



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE ECOLOGÍA DE
LA CONDUCTA

**“CARACTERIZACIÓN DE LA VISIÓN A COLOR DE *Xenotoca
variata*”**

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Daniel Obed de la Rosa Paredes

Director de tesis:

Dr. Alejandro C. Moyaho Martínez

Co-director de tesis:

M.C. Óscar E. Juárez Mora

Asesores:

Dra. Amira Flores Urbina

Dra. Alejandra Escobar Noriega

Puebla, Pue, febrero 2020

ÍNDICE

1.RESUMEN	4
2.INTRODUCCIÓN	5
2.1. Fisiología de la visión	5
2.2. Visión del color.....	8
3.ANTECEDENTES	10
3.1 Antecedentes generales	10
3.1.1 Estudios sobre la visión a color en animales	10
3.2 Antecedentes específicos	13
3.2.1 <i>Xenotoca variata</i> y su visión de color	13
4.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4.1. Hipótesis y predicciones	14
5.OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6.MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Peces experimentales	18
6.2 Pecera experimental.....	18
6.3 Alimento de recompensa.....	19
6.4 Placas para entrenamiento y discriminación.....	19
6.5 Diseño experimental	21
6.6 Programa de entrenamiento	24
6.7 Pruebas de discriminación	26
6.8 Medición de la longitud estándar.....	26
6.9 Análisis estadístico	27
7.RESULTADOS	28
7.1 Entrenamiento	28
7.2 Láminas tipo Ishihara	29
7.3 Pruebas de discriminación	31
8.DISCUSIÓN	34
8.1 Condicionamiento	34
8.2 Láminas ishihara y pruebas tipo Ishihara.....	35
8.3 Pruebas de discriminación.....	36

9. CONCLUSIÓN	38
10. BIBLIOGRAFÍA	39
11. APÉNDICES	42
Apéndice 1. Hojas de registro utilizadas en el entrenamiento y las pruebas de discriminación	42
Apéndice 2. Muestra de los 10 tratamientos utilizados	44
Apéndice 3. Medidas de reflectancia para las 10 placas utilizadas	47

1. RESUMEN

Xenotoca variata es un pez endémico de México que se caracteriza por poseer escamas iridiscentes, estas escamas son utilizadas por los machos para atraer a las hembras. Las escamas iridiscentes reflejan la luz en el espectro visible y en el espectro ultravioleta, por lo que algún tipo de visión a color les sería necesario a estos peces para ver estas características de sus propias escamas.

Para discernir que tipo de visión a color de tiene *X. variata* entrené a 32 peces para realizar una prueba donde debían comparar dos colores distintos y escoger uno para obtener una recompensa en aliemento. La prueba que realizaron estos peces fue la prueba tipo Ishihara, que consiste en una placa con un patrón de círculos en el que uno es de color distinto a los demás. Los colores utilizados fueron escogidos con base en la pruebas de Ishihara utilizadas en los humanos y prueban si el individuo tiene un tipo de cono específico en su retina.

Los resultados indicaron que los peces de *X. variata* pudieron pasar todas las pruebas de colores, lo que indica que tanto machos como hembras tienen al menos una visión tricromática. aunque hubo diferencias entre la proporción de aciertos para algunos de los colores de ciertas pruebas, lo que indica que su visión a color es distinta a la del ser humano. Además de que se necesitan pruebas futuras para saber si poseen una visión tetracromática. Estos resultados son un primer acercamiento a describir la fisiología de la visión a color de esta especie y de sus capacidades cognitivas.

2. INTRODUCCIÓN

El sentido de la visión es un canal de información que ha evolucionado en numerosos grupos de animales. Éstos perciben el mundo por medio de pistas y señales visuales que varían en movimiento, forma, luminosidad y particularmente en su matiz (i.e., color). La visión de colores permite a los animales recibir información variada de su ambiente, como encontrar una pareja para aparearse, el alimento para crecer y evitar a los depredadores potenciales. Por ejemplo, algunas flores presentan patrones de colores que las abejas utilizan para encontrar la ubicación del polen (Manning y Dawkins, 1992). También ciertas especies de primates presentan coloraciones rojas brillantes en sus rostros o genitales que indican su disponibilidad para aparearse (Snowden y cols, 2012).

Xenotoca variata es una especie de pez vivíparo de agua dulce de la subfamilia goodeinae (Parenti, 1981). Los machos de esta especie se caracterizan por poseer escamas iridiscentes de colores diversos. A este respecto, estudios recientes han revelado que probablemente perciben colores (Juárez, 2015). Sin embargo, se desconoce la naturaleza de los mecanismos que producirían tal percepción de colores. En la siguiente sección del texto explicaré cómo se podría descubrir, mediante pruebas de aprendizaje, los mecanismos que permiten a *X. variata* ver colores.

2.1. Fisiología de la visión

La luz está conformada por radiación electromagnética que se propaga por distintos medios como el aire o el agua en forma de ondas que varían en su longitud. La luz entonces se puede caracterizar como longitudes de onda que varían del espectro ultravioleta al infrarrojo. Al conjunto de estas ondas se le conoce como el espectro electromagnético (Goldstein, 2010) (Fig. 1).

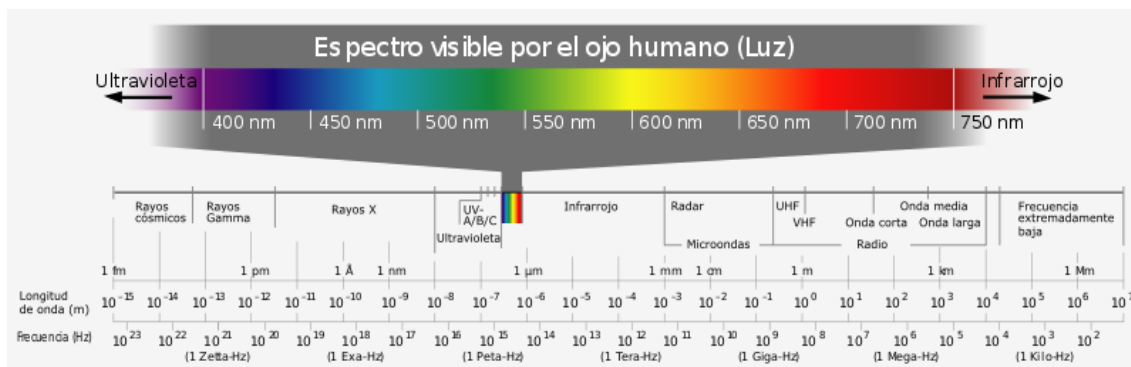


Figura 1. El espectro electromagnético. Imagen que muestra el espectro electromagnético, enfatizando la parte que es visible por el ojo humano (Frank, 2007)

La luz pasa a través del globo ocular y llega a la retina, una red de células fotorreceptoras y neuronas que transforman el estímulo luminoso en potenciales de acción. Estas señales luego son procesadas por estructuras del cerebro para producir las sensaciones visuales que experimentamos los animales.

Los fotorreceptores son las células especializadas sensibles a la luz, aunque solo son capaces de responder a longitudes de onda específicas. Lo hacen gracias a la presencia de proteínas transmembranales llamadas rodopsinas, también conocidas como pigmentos visuales. Éstas se conforman de una parte proteica, la opsina, y una parte no proteica, el 11-cis retinal. El 11-cis retinal cambia su conformación al exponerse a la luz (Fig. 2), lo que desencadena una serie de cambios químicos y eléctricos que inician el procesamiento del estímulo visual que se detalla a continuación (Boron, 2015):

- i) Cuando el fotorreceptor no está expuesto a la luz ocurre un flujo de iones de sodio que entran a la célula y otro de iones de potasio que salen de ella, generando una "corriente oscura";
- ii) La rodopsina cambia su conformación cuando un fotón la activa. Las rodopsinas están acopladas a proteínas G, de tal manera que cuando cambian su conformación inician una "cascada" de señalización;
- iii) Esta cascada de señalización culmina con el cierre, dependiente de GMPc, de los canales de sodio de la membrana del fotorreceptor. El resultado es que la célula se hiperpolariza (Fig. 3);

iv) La hiperpolarización detiene la liberación del neurotransmisor glutamato a través de las subsecuentes células de la retina, lo que provoca que el fotorreceptor detecte un cambio de iluminación.

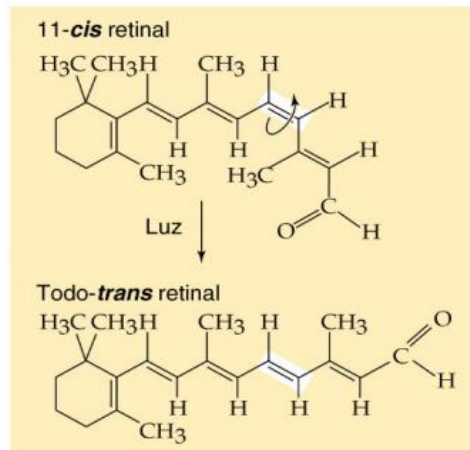


Figura 2. Retinal. Figura que muestra la conformación del 11-*cis* retinal y su cambio de conformación al estado todo-*trans* retinal cuando entra en contacto con la luz. (Boron y Boulpaep, 2015).

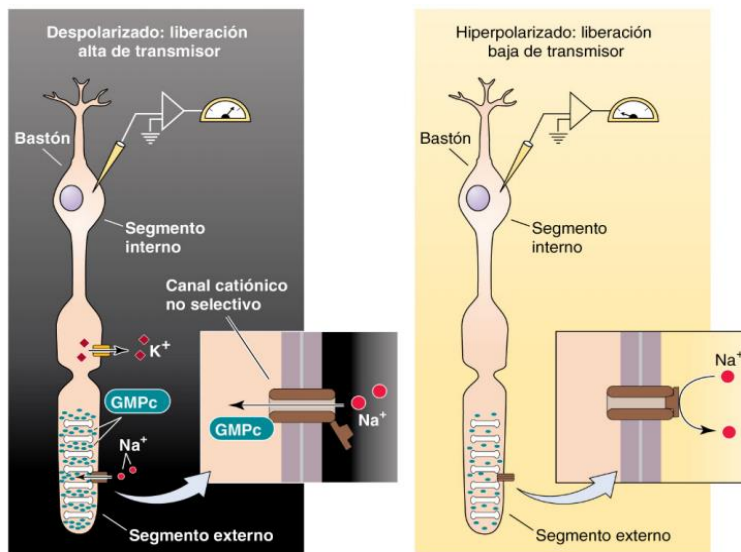


Figura 3. Fototransducción. Figura que muestra el estado de los canales de sodio dependientes de GMPc como resultado de la respuesta a la oscuridad (primera figura) y a la exposición del bastón a la luz (segunda figura) (Boron y Boulpaep, 2015).

La opsina determina la longitud de onda a la que pueden responder estos pigmentos visuales, nombrados en los vertebrados como, SWS1, SWS2, MWS y LWS (Hunt y cols. 2014). La opsina deriva de la acción de 4 genes que

determinan a los residuos de aminoácidos participantes confiriéndole características distintivas (Uturbia, 1999).

Los fotorreceptores de los vertebrados se dividen en dos clases, los conos y los bastones. Cada tipo está especializado para responder a condiciones lumínicas específicas. Así, los bastones responden a la intensidad baja de la luz (i.e., luz crepuscular y de la noche) conocida como escotópica. Los bastones responden muy bien a las diferencias entre los cambios de luminosidad, ya que su pigmento visual recupera rápido su estado basal (Goldstein, 2010). Los conos por su parte son menos y están especializados en responder a la luminosidad brillante o fotópica. También son menos sensibles a los cambios de luminosidad, y son los responsables de la visión de color (Rodieck, 1998).

2.2. Visión del color

Los conos pueden tener distintos pigmentos visuales, por lo que difieren en su sensibilidad a las distintas longitudes de onda (Fig. 1). Por esta razón los conos se clasifican como conos de onda larga (L), media (M), corta (S), y muy corta (VS) (Rodieck, 1998). El rango de las longitudes de onda a las que un cono particular puede responder se conoce como sensibilidad espectral. El espectro visible es el rango de las longitudes de onda que los organismos de una especie pueden percibir.

El color se puede definir como el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos estructuras o campos visuales, del mismo tamaño y forma, con base en la composición espectral de la luz que reflejan (Kelber y cols, 2003).

Hay dos teorías que explican cómo la luz al mezclarse forma colores distintos. Si mezclamos una luz azul (formada por longitudes de onda corta) con una luz amarilla (formada por longitudes de onda largas y medias), se obtiene una luz blanca. La teoría aditiva de la luz explica este resultado asumiendo que las longitudes de onda que forman esas dos luces se suman. Si mezclamos pintura azul y pintura amarilla, obtendremos pintura verde. La teoría subtractiva explica este resultado proponiendo que el pigmento de la

pintura absorbe ciertas longitudes de onda y refleja otras; sólo las longitudes de onda que no son absorbidas por el pigmento son las que se pueden percibir. Por eso, si el pigmento absorbe todas las longitudes de onda, el color percibido es el negro (Goldstein, 2010).

