fuera significativa ($\mathcal{L}$ = 5.22, g.l. = 4; p = 0.26). Tampoco hubo un efecto significativo del sexo de los peces ($\mathcal{L}$ = 1.32, g.l. = 1; p = 0.25). En contraste, la variación en el ángulo de incidencia de la luz si tuvo un efecto

significativo ($\mathcal{L}$ = 37.46, g.l. = 3; $p < 0.001$). Por lo tanto, el modelo mínimo adecuado contiene al logaritmo de la longitud de onda a la cual sintonizan su $\lambda_{máx}$ como efecto fijo; el bloque, los peces y las escamas constituyeron a los efectos aleatorios (**Tabla 6**). El proceso de simplificación del modelo se puede consultar en el **apéndice A (Tabla A2, Figura A14**). En cuanto a los efectos aleatorios, la correlación dentro de cada nivel de anidación fue prácticamente nula. Así, las tres mediciones provenientes de la misma escama mostraron una correlación de 0.04. En el caso de las escamas que provenían del mismo pez y de las mediciones de los peces provenientes del mismo bloque presentaron una correlación fue de 0.05. Por lo tanto, puede afirmarse que la posible dependencia entre las mediciones obtenidas es insignificante, lo que hace más confiable el resultado del modelo estadístico.

El análisis puntual comparativo de los efectos de la variación del ángulo de luz incidente, indica que los ángulos a los que la $\lambda_{máx}$ se sintoniza en el rango UV (< 400 nm) difieren significativamente del control (**Tabla 6; Figura 13**). También hay diferencias significativas entre 35 y 45 grados respecto de 25° (**Figura 13**). De igual manera, la longitud de onda a la cual la $\lambda_{máx}$ se encuentra sintonizada a 55° difiere significativamente de la alcanzada a 35° y 45° (**Figura 13**).

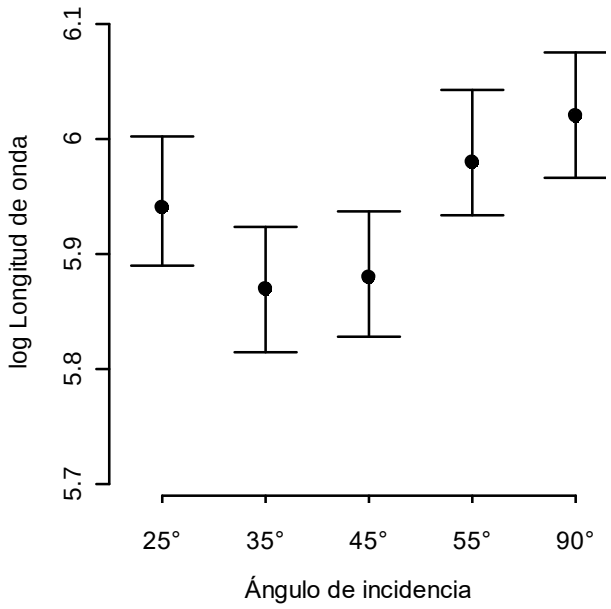

Figura 13. Logaritmo promedio ± intervalos de confianza de la longitud de onda a la cual las escamas de *X. variata* alcanzan su reflectancia máxima en función a la variación del ángulo de luz incidente.

Tabla 6. Modelo mínimo adecuado del efecto de la variación del ángulo de incidencia de la luz (efecto fijo) y de la variación debida al bloque, a los peces y las escamas (efectos aleatorios) en la variación de la longitud de onda a la cual se alcanza la reflectancia máxima en las escamas brillantes de *X. variata*.

Efectos aleatorios	**Desviación estándar**				
Bloque	0.03				
Pez	5.02×10^{-6}				
Escamas	4.03×10^{-6}				
Efectos fijos					
Ángulos de incidencia	**Coeficiente**	**Error estándar**	**g.l.**	**Valor de t**	**Valor de *p***
90°	6.02	0.02	284	216.65	0
25°	-0.07	0.02	284	-2.51	0.0125
35°	-0.15	0.02	284	-5.19	0
45°	-0.13	0.28	284	-4.75	0
55°	-0.03	0.02	284	-1.11	0.26

En relación a la variación del ángulo de incidencia de la luz, existe una relación lineal positiva entre ésta y $\lambda_{máx}$ ($F_{1,3} = 26.02$, $p = 0.014$; $R^2 = 0.89$; **Figura 14**). Es decir, $\lambda_{máx}$ crece con el ángulo de incidencia de la luz.

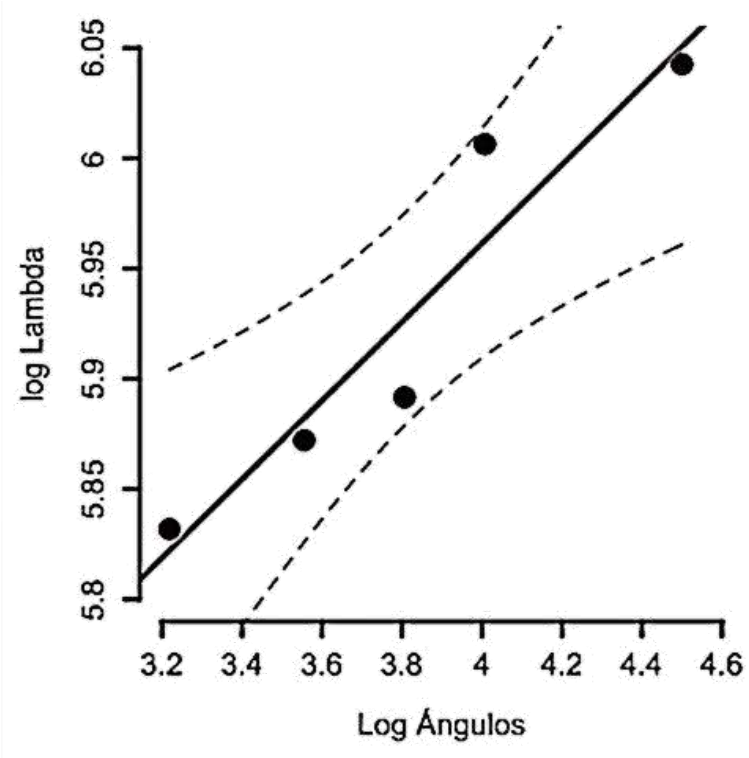

Figura 14. Regresión lineal del logaritmo promedio de la longitud de onda a la cual se alcanza la reflectancia máxima en función del incremento del ángulo de incidencia de la luz. La línea sólida representa los valores ajustados del modelo y las líneas punteadas los límites de confianza al 95 %.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en cuanto a $\lambda_{máx}$, la varianza de esta medición en los machos (8084.33) fue 63.23 % más que la de las hembras (4952.48), siendo tal diferencia significativa estadísticamente ($F_{159,159} = 0.61$, $p = 0.0021$) (**Figura 15**).

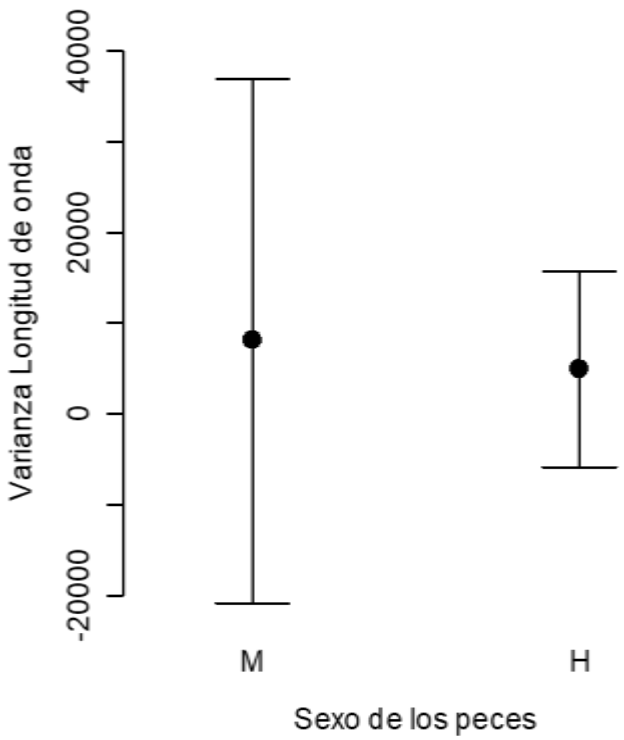

Figura 15. Varianza de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de hembras (H) y machos (M) alcanzan su reflectancia máxima ± la desviación estándar de la varianza.

6.1.3. Análisis del brillo de las escamas brillantes

La aplicación del modelo lineal general mixto no mostró un efecto estadísticamente significativo ($\mathcal{L}$ = 2.8, g.l. = 4; p = 0.59) de la interacción entre el sexo de los animales y el ángulo de incidencia de la luz. Tampoco se encontró un efecto significativo en el caso del sexo de los peces ($\mathcal{L}$ = 2.52, g.l. = 1; p = 0.11). Sin embargo, la variación en el ángulo de incidencia de la luz si mostró un efecto estadísticamente significativo ($\mathcal{L}$ = 2.52, g.l. = 4; p < 0.001). Por lo tanto, el modelo mínimo adecuado contiene al ángulo de luz incidente como efecto fijo, en tanto que el bloque, los peces y las escamas quedaron incluidos como efectos aleatorios (**Tabla 11**). La simplificación y ajuste de bondad del modelo pueden revisarse en el **apéndice A (Tabla A3, Figura A15**).

Los valores de correlación entre las mediciones provenientes de cada nivel de anidación revelan que la dependencia entre ellas es prácticamente inexistente. En el caso de las mediciones provenientes de la misma escama la correlación es casi nula (0.01). De manera similar, las mediciones de las escamas provenientes del mismo pez y las de los peces provenientes del mismo bloque mostraron una correlación baja (0.33).

Una comparación específica entre las diferentes variaciones del ángulo de incidencia de la luz revela que el brillo total medido a 90 grados mostrado por las escamas brillantes fue alrededor de 325.92 % superior al mostrado cuando la luz incide sobre las escamas a los otros ángulos (25, 35, 45 y 55 grados; **Tabla 4**; **Figura 16**). Además, el análisis estadístico mostró que el brillo medido a 55° fue 97 % más intenso que el medido a 35° (**Figura 16)**.

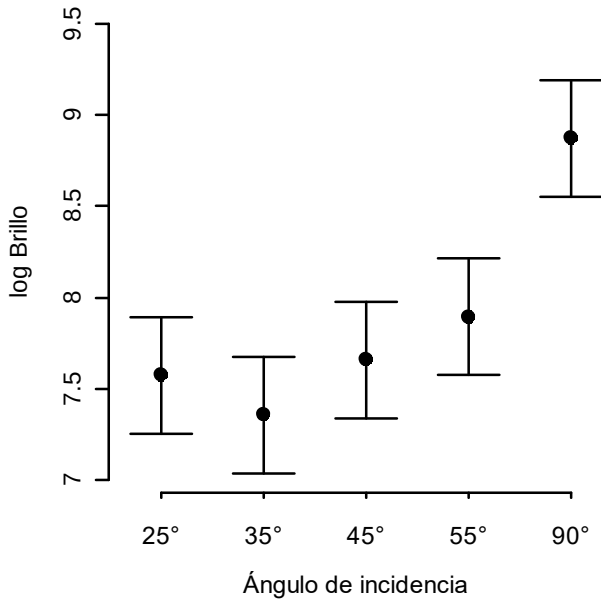

Figura 16. Logaritmo promedio ± intervalos de confianza del brillo medido de las escamas de *X. variata* en función a la variación del ángulo de luz incidente.

