



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

FACULTAD DE BIOLOGIA  
**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Eficiencia en la transmisión de señales agonísticas en el género  
*Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae).**

**PROYECTO DE TESIS**

Que presenta:

**Biol. Pedro Eugenio Castillo Ayala**

Como requisito para obtener el grado académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Director de tesis:

**Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca**



Morelia Michoacán, marzo de 2017

## Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
1.1 Los sistemas visuales y el color .....	5
1.2 El sistema visual en Odonata.....	10
1.3 El sistema de apareamiento en <i>Hetaerina</i> .....	18
1.4 Función de la coloración en <i>Hetaerina</i> .....	20
<b>2. Hipótesis:</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Objetivo general:</b> .....	<b>24</b>
3.1 Objetivos particulares: .....	24
<b>Capítulo I</b> .....	<b>25</b>
<b>Wing spot coloration contrasts and competitive status in the territorial damselfly <i>Hetaerina cruentata</i></b> .....	<b>25</b>
<b>Capitulo II</b> .....	<b>46</b>
<b>Variación inter-específica en la coloración alar en <i>Hetaerina</i>; una aproximación usando modelos visuales y escenarios de Selección.</b> .....	<b>46</b>
<b>4. Apéndice 1</b> .....	<b>66</b>
4.1 Imágenes multiespectrales .....	66
4.2 Análisis de coloración usando a <i>Sympetrum rubicundulum</i> como modelo visual.....	67
4.3 Comparación cromática.....	68
4.4 Comparación acromática.....	70
<b>5. Apéndice 2</b> .....	<b>71</b>
5.1 Tetraédros del modelo de visión presa y depredador.....	71
<b>6. Discusión general</b> .....	<b>72</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>74</b>

## Resumen

La comunicación animal es un aspecto central de la ecología conductual para comprender como los animales utilizan la información en interacciones sociales, la elección de pareja y puede servir para explicar el surgimiento de nuevas especies. En éste trabajo utilizamos un modelo visual de odonato dentro de un contexto de selección sexual para explicar (1) comportamientos de competencia intra- específica y (2) de reconocimiento visual inter-específico asociados a las señales de color en *Hetaerina*. Primero, comparamos machos de dos edades reproductivas y discutimos como el cambio de coloración encontrado puede estar asociado a cambios en el metabolismo y la conducta de los individuos y su posible uso como señal de condición en la comunicación intra-sexual. En segunda instancia, analizamos la variación inter- específica de la coloración en 5 especies de *Hetaerina* utilizando hábitats de iluminación contrastantes y realizamos un análisis de discriminación entre especies simpátricas. Encontramos que pueden ocurrir cambios notables del color de las alas (especialmente en alas posteriores) en diversos ambientes lumínicos y reportamos que puede existir interferencia en la comunicación visual en especies con firmas espectrales similares, lo cual provocaría fallas en el reconocimiento de los competidores, por lo que sugerimos la existencia de adaptaciones locales que promueven distintos grados de discriminación entre especies simpátricas.

**Palabras clave:** *Coloración animal, señales agonísticas, firmas espectrales, sistema visual, selección sexual.*

## Abstract

Animal communication is a central aspect in behavioural ecology to understand how animals use information in social interactions, mate choice and can serve to explain the emergence of new species. In this work, we used an odonate visual model within a context of sexual selection to explain (1) intra-specific competition behaviour and (2) inter-specific visual recognition in colour signals in *Hetaerina*. First, we compared males of two different reproductive ages and we discussed how the colour variation we found is associated with changes in metabolic rate and behaviour as well as its' possible use as a condition signal in intra-sexual communication. Second, we analyzed the inter-specific colour variation in 5 species of *Hetaerina* using contrasting lighting habitats and performed a discrimination analysis between sympatric species and the possible recognition effects when species coexist. We found that significant changes in wing colouration (especially in hind wings) may occur in various light environments, suggesting local adaptations to the light characteristics of different microhabitats. We report that there may be interference in visual communication in species with similar spectral signatures, which could cause mismatches in correct competitor recognition. We suggest the existence of local adaptations that promote different degrees of discrimination among sympatric species.