Para caracterizar al color se usan tres propiedades: la luminosidad o brillo, la saturación y el tono o matiz (Kelber y cols, 2003):

- i) La luminosidad es el valor que tiene un color en una escala que cambia del oscuro al claro.
- ii) La saturación se refiere a la similitud que un color tiene con un gris neutral o el blanco.
- iii) El tono se refiere a las diferencias de color que no incluyen la saturación o brillo, y comúnmente es lo que denotamos por términos como rojo, amarillo, verde, etc.

Por lo general, la cantidad de colores que un animal puede distinguir está relacionada con la cantidad de tipos distintos de conos que tenga en su retina. Si un animal tiene un solo tipo de cono en su retina, solo puede detectar la luz en un rango limitado de longitudes de onda. Pero si tiene dos tipos de conos, no solo puede detectar un rango de longitudes de onda más amplio, sino que también puede comparar la información de cada tipo de cono, y percibir las diferencias entre las longitudes de onda como colores distintos. Generalmente, cuanto más tipos de conos haya, mejor se percibirán las diferencias entre dos longitudes de onda, y como consecuencia, ocurrirá la distinción de más colores (Kelber y cols, 2003).

La visión del color, entonces, puede clasificarse con base en el número de conos de distintas sensibilidades espectrales que los animales tienen en sus retinas. Así, hay animales con visión dicromática, como las ardillas (*Spermophilus sp.*) (Kelber y cols, 2003); animales con visión tricromática como los humanos (Goldstein, 2010) y las abejas (*Apis mellifera*) (Kelber y cols, 2003), y animales con visión tetracromática como muchas aves y peces (Kelber y cols, 2003).

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Estudios sobre la visión a color en animales

A pesar de la aparente riqueza de colores del ambiente de muchos animales, el estudio de la visión de color empezó en los humanos. En el siglo XIX se propuso que la visión de color en los humanos se debía a tres tipos de sensores (Urbia, 1999). Esta hipótesis se fundamentó con los experimentos psicofísicos de igualación de color que realizó Hermann von Helmholtz (Goldstein, 2010). En ellos un observador mezclaba luces de distintos colores para tratar de igualar el color que se le presentaba como modelo. Para los observadores fue más sencillo empatar el color correcto con el del modelo cuando usaban 3 luces en vez de 2. Así fue cómo surgió la teoría tricromática para explicar la visión de color. En 1979 James Bowmaker y Herbert Dartnall corroboraron la teoría tricromática por medio del uso de técnicas de microespectrofotometría, y describieron con precisión la sensibilidad espectral de los conos en la retina humana (Bowmaker y Dartnall, 1980).

Se descubrió luego que la deficiencia en la visión a color se asocia con uno de los tres tipos de conos. Al trastorno así producido se le conoce como daltonismo (Goldstein, 2010) en alusión a su descubridor, John Dalton, quien en 1794 describió su propia deficiencia. (Hunt y cols, 1995). En 1918 Shinobu Ishihara publicó una prueba para detectar deficiencias congénitas en la visión de color en humanos. La prueba consiste en una serie de placas de papel; cada placa consiste de un conjunto de círculos que varían de 1 a 5 mm de diámetro, acomodados a su vez en un círculo de 19 cm de diámetro (Fig. 4). Con los círculos pequeños se pueden formar números que una persona sin daltonismo puede distinguir sin problemas. Los círculos que forman los números están coloreados con tonos que una persona con daltonismo percibe como si fueran iguales a los de los círculos que forman el fondo. (Ishihara, 1987).

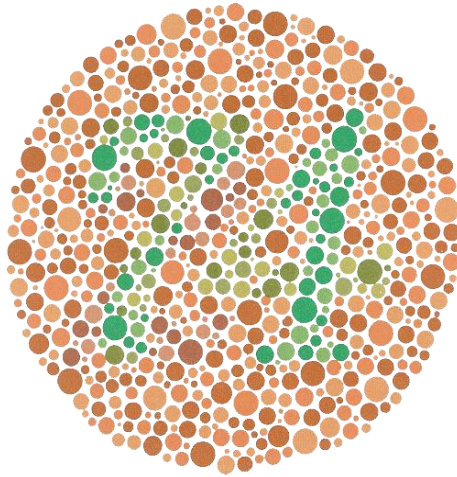


Figura 4. Placa de Ishihara. Placa que muestra el número "74". Una persona con daltonismo no puede distinguirlo. (Ishihara, 1987)

Conforme se adquirió más información sobre los procesos visuales en los humanos, comenzaron a surgir preguntas sobre la posibilidad de que otros animales también percibieran colores. El estudio de la visión de color en animales comenzó por la demostración de su existencia antes de estudiar sus mecanismos neurofisiológicos (Kelber y cols, 2003). Algunos de los primeros experimentos para demostrar la visión a color incluyen a los realizados por John Lubbock quien en 1888 describió, utilizando filtros para luz, la preferencia de *Daphnia sp.* por la luz amarilla (Kelber y cols, 2003), fenómeno conocido como fototaxis.

En la mayoría de los casos se utilizan pruebas conductuales para estudiar la visión de color en los animales (Kelber y cols, 2003), ya que el comportamiento éstos es una manifestación de cómo perciben los estímulos provenientes de las distintas modalidades sensoriales. Sin embargo, tal tipo de pruebas solo permite conocer el grado de percepción del estímulo, pero no los mecanismos internos participantes.

En 1914 Karl von Frisch estudió el comportamiento de búsqueda de alimento en las abejas europeas (*Apis mellifera*). En uno de sus experimentos entrenó a abejas para alimentarse de una solución azucarada que él vertía en cajas de Petri que ponía sobre una tarjeta azul o amarilla. Encontró, luego del

proceso de entrenamiento, que las abejas reconocían el color—entre 30 tonalidades diferentes de grises—asociado con las cajas de alimento.

Otro ejemplo es el trabajo de investigación de Christa Neumeyer (1992) quien concluyó que el pez dorado (*Carassius auratus*) probablemente era tetracromático. Lo consiguió haciendo experimentos en los que utilizó mezclas de luces de colores, también llamadas mezclas aditivas de luz, un procedimiento similar al utilizado por Helmholtz. Entrenó a los peces para que discriminaran entre dos estímulos lumínicos: una luz blanca contra una mezcla de varias longitudes de onda. Cuando la mezcla era de cuatro luces, los peces no podían discriminar entre los dos estímulos; parecía que los percibían como si fueran la misma luz.

Para estudiar los mecanismos internos por los cuales se procesa la información visual del color hay otras técnicas que pueden usarse para tal fin. Éstas se basan en el estudio directo de los pigmentos visuales, lo que permite saber cuántos tipos de conos hay en la retina de los animales. Un ejemplo de estas técnicas es la microespectrofotometría, que mide la respuesta (la absorción) de los pigmentos visuales de los conos a la estimulación de un haz luminoso fino (Urbia, 1999). Otro ejemplo es el uso del electroretinograma, que registra la actividad eléctrica de la retina por medio de electrodos puestos en el ojo del animal (Urbia, 1999). Y en el campo de la biología molecular se pueden estudiar a los genes que codifican la expresión de las opsinas, y con ello saber incluso cómo los pigmentos visuales evolucionaron en las distintas especies. (Kelber y cols, 2003).

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 *Xenotoca variata* y su visión de color

Xenotoca variata (Foto 1) es un pez endémico de México de la subfamilia Goodeinae. Los individuos de esta especie se caracterizan por poseer escamas iridiscentes (Fitzsimons, 1972); los machos las usan para atraer a las hembras, quienes las poseen en mucho menor cantidad (Moyaho y cols, 2004). Algunas poblaciones de *X. variata* viven en cuerpos de agua turbia, como la laguna de Yuriria, Guanajuato, donde una visión eficiente podría ser crucial para identificar a los miembros de la especie, encontrar alimento y detectar a los depredadores potenciales.



Foto 1. *Xenotoca variata* (macho). Fotografía obtenida en el Laboratorio de Ecología de la conducta.

Juárez Mora (2015) encontró que el brillo reflejado por señuelos decorados con estructuras iridiscentes similares a las escamas iridiscentes de *X. variata* atrapaban la atención de las hembras. Puesto que la respuesta varió con los colores que las estructuras reflejaban, pudo concluir que posiblemente los peces de esta especie percibían colores. Estudios recientes (Olmos-Santiago, 2018) refuerzan esta hipótesis e indican que las escamas iridiscentes de *X. variata* tienen la capacidad de reflejar no solo la luz en el espectro visible sino también la ultravioleta.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En conjunto, los estudios realizados en los peces de *X. variata* sugieren que estos peces poseen algún tipo de visión de color, aunque por ahora se desconocen las características que tendría tal visión de color. Saberlo permitiría tener un conocimiento más profundo acerca de su biología, lo que podría contribuir al diseño e implementación adecuados de programas de preservación.

Por lo tanto, en esta tesis propongo abordar la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuántos tipos de conos tendrían los peces de *Xenotoca variata*?

4.1. Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1

Los peces de *Xenotoca variata* tienen una visión tricromática (i.e. 3 tipos de conos diferentes).

Si la hipótesis es cierta, esperararía que se cumplieran las siguientes predicciones:

- i) Un pez entrenado para discriminar diferentes colores diferenciará todos los contrastes de color;
- ii) Un pez no pudiera reconocer diferencias en colores idénticos.

Hipótesis 2

Xenotoca variata tiene una visión dicromática (i.e. 2 tipos de conos diferentes)

Si la hipótesis es cierta, esperararía que se cumplieran las siguientes predicciones:

- i) Un pez entrenado para discriminar diferentes colores diferenciara solo algunos de ellos;
- ii) Un pez no pudiera reconocer las diferencias de colores idénticos.

Hipótesis 3

Xenotoca variata tiene una visión monocromática (i.e. no posee conos)

Si la hipótesis es cierta, esperaríamos que se cumpliera la siguiente predicción:

- i) Un pez entrenado para discriminar diferentes colores no diferenciaría ninguno de ellos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Encontrar el tipo de visión de *Xenotoca variata* mediante pruebas de discriminación de colores.

5.2 Objetivos específicos

- i) Crear un programa de entrenamiento apropiado para los peces de *Xenotoca variata*;
- ii) Crear láminas tipo Ishihara apropiadas para poner a prueba la capacidad de contrastar colores;
- iii) Medir a los peces su capacidad de aprendizaje de colores usando placas tipo Ishihara.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para poner a prueba las predicciones hice una serie de experimentos donde los peces aprendieron a discriminar entre un estímulo objetivo y otros estímulos distractores que variaban en tono o brillo. Para ello utilicé una prueba análoga a las pruebas de Ishihara aplicadas a humanos (Cheney y cols, 2018).

A los peces les mostraba una lámina con un patrón tipo Ishihara. La lámina consiste en círculos coloreados de distintos tamaños y brillos, llamados estímulos distractores y de un círculo de un color diferente al resto (llamado estímulo objetivo; Fig. 5), debajo del cual ponía una recompensa (i.e. alimento). Entrenaba a cada pez del estudio para que aprendiera a escoger el estímulo objetivo (i.e. el círculo de un color distinto), romperlo y obtener el alimento. Seleccionaba el estímulo objetivo de manera aleatoria de entre todos los círculos, siendo el tono del color lo único que diferenciaba al estímulo objetivo de los estímulos distractores. Generé las láminas con patrones tipo Ishihara con una función de Matlab (Versión 9.0.0.321247; Cheney y cols, 2018).

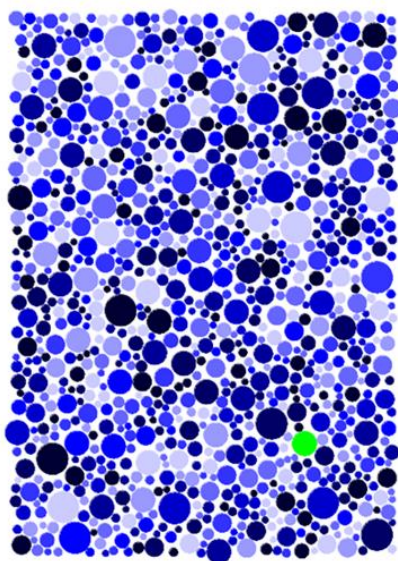


Figura 5. Lámina con un patrón tipo Ishihara. Dibujo que muestra una lámina con círculos de distintos brillos, tamaños v tonalidades. Los estímulos distractores son azules v el estímulo objetivo es verde.

6.1 Peces experimentales

Para los experimentos utilicé a 16 hembras y 16 machos de *Xenotoca variata* que se mantuvieron en peceras en el Laboratorio de Ecología de la Conducta. Los seleccioné de manera aleatoria de una población de 30 hembras y 53 machos adultos de una población criada en las instalaciones del Instituto de Fisiología. El agua de las peceras (25 x 50 x 30 cm) en que fueron alojados los peces se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) y bajo un fotoperiodo de 12 horas (las luces se encienden a las 07 hrs). Los peces eran alimentados dos veces al día con alimento disponible comercialmente.