Tabla 7. Modelo lineal mixto mínimo adecuado ajustado a los datos del brillo de las escamas brillantes de *X. variata* en función a diferentes ángulos de incidencia. El tratamiento (ángulos de incidencia de la luz) es el efecto fijo, y el bloque, los peces y las escamas los efectos aleatorios. La comparación es entre los ángulos de 25 a 55 grados contra el de 90°.

Efectos aleatorios	**Desviación estándar**				
Bloque	0.15				
Pez	0.17				
Escamas	0.12				
Efectos fijos					
Ángulos de incidencia	**Coeficiente**	**Error estándar**	**g.l.**	**Valor de t**	**Valor de p**
90°	8.87	0.16	284	54.28	> 0.001
25°	-1.3	0.19	284	-6.83	> 0.001
35°	-1.51	0.19	284	-7.98	> 0.001
45°	-1.21	0.19	284	-6.38	> 0.001
55°	-0.98	0.19	284	-5.14	> 0.001

Como en los casos anteriores, encontré que la varianza en el brillo de las escamas de los machos (0.000032) superó (68 %) a la mostrada por las hembras (0.000019). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($F_{159,159} = 0.59$, $p = 0.0011$; **Figura 17**). Los datos de brillo se muestran normalizados a 1.

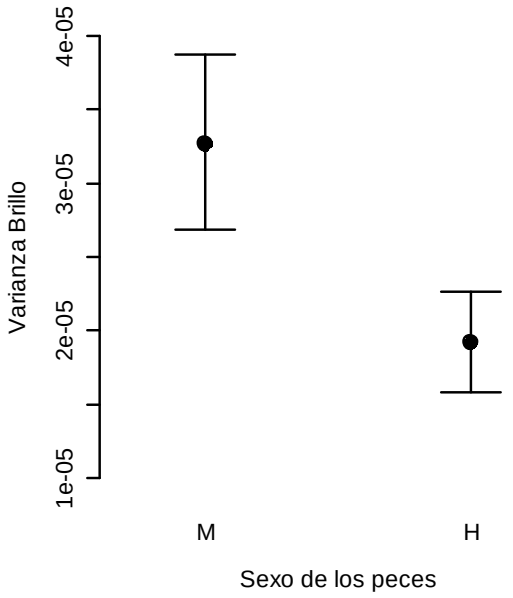

Figura 17. Gráfica que muestra la varianza del brillo de las escamas brillantes en hembras (H) y machos (M) de *X. variata* ± la desviación estándar de la varianza. Los datos se muestran normalizados a 1.

6.2. Microscopía

El análisis del integumento de un pez recientemente muerto (**Figura 18a**) reveló que las nanoestructuras que producen la iridiscencia y el color brillante de las escamas probablemente se encuentran en la porción más superficial del *stratum spongiosum*. Al retirar la primera capa del integumento, ésta se desprendió y fragmentó en escamas. Las escamas que se apreciaban con brillo poseían una estructura blanca con bordes irregulares que bajo la luz presentaba iridiscencia, y las que no presentaban brillo carecían de dicha estructura **(Figura 18b)**. Esta diferencia sugiere que esta estructura blanca podría ser la que produce el color brillante e iridiscencia en las escamas de *X. variata*. Al retirar esta primera capa, se seguía apreciando color en la piel del pez y diferenciación de escamas, pero ya ninguna presentaba brillo o iridiscencia. Es posible, entonces, que aún quedara la porción más profunda del *stratum spogiosum* pero con otro tipo de cromatóforos **(Figura 18c).**

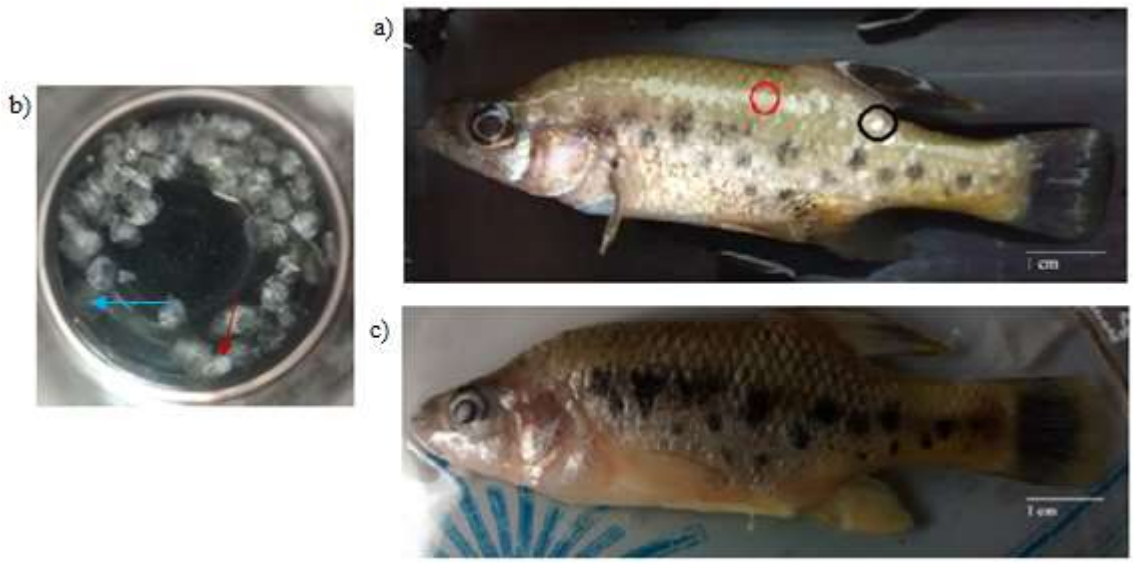

Figura 18. a) Fotografía de un pez macho *Xenotoca variata*, muerto. Con un círculo rojo se muestra a una escama sin brillo y con uno negro una brillante. b) Escamas extraídas de la primera capa del integumento del mismo ejemplar en a. Escamas brillantes (flecha roja) y no brillantes (flecha azul). c) Mismo ejemplar sin la primera capa del integumento.

El análisis posterior de dos de estas mismas escamas con la estructura blanquecina mencionada arriba reveló con observaciones bajo el microscopio confocal, que la morfología que presentan es característica de las escamas conocidas como ctenoidea. Es una escama redonda, con un margen posterior y proyecciones en forma de peine. Además, se pueden observar los clenios, el foco, los radios, los círculos y el margen anterior (**Figura 19**). La primera escama se dañó con el análisis realizado; con la segunda escama se completó el análisis satisfactoriamente y se halló que las escamas pueden tener un grosor de 220 µm aproximadamente

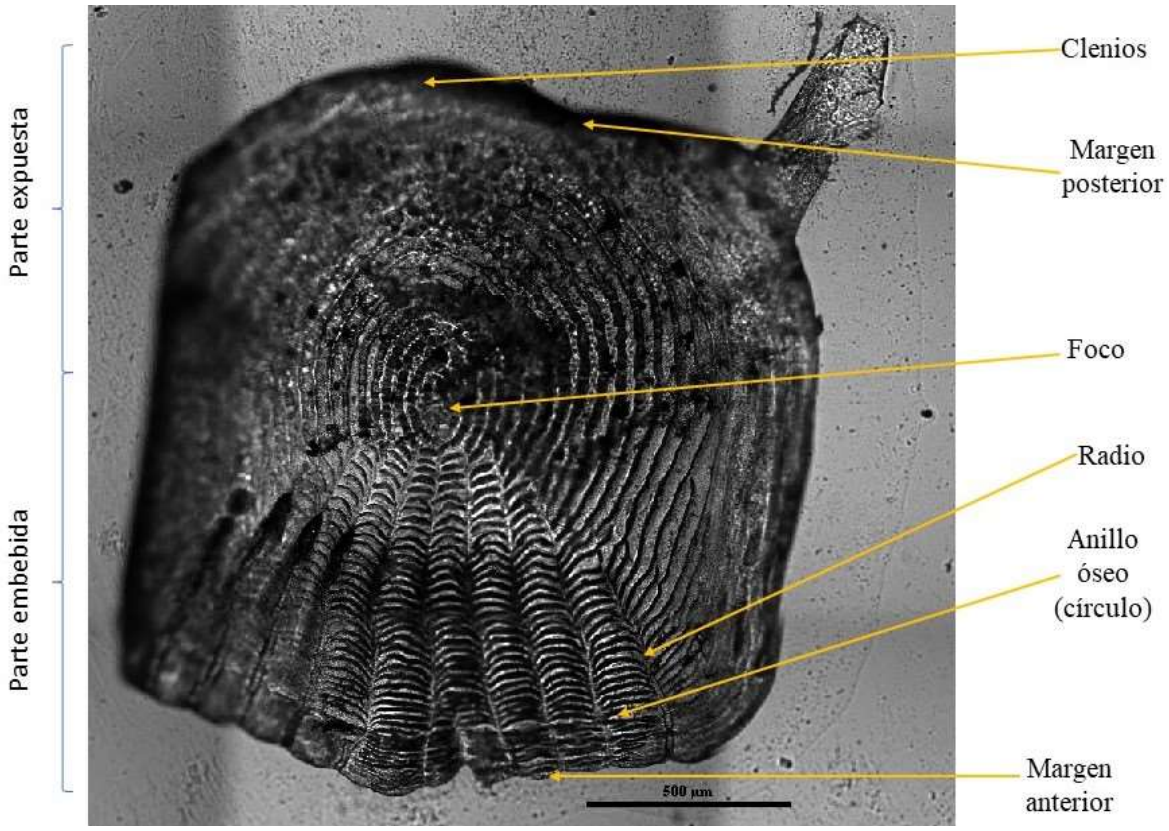

Figura 19. Micrografía de una escama de *X. variata* observada bajo el microscopio confocal. Se muestran sus partes principales con flechas naranjas y con llaves azules las porciones que se encuentran embebidas y expuestas en el integumento del pez.

Al observar la escama en el microscopio confocal bajo diferentes longitudes de onda de excitación (405, 488 y 531 nm) pudo verse que las escamas fluorecen naturalmente. Emitiendo luz en un rango de 417-477 nm, 505-550 nm y 570-más de 800 nm, respectivamente a las diferentes longitudes de onda de excitación. Posiblemente esta fluorescencia sea producida por diferentes organelos o proteínas en la escama. La mayor proporción de fluorescencia que se aprecia en la escama es de color azul (417-477 nm), mientras que la roja (505-550 nm) y verde (570-más de 800 nm) disminuyen a lo largo del plano horizontal de la escama (**Figura 20**).