**Keywords:** *Animal colouration, agonistic signals, spectral signatures, visual system, sexual selection*

## **1. Introducción**

### 1.1 Los sistemas visuales y el color

Una pregunta recurrente de carácter introspectivo que se han hecho los humanos a través de la historia y que se atribuye por primera vez al filósofo Romano Plotino es: ¿cómo ven el mundo otros animales?. Plotino escribió: “Para cualquier visión debe provocarse un ojo adaptado a lo que éste está viendo, y llevar un grado de semejanza en ello” (Plotino, Sección 9, 6to tratado, Siglo III d.C.). Lo anterior es evidencia que desde entonces se consideraba a la visión como un complejo de componentes visuales especializados para las tareas de un animal. Darwin en 1859, argumentó que hasta para él era absurdo pensar que un ojo tan complejo como el nuestro pudiera haberse perfeccionado gradualmente por selección natural ya que ésta no ocurre en ambientes perfectos, sin embargo, la idea de que la selección natural puede optimizar aspectos relacionados con la visión y el uso de señales de color es un concepto que los ecólogos visuales recientemente han adaptado para responder preguntas como, ¿qué ven los animales?, ¿por qué es particularmente importante para ellos verlo como lo hacen?, ¿qué tan diferente ven el mundo esos animales de otros en la naturaleza?, etc.

Diversas especies utilizan la visión como modalidad sensorial primaria, la cual les permite un reconocimiento eficiente del medio en donde habitan y dependen de ella para discriminar pareja, competidores, presas o depredadores

(Endler, 1980). La visión en general, puede brindar muchas ventajas pero dos de las más importantes son sin duda la supervivencia (Endler, 1990) y la reproducción (Darwin, 1871; Zahavi, 1975; Fisher, 1958; Kirckpatrick, 1982; Hamilton & Zuk, 1982; Endler & McLellan, 1988; Ryan, 1990). Se ha sugerido que la evolución de la coloración animal es particularmente compleja por tener un fuerte componente de selección natural capaz de restringir la variación en los ornamentos o caracteres sexuales secundarios de una especie en sentido opuesto a la selección sexual e incrementar su variación interpoblacional. Los despliegues morfológicos (e.g. tamaño, coloración) o conductuales (e.g. cortejo, despliegues), comúnmente están limitados por restricciones energéticas o fisiológicas y se encuentran en estrecha relación con la adecuación de los individuos, por lo que la evolución y expresión de los rasgos sexuales resulta del balance entre selección natural y sexual (Andersson, 1994).

Los peces son un grupo en que se resalta la importancia de las señales y la visión de color en términos adaptativos, siendo común encontrar especies cercanamente relacionadas coexistiendo bajo las mismas características ambientales. En ese contexto Marshall *et al.* (2003c) examinaron los colores de tres especies de peces tropicales de la familia Apogonidae (*Apogon fragilis*, *A. leptacanthus* y *Rhabdamia gracilis*) que coexisten en varios arrecifes asociadas a cabezas de coral (fig. 1); todas experimentan la misma incidencia de luz en el microhábitat (1B), y presentan conductas similares. Son forrajeros planctónicos nocturnos y tienen comportamientos sociales y sexuales durante el día. Las

especies poseen marcas UV, violeta y azul alrededor de la cabeza involucradas en las interacciones sociales, aunque la coloración general parece coincidir con el fondo y sirve como una estrategia de camuflaje para evitar la depredación de su principal depredador la trucha del coral (Fig.1C). Aunque *R. gracilis* es la especie más diferente con un camuflaje basa en la transparencia, las 3 especies son probablemente tricromáticas, pero la posición de sus tres canales de color dentro del espectro visible son bastante diferentes (fig. 1A). La diversidad de la visión de color de éstos apogónidos sugiere que, independientemente de que si las tareas conductuales pueden realizarse eficientemente o no entre las especies, la presión selectiva sobre la posición exacta de las sensibilidades espectrales presenta un alto grado de flexibilidad y su especialización puede deberse a presiones selectivas de otro tipo (i.e. sexuales).