6.2 Pecera experimental

Para hacer los experimentos utilicé ocho peceras de vidrio (25 x 50 x 30 cm). Cada una tenía dos compartimentos, uno en el que los peces hacían las pruebas (15 x 11 x 30 cm) y otro en el que habitaron el resto del tiempo. Entre los dos compartimentos había una división opaca hecha de acrílico (25 x 20 cm) con una compuerta removible de 6 x 20 cm. La compuerta, que estaba colocada en medio de la división, permitía a los peces pasar de un compartimento al otro durante las pruebas (Fig. 6).

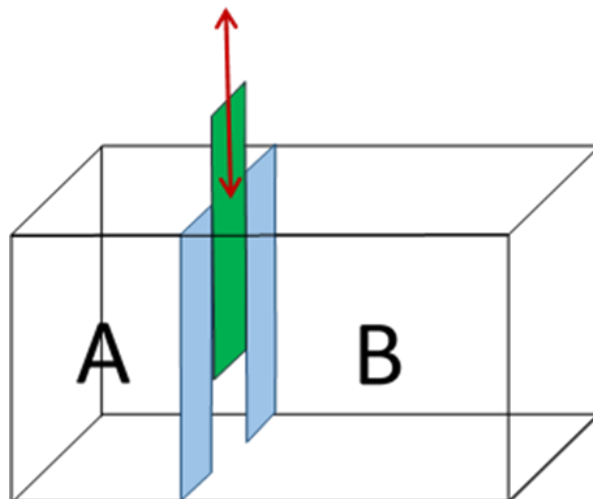


Figura 6. Pecera experimental. El espacio donde los peces hicieron las pruebas está marcado con la letra "A", y el espacio donde vivieron está marcado con la letra "B". En medio se encuentra la división opaca coloreada de azul y de verde la compuerta removible.

6.3 Alimento de recompensa

Como recompensa utilicé varios lotes de croquetas de alimento hechas en el laboratorio. Para hacer cada lote mezclaba 1.5 g de hojuelas de alimento comercial para peces con 0.3 g de grenetina en 3 mL de agua. Con esta mezcla formaba una pasta que extendía sobre una superficie plana y cortaba en círculos de tamaño similar. De cada círculo moldeaba pequeñas croquetas que ponía a secar durante 30 min debajo de un foco de luz incandescente. Las croquetas secas eran almacenadas en un recipiente a 4°C.

6.4 Placas para entrenamiento y discriminación

Entrené a los peces antes de aplicar las pruebas de discriminación. Para ello utilicé placas de entrenamiento, cada una formada por una lámina de polipropileno de color gris (10.5 x 14 cm), una malla de plástico (10 x 14 cm) y una lámina de acrílico transparente (10 x 14 cm); sobreponía a las tres y las mantenía unidas con dos bandas elásticas (Fig. 7).

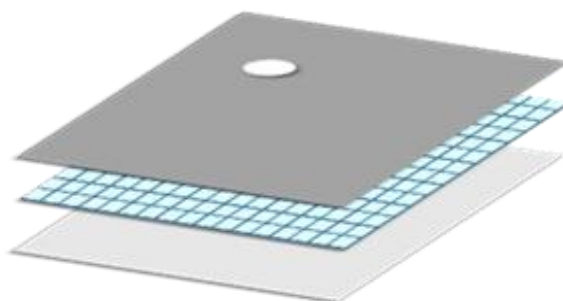


Figura 7. Placa de entrenamiento. La placa de entrenamiento está formada por una lámina de polipropileno gris, una malla de plástico y una lámina de acrílico transparente.

Las láminas de polipropileno estaban perforadas con 1 ó 6 agujeros de 8 mm de diámetro por donde cada pez podía acceder al alimento. Cubría cada agujero con papel por la parte de abajo para que el pez tuviera que romperlo. Usé dos tipos de láminas de polipropileno que llamé “A” y “B” (Fig. 8). La placa “A” está perforada con un solo agujero, mientras que la “B” con 6 agujeros

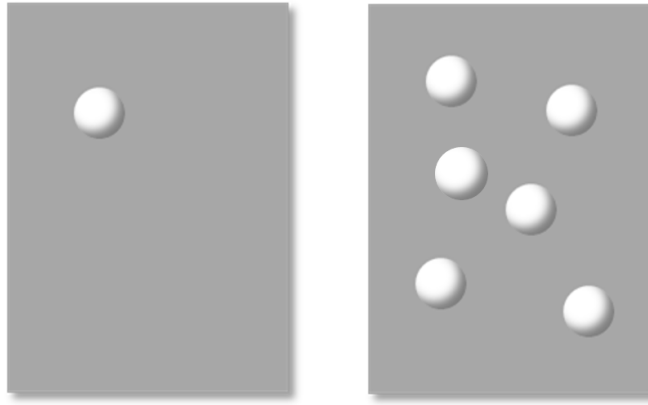


Figura 8. Placa de condicionamiento A y B. Se muestran los dos tipos de placas y el número de perforaciones que tiene cada tipo.

La malla de plástico estaba perforada en los mismos sitios que las láminas de polipropileno. En los espacios así formados se pueden colocar las croquetas de alimento para que no se muevan, y siempre queden debajo del agujero deseado. Por último, la lámina de acrílico transparente sirve como una base para la malla y la lámina de polipropileno; el arreglo permite ver si el alimento se encuentra en su sitio, antes y después de las pruebas (Fig. 7).

Para las pruebas de discriminación utilicé una placa similar a las placas de entrenamiento, excepto que sustituí la placa de polipropileno por una de papel con una impresión de un patrón tipo Ishihara. (Fig. 5). Los agujeros de la malla de plástico también estaban alineados con los círculos de los estímulos objetivos, para que el pez rompiera la lámina de papel y encontrara la recompensa.

Imprimí las placas en papel (80 g/m²; 8 x 11.5 cm) con un margen blanco de aproximadamente 1cm. Generé las placas usando el programa Matlab, y diseñé cada una para poner a prueba la capacidad de los peces para diferenciar el contraste entre dos colores. En el caso del estímulo distractor escogía un color y hacían 4 estímulos más brillantes y 4 más oscuros, lo que resultaba en 9 colores en total para los estímulos distractores. El programa generaba 1017 círculos de 7 tamaños distintos (0.14, 0.25, 0.31, 0.41, 0.54, 0.64 y 0.71 cm). Asignaba aleatoriamente alguno de los 9 colores a los círculos

de la placa. Por último, el programa elegía al azar un círculo al cual yo asignaba el color del estímulo objetivo.

6.5 Diseño experimental

Utilicé un diseño cruzado, donde cada unidad experimental (i.e. cada pecera) recibió en un orden aleatorio los 10 tratamientos (cada una de las láminas; Tabla 1) en cada una de 3 ocasiones. (Tabla 2). Hice las pruebas correspondientes a 5 láminas por día y por pecera. Por lo tanto, hacía 30 pruebas en 6 días por cada pecera. Conté la proporción de aciertos de cada prueba y consideré la longitud estándar del pez como una covariable (Tabla 3).

Cada tratamiento consistió en que los peces contrastaran dos colores; escogí los contrastes con base en los utilizados en las pruebas de Ishihara (Ishihara, 1987).

Tabla 1.- Tratamientos

Número del tratamiento	Color de los estímulos distractores	Color del estímulo objetivo	Tipo de cono (color) que prueba el contraste de colores
1	Gris	Azul	Azul
2	Azul	Verde	Azul
3	Verde	Azul	Azul
4	Gris	Magenta	Verde
5	Amarillo	Verde	Verde
6	Verde	Amarillo	Verde
7	Gris	Naranja	Rojo
8	Naranja	Rojo	Rojo
9	Rojo	Naranja	Rojo
10	Gris	Gris	NA

Tabla 2.- Diseño Cruzado

Pecera	Sexo	Tratamientos				
		Ocasiones	1	2	...	10
1	Machos (n=4)	1				
		2				
		3				
...	...					
4	Machos (n=4)	1				
		2				
		3				
1	Hembras (n=4)	...				
...	...					
4	Hembras (n=4)	...				

Tabla 3.- Variables presentes en el estudio

VARIABLES INDEPENDIENTES		
<i>Nombre de la variable</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Definición</i>
Contrastes de colores	Variable categórica	Dos colores distintos escogidos para poner a prueba la existencia de un cono.
Sexo del pez	Variable categórica	
VARIABLES DEPENDIENTES		
<i>Nombre de la variable</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Definición</i>
Proporción de aciertos	Variable continua	Es el resultado de la siguiente relación: (aciertos/ (aciertos + errores)).
COVARIABLES		
Longitud estándar	Variable continua	La distancia en centímetros que hay de la boca del pez a su pedúnculo (donde inicia su aleta caudal); es un indicador de su edad.

6.6 Programa de entrenamiento

El entrenamiento previo a la ejecución de las pruebas de discriminación estaba formado por 6 etapas, cada etapa consistió en varias sesiones. El número de sesiones no fue el mismo para todas las etapas y peceras, ya que algunos peces avanzaban más que otros. En un día en particular realizaba una sesión por pecera, y cada sesión consistía en 4 pruebas consecutivas. Hacía ensayos experimentales 5 días cada semana (Fig.9).

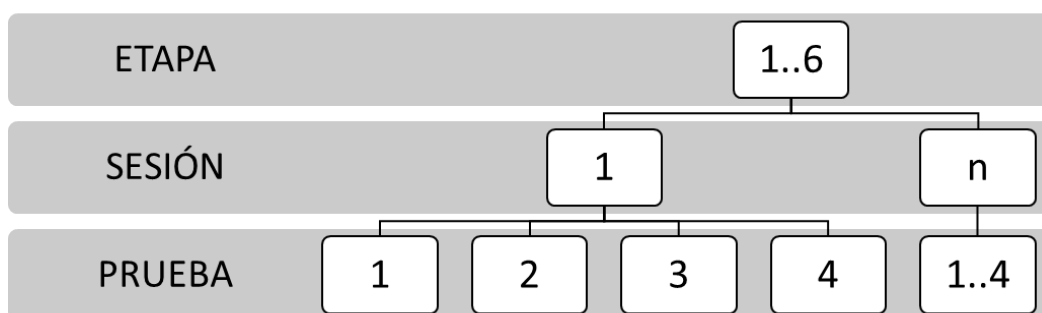


Figura 9. Programa de entrenamiento. Cada etapa consistió en un número variado de sesiones, cada sesión se hacía en un día y consistía en 4 pruebas consecutivas que duraban 3 minutos cada una.

Etapa 0: Puse a los peces en las peceras experimentales donde permanecieron de 3 a 7 días para que se aclimataran. Dejaba la compuerta abierta a la víspera del inicio de la etapa 1 para que se familiarizaran con los compartimentos. Además, alimentaba a los peces con las croquetas que utilizaría como recompensa.

Etapa 1: Entrené a los peces para que comieran las croquetas alcanzándolas desde la parte de arriba de la placa de entrenamiento "A". Esto ayudó a que aprendieran a asociar la recompensa con la presencia de las placas. Para facilitar la tarea a los peces, pegaba un trozo de papel delgado (20 gr/m²) debajo del agujero de la placa de entrenamiento. Ponía la recompensa arriba del papel, a la vista de los peces. Una vez que los peces completaban una sesión comiendo de la placa en cuatro pruebas seguidas, los pasaba a la siguiente etapa.

Etapa 2: Para que los peces aprendieran a rasgar el papel delgado, dejaba de poner la croqueta encima de él y ahora lo ponía debajo. El color del papel delgado (rosa y azul) cambiaba indistintamente en cada prueba para que el pez no lo asociara con la recompensa. Una vez que los peces completaban una sesión rompiendo el papel delgado, en cuatro pruebas consecutivas, los pasaba a la etapa siguiente.

Etapa 3: Cambiaba la placa de entrenamiento "A" por la "B". Ahora había seis círculos con papel delgado, cinco de ellos del mismo color y el restante de un color distinto con la recompensa debajo. Todos los círculos tenían dos capas de papel delgado para que el pez aprendiera a rasgar papel cada vez más grueso. Una vez que los peces aprendían a rasgar el círculo objetivo en cuatro pruebas consecutivas, pasaban a la etapa 4.

Etapa 4: En esta etapa aumentaba a tres el número de capas de papel delgado. Cuando rasgaban el círculo objetivo cuatro pruebas consecutivas, los pasaba a la etapa siguiente.

Etapa 5: Con el objetivo de que el pez aprendiera a rasgar papel grueso, seguí usando la placa de entrenamiento "B" pero sustituí el papel delgado por uno para impresión (80 gr/m²), con los colores amarillo, magenta y azul. Una vez que los peces aprendían a romper el papel, y lo hacían durante cuatro pruebas consecutivas, los pasaba a la etapa final.