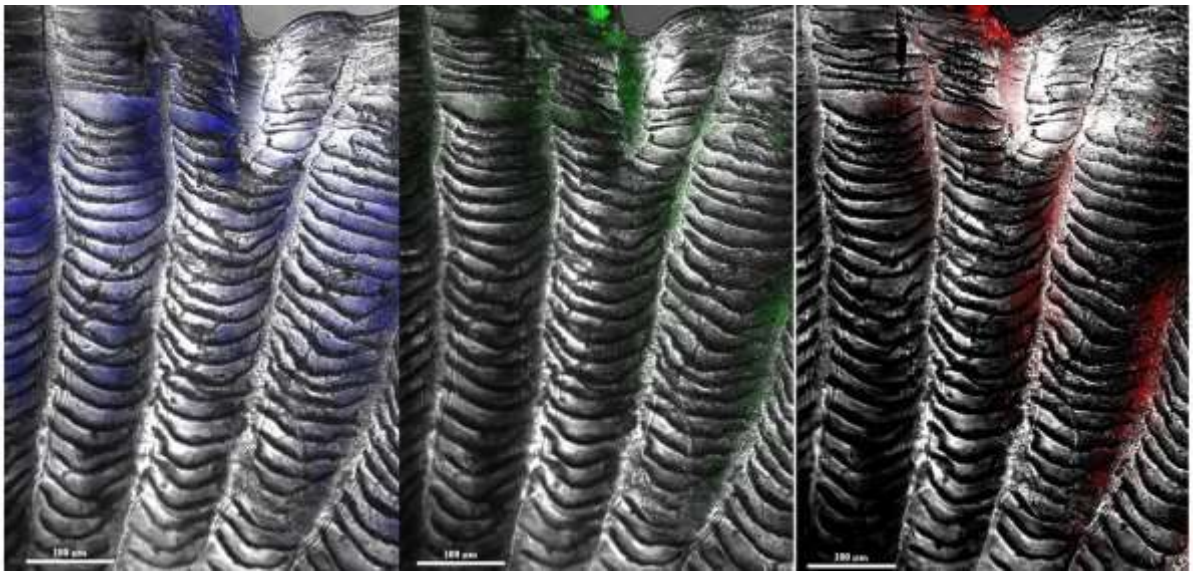

Figura 20. Micrografía de una porción del margen posterior de una escama de *X. variata* tomada con un microscopio confocal con un lente 60x bajo diferentes longitudes de onda excitatoria.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivos determinar el ángulo al cual las escamas iridiscentes de los peces de *Xenotoca variata* producen una reflectancia máxima, y describir algunos aspectos de la morfología de las estructuras que la producen. Para cumplir con estos objetivos puse a prueba las predicciones derivadas de las dos hipótesis que planteé: i) La obtención de espectros de reflectancia con uno o más picos estrechos producidos por una coloración direccional basada en nanoestructuras laminares o, ii) la obtención de espectros de reflectancia con picos amplios producidos por una coloración difusa basada en nanoestructuras tipo esponja. Obtuve los espectros de reflectancia de 64 escamas brillantes de 32 peces (16 machos y 16 hembras) bajo cinco diferentes ángulos de incidencia de la luz (25, 35, 45, 55 y 90 grados). Medí a partir de los espectros, la reflectancia máxima en cada uno de ellos y la longitud de onda a la cual fue alcanzada ($\lambda_{máx}$), así como el brillo.

Los resultados que obtuve indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los machos y las hembras en ninguna de las tres mediciones. Sin embargo, los machos mostraron mucha más variación en esas mediciones que la que mostraron las hembras. Además, encontré que $\lambda_{máx}$ y el brillo capturados a 90 grados difirieron de los otros ángulos. En éstos, excepto 55° y 90°, la $\lambda_{máx}$ se sintoniza entre 300 y 400 nm. Respecto a este punto, también corroboré la naturaleza iridiscente de las escamas brillantes ya que, al variar el ángulo de incidencia de la luz, la $\lambda_{máx}$ se sintonizó a diferentes longitudes de onda.

Finalmente, analicé las escamas iridiscentes bajo el microscopio confocal, con lo cual pude determinar que el tipo de escama de *X. variata* es ctenoidea. Con este mismo análisis encontré que las escamas brillantes muestran autofluorescencia bajo diferentes longitudes de onda. Sin embargo, no pude profundizar el análisis y llevarlo hasta la realización de observaciones bajo el microscopio electrónico. Esto me ha impedido determinar el tipo específico de nanoestructura responsable del color iridiscente metálico. No obstante, con base en los espectros de reflectancia obtenidos puedo anticipar que la nanoestructura muy probablemente es un reflector multicapa.

7.1. Medición de la reflectancia

La iridiscencia es el cambio de matiz o color en función a la geometría de la iluminación o visión (Osorio y Ham, 2002). Es esto precisamente lo que hallé con las escamas iridiscentes de *Xenotoca variata*, pues las mediciones que realicé indican que la variación en el ángulo de incidencia de la luz produjo $\lambda_{máx}$ sintonizadas a distintas longitudes de onda. Específicamente, cuando la luz incide sobre la escama a 90° la $\lambda_{máx}$ se sintoniza a 421 nm,

cuando incide a 25° y 55° la $\lambda_{máx}$ se sintoniza a 341 y 406 nm respectivamente, y cuando incide a 35° y 45° la $\lambda_{máx}$ se sintoniza a 355 y 362 nm, respectivamente. Estos datos corroboran que las escamas brillantes son iridiscentes y que la asociación—longitud de onda y ángulo de incidencia de la luz—es mas o menos lineal. Este fenómeno, coloración iridiscente, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (White, 2018). Por ejemplo, Yin *et al*., (2006) reportaron la presencia de iridiscencia en las plumas del ave *Columba livia domestica* en la cual las bárbulas verdes cambian a púrpura al variar el ángulo de observación de normal a oblicuo, mientras que las bárbulas púrpura se tornan verdes al variar el ángulo de observación en el sentido opuesto. Además, la relación también parece ser lineal, lo que sugiere que podría tratarse de una característica inherente a las estructuras iridiscentes.

La iridiscencia es un subconjunto de los colores estructurales (Prum, 2006), pudiendo ser direccional o difusa. Las distribuciones espectrales que se obtuvieron de las escamas iridiscentes de machos y hembras de *X. variata* presentan un pico de reflectancia estrecho en el rango UV (300-400 nm), mientras que en el rango del espectro visible la reflectancia se mantiene casi invariable hasta los 600 nm aproximadamente, longitud de onda a partir de la cual se aprecia una disminución del porcentaje de la reflectancia. Estos resultados indican que las escamas iridiscentes reflejan la luz en todas las longitudes de onda en el espectro visible y al menos una parte de las del espectro UV (315-400 nm). El pico de reflectancia en UV es casi idéntico en porcentaje y sintonización entre machos y hembras, lo que sugiere que los peces de *X. variata* pueden percibir la luz ultravioleta, y que posiblemente la usen en algún sistema de señales. Tal es el caso de los peces de la especie *Girardhynichthys multirradiatus*, en los cuales se encontró que las hembras

preferían a los machos cuya coloración no había sido bloqueada en el rango ultravioleta (Macias y Burt, 2002). Es probable que los machos de *X. variata* también usen ese rango del espectro de luz para emitir señales, aunque en un sistema intraespecífico (i.e. entre individuos de la misma especie), pues tanto machos como hembras mostraron brillo y sintonización espectral semejantes en el rango ultravioleta.

El sistema visual de los peces es uno de los primeros en desarrollarse y desde las primeras etapas de vida adquiere una función crítica para llevar a cabo comportamientos como la alimentación, el reconocimiento de conespecíficos, heteroespecíficos y también en aspectos de comunicación (Siebeck, 2014). Los peces teleósteos en particular muestran una gran diversidad de pigmentos visuales relacionada con el ambiente y estilo de vida locales. Por ejemplo, en especies diurnas de aguas poco profundas donde un espectro amplio de luz se encuentra disponible, muchas especies de peces suelen tener al menos 4 tipos de conos incluyendo los sensibles a violeta y UV (V/UVS), además de los bastones. Como consecuencia de tal conformación tetracromática (Bowmaker, 1988), el espectro de sensibilidad visual varía de 320 a 700 nm. Esta capacidad de emitir reflectancia en el rango UV es una característica presente en otras especies de peces en las que se han obtenido espectros de reflectancia similares a los reportados aquí para *X. variata* (Losey G, 2001; Rick y Backer, 2008; Sabol *et al*., 2017). Se desconoce el conjunto de conos que *X. variata* posee, pero los resultados presentados sugieren que al menos presentan 4 con los cuales estos peces podrían estar percibiendo longitudes de onda muy cortas (320-400 nm), cortas (400-500 nm), medianas (500-590 nm) y largas (590-700 nm).

Entre las funciones que puede tener esta capacidad se sabe que los peces que la presentan la pueden utilizar en comunicación social de corto alcance (Losey, 2001), como

un atractivo visual durante el cortejo tanto para machos como para hembras (Rick y Backer, 2008) y también en interacciones intrasexuales ya que los peces que la usan así distinguen la familiaridad, identidad y sexo de sus conespecíficos (Sabol *et al*. 2017). Puesto que se ha demostrado que *X. variata* usa las escamas brillantes en el contexto de la elección de pareja y en interacciones territoriales (Moyaho, 2002; Moyaho *et al*., 2004; Salazar-Bautista *et al.*, 2018), podría decirse que el hecho de que al menos en tres ángulos de incidencia de la luz (25°, 35° y 45°) la $\lambda_{máx}$ alcanzada se sintoniza en el rango UV sugiere que la iridiscencia UV de estas escamas podría también participar en la exhibición de algunas pautas de cortejo.

La similitud en el rango UV mostrada por machos y hembras no sucede en el rango visible (400-750 nm) donde los machos exhiben en promedio un pico amplio de reflectancia cuyo porcentaje es en promedio mayor al que exhiben las hembras. Parece entonces que, en este caso la iridiscencia en el rango visible podría estar siendo usado por los machos para generar señales para atraer a las hembras. A este respecto se sabe (Moyaho, 2018, comunicación personal) que en condiciones de cautiverio los machos de *X. variata* cortejan al atardecer. En condiciones silvestres la luz incidiría sobre un cuerpo de agua a 70° respecto de la normal a esa hora del día. Según la ley de Snell con este ángulo la luz incidiría sobre el cuerpo de un pez bajo el agua aproximadamente a 45°. Más aun, Fascinetto-Zago (2018) encontró que los machos presentan mas pautas de cortejo en un ángulo de incidencia de la luz sobre el agua de 60° y 70° respecto de la normal. En estas condiciones la luz incidiría sobre el pez a 46 y 40 grados respectivamente. Este resultado contrasta con lo hallado en este estudio, ya que entre dichos ángulos se registra el menor porcentaje de reflectancia (15.55 %). Parece entonces, que la geometría de la luz que *X.*

variata utiliza para cortejar a las hembras no coincide con la hallada a la cual se produce la reflectancia máxima. Se ha reportado que los machos de pavorreales cortejan a las hembras cuando el ángulo de incidencia de la luz es de 45°; es un ángulo que podría considerarse como óptimo en esta especie. En muchas especies tanto la ubicación como el momento de las exhibiciones de cortejo parecen ser seleccionados por la eficacia de la señal (Dakin y Montgomerie, 2009). Por ejemplo, se comprobó que la ornamentación UV en el pez *Xiphophorus nigrensis* incrementa el atractivo de los machos hacia las hembras, a la vez que pasa desapercibido por su depredador principal *Astyanax mexicanus* (Cummings *et al*., 2003). Una adaptación similar podría estar ocurriendo en *X. variata* lo cual explicaría la sintonización en UV, aunque también es posible que este tipo de longitudes de onda sean parte de un sistema de comunicación intraespecífica. Valdría la pena realizar experimentos para poner a prueba las predicciones derivadas de estas hipótesis.