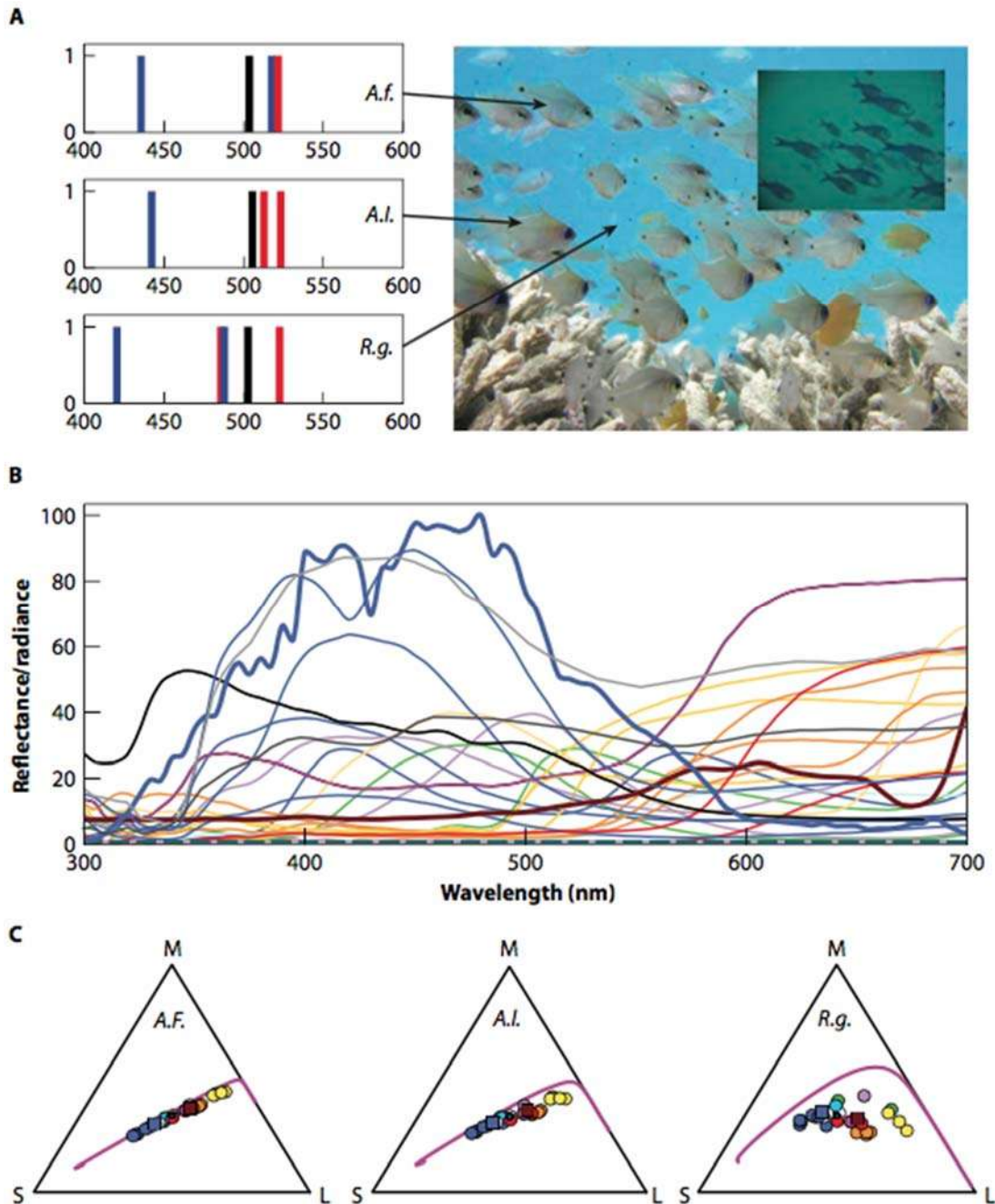


Fig. 1 Análisis de la visión de color en 3 especies de peces cardenales (Familia Apogonidae). (A) Sensibilidad espectral y variación de los fotorreceptores de las especies, una fotografía UV ha sido incluida dentro de la foto normal para ilustrar como las especies se vuelven conspicuas cuando son vistas en longitudes de onda cortas. (B) Espectros de reflectancia de los colores de las tres especies de peces, la irradiación y luz del fondo se muestran como una línea azul gruesa y sólida. (C) Triángulos cromáticos de Maxwell de las tres especies viendo los colores de los espectros en B. Los círculos son los colores de los peces, el cuadro café representa el color del coral, el cuadro azul representa la irradiación del fondo y el círculo azul claro representa el color de la trucha depredadora. (Figura tomada de Cronin *et al.*, 2014).