Etapa 6: Sustituía la placa de entrenamiento por las de discriminación, las que contenían a los patrones tipo Ishihara. Cuando los peces habían roto el papel de al menos seis láminas, los pasaba a las pruebas de discriminación.

6.7 Pruebas de discriminación

En cada prueba de discriminación utilizaba una lámina con un patrón tipo Ishihara con dos colores, el del estímulo objetivo y el de los distractores. Usé 10 láminas distintas (Tabla 1) para cada pecera; las presenté a los peces en un orden aleatorio, y en cada caso anotaba las veces que el pez intentaba romper un estímulo distractor antes de romper el estímulo objetivo. Así obtuve el número de errores en cada prueba. Cada una de éstas duraba 3 minutos. Si el pez no encontraba el estímulo objetivo en ese tiempo, le presentaba a la siguiente lámina. Repetí en tres ocasiones cada prueba de discriminación, en total hice 30 pruebas por pecera. Videograbé las pruebas para futuros análisis.

Utilicé como control una lámina donde el color de los estímulos distractores y el objetivo eran grises. Este procedimiento permitió asegurar que el pez no estuviera utilizando otro tipo de pistas para encontrar el alimento.

6.8 Medición de la longitud estándar

Al finalizar las pruebas de discriminación medí la longitud estándar de cada pez. Primero anestesiaba a cada pez y luego lo ponía en un arreglo para tomarle las fotografías (Fig.10). Finalmente, medía la longitud estándar de cada pez usando las fotografías y el programa ImageJ.

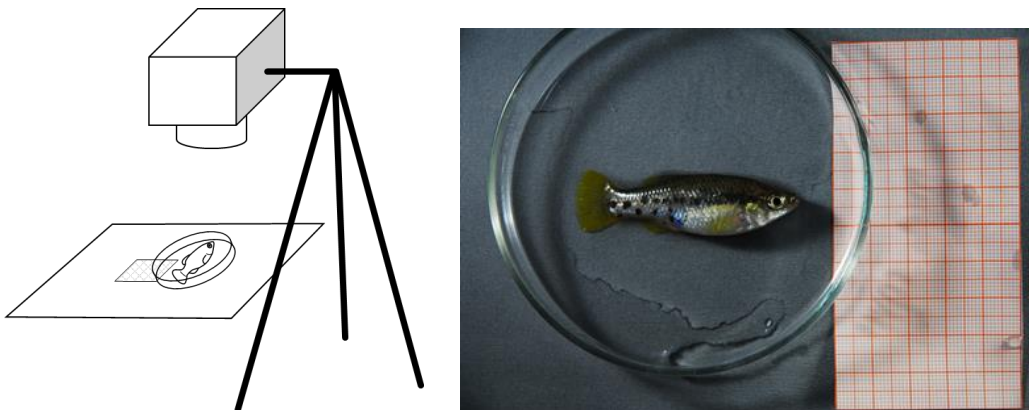


Figura 10. Arreglo para la toma de fotografías. Para tomar las fotografías ponía al pez, anestesiado, en una caja de Petri con papel milimétrico de fondo. La cámara estaba justo arriba de la caja de Petri y una lámpara que irradiaba una iluminación difusa.

6.9 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre tratamientos, incluido el control, apliqué modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs, por sus siglas en inglés). Por las características de las respuestas evaluadas (acierto o fallo) los datos no siguieron una distribución normal, por lo que consideré usar una distribución binomial. Además Incluí a la identidad de la pecera como variable de efectos aleatorios, y consideré a las tres réplicas de cada pecera como pseudo-réplicas.

También apliqué pruebas binomiales exactas para cada tratamiento, teniendo como hipótesis nula a la probabilidad de que los peces hubieran encontrado el estímulo objetivo solo por casualidad. Procedí así para determinar si otra pista pudiera haber sido la razón por la cual los peces acertaban la prueba.

7. RESULTADOS

7.1 Entrenamiento

Durante el entrenamiento registraba si los peces hacían las tareas esperadas durante cada etapa y si lograban comer el alimento de recompensa. Los peces no lograban obtener su recompensa en todas las pruebas; analicé si esto afectaba al número de veces que los peces intentaban hacer la prueba (su motivación para hacerla). El análisis estadístico no identificó un efecto significativo ($p > 0.05$). Así pude inferir que su motivación a hacer la prueba no cambió mucho durante las pruebas de discriminación, aunque sí varió entre peceras durante el entrenamiento.

El entrenamiento para los peces de cada pecera requirió tres meses. En la tabla 4 se muestra el número de sesiones que tomó a los peces de cada pecera completar cada etapa. Tomó a los peces 40 sesiones en promedio completar el entrenamiento.

Tabla 4.- Número de sesiones totales de entrenamiento por pecera y etapa

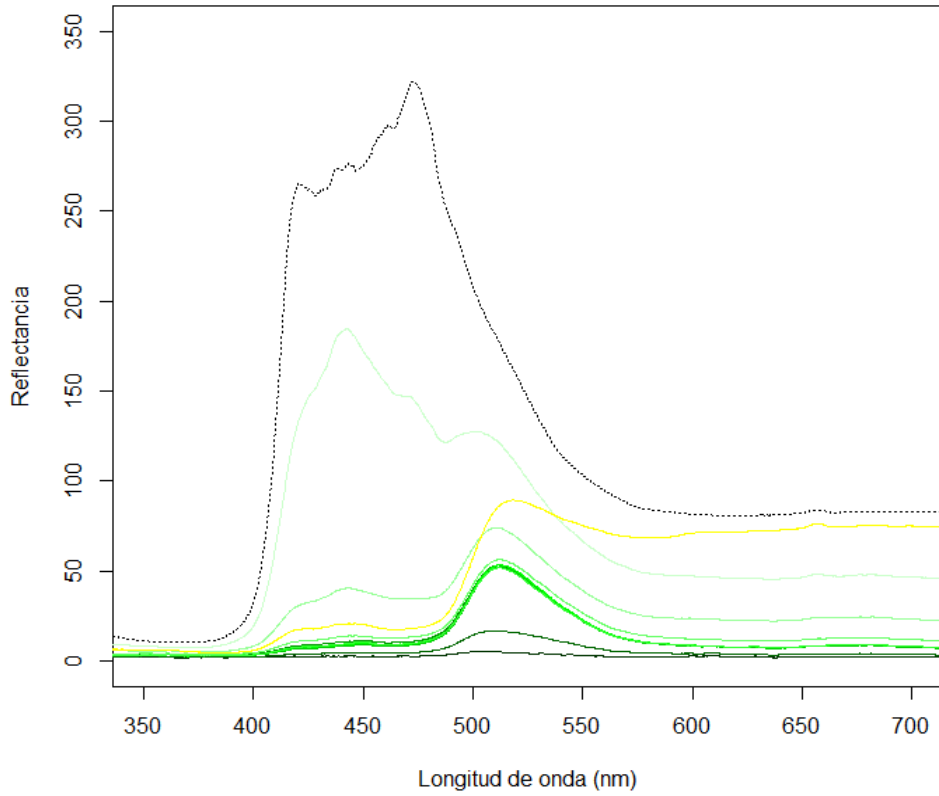
P E C E R A		ETAPA DEL ENTRENAMIENTO						TOTAL
		<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	
	<i>P1 ♀H</i>	14	5	2	3	4	10	38
	<i>P2 ♀H</i>	3	4	9	1	14	5	36
	<i>P3 ♂M</i>	3	20	13	5	6	3	50
	<i>P4 ♀H</i>	12	3	4	5	6	5	35
	<i>P5 ♂M</i>	2	5	4	1	17	10	39
	<i>P6 ♂M</i>	4	7	16	5	3	8	43
	<i>P7 ♀H</i>	4	7	13	3	7	1	35
	<i>P8 ♂M</i>	6	11	20	0	4	5	46
	TOTAL	48	62	81	23	61	47	322

La etapa 3 fue la que tomó a los peces más sesiones de entrenamiento, mientras que la etapa 4 fue la más corta (tabla 4). Como puede observarse en la misma tabla, las peceras con las hembras (P1, P2, P4 y P7) tardaron menos en completar el entrenamiento que las peceras con los machos (P3, P5, P6 y P8).

Durante el entrenamiento hubo peceras cuyos peces tardaron mucho en pasar de una etapa a otra. A pesar de lograr realizar la tarea en repetidas ocasiones, no lograron hacerlo en 4 pruebas consecutivas. En estos casos, tomé la decisión de pasar a los peces a la etapa subsiguiente. Por ejemplo, en el caso de la pecera 8, después de que los peces estuvieron 4 semanas en la etapa 3, los pasé a la etapa 5.

7.2 Láminas tipo Ishihara

Para la prueba final de discriminación imprimí 240 placas únicas, correspondientes a la aplicación de los 10 tratamientos con 3 repeticiones en cada una de las 8 peceras. Imprimí en una hoja de papel una muestra de los colores usados en los experimentos y medí su reflectancia (porcentaje) con un espectroradiómetro (Ocean Optics HR4000). Los resultados de dichas mediciones para la placa 5 se muestran en la figura 11; Las mediciones para cada una de las 10 placas se encuentran en el apéndice 3.



PLACA 5	
COLOR	RGB
	255,255,0
	0,51,0
	0,102,0
	0,153,0
	0,204,0
	0,255,0
	51,255,51
	102,255,102
	153,255,153
	204,255,204

Figura 11. Medidas de reflectancia de la placa 5. En la gráfica se muestran las medidas de reflectancia de cada uno de los estímulos utilizados en la placa 5. La reflectancia se midió como un porcentaje a partir de un material de referencia (estándar). La línea punteada muestra la reflectancia del papel utilizado para imprimir las placas. En la tabla se muestran los valores en código RGB que utiliza el programa informático para cada uno de los colores usados en la placa.

7.3 Pruebas de discriminación

Una vez finalizado el entrenamiento, los peces de cada pecera hicieron 30 pruebas de discriminación, las que correspondían a las 3 veces de cada uno de los 10 tratamientos. En cada caso conté los aciertos obtenidos en cada uno de los contrastes usados. Estas pruebas se realizaron para cada pecera en el transcurso de dos semanas.

Promedíé los resultados de las tres repeticiones de cada tratamiento de cada pecera. La figura 12 muestra a la proporción de aciertos en función de cada tratamiento. El análisis estadístico mostró que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes del control ($p < 0.05$). Las respuestas a las láminas variaron en el promedio de la proporción de los aciertos, así como también en la varianza. Esto sugiere que la proporción de los aciertos varió entre contrastes que probaban el mismo tipo de cono. Aun así, los peces encontraron el estímulo objetivo en todos los tratamientos, excepto en el control, lo cual sugiere que poseen los fotorreceptores propuestos.

El análisis estadístico también reveló la presencia de un efecto significativo del sexo ($p < 0.01$), los machos tuvieron una menor proporción de aciertos para todos los tratamientos (Fig. 13). Sin embargo, no hubo una interacción que fuera significativa entre el tratamiento y sexo ($p > 0.05$) (Fig. 14). Esto sugiere que hembras y machos poseen una sensibilidad visual comparable, aunque las hembras respondieron con mayor intensidad.

La prueba de tipo Ishihara tiene una ventaja sobre las pruebas dicotómicas (donde se comparan solo dos estímulos entre sí) donde la probabilidad de acertar por casualidad es de 1:2, y en las pruebas de tipo Ishihara es de 1:1017. Esto debido a que la recompensa en alimento está en solo uno de los 1017 estímulos (círculos en las placas). Esto se ve reflejado en el control ya que ningún pez en ninguna prueba de discriminación pudo encontrar su recompensa solo por casualidad o algún otro tipo de información (e.g. pistas olfativas, etc.). La proporción de aciertos de los tratamientos fueron comparadas con el control por medio de pruebas binomiales exactas y mostraron en todos los casos que la proporción de aciertos fue significativamente diferente a la del control.