Aunque no hubo diferencias significativas entre machos y hembras en ninguno de los parámetros medidos en función de la variación del ángulo de incidencia de la luz, la varianza en las tres mediciones (reflectancia máxima, la longitud de onda a la que ésta ocurrió y el brillo) difirió significativamente entre los dos sexos. Esta diferencia podría explicarse por la cantidad de brillo y porcentaje de reflectancia alcanzada por los machos entre 500 y 600 nm. La diferencia hallada también es consistente con lo hallado en otros casos donde se ha mostrado que las señales visuales tanto en UV como en otros rangos del espectro pueden ser sexualmente dimórficas (Cummings *et al*., 2003; Sabol *et al.*, 2017). Ya se conoce que los machos de *X. variata* tienen más escamas iridiscentes que las hembras (Fitzsimons, 1972), y los resultados descritos aquí sugieren que también sus características colorimétricas difieren entre los dos sexos.

Se ha reportado que las escamas brillantes de *X. variata* podrían funcionar como reflectores en los machos durante los movimientos elaborados que hacen para llamar la atención de las hembras y conseguir cópulas (Moyaho, 2002; Moyaho *et al*., 2004). Además, los machos carecen de un órgano intromitente verdadero por lo que requieren de la cooperación de la hembra para copular mediante pautas de cortejo (Bisazza, 1997). Los machos también utilizan sus escamas iridiscentes en pautas de amedrentación de rivales (Salazar-Bautista *et al.*, 2018). Las funciones que ya se conocen para las escamas iridiscentes y las diferencias de la varianza de las mediciones entre los sexos concuerdan con lo que la selección sexual predice: debería existir variación en el caracter o caracteres sujetos a elección femenina. (Darwin, 1874; Endler, 1983).

El fenómeno de iridiscencia puede servir para resaltar o amplificar ornamentos o pautas de comportamiento pues puede producir brillo intermitente creando una coloración temporal y haciendo conspicuo un comportamiento o desplante (Meadows *et al*., 2009). Por ejemplo, los cangrejos del género *Ovalipes* habitan en la porción de la columna de agua donde permanece el espectro azul (la más superficial) y presentan iridiscencia paralela a la superficie del agua. Este mecanismo es fundamental en la comunicación intraespecífica de esta especie, además de que sus individuos utilizan la reflectancia para mantenerse ocultos de sus depredadores al camuflarse con los colores reflejados por el agua (Parker *et al*., 1998). Conspicuidad y camuflaje simultáneos es algo que también podría estar ocurriendo durante el cortejo de los machos de *X. variata*. Por ejemplo, recientemente se ha obtenido evidencia de que los machos pueden producir destellos de luz durante pautas de cortejo (Fascinetto-Zago, 2018, datos no publicados). Esta observación coincide con lo que Juárez (2015) reportó: el brillo es la característica de las escamas iridiscentes de los machos de *X.*

variata que retiene la atención de las hembras. En el trabajo que aquí presento, encontré que la reflectancia y el brillo máximos de las escamas iridiscentes de *X. variata* se alcanzan cuando la luz incide sobre ellas a un ángulo de 90° sobre el cuerpo del pez. Los valores alcanzados de reflectancia con ese ángulo superaron en más de 165% a los demás ángulos, y aún más (325%) para los valores del brillo. Entonces, los destellos de luz reportados por Fascinetto-Zago podrían ocurrir con el pez orientado a este ángulo respecto de la fuente luminosa. Sin embargo, para que la luz incida sobre las escamas en este ángulo y alcancen estos valores, el pez tendría que rotar sobre su eje longitudinal y mostrar uno de sus flancos directamente a la fuente luminosa. Es lo que parece ocurrir (Azcué, comunicación personal) en pautas del cortejo de los machos de *X. variata* que no se habían descrito previamente por otros autores (Fitzimons, 1972; Fitzimons 1976; Salazar-Bautista *et al.,* 2018). Después del ángulo de incidencia de la luz a 90° (respecto a la normal), 35° y 45° fueron los ángulos que más brillo produjeron. En cambio, 75° y 45° (respecto a la normal) fueron los ángulos con los que se logró alcanzar el porcentaje más grande de reflectancia. Estos resultados sugieren que la utilización óptima de las características colorimétricas de las escamas podría variar dependiendo del contexto en el que se encuentren los peces. Así, podrían producir destellos de luz en ciertas pautas, o atenuar su brillo en otras durante el cortejo.

Los espectros obtenidos de las escamas iridiscentes de *X. variata* muestran características de coloración direccional en el rango espectral UV y de coloración difusa en el rango visible, propiedades comunes de los espectros producidos por reflectores multicapa (Osorio y Ham, 2002; Kinoshita *et al*., 2008). Los reflectores multicapa con 5 o más láminas igualmente espaciadas pueden producir espectros con uno o múltiples picos con un porcentaje de reflectancia alto, mientras que un reflector con menos de 5 láminas puede

producir picos amplios con un porcentaje de reflectancia bajo (Land, 1972). Esto me lleva a sugerir que el color iridiscente metálico de las escamas iridiscentes de *X. variata*, posiblemente sea producido por un reflector multicapa de más de cinco láminas, ya que esta nanoestructura puede producir espectros similares a los reportados anteriormente. La hipótesis está apoyada también por la relación lineal positiva que encontré entre la longitud de onda a la cual se alcanza la reflectancia máxima y el ángulo de incidencia de la luz, como la reportada por Land (1972). Además, es común que cuando un espectro presenta un pico de reflectancia en UV, éste vaya acompañado de reflexión en longitudes de onda más largas (Siebeck, 2014), lo cual concuerda con la clase de espectros de reflectancia encontrados en las escamas iridiscentes de *X. variata*. A pesar del apoyo que estos argumentos pueden dar a la hipótesis que planteo, cabe advertir que la medición de los espectros se realizó sobre las escamas de peces vivos; y aunque el color completo del pez es producido principalmente por cromatóforos, también está determinado por la suma del color de sus tejidos y fluidos corporales (Noguera *et al*., 2015). Por lo tanto, esta hipótesis acerca de la naturaleza de las nanoestructuras debe tomarse con reserva hasta que un procedimiento de microscopía electrónica la corrobore. En este mismo sentido, sería prudente hacer un análisis comparativo entre las características colorimétricas de las escamas iridiscentes y las que no lo son, así como evaluar el aporte de los otros cromatóforos a los espectros de reflectancia obtenidos.

Por otra parte, se sabe que los cambios en el ambiente acuático como el incremento de turbiedad inducidos por la actividad humana pueden tener efectos dañinos en el sistema de apareamiento de los peces que los habitan. Se conoce que conforme aumenta la turbiedad disminuye la cantidad de luz que puede penetrar la columna de agua, lo que deteriora el

ambiente visual. Estas condiciones afectan especialmente a aquellas especies de peces con un sistema de apareamiento basado en señales visuales, pues alteran los caracteres que se encuentran bajo la fuerza evolutiva de la selección sexual (Utne-Palm 2002; Engström-Öst y Candolin, 2007). Algo similar podría estar ocurriendo con los peces *X. variata*. En uno de sus ambientes naturales (Laguna de Yuriria, Guanajuato) se ha registrado un incremento dramático en el número de lirio que parece estar asociado con el decremento en el número de individuos en la zona (observación personal, 2017). Estas condiciones podrían tener un efecto negativo en la variación de las características del color de las escamas iridiscentes y en la disminución poblacional de estos peces. Si así fuera, cobraría relevancia analizar las características espectrales de individuos de *X. variata* silvestres y compararlas con los individuos en cautiverio a lo largo del tiempo. Esta comparación permitiría saber si las condiciones adversas del hábitat incrementan la presión de selección sexual en dicho carácter.

Como la coloración mostrada por los animales resulta de un compromiso entre cripsis y comunicación (Champ y Vorobyev, 2016), sería interesante profundizar en la diferenciación de las características colorimétricas que implica el pico de reflectancia amplio encontrado en el espectro de los machos. Podría aprovecharse la oportunidad para analizar también otras características de los espectros de reflectancia tal como la variación del tono, y combinarlos con experimentos de comportamiento donde los peces interactúen con sus conespecíficos en condiciones donde las características colorimétricas de sus escamas hayan sido modificadas.

7.2. Microscopía

El integumento de los peces puede dividirse en epidermis y dermis. La dermis a su vez se compone por el *stratum spongiousum* (más externo) y el *stratum compactum*. En el *stratum spongiosum* se encuentran las escamas y los cromatóforos, los cuales pueden ser de diferente tipo según la coloración y/o los patrones de color del pez. El análisis que realicé con la asistencia del Biólogo José Luis Córdoba a las escamas iridiscentes extraídas de un pez muerto de *X. variata* reveló que el pez perdió su brillo pero no su color al retirar la capa externa del integumento. Por lo tanto, es posible que exista otro tipo de cromatóforos debajo de los iridóforos, en capas más internas del *stratum spongiosum*, que genere el color completo del pez y que pueda tener una relación con las características colorimétricas de las escamas iridiscentes. Por ejemplo, el salmón *Oncorhynchus kisutch* posee un arreglo de cromatóforos que le permite un cambio de color de oscuro a brillante cuando cambia de ambiente (e. g. de aguas profundas a la superficie) cuando alcanza la etapa adulta y migra. Este cambio de color es producido como una respuesta a las variaciones en las concentraciones de sodio y potasio que producen agregación de pigmentos tanto en los xantóforos como en los melanóforos. De esta forma ocurre el paso selectivo de longitudes de onda debido a la absorción y reflexión selectivas de aquellas por los pigmentos al través de dichos cromatóforos. Posteriormente, la luz atraviesa las estructuras en los iridóforos originando que el color reflejado se sintonice en función de las longitudes de onda que inciden sobre estas células (Hawkes, 1974).