En términos de la coloración subacuática, Lythgoe sugiere que la visión de color es codificada de manera óptima por un sistema de compensación dicromático donde la sensibilidad máxima de uno de los pigmentos visuales responde bien a la coloración del fondo y el otro pigmento difiere causando contrastes de coloración (Lythgoe, 1972; 1979). En esos casos se asume que la funcionalidad de un sistema dicromático puede ser más eficiente en términos de detección que uno tricromático dado que la compensación entre pigmentos permite la detección de siluetas para ubicar peces contra el fondo.

En un contexto general, la complejidad al interpretar datos de la coloración de un animal requiere una aproximación conservadora y es primordial comprender cómo funciona el sistema visual del sistema de trabajo de interés. En décadas recientes, el avance tecnológico y científico ha proporcionado herramientas y conocimiento teórico sobre los mecanismos y procesos subyacentes a las señales de color y la visión en diversos grupos animales. Por ejemplo, los análisis moleculares han proporcionado evidencia para interpretar la historia evolutiva de la enorme diversificación de sistemas visuales en la naturaleza, y cada vez es más común encontrar nuevas técnicas y métodos para determinar las características fisiológicas sobre la sensibilidad espectral de diversos animales, lo que permite generar interpretaciones objetivas y contextualizadas (i.e. usando modelos visuales) y poder resolver preguntas sobre la evolución de las señales de color y los sistemas visuales (Vorobyev & Osorio,

1998; Merilaita *et al.*, 1999; Kelber *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2013).

La visión de color puede dirigir la evolución de comportamientos tan diversos como el forrajeo, la evasión de depredadores, el reconocimiento inter-específico y la elección de pareja, convirtiéndose así en una de las modalidades sensoriales de mayor importancia en términos de adecuación (Stevens, 2013). En el caso de los insectos, su notable diversificación está acompañada por una extraordinaria variedad de colores e innovaciones fisiológicas asociadas a la producción de colores de distinta naturaleza (i.e. pigmentarios y estructurales) y a una gran diversificación de sistemas visuales (Nilsson y Kelber, 2007; Vukusic & Chittka, 2013). Dentro de los insectos, los odonatos han sido ampliamente estudiados y representan un sistema modelo dentro de la ecología visual, ya que presentan sistemas visuales extraordinariamente complejos (Futahashi *et al.*, 2015), y una gran diversidad de colores corporales expresados en forma de pigmentos y colores estructurales (Chapman, 1998; Vukusic & Stavenga, 2009).

## 1.2 El sistema visual en Odonata

Estudiar la evolución del color y la visión en insectos implica comprender el origen de la enorme variación de factores implícitos en el origen de las señales de color y la implicación conductual generada por un sistema visual especializado en percibirlos. En éste grupo es posible encontrar variación

cuantitativa y cualitativa en la percepción del color dentro de una misma especie, entre individuos de diferente sexo y en diferentes regiones del ojo, lo cual supone un gran potencial en la co-evolución entre señales y sistemas visuales en éste grupo (Briscoe & Chittka, 2001).

El sistema visual, requiere de la capacidad de los animales para detectar contrastes y resolver distancias entre objetos, es decir, la habilidad para detectar diferencias entre el color y el brillo de un objetivo respecto al fondo donde se encuentra, así como la capacidad de ubicarlo en el espacio (Endler, 1992). El sistema visual de cualquier animal está conformado por una sola familia de proteínas del mismo origen evolutivo y son llamadas opsinas (Cronin *et al.*, 2014). Las opsinas son receptores transmembranales asociados a una subfamilia de las proteínas G, que junto a los cromatoforos retinales forman pigmentos visuales (Shichida & Matsuyama, 2009). La absorción espectral de cada pigmento en los receptores representa diversas capacidades de percibir colores a lo largo del espectro de luz (e.g. 300-700 nm) (Cronin *et al.*, 2014). El sistema visual de los insectos abarca inicialmente una gran diversificación en el número de omatidias presentes en cada ojo (e.g. de 50 en Strepsiptera, hasta 10,000 en Odonata), arregladas en retículas a manera de hexágonos, las cuales pueden presentar diferentes tipos de células receptoras para distintas longitudes de onda (i.e. receptores ultravioleta; UV, longitud corta; SW, longitud media; MW y longitud larga; LW) (Peisker & Gorb, 2010) y especialización en distintas regiones del ojo (Labhart & Nilsson, 1995). En ese sentido, diferentes especies

han evolucionado receptores de distintos tipos y en diferentes proporciones respondiendo a factores adaptativos, por ejemplo el ojo de *Sympetrum frequens* muestra una especialización adaptativa en la parte dorsal y ventral del ojo, la cual sirve para detectar presas contra el fondo y para una óptima navegación (Futahashi *et al.*, 2015, fig. 2).