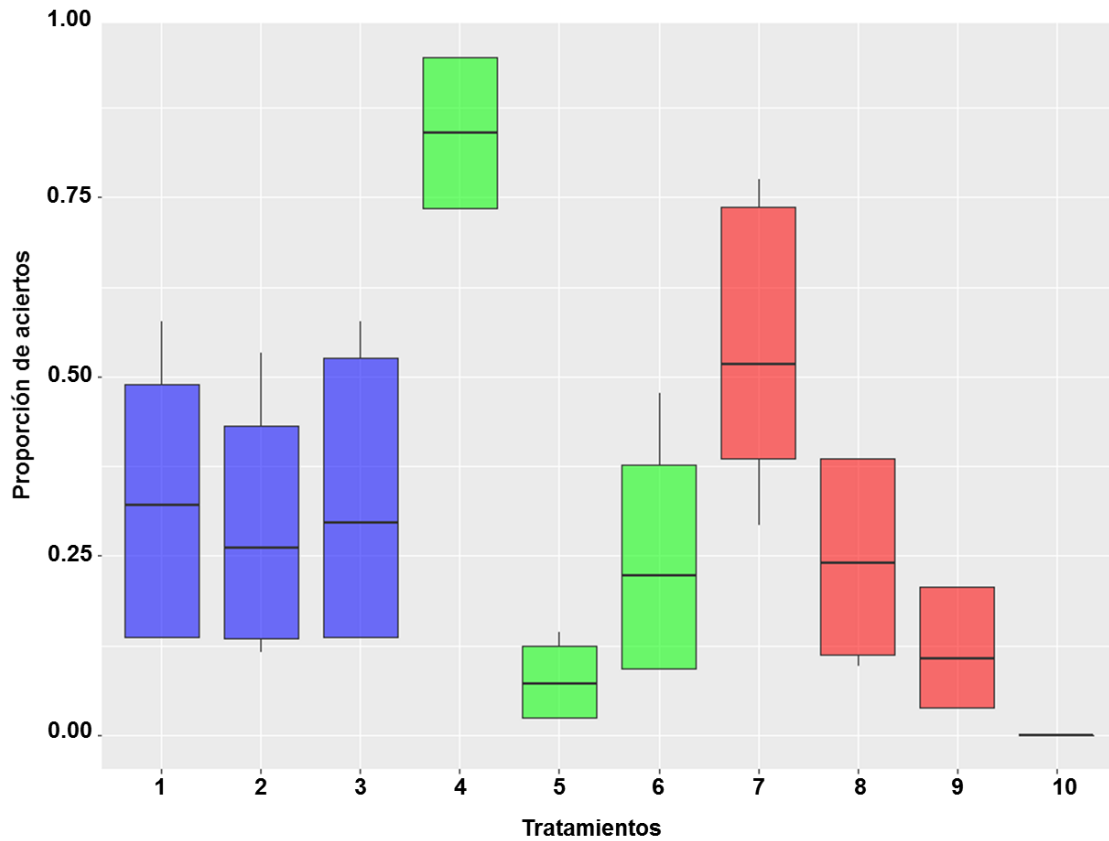


Figura 12. Resultados de la prueba de discriminación. La gráfica de cajas muestra la proporción de los aciertos de todos las peceras (n=8) en función de los diferentes tratamientos (placas tipo Ishihara) . La línea horizontal en cada caja representa a la mediana, los bordes inferior y superior de la caja corresponden al primer y tercer cuartil respectivamente. Los bigotes se extienden a ± 1.5 veces el rango intercuartil. Los tratamientos fueron comparados con el control que representa la probabilidad de que los peces hayan encontrado al estímulo objetivo solo por casualidad. Los colores de las cajas representan la agrupación de los tratamientos por el tipo de cono que probaban (azul, cono de tipo azul; verde, cono de tipo verde; rojo, cono de tipo rojo).

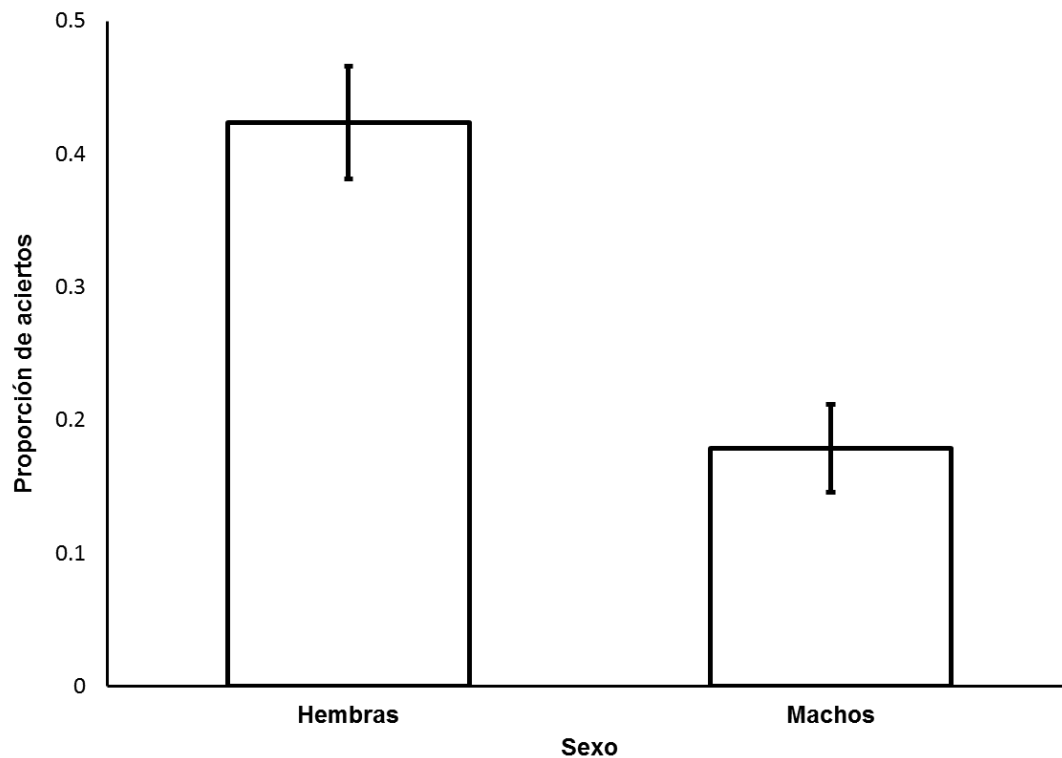


Figura 13. Comparación de la proporción de aciertos de las hembras contra los machos. La gráfica de barras muestra la proporción de los aciertos (promedio \pm desviación estándar del promedio) de las peceras con peces machos ($n=4$) y las peceras con peces hembras ($n=4$) para todos los tratamientos.

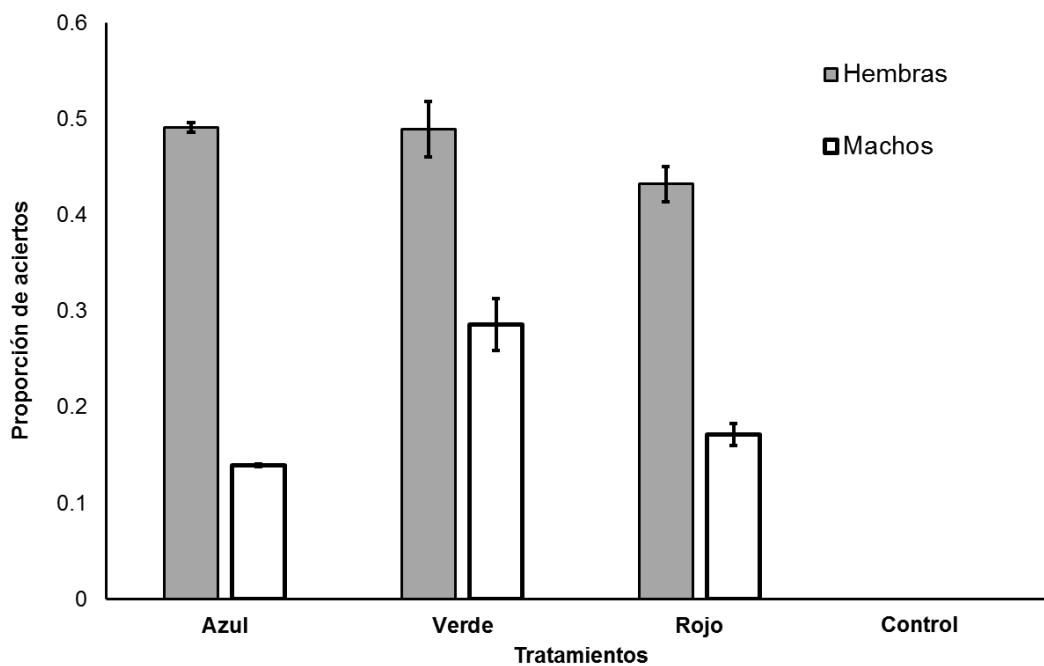


Figura 14. Comparación de la proporción de aciertos de las hembras contra los machos agrupados por tratamientos. La gráfica de barras muestra la proporción de los aciertos (promedio \pm desviación estándar del promedio) de las peceras con peces machos ($n=4$) y las peceras con peces hembras ($n=4$) con respecto a los tratamientos y el control, agrupados por el tipo de cono que probaban.

8. DISCUSIÓN

8.1 Condicionamiento

El tipo de entrenamiento que apliqué resultó efectivo para que los peces aprendieran a discriminar colores. Este tipo de tarea, asociar una recompensa oculta por un objeto con un color específico, ha sido utilizado en otras especies de peces de agua dulce, como los guppies (*Poecilia reticulata*). Sibeaux y cols (2019) entrenaron a un grupo de estos peces para resolver una prueba de discriminación de color que consistió en realizar una tarea por etapas sucesivamente complejas. En el presente trabajo seguí un procedimiento similar, pues entrené a los peces para que discriminaran colores a través de etapas sucesivamente más demandantes.

El aislamiento social en los vertebrados en general y en los peces en particular, causa estrés lo que hace difícil aplicar programas de entrenamiento. En pruebas piloto observé que los peces no respondían a las pruebas que les aplicaba al trasladarlos de manera individual a la pecera de pruebas. Por eso decidí mantener a los peces en grupos de cuatro en cada pecera, y someterlos a las pruebas en un compartimento contiguo; así logré mantener la condición social y a la vez la experimental sin crear mayores alteraciones al arreglo experimental. Este tipo de inconvenientes son comunes en pruebas de entrenamiento en otras especies (Agrillo y cols. 2012). Las pruebas piloto revelaron que la condición social favorecía el aprendizaje de los peces, ya que si uno de ellos hacía exitosamente la tarea con la consecuente recompensa, el resto de los peces lo imitaban. De igual manera, una vez que un pez encontraba el estímulo objetivo los demás lo emulaban y rompían más rápido el papel.

Las hembras terminaron el entrenamiento más rápido que los machos, a quienes tomó un promedio de 30 sesiones completar el entrenamiento; las hembras en cambio tardaron 24 sesiones. Un resultado similar se ha encontrado en otros estudios. Por ejemplo, Lucon-Xiccato y Bisazza. (2014) hallaron que las hembras eran más fáciles de reentrenar que los machos. En el presente estudio los machos probablemente tardaron más en encontrar el estímulo correcto porque, al menos en algunos casos, se distraían

perseguiéndose dentro del área de pruebas, lo que evitaba que pudieran resolver la tarea en el tiempo límite. Esto podría explicar las diferencias entre los machos y las hembras respecto del número de sesiones que les tomó avanzar en el entrenamiento.

8.2 Láminas ishihara y pruebas tipo Ishihara

El uso de la prueba de las placas tipo Ishihara en peces es relativamente nueva. Cheney y cols. (2019) demostraron que es útil para medir exitosamente algunos de los aspectos de la discriminación visual en los peces. En este estudio usamos esta prueba para encontrar el tipo de conos que los peces podrían tener. Y en efecto, la prueba fue apropiada para observar la capacidad de los peces para aprender a diferenciar entre diferentes colores.

El brillo de los estímulos usados en las pruebas de discriminación de colores es una variable cuyos efectos indeseable deben tomarse en cuenta (Kelber y cols, 2003), ya que un animal podría discriminar dos estímulos por su brillo. Para contrarrestar este efecto, las láminas tipo Ishihara emplean estímulos distractores con brillos distintos (Fig. 11). Si el pez estuviera discriminando los estímulos por su brillo, entonces tendría dificultades para encontrar el estímulo objetivo, pues su brillo se parecería mucho al de otros estímulos en la misma placa.

Otra ventaja en este tipo de placas es que se puede evitar que el pez aprenda a encontrar la recompensa por su ubicación en la placa, pues se determina aleatoriamente. Por otra parte, pude determinar indirectamente que 0.14 cm es la agudeza visual de estos peces, pues detectaban círculos de este tamaño a una distancia de 2 cm aproximadamente.

Las pistas visuales no son las únicas que los peces podrían usar para encontrar una recompensa; las croquetas de comida podrían ser encontradas por su olor o apariencia a través del papel. Por esta razón incluí un grupo control en el estudio (la placa 10; Tabla 1), donde el estímulo visual no era distinto de los estímulos distractores (Apéndice 3, placa 10). En ninguna de las pruebas los peces lograron encontrar la recompensa en estas placas. La probabilidad de encontrar casualmente el estímulo correcto entre los estímulos

distractores es de 1/1017. Esto indica que los peces solo tenían la pista visual del color del estímulo objetivo.

8.3 Pruebas de discriminación

Los tratamientos fueron diseñados para caracterizar la visión de color de *Xenotoca variata*, cada uno de ellos ponía a prueba la existencia de un cono específico. Los tratamientos 1, 4 y 7 (Tabla 1) ponían a prueba que los peces no tuvieran una visión monocromática. Si los peces lograban diferenciar los estímulos objetivos de los distractores de color gris, entonces se podía concluir que tenían una visión en colores. En efecto, los peces lograron diferenciar estos contrastes.