Un cambio similar ocurre en el caso de *Oreochromis niloticus*. En esta especie los pigmentos contenidos en los eritróforos de su integumento se agregan y disgregan en respuesta a cambios en la longitud de onda que incide en ellos. Con esta transformación

logran una coloración roja en la época de apareamiento durante la cual el número de eritróforos se incrementa (Oshima y Yokozeki, 1999). En cambio, los calamares de la especie *Doryteuthis opalescens* exhiben un mecanismo de iridiscencia sintonizable que, es producido por reflectores multicapa de láminas de guanina y espacio extracelular. En este caso el cambio de color ocurre en respuesta al neurotransmisor Acetilcolina, el cual genera una cascada de señalización que provoca la condensación de las proteínas reflectantes. Esto, a su vez, provoca una disminución en el volumen celular y expulsión de agua, provocando un incremento en el brillo. Este cambio es reversible cuando el efecto del neurotransmisor cesa, provocando que el brillo disminuya nuevamente. Es probable que este proceso lo utilicen para camuflarse. En *X. variata*, los machos exhiben sus escamas iridiscentes durante desplantes de amedrentación a rivales (Salazar-Bautista *et al*., 2018), y se ha observado que las partes laterales de su cuerpo se tornan más obscuras durante estos desplantes. Esta podría ser una estrategia que ellos usan para resaltar su brillo.

Como resultado de la combinación de cromatóforos los animales pueden generar patrones de coloración que pueden tener características brillantes o iridiscentes (Goda *et al*., 2013). En el caso de los peces que presentan iridiscencia, son reflectores multicapa las nanoestructuras que hasta ahora se han reportado como las responsables del fenómeno (Kuriyama *et al*., 2017), tal es el caso de *Chromis viridis* (Fujii *et al*., 1989) y *Paracheirodon innesi* (Oshima y Nagaishi, 1992).

Si bien no me fue posible obtener las micrografías que mostraran la nanoestructura responsable de la iridiscencia de las escamas brillantes de *X. variata*, las características de las distribuciones espectrales de la reflectancia indican que un reflector multicapa posiblemente sea la estructura responsable. Las distribuciones espectrales que obtuve

ciertamente coinciden con las reportadas para este tipo de estructuras laminares (Osorio y Ham, 2002). Sin embargo, no será posible corroborarlo hasta obtener un análisis morfológico con el cual además, se pueda determinar si existen otro tipo de cromatóforos involucrados en la producción de la iridiscencia y el brillo de estas escamas. Características como el número de láminas en el reflector, la orientación, el material y grosor de éstas determinan las longitudes de onda a las cuales se sintoniza la reflectancia máxima alcanzada (Fujii, 1993).

No obstante, pude realizar un análisis morfológico de las escamas usando el microscopio confocal del Instituto de Fisiología. El análisis reveló que las escamas de *X. variata* tienen características que corresponden a la morfología de una escama ctenoidea (ver más abajo), con un grosor de 200 µm y dientes en forma de peineta en su borde inferior. En cuanto a su morfología, existen tres tipos de escamas en los peces: i) Placoidea, son las más primitiva, típicas en tiburones, y compuestas de pulpa dentaria de marfil y esmalte, lo cual les brinda una textura de lija; ii) Cicloideas, son escamas de espesor grande con forma de rombo o elipsis y se recubren con un esmalte brillante. Características por las cuales sus portadores las utilizan como una coraza protectora y; iii) Ctenoideas, son escamas similares en forma a las cicloideas pero presentan "dientes" a modo de peineta en su borde inferior (Sierra *et al*., 2011). Este es el tipo de escama más común en los peces (Sierra *et al*., 2011; Noguera *et al*., 2015).

El mismo análisis morfológico reveló que las escamas presentan autofluorescencia al incidir sobre ellas longitudes de onda de 405, 488 y 561 nm, emitiendo luz en rangos de 417-477 nm, 505-550 nm y 570-más de 800 nm, respectivamente. En células de mamíferos la autofluorescencia cuando se presenta es heterogénea y su intensidad está determinada por

el tipo específico de célula que la presenta (Xiao, 2009). Da costa *et al*., (2005) encontraron que la mitocondria y los lisosomas son los organelos de células epiteliales de humanos que principalmente presentan autofluorescencia. En cuanto a los peces, se sabe que la composición química de las escamas varía entre especies. Por ejemplo, Tang *et al*. (1997) encontraron variación en la presencia y concentración de Fe, Mn, Zn, Cu, Ca, Sr, Ni, As, Br, Be, en diferentes especies. Estos metales podrían estar participando en la producción de fluorescencia ya que todos son agentes quelantes que pueden interactuar fácilmente con riboflavinas, compuestos de anillo cíclico y colágeno emiten fluorescencia. Estos compuestos absorben luz en longitudes de onda que varían en un rango de 355 a 488 nm y emiten un fulgor en un rango de 350-600 nm (Xiao, 2009). Debido a esto, una posible explicación de la fluorescencia encontrada es que tales moléculas estén presentes en algunos organelos o como catalizadores en algunas cadenas metabólicas en las células del integumento de *X. variata*. Como resultado podrían producir fluorescencia sintonizada a diferentes longitudes de onda dependiendo del elemento particular que estuviese participando.

Aunque por otra parte, la fluorescencia encontrada en las escamas de *X. variata* podría estar funcionando como un tipo de señal de color. Arnold *et al*. (2002) encontraron justamente esto con el plumaje de la corona y mejillas del periquito australiano *Melopsittacus undulatus*; estos caracteres funcionan como un tipo de señalización sexual fluorescente que, posiblemente sea un indicador honesto de la calidad del individuo que la muestra. En machos del camarón mantis *Lysiosquillina glabriuscula* también se ha reportado que la presencia de algunos puntos fluorescentes incrementan su fulgor durante desplantes hacia machos de la misma especie y depredadores, un cambio que hace parecer

más grandes a los emisores. Además, la intensidad de dicha fluorescencia cambia a diferentes profundidades lo cual parece indicar que, al menos en esta especie, mejora e identifica espectralmente la señal de color (Hazel et al., 2004). Algo así ocurre en la araña *Cosmophasis umbratica*. Lim *et al*., 2007 determinaron que la coloración que presentan individuos de esta especie en rangos UV y fluorescencia es un componente crucial para el cortejo, aunque la señal fluorescente está presente solo en los palpos de las hembras. Sería interesante realizar experimentos de comportamiento donde se explore la posibilidad de que *X. variata* también esté usando señales fluorescentes para comunicar o mejorar un mensaje.

8. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados presentados en este trabajo puedo concluir que las escamas brillantes de *X. variata* presentan iridiscencia, la cual posiblemente es producida por el tipo de nanoestructura conocida como reflector multicapa. El color de estas escamas puede ser sintonizado en un rango amplio del espectro UV-VIS y sus características colorimétricas parecen ser sexualmente dimórficas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Arnold K., Owens I. y Marshall N. 2002. Fluorescent Signaling in Parrots. Science. 295 (5552): 92.

Bisazza A. 1997. Sexual selection constrained by internal fertilization in the livebearing fish *Xenotoca eiseni.* Animal Behaviour 54, 1347–1355.

Bradbury J. W. y Vehrencamp S. L. 2011. Principles of animal communication. 2 ed. Sinauer Associates Inc.

Bowmaker J. 1988. Evolution of colour vision in vertebrates. Eye. 12:541-547.

Champ C. y Vorobyev M. 2016. Colour thresholds in a coral reef fish. Royal Society Open Science. 3: 160399.

Constantino G. y Burt P. 2002. Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish. Behav Ecol Sociobiol. 52:1-6.

Cooke S., Susky S., Kenneth G., Bruce L. y David H. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture. 239: 509-529.

Cummings M., Rosenthal G. y Ryan M. 2003. A private ultraviolet channel in visual communication. Proc. R. Soc. Lond. B. 270: 897-904.

DaCosta R., Andersson H., Cirocco M., Marcon N. y Wilson B. 2005. Autofluorescence characterization of isolated whole crypts and primary cultured human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. Journal of Clinical Pathology. 58: 766-744.

Dakin R. y Montgomerie R. 2009. Peacocks orient their courtship displays towards the sun. Behavioral Ecology and Sociobiology. DOI 10.1007/s00265-009-0717-6.

Endler J. 1983. Natural and sexual selection on color patterns in poecilid fishes. Environmental Biology of Fishes. 9(2): 173-190.

Engström-Öst J. y Candolin U. 2007 Human-induced water turbidity alters selection on sexual displays in sticklebacks. Behavioral Ecology. 18: 393-398.

Fascinetto-Zago P. 2018. Optimización del comportamiento de cortejo de los machos *Xenotoca variata* en función de la luz ambiental. Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

Fitzsimons J. 1972. A revision of two genera of goodeid fishes (Cyprinodontiformes, Osteichthyes) from the mexican plateau. Copeia. 728-756.

Fitzimons J. 1976. Ethological Isolating Mechanisms in Goodeid Fishes of the Genus *Xenotoca* (Cyprinodontiformes, Osteichthyes). Bulletin of the Southern California Academy of Sciences. 75 (2): 84-99.

Fujii, R., Kasukawa, H., Miyaji, K. y Oshima, N., 1989. Mechanisms of skin coloration and its changes in the blue-green damselfish, *Chromis viridis*. Zool. Sci. 6,477–486.

Fujii, R., 1993. Cytophysiology of fish chromatophores. Int. Rev. Cytol. 143, 191–255.

Fox J. y Weisberg S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion

Goda M., Fujiyoshi Y., Sugimoto M. y Fujii R. 2013. Novel Dichromatic Chromathopores in the Integumento of the Mandarin Fish *Synchiropus splendidus*. Biol Bull. 224: 14-17.

Hawkes J. 1974. Th estructure of fish skin: II. Chromatophore Unit. Cell Tis. Res. 149: 159-172.

Hazel C., Cronin T., Caldwell L. y Marshall L. 2004. Science. 303 (2): 51.

Heckman C., Roberts L. y Larson A. 2001. Chapter 31: Support, Protection and Movement. En: Heckman C., Roberts L. y Larson A. Integrated Principles of Zoo, 11ª ed. New York, pp.642-643.

Dzhardiemalieva G. y Uflyand I. 2018. Chapter I: General Introduction. En: Chemistry of Polymeric Metal Chelates. Suiza, pp. 1-9.

Juárez, O. 2015. Efecto de la variación de color de las escamas iridiscentes de los machos de Xenotoca variata en la elección de pareja de apareamiento. Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

Jayathilake P., Edirisnghe U. y De Silva D. 2003. Use of Clove Oil to Anesthetize Female Wild Guppy *(Poecilia reticulata)* for a Short Duration. Tropical Agricultural Research. 15: 235-241.

Jordan T., Partridge J. y Roberts N. 2014. Disordered animal multilayer reflectors and the localization of light. J. R. Soc. Interface 11. 20140948. (doi:10.1098/rsif.2014.0948)

Kathryn A., Owens I., Marshall N. 2002. Fluorescent Signaling in Parrots. Science. 295(5552) pp. 92.

Kenne J., Noakes D., Moccia R. y Soto C. 1998. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). Aquaculture Research. 29: 89-101.