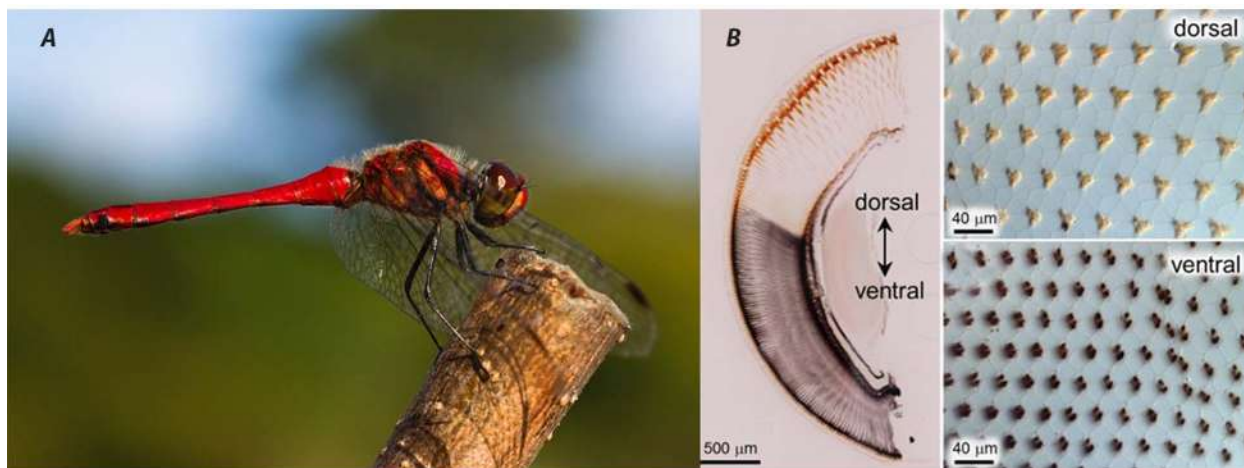


Fig. 2. Variación en la especialización del ojo compuesto en *Sympetrum frequens*. (A) Representa la postura de percha típica de esta especie y el contraste que tiene que resolver entre el color azul del cielo (arriba) y la vegetación verde del sustrato (abajo). (B) Muestra la especialización del ojo, en la parte dorsal el animal presenta una alta proporción de receptores SW y en la parte ventral dominan los receptores MW, (figura modificada de Futahashi *et al.*, 2015).

Algunos de los pioneros en el campo de la investigación de la visión en odonatos determinaron las capas presentes en los ojos así como la cantidad de omatidias presentes en éstos insectos, de forma que se han desarrollado modelos predictivos de la longitud de onda que perciben los individuos en relación al ángulo de incidencia de luz y las capas de la lamela en las omatidias de diversas especies como *Aeshna grandis* y *A. cyanea* (Eguchi, 1971). Rydberg (1959) propuso que existe contraste en la sensibilidad de los odonatos en etapas

larvarias, lo cual es apoyado años después por Pritchard (1966), quien realizó algunas medidas de los caracteres asociados al sistema visual en larvas de *Aeshna interrupta*, *Libellula quadrimaculata* y adultos de *A. eremita*, *L. quadrimaculata* y *Ophiogomphus colubrinus*, este autor realizó una serie de comparaciones entre la posición de los ojos, el número de omatidias presentes y el ángulo de visión que tienen ante una presa tanto los estadios larvarios como los adultos de las especies mencionadas. Sus resultados sugieren que conforme el depredador se aproxima a su presa aumenta su agudeza visual y distingue más claramente en función de la disminución del ángulo de las omatidias y sugiere que los ángulos de visión de estos animales están asociados con la evasión de depredadores (e.g. visión de 360°) y proponen que la visión binocular ayuda a la percepción a distancia en orientación hacia las presas. Este estudio fue de los primeros en sugerir diferencias en la composición estructural de las omatidias dividiéndolas en zona ventral y dorsal (Ruck, 1964) existiendo variación en los receptores presentes en la zona ventral (3 o quizá 4 fotoreceptores) y 2 fotoreceptores para la zona dorsal.