Por otra parte, los contrastes de colores de los tratamientos 2, 3, 5, 6, 8, y 9 tuvieron como finalidad determinar los tipos de conos presentes en los peces. Cada par de tratamientos sirvió para poner a prueba la presencia de uno de los tres tipos de conos (rojo, verde y azul). Si no lograban identificar alguno de los pares, se podía concluir que su visión sería dicromática, y además anticipar el tipo de cono ausente. Por el contrario, si lograban identificar todas las diferencias entre los contrastes, se podía decir que los peces tenían una visión tricromática.

Hubo diferencias entre los contrastes que ponían a prueba la existencia del mismo tipo de cono, por ejemplo entre los tratamientos 5 y 6 (Fig. 12), lo que resultó interesante ya que indica que otros aspectos podrían estar involucrados en la visión de color de estos peces. Una razón para explicar estas diferencias es que los tratamientos fueron diseñados con base en las pruebas de Ishihara, que fueron hechas para determinar deficiencias en la visión de color en los humanos. Aunque los animales pudieran tener la misma cantidad de conos, ello no significa que sus conos estén sintonizados en la misma longitud de onda (Kelber y cols. 2003). Esto quiere decir que la longitud de onda a la cual ocurre la absorción máxima de los conos no es idéntica, lo que sin duda causaría diferencias en la percepción de los colores. Por lo tanto, *X. variata* podría tener los tres tipos de conos sintonizados en longitudes de onda distintas a la de los humanos, y entonces percibir estos contrastes de forma también distinta.

Como mencioné antes, había evidencia de que estos peces podrían tener al menos una visión tricromática (Juárez. 2015, Olmos-Santiago. 2018), lo que es común a otros peces de agua dulce (Neumeyer. 1992, Sibeaux. 2019, Kelber. 2003). La visión a color podría ser importante en *X. variata*, por ejemplo para realizar actividades como encontrar alimento, identificar depredadores, o de lo que se tiene más evidencia, reproducirse. *X. variata* tiene en su cuerpo manchas negras, una franja amarilla en la aleta caudal, y escamas iridiscentes. Estas marcas podrían tener una función en su comportamiento social. Los machos en particular utilizan estas escamas iridiscentes para atraer a las hembras; lo consiguen por medio de una serie de pautas de cortejo que podrían servir para aprovechar el brillo de las escamas (Fascinetto-Zago. 2018). Además, trabajos recientes llevaron a confirmar que estas escamas brillan en distintas longitudes de onda (Olmos-Santiago. 2018), por lo que la existencia de una visión de color sería indispensable para identificar las diferencias de colores producidas por las escamas.

Olmos-Santiago también encontró que las escamas iridiscentes de esta especie pueden reflejar luz ultravioleta, lo que lleva a anticipar que estos peces poseen una visión tetracromática; es decir que tienen un cuarto tipo de cono. La visión ultravioleta es común en algunos peces de agua salada (Marshall y cols. 2015) y en muchos peces de agua dulce (Neumeyer, 1992; Kelber, 2003). Sin embargo, esta capacidad es difícil de identificar usando solo pruebas como las que utilicé en este trabajo. Una fuente de luz ultravioleta y otros colores en lugar de los estímulos pintados con pigmentos comerciales, serían necesarios para llevar a cabo dicha investigación. Experimentos futuros con procedimientos diferentes podrían emplearse para conocer más este aspecto de la visión de *X. variata*.

9. CONCLUSIÓN

Se puede concluir que *Xenotoca variata* posee al menos una visión de color tricromática cuyos conos podrían no coincidir con la absorbancia máxima de los conos de los humanos. Estudios futuros son necesarios para determinar las características de cada tipo de cono, y de la existencia de un cuarto tipo responsable probable de la visión UV.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agrillo, C., Petrazzini, M. E. M., Piffer, L., Dadda, M., & Bisazza, A. (2012). A new training procedure for studying discrimination learning in fish. *Behavioural brain research*, 230(2), 343-348.

Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2015). Cap 15 Transducción sensorial en *Fisiología médica*. (pp 359-371) Elsevier.

Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2015). Retinal [Figura]. Recuperado de Fisiología Médica.

Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2015). Fototransducción [Figura]. Recuperado de Fisiología Médica.

Bowmaker, J. K., & Dartnall, H. (1980) Visual pigments of rods and cones in a human retina. *The Journal of physiology*. 298(1): 501-511.

Cheney, K. L., Green, N. F., Vibert, A. P., Vorobyev, M., Marshall, N. J., Osorio, D. C., & Endler, J. A. (2019). An Ishihara-style test of animal colour vision. *Journal of Experimental Biology*. 222(1).

Fascinetto-Zago, P. (2018). *Optimización del comportamiento de cortejo de los machos de Xenotoca variata en función a la luz ambiental*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Fitzsimons, J. M. (1917). A revision of two genera of goodeid fishes (Cyprinodontiformes, Osteichthyes) from the Mexican Plateau. *Copeia*. 728-756.

Frank, H (2007) Espectro electromagnético [Figura] Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum-es.svg.

Goldstein, E. B. (2010). Cap 3 Introduction to vision en *Sensation and perception*. (pp 43-71) Cengage Learning.

Hunt, D. M., Dulai, K. S., Bowmaker, J. K., & Mollon, J. D. (1995). The chemistry of John Dalton's color blindness. *Science*. 267(5200): 984-988.

Hunt, D. M., Hankins, M. W., Collin, S. P., & Marshall, N. J. (Eds.). (2014). *Evolution of visual and non-visual pigments* (Vol. 4). Boston, MA: Springer.

Ishihara, S. (1918). Tests for Color blindness. *American Journal of Ophthalmology*. 1(5): 376

Ishihara, S. (1987). *Test for colour-blindness*. Tokyo: Kanehara.

Ishihara, S. (1987) Ishihara plate 9 [Figura]. Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ishihara_9.png.

Juarez, O. (2015). *Efecto de la variación de color de las escamas iridiscentes de los machos de Xenotoca variata en la elección femenina de apareamiento*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Kelber, A., Vorobyev, M. y Osorio, D. (2003) Animal colour vision - behavioural test and physiological concepts. (pp 46-70) *Biology Revisions*. 78: 81-118.

Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2014). Discrimination reversal learning reveals greater female behavioural flexibility in guppies. *Biology Letters*, 10(6), 20140206.

Manning, A., & Dawkins, M. S. (1992). Cap 3 Stimuli and communication en *An introduction to animal behaviour*. Cambridge University Press.

Marshall, J., Carleton, K. L., & Cronin, T. (2015). Colour vision in marine organisms. *Current opinion in neurobiology*, 34, 86-94.

Moyaho, A., Garcia, C. M., & Ávila-Luna, E. (2004). Mate choice and visibility in the expression of a sexually dimorphic trait in a goodeid fish (*Xenotoca variatus*). *Canadian journal of zoology*, 82(12), 1917-1922.

Neumeyer, C. (1992). Tetrachromatic color vision in goldfish: evidence from color mixture experiments. *Journal of Comparative Physiology A*, 171(5), 639-649.

Olmos-Santiago, N. *Descripción morfológica y funcional de las estructuras que producen color iridiscente en los peces Xenotoca variata*. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.

Parenti, L. R. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*.

Rodieck, R. W., & Rodieck, R. W. (1998). *The first steps in seeing* (Vol. 1). Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Sibeaux, A., Cole, G. L., & Endler, J. A. (2019). Success of the receptor noise model in predicting colour discrimination in guppies depends upon the colours tested. *Vision research*, 159, 86-95.

Snowden, R., Snowden, R. J., Thompson, P., & Troscianko, T. (2012). Cap. 5 Color vision en *Basic vision: an introduction to visual perception*. (pp 132-171) Oxford University Press.

Urbia, C. V. (1999). Cap 18 Bases físicas y bioquímicas de la vision en color en *Neurobiología de la vision*. (Vol. 51) (pp 229-240) Univ. Politèc. de Catalunya.

11. APÉNDICES

Apéndice 1. Hojas de registro utilizadas en el entrenamiento y las pruebas de discriminación

Entrenamiento:

ETAPA 1	PECERA:	FECHA: / /19	
HORA	PLACA Y PAPEL	COLOR ESTÍMULO	COMER ARRIBA
	PA CH1		
	PA CH1		
	PA CH1		
	PA CH1		

ETAPA 2	PECERA:	FECHA: / /19		
HORA	PLACA Y PAPEL	COLOR ESTÍMULO	ROMPER ESTÍMULO	COMER ABAJO
:	PA CH1			
:	PA CH1			
:	PA CH1			
:	PA CH1			

ETAPA 3	PECERA:	FECHA: / /19				
HORA	PLACA Y PAPEL	COLOR ESTÍMULO	COLOR FONDO	ROMPER ESTÍMULO	COMER ABAJO	ERROR ES
:	PB CH3					
:	PB CH3					
:	PB CH3					
:	PB CH3					

ETAPA 4		PECERA:					FECHA: / /19				
HORA	PLACA Y PAPEL	COLOR ESTÍMULO	COLOR FONDO	ROMPER ESTÍMULO	COMER ABAJO	ERRORES					
:	PB PAPEL										
:	PB PAPEL										
:	PB PAPEL										
:	PB PAPEL										

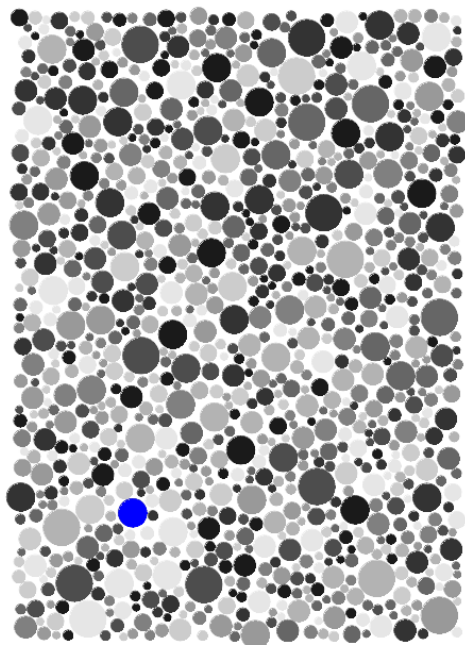
ETAPA 5		PECERA:				FECHA: / /19			
HORA	PLACA Y PAPEL	TRATAMIENTO	ROMPER ESTÍMULO	COMER ABAJO	ERRORES				
:	ISHIHARA								
:	ISHIHARA								
:	ISHIHARA								
:	ISHIHARA								

Pruebas de discriminación:

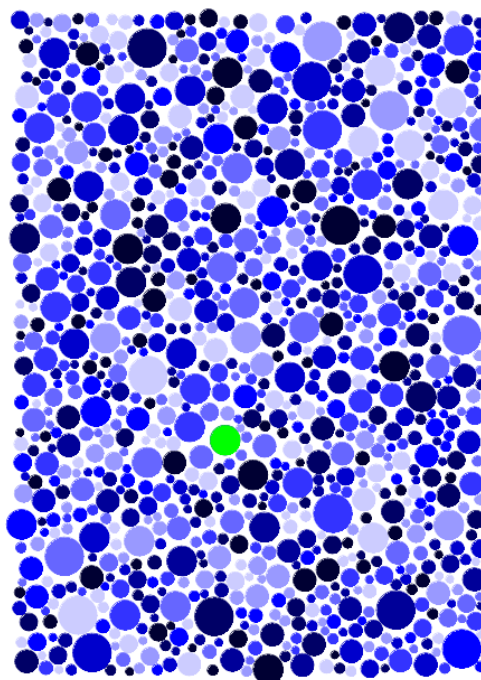
DISCRIMINACIÓN		PECERA:				FECHA: / /19			
HORA	TRATAMIENTO	ROMPER ESTÍMULO	ERRORES	COMER ABAJO					
:									
:									
:									
:									
:									