Keyser A y Hill G. 2000. Structurally base plumage coloration is an honest signal of quality in male blue grosbeaks. Behav Ecol. 11: 202-209.

Khoo G., Meng Lim T. y Phang V. 2013. Cellular Basis of Iridiscence in the Siamese Fighting Fish *Betta Splendens*. The Israeli Journal of Aquaculture. 65: 1-10.

Kinoshita S., Yoshioka S., Miyazaki J. 2008. Physics of structural colors. Rep. Prog. Phys. 71 (7): 076401.

Kinoshita S. y Yoshioka S. 2005. Structural colors in nature: The role of regularity and irregularity in the structure. Chem. Phys. Chem. 6: 1442 – 1459.

Krebs J. y Davies N. 1993. An introduction to behavioral ecology. Third edition.

Kuriyama T., Esashi J. y Hasegawa M. 2017. Light reflection from crystal platelets in iridophores determines green or brown skin coloration in Takydromus lizards *Takeo*. Zoology. 121: 83-90.

Land MF. 1972. The physics and biology of animal reflectors. Prog. Biophys. Mol. Biol. 24: 75–106.

Lim M., Land M. y Li D. 2007. Sex-Specific UV and Fluorescence Signals in Jumping Spiders. Science 315 (5811): 481.

Losey G. 2003. Crypsis and communication functions of UV-visible coloration in two reef damselfish, *Dascyllus aruanus* and *D. reticulus*. Animal Behaviour. 66: 399-307.

Lowen W. 2005. Difraction gratin handbook. New York, USA. Newport Corporation.

Meadows M., Butler M., Morehouse N., Taylor L., Toomey M., McGraw K., Rutowski R. 2009. Iridescence: views from many angles. J. R. Soc. Interface. 6: S107–S113.

Macías C y Burt T. 2002. Ultraviolet-based female preferences in a viviparous fish. Behavioral Ecology and Sociobiology 52:1-6.

Meadows M., Morehouse N., Rutowski R., Douglas J., McGraw K. 2011. Quantifying iridescent coloration in animals: a method for improving repeatability. Behav. Ecol. Sociobiol. 65:1317–1327.

Moyaho A. 2002. The role of sexual and natural selection in phenotypic variation within and amongst goodeid species. Ph. D. Thesis, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Moyaho A., Macias C., Manjarrez J. 2004. Predation risk is associated with the geographic variation of a sexually selected trait in a viviparous fish (*Xenotoca variata*). J. Zool., Lond. 262: 265–270.

Noguera P. Ubeda C., Bruno D. y Semenas L. 2015. The Fish Necropsy Manual. En: http://www.necropsymanual.net/en/

Oshima, N. y Nagaishi, H., 1992. Study of the motile mechanism in neon tetra (*Paracheirodon innesi*) iridophores. Comp. Biochem. Physiol. 102A, 273–278.

Oshima N. y Yokozeki A. 1999. Direct Control of Pigment Aggregation and Dispersion in Tilapia Erythrophores by Light. Zoological Science. 16(1):51-54.

Osorio D. y Ham A. D. 2002. Spectral reflectance and directional properties of structural coloration in bird plumage. The Journal of Experimental Biology. 205:2017–2027.

Parker A. 1998. The diversity and implications of structural colours. The Journal of Experimental Biology. 201: 2343–2347.

Parker A., Mckenzie D. y Ahyong S. 1998. A unique form of light reflector and the evolution of signalling in Ovalipes (Crustacea: Decapoda: Portunidae). Proc. R. Soc. Lond. B. 265: 861–867.

Parker A. 2000. 115 millions years of structural colour. J. Opt. A: Pure Appl. Opt. 2: 15-28.

Pandey B. y Mathur V. 2018. Biology of chordates. Delhi, India. PHI Learning Private Limited.

Prum R. y Torres R. 2004. Structural coloration of mammalian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. The Journal of Experimental Biology. 207: 2157-2172.

Prum R. 2006. Anatomy, physics, and evolution of structural colors. En Bird coloration, Vol. 1. 295–353 pp. Harvard University Press.

Land, M. F. (1972). The physics and biology of animal reflectors. Prog. Biophys. Mol. Biol. 24: 75–106.

Rick I. y Bakker T. 2008. Color signaling in conspicuous red sticklebacks: do ultraviolet signals surpass others?. BMC Evolutionary Biology. 8: 189.

Sabol A., Hellmann J., Gray S. y Hamilton I. 2017. The role of ultraviolet coloration in intrasexual interactions in a colonila fish. Animal Behaviour. 131:99-106.

Salazar-Bautista J.L. Beristain-Castillo E., Macías-García C. y Moyaho A. 2018. Male iridiscent colours indicate fighting ability over acces to female in viviparous fish (*Xenotoca variata*). En preparación para ser sometido a revisión y posible publicación.

Schartl M.,Larue L., Goda M., Bosenberg M., Hashimoto H. y Kelsh R. 2015. What is a vertebrate pigment cell?. Pigment cell Melanoma Res. 29: 8-14.

Sierra E., Espinosa de los Monteros A., Real F., Herráez P, Castro P. y Fernández A. 2011. Histología y patología de los peces. Parte I:Biología y necropsia de los peces. Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias. 1:44-51.

Siebeck U. 2014. Capítulo 17: Communication in the Ultraviolet: Unravelling the Secret Language of Fish. En: G. Witzany (ed.), Biocommunication of Animals. Londres. 299-320 pp.

Simon H. The Splendor of Iridiscence. Structural color in the Animal World. Dood, Mead & Company. New York.67-77 pp.

Sladky K.,Swanson C., Stoskopf M., Loomis M. y Lewbart G. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). American Journal of Veterinary Research. 62(3): 337-342.

Stavenga D. 2014. Thin film and multilayer optics cause structural colors of many insects and birds. Proceedings 1S: 109-121.

Utne-Palm AC. 2002. Visual feeding of fish in a turbid environment: physical and behavioural aspects. Mar Freshwater Behav Physiol. 35:111–128.

Tang S. Orlic I., Yu K., Sanchez J., Thong P., Watt F. y Khoo H. 1997. Nuclear instruments and Methods in Physics Research B. 130: 396-401.

Vázquez G., Castro T., Hernández A., Castro J. y De Lara R. 2013. Comparación del efecto anestésico del aceite de clavo, solución salina y solución coloidal en juveniles de *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894). Archivos de Medicina Veterinaria. 45: 59-66.

White T. 2018. Illuminating the Evolution of Iridescence. Trends in Ecology and Evolution. 33(6): 374-375.

Vinther J., Briggs D., Clarke J., Mayr G. y Prum R. 2010 Structural coloration in a fossil feather. Biology Letters. 6: 128-131.

Xiao J. 2009. Single-Molecule Imaging in Live Cells. En Hinterdorfer P. y van Oijen A. (Ed.), Handbook of Single-Molecule Biophysics. (pp 43-85). New York. Springer.

Yin H., Shi L., Sha J., Li Y., Qin Y., Dong B., Meyer S., Liu X. y Zhao L. 2006. Iridiscence in the neck feathers of domestic pigeons. Physical Review E. 74(051916):1-6.

10. APÉNDICE

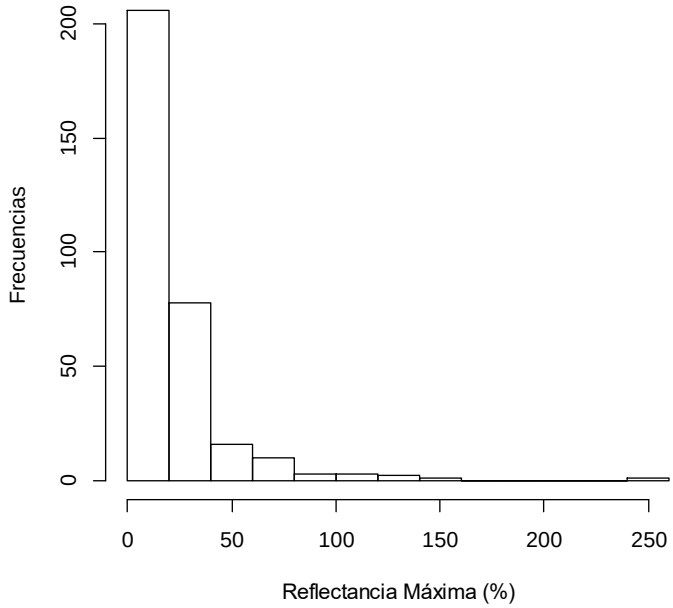

Figura A1. Histograma de los datos de reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes de X. *variata*.

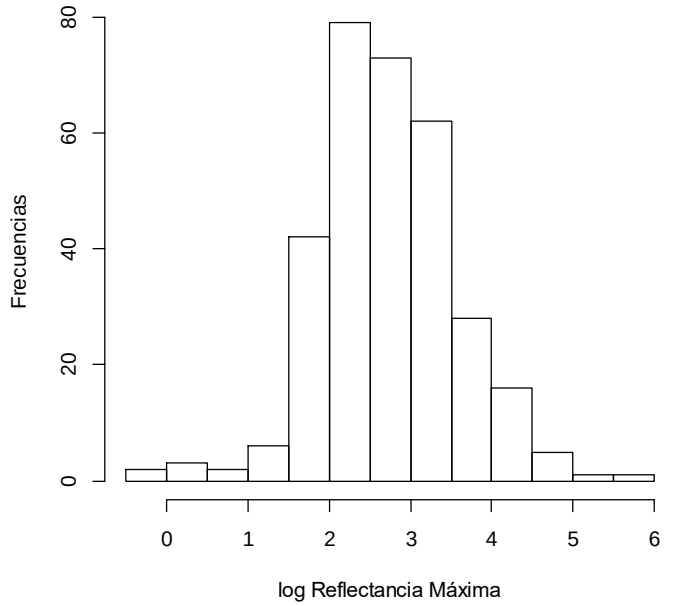

Figura A2. Histograma de los datos logarítmicos de la reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes de *X. variata*.

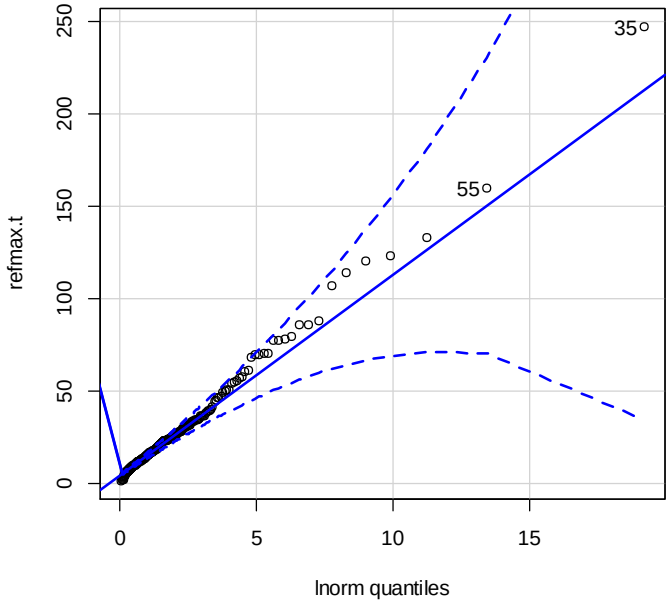

Figura A3. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos de reflectancia máxima (refmax.t) de las escamas brillantes de *X. variata* en función a los cuantiles de la reflectancia máxima ajustados a una distribución log-normal (lnorm quantiles). Se aprecia que todos los datos permanecen dentro de las bandas de confianza (líneas punteadas).

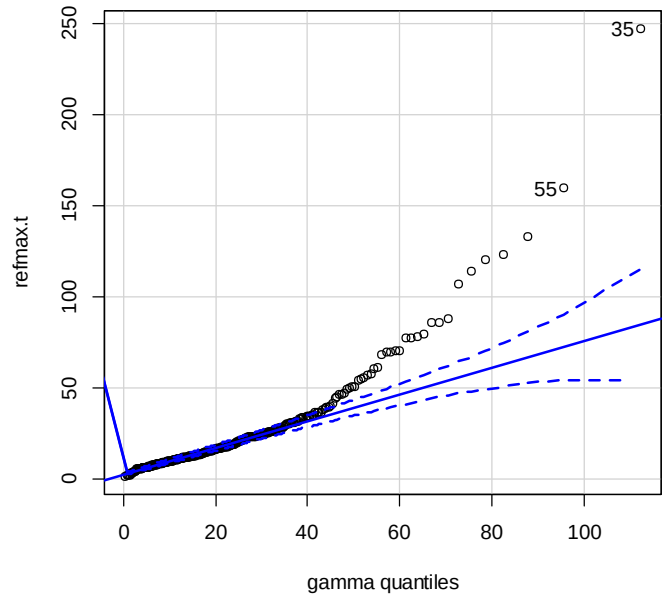

Figura A4. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos de reflectancia máxima (refmax.t) de las escamas brillantes de *X. variata* en función a los cuantiles de la reflectancia máxima ajustados a una distribución gamma (gamma quantiles). Se observa que al menos la mitad de los datos salen de las bandas de confianza (líneas punteadas).

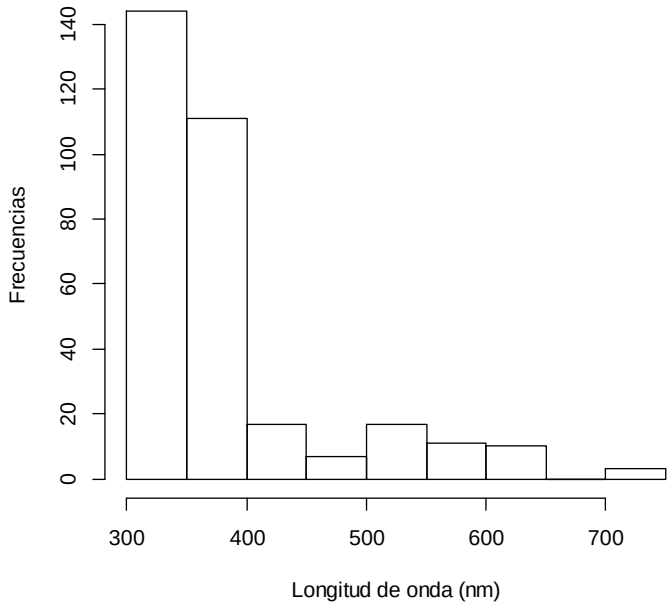

Figura A5. Histograma de los datos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de X. *variata* alcanzan su reflectancia máxima.

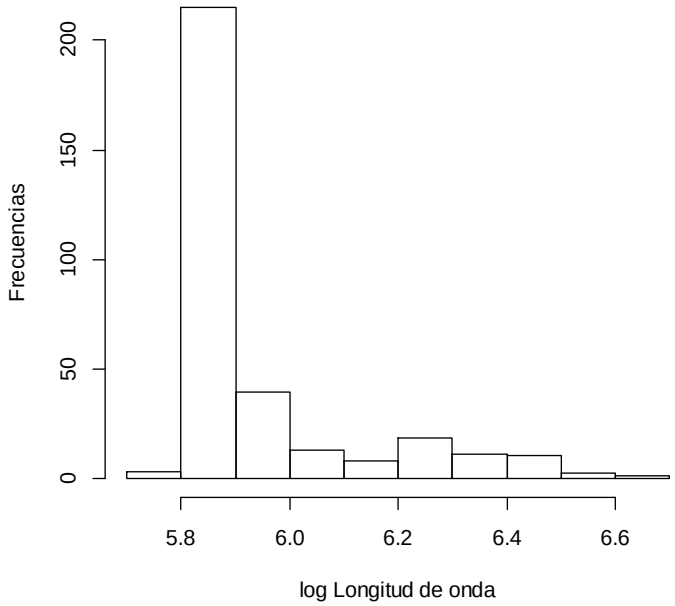

Figura A6. Histograma de los datos logarítmicos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de *X. variata* alcanzan su reflectancia máxima.

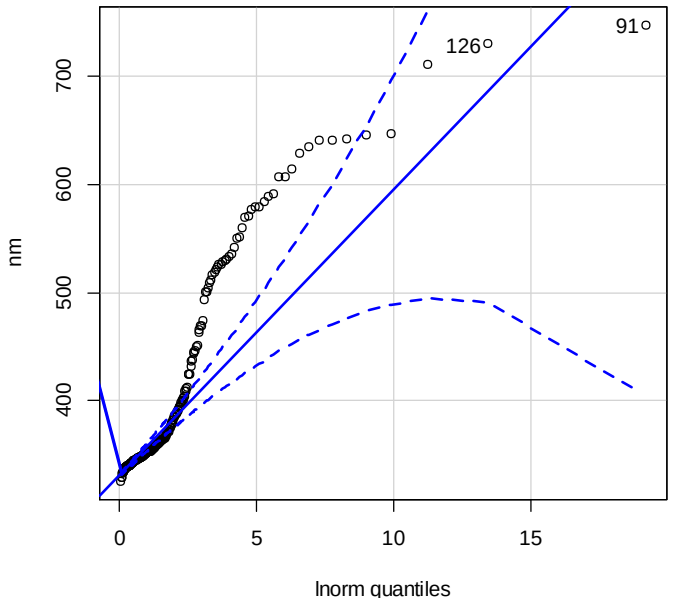

Figura A7. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de *X. variata* alcanzan su reflectancia máxima en función a los cuantiles de los mismos datos ajustados a una distribución log-normal (lnorm quantiles). Se aprecia que la mayoría de los datos salen de las bandas de confianza (líneas punteadas).

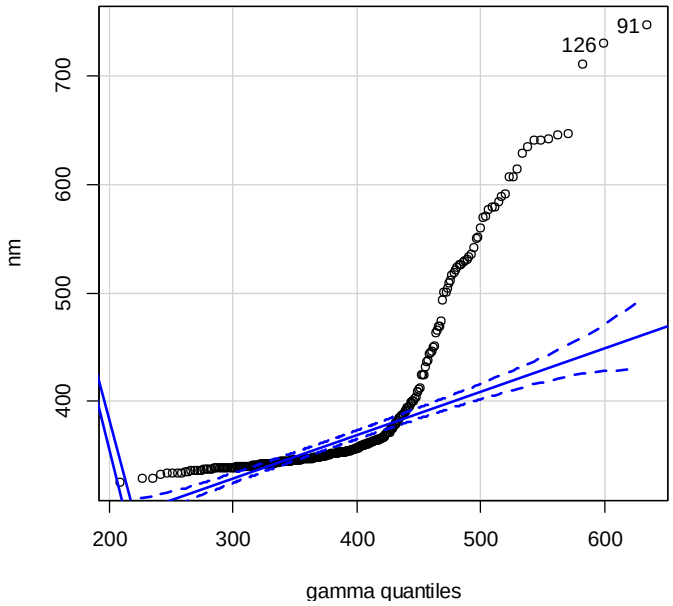

Figura A8. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de *X. variata* alcanzan su reflectancia máxima en función a los cuantiles de los mismos datos ajustados a una distribución gamma (gamma quantiles). Se observa que la mayoría de los datos salen de las bandas de confianza (líneas punteadas).

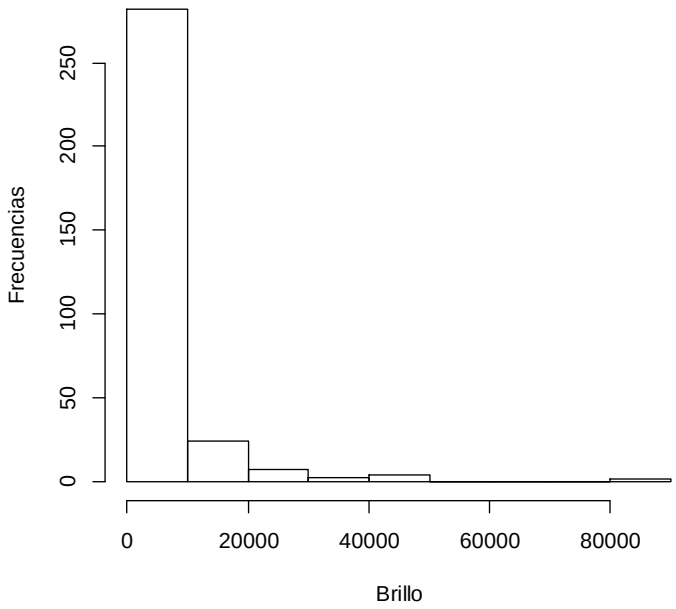

Figura A9. Histograma de los datos de brillo de las escamas brillantes de *X. variata*.

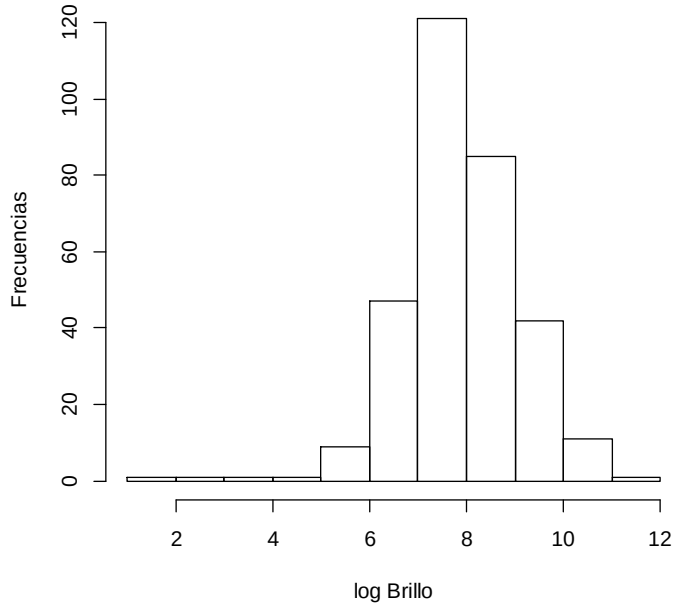

Figura A10. Histograma de los datos logarítmicos del brillo de las escamas brillantes de *X. variata*.