Apéndice 2. Muestra de los 10 tratamientos utilizados

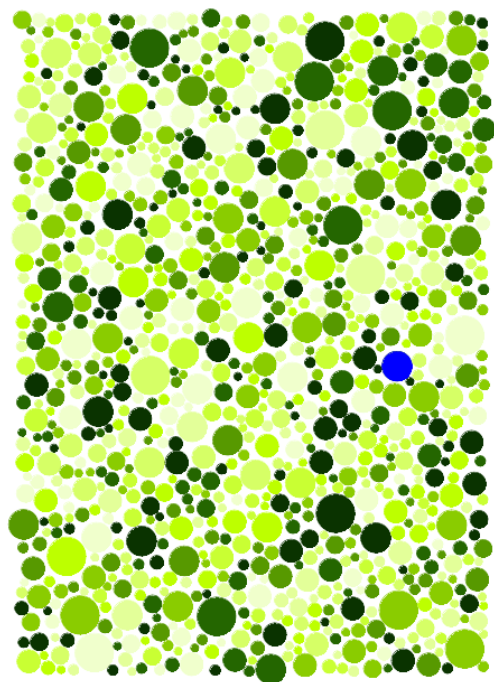
PLACA 1



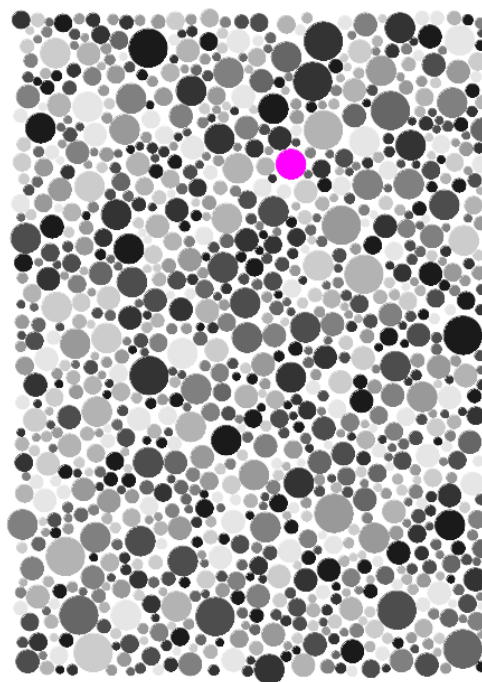
PLACA 2



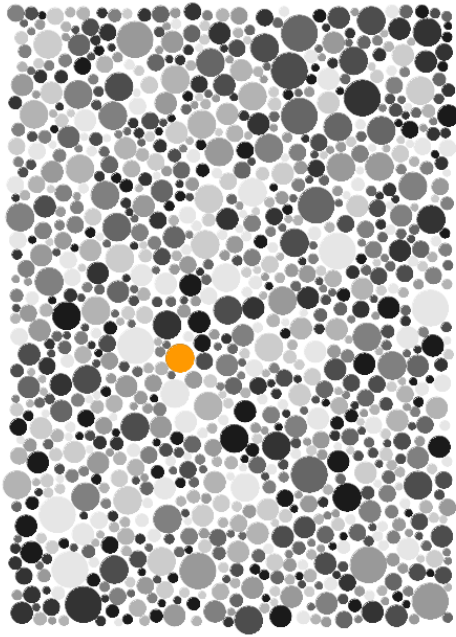
PLACA 3



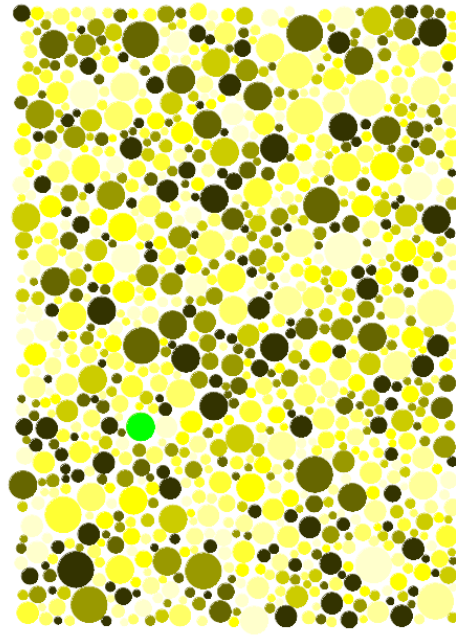
PLACA 4



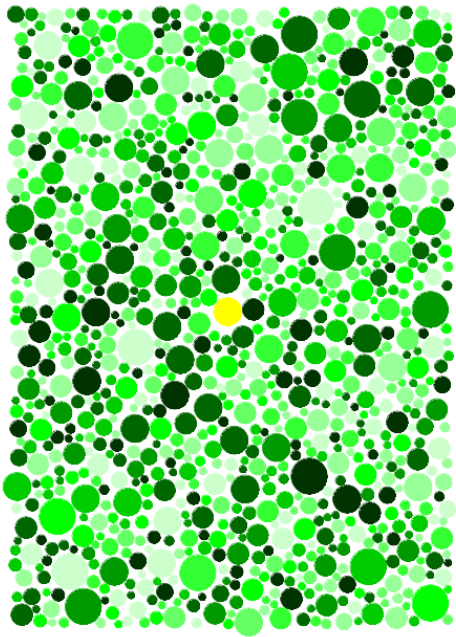
PLACA 5



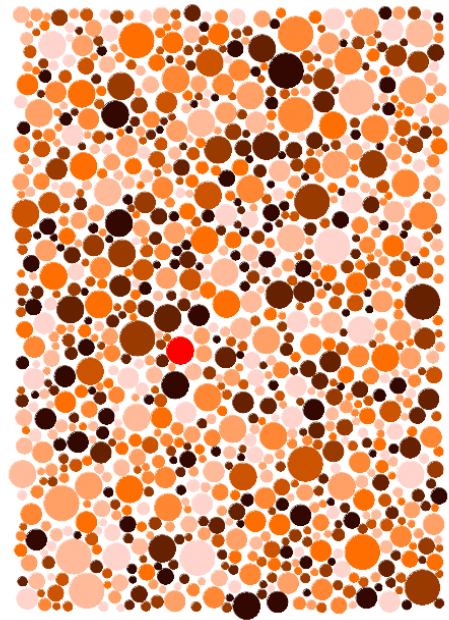
PLACA 6



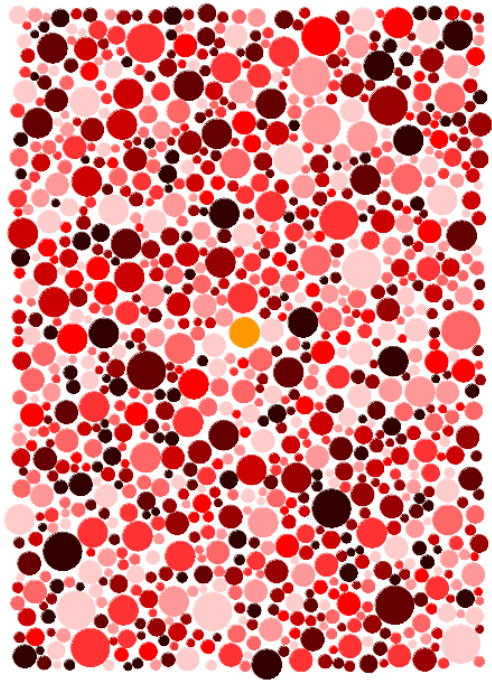
PLACA 7



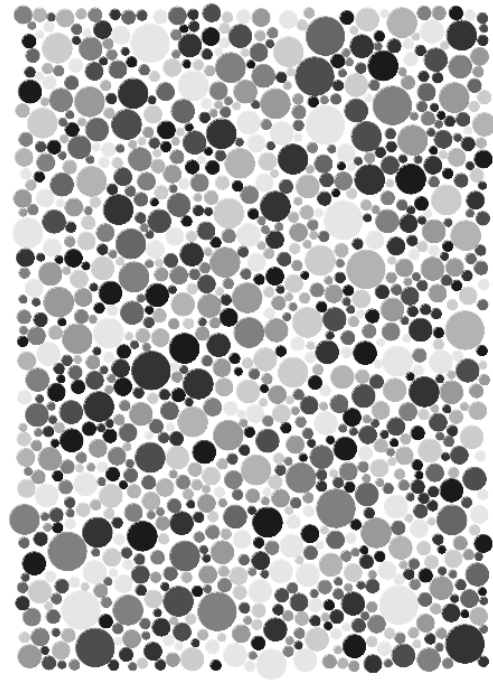
PLACA 8



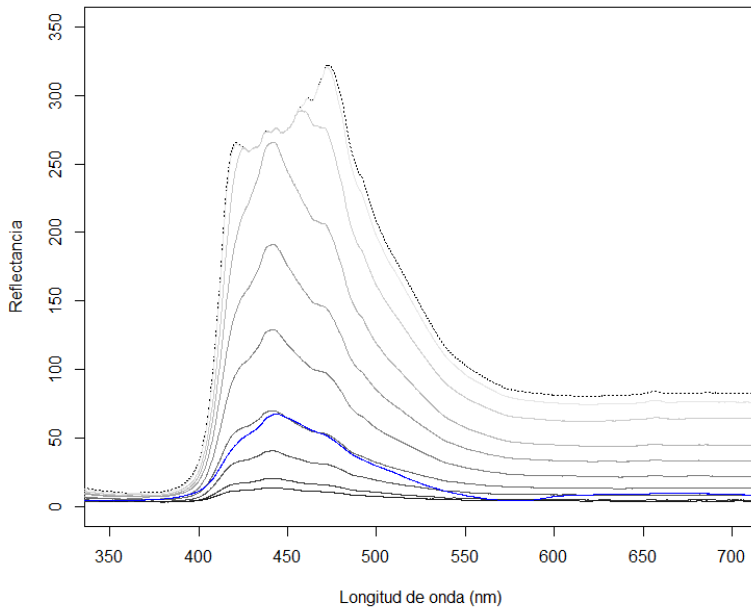
PLACA 9


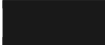
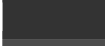


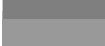
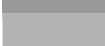
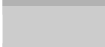
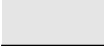



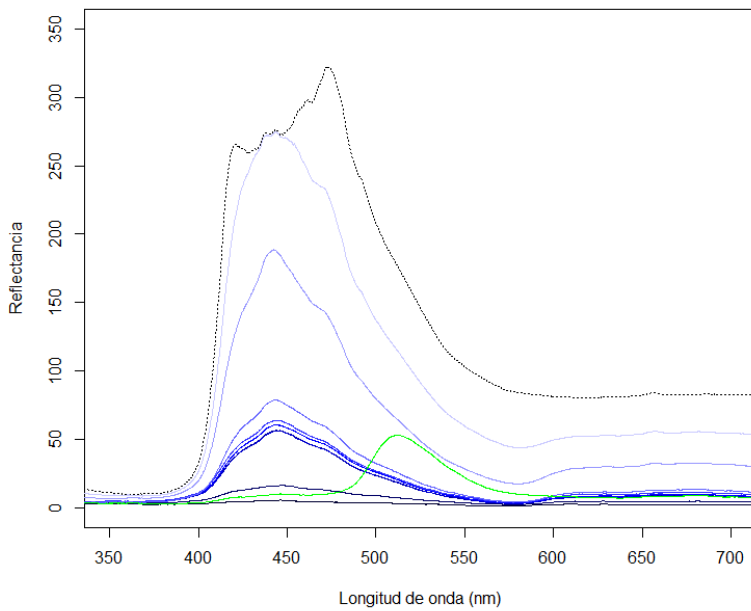
PLACA 10













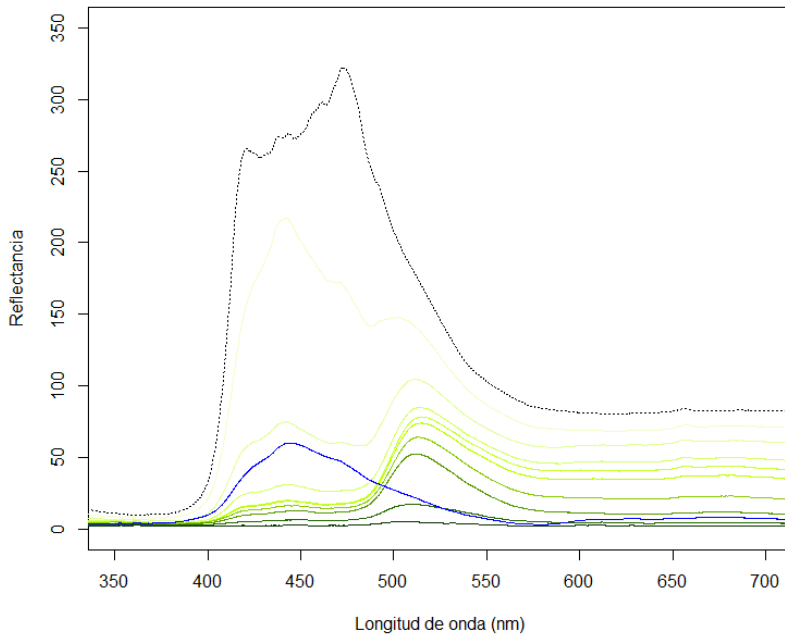
Apéndice 3. Medidas de reflectancia para las 10 placas utilizadas









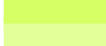



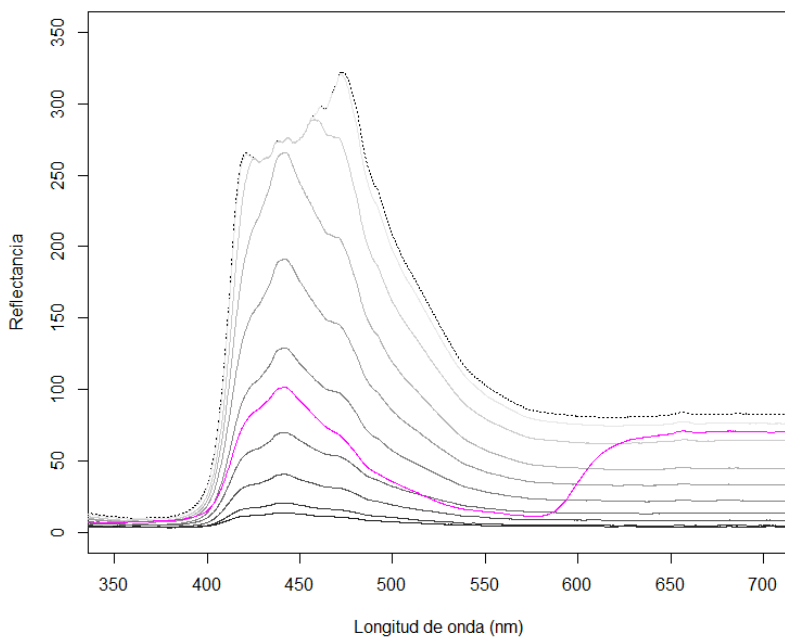
PLACA 1	
COLOR	RGB
	0,0,255
	25.5,25.5,25.5
	51,51,51
	76.5,76.5,76.5
	102,102,102
	127.5,127.5,127.5
	153,153,153
	178.5,178.5,178.5
	204,204,204
	229.5,229.5,229.5


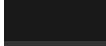






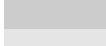



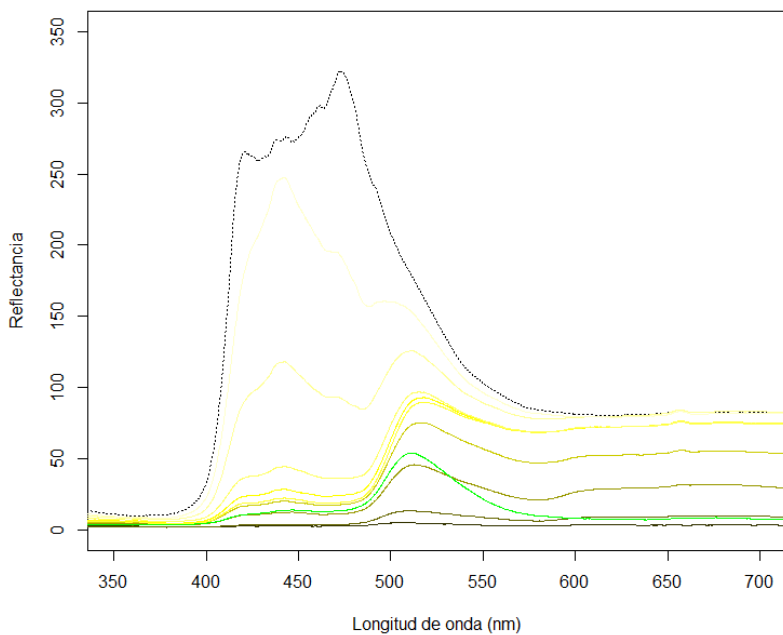
PLACA 2	
COLOR	RGB
	0,255,0
	0,0,51
	0,0,102
	0,0,153
	0,0,204
	0,0,255
	51,51,255
	102,102,255
	153,153,255
	204,204,255



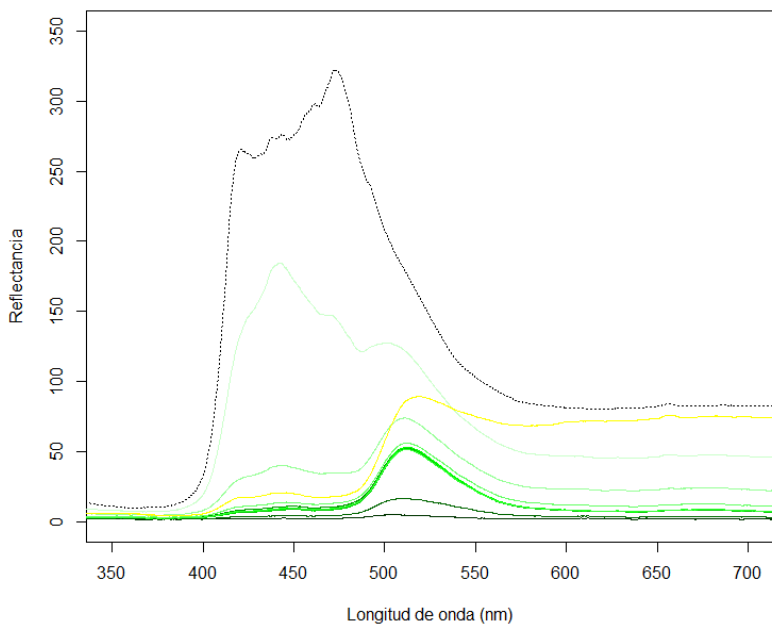
PLACA 3	
COLOR	RGB
	0,0,255
	10.2,51,0
	35.7,102,0
	86.7,153,0
	137.7,204,0
	188.7,255,0
	201.45,255,51
	214.2,255,102
	226.95,255,153
	239.7,255,204



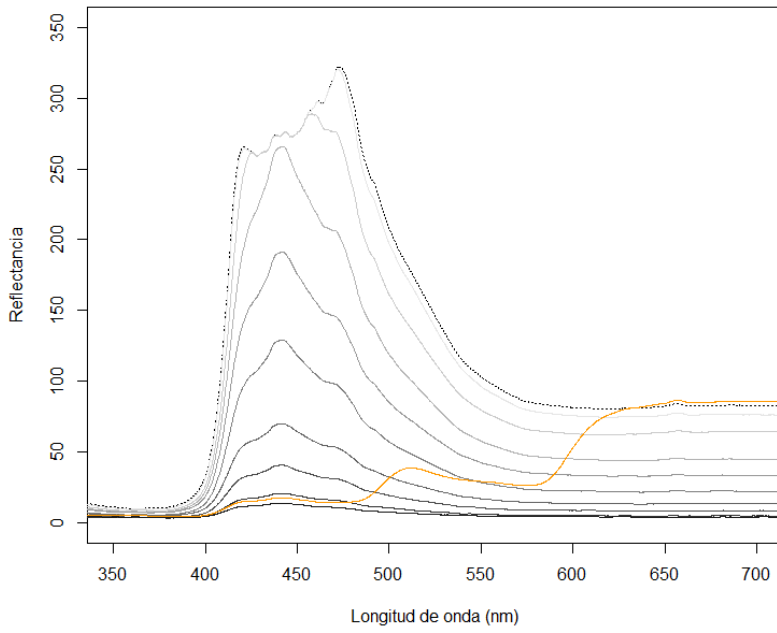
PLACA 4	
COLOR	RGB
	255,0,255
	25.5,25.5,25.5
	51,51,51
	76.5,76.5,76.5
	102,102,102
	127.5,127.5,127.5
	153,153,153
	178.5,178.5,178.5
	204,204,204
	229.5,229.5,229.5



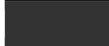
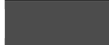

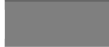
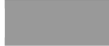
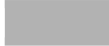

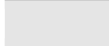


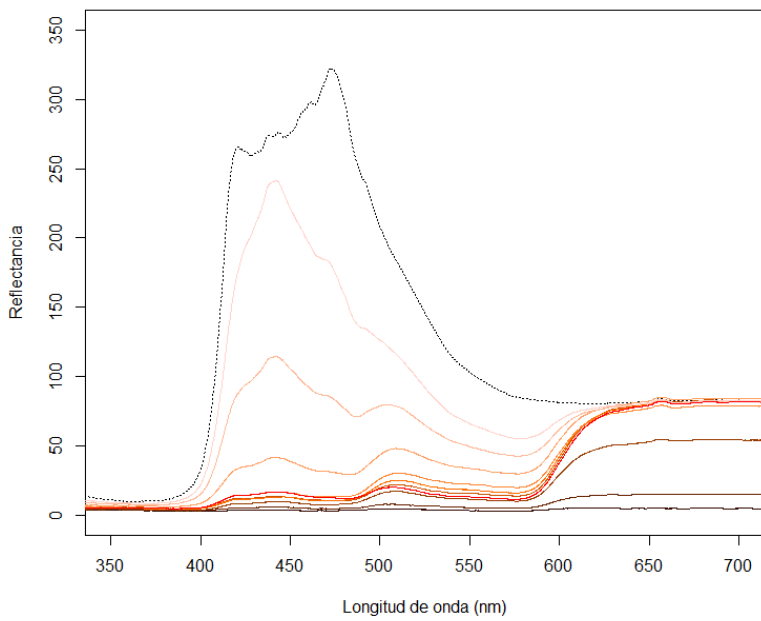
PLACA 5	
COLOR	RGB
	0,255,0
	51,51,0
	102,102,0
	153,153,0
	204,204,0
	255,255,0
	255,255,51
	255,255,102
	255,255,153
	255,255,204













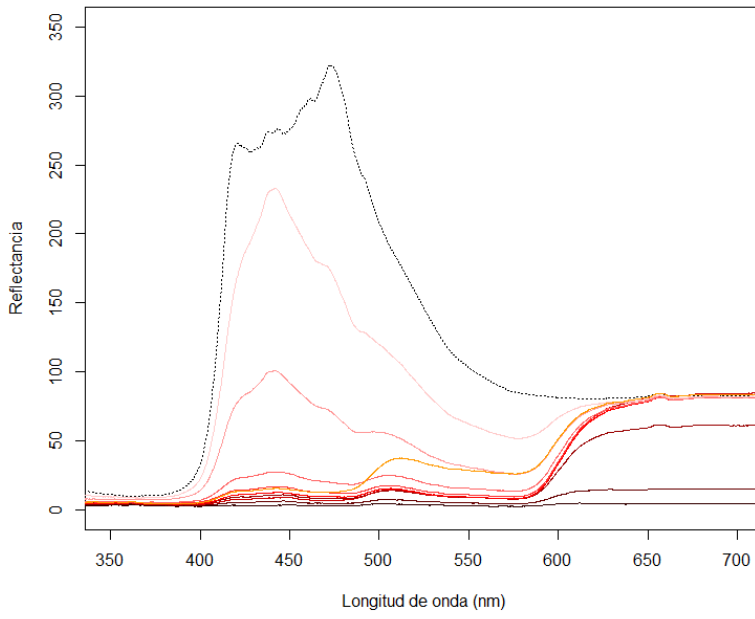
PLACA 6	
COLOR	RGB
	255,255,0
	0,51,0
	0,102,0
	0,153,0
	0,204,0
	0,255,0
	51,255,51
	102,255,102
	153,255,153
	204,255,204










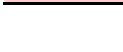


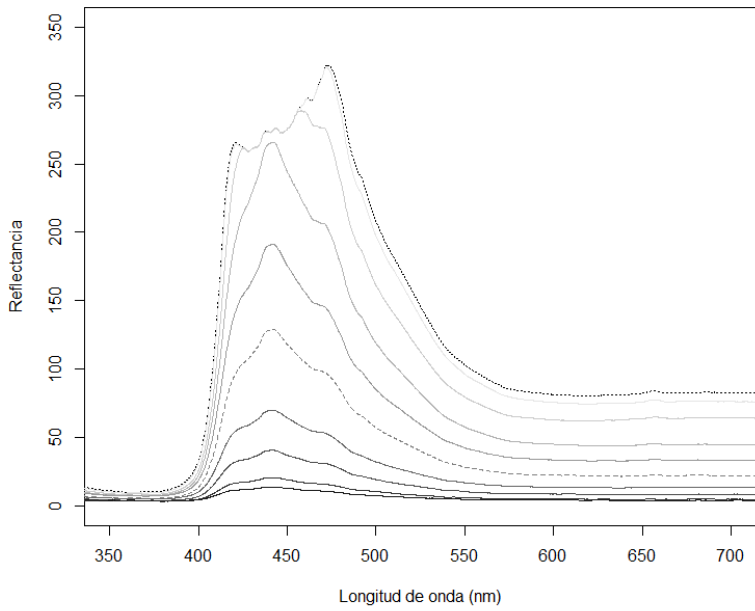
PLACA 7	
COLOR	RGB
	255,153,0
	25.5,25.5,25.5
	51,51,51
	76.5,76.5,76.5
	102,102,102
	127.5,127.5,127.5
	153,153,153
	178.5,178.5,178.5
	204,204,204
	229.5,229.5,229.5


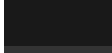





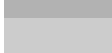
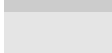
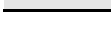


PLACA 8	
COLOR	RGB
	255,0,0
	51,7.65,0
	102,33.15,0
	152,58.65,0
	204,84.15,0
	255,109.65,0
	255,135.15,51
	255,160.65,102
	255,186.15,153
	255,211.65,204



PLACA 9	
COLOR	RGB
	255,153,0
	51,0,0
	102,0,0
	153,0,0
	204,0,0
	255,0,0
	255,51,51
	255,102,102
	255,153,153
	255,204,204



PLACA 10	
COLOR	RGB
	127.5,127.5,127.5
	25.5,25.5,25.5
	51,51,51
	76.5,76.5,76.5
	102,102,102
	127.5,127.5,127.5
	153,153,153
	178.5,178.5,178.5
	204,204,204
	229.5,229.5,229.5