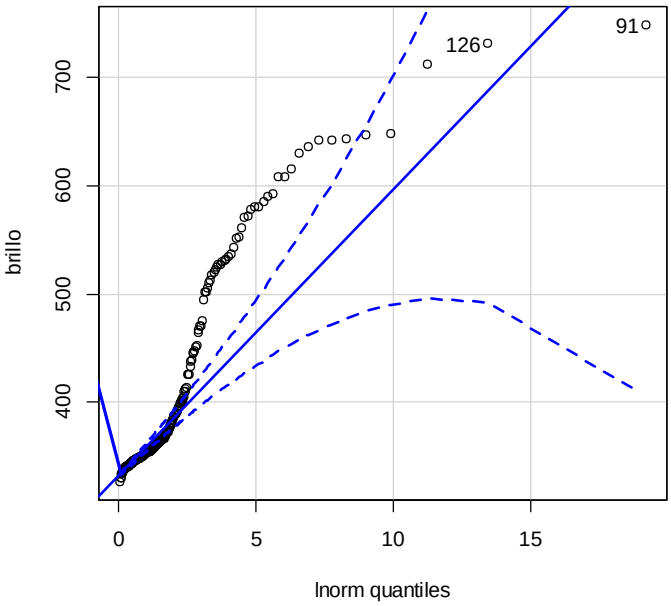

Figura A11. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos del brillo total de las escamas en función a los cuantiles de los datos del brillo total de las escamas brillantes de *X. variata* ajustados a una distribución log-normal (lnorm quantiles). Se aprecia que la mayoría de los datos salen de las bandas de confianza (líneas punteadas).

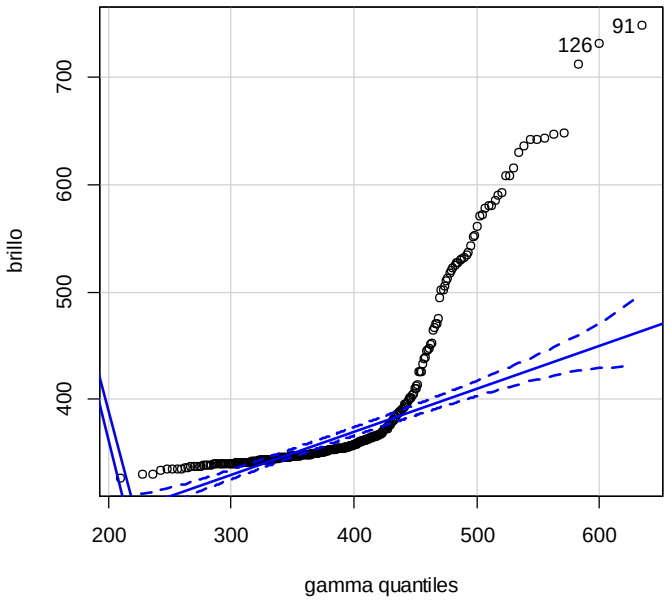

Figura A12. Gráfica cuantil-cuantil que muestra los datos del brillo total de las escamas brillantes de *X. variata* en función a los cuantiles de los mismos datos ajustados a una distribución gamma (gamma quantiles). Se observa que la mayoría de los datos salen de las bandas de confianza (líneas punteadas).

Tabla A1. Resumen de la simplificación del modelo lineal mixto para el análisis de los datos de la reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes de *X. variata*.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik[1]	Valor de p
Modelo máximo	gen*ang+bloq/pez/esc	14	-365.65	
1	Ang+gen+bloq/pez/esc	10	-367.1	0.57
2	ang+bloq/pez/esc	9	-368.15	0.1463
3	gen+bloq/pez/esc	5	-393.58	<0.0001

[1]logLik, tasa de máxima verosimilitud.

[2]gen, género (machos y hembras); ang, tratamientos (ángulo de incidencia de la luz: 25°, 35°, 45°, 55° y 90°); bloq, bloque; esc, escama. El símbolo (+) representa la inclusion de la variable explicatoria, el símbolo (*) representa la interacción entre las variables y el símbolo (/) indica la anidación de los factores (i.e. el factor escamas está anidado en el factor pez y éste a su vez está anidado en el factor bloque).

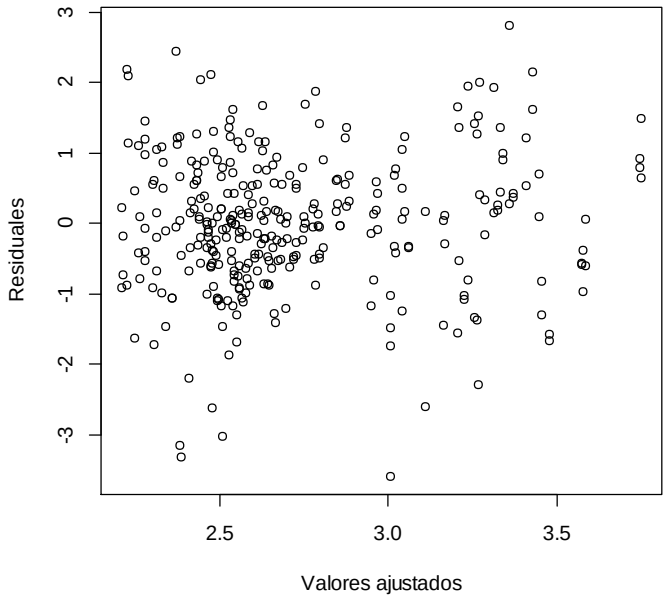

Figura A13. Residuales en función de los valores ajustados del modelo mínimo adecuado utilizado para la evaluación de las diferencias de la reflectancia máxima alcanzada por las escamas brillantes de *X. variata* en función a la variación del ángulo de incidencia de la luz. No se aprecia ningún patrón aparente.

Tabla A2. Resumen de la simplificación del modelo lineal mixto para el análisis de los datos de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes alcanzan su reflectancia máxima.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik[1]	Valor de p
Modelo máximo	gen*ang+bloq/pez/esc	14	-472.73	
1	Ang+gen+bloq/pez/esc	10	-474.12	0.59
2	ang+bloq/pez/esc	9	-475.38	0.1122
3	gen+bloq/pez/esc	5	-513.31	<0.0001

[1]logLik, tasa de máxima verosimilitud.

[2]gen, género (machos y hembras); ang, tratamientos (ángulo de incidencia de la luz: 25°, 35°, 45°, 55° y 90°); bloq, bloque; esc, escama. El símbolo (+) representa la inclusión de la variable explicatoria, el símbolo (*) representa la interacción entre las variables y el símbolo (/) indica la anidación de los factores (i.e. el factor escamas está anidado en el factor pez y éste a su vez está anidado en el factor bloque).

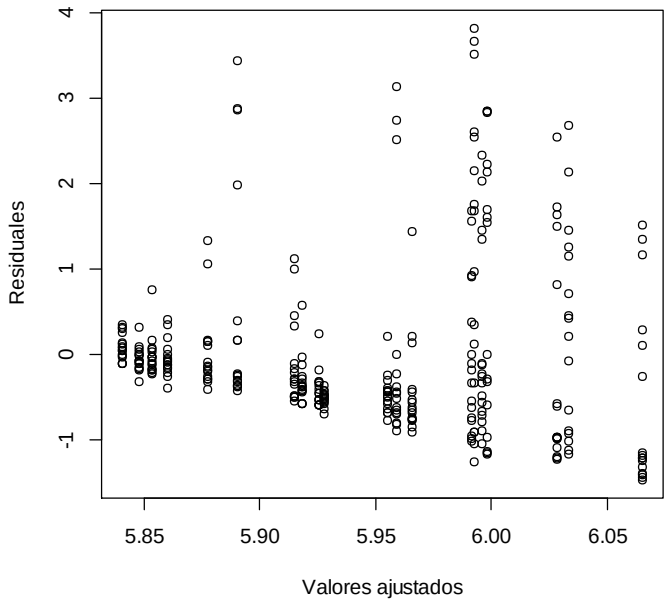

Figura A14. Residuales en función de los valores ajustados del modelo mínimo adecuado utilizado para la evaluación de las diferencias de la longitud de onda a la cual las escamas brillantes de *X. variata* sintonizan su $\lambda_{máx}$ en función a la variación del ángulo de incidencia de la luz. No se aprecia ningún patrón aparente.

Tabla A2. Resumen de la simplificación del modelo lineal mixto para el análisis de los datos del brillo total de las escamas brillantes de *X variata*.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik[1]	Valor de p
Modelo máximo	gen*ang+bloq/pez/esc	14	127.45	
1	Ang+gen+bloq/pez/esc	10	124.83	0.2645
2	ang+bloq/pez/esc	9	124.17	0.25
3	gen+bloq/pez/esc	5	105.44	<0.0001

[1]logLik, tasa de máxima verosimilitud.

[2]gen, género (machos y hembras); ang, tratamientos (ángulo de incidencia de la luz: 25°, 35°, 45°, 55° y 90°); bloq, bloque; esc, escama. El símbolo (+) representa la inclusion de la variable explicatoria, el símbolo (*) representa la interacción entre las variables y el símbolo (/) indica la anidación de los factores (i.e. el factor escamas está anidado en el factor pez y éste a su vez está anidado en el factor bloque).

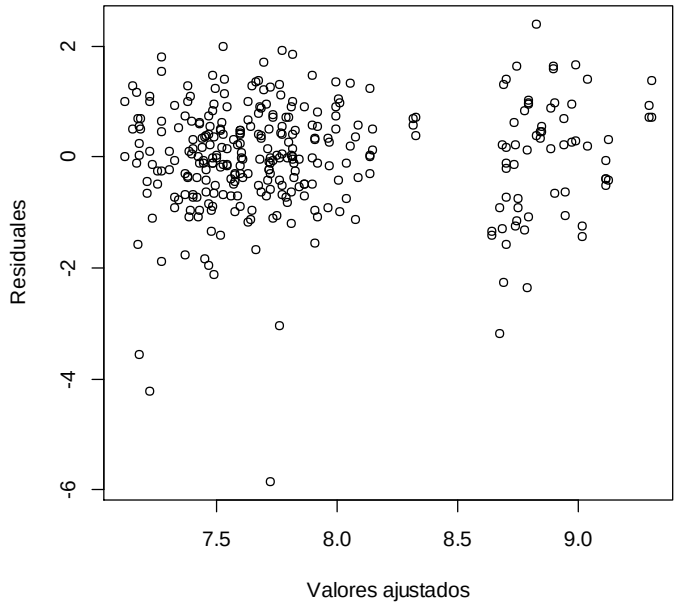

Figura A15. Residuales en función de los valores ajustados del modelo mínimo adecuado utilizado para la evaluación de las diferencias del brillo total de las escamas brillantes de *X. variata* sintonizan. No se aprecia ningún patrón aparente.