Las técnicas electrofisiológicas tienen una importancia significativa en la determinación de la recepción de colores en el orden Odonata, Laughling (1976) demostró mediante el método de flash que existen al menos tres tipos de rodopsinas que controlan la visión en *Hemicordulia tau*; UV, SW y MW. En ese trabajo también se discute el efecto que pueden tener los receptores del ojo entre sí al aumentar o disminuir la sensibilidad entre ellos, se describen células

receptoras “simples” que producen picos de sensibilidad estrechos con picos en UV (360 nm), SW (440 nm) y verde (510 nm) y células “enlazadas” que producen picos espectrales más anchos sugiriendo que son producto de tres rodopsinas. Por otro lado la sensibilidad a luz polarizada es mayor en las células UV, y se sugiere que pueden funcionar como filtros dicroicos (i.e. dividir la luz en haces monocromáticos o absorber la luz polarizada). En ese sentido la especialización de células fotorreceptoras en el contorno de los ojos compuestos ha generado estudios para determinar la función de las células dorsales en diversos grupos de insectos incluidos odonatos, y se sugiere (Labhart & Meyer, 1999) la presencia de células fuertemente sensibles a la luz polarizada en ésta zona. Las omatidias localizadas en ésta región de los ojos presentan dos juegos de fotorreceptores monocromáticos arreglados ortogonalmente para analizar la luz en una orientación específica de 90° y se sugiere que su presencia en diferentes grupos de insectos (Meyer & Labhart, 1993) representa un indicador de que la visión polarizada surgió temprano en la filogenia de los insectos. La consistencia de un sistema básico tricromático UV-SW-MW es una de las evidencias filogenéticas y moleculares que revelan un ancestro visual común a todos los insectos de la subclase Pterigota y se remonta al periodo Devónico (Briscoe & Chittka, 2001). Análisis filogenéticos más recientes sugieren que en Odonata han ocurrido multiplicaciones y deleciones dinámicas de genes de opsinas, lo cual ha tenido implicaciones en las adaptaciones visuales subyacentes a la historia evolutiva de éstos animales en términos de la conducta y la ecología tanto en hábitats acuáticos como aéreos (Futahashi *et al.*, 2015). Otra síntesis de los trabajos

realizados a nivel electrofisiológico, PCR y transcriptómica (Bybee *et al.*, 2012), propone que en la visión de todo el linaje de odonata se conservan tres copias de opsinas (UV, SW y LW), y sugieren que en los grupos ancestrales probablemente la visión de color dependía únicamente de una copia de cada clase de opsinas. De manera interesante, los resultados de éste estudio (Bybee *et al.*, 2012) resaltan la divergencia entre los sistemas visuales de Anisopteros con alas coloridas y Zygopteros con alas hialinas por lo que la co-evolución del sistema visual y las señales del color en éste orden podrían estar ligadas en ese sentido.

Otras aproximaciones para probar las funciones de la coloración proviene de pruebas conductuales, en la libélula territorial *Mnesarete pudica* por ejemplo, se modificó la coloración UV utilizando una sustancia encontrada en los bloqueadores solares y se propone que la coloración UV actúa en conjunto con la coloración roja también presente en las alas para desplegar o reafirmar una señal de importancia en el reconocimiento sexual y la edad de los individuos (Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014). De igual manera, una aproximación similar en donde se modificó también el color UV existente en las bandas blancas de *Megaloprepus caerulatus* mostró que la reflectancia UV puede servir como predictor del éxito territorial de los machos, donde valores más bajos de reflectancia están presentes en los machos perdedores de las contiendas territoriales, de manera interesante los autores sugieren que éste efecto disminuye conforme los sitios defendidos por los machos (i.e. sitios de oviposición) disminuyen en su calidad (Xu & Fincke, 2015).

La evidencia en Odonata sugiere que se ha conservado la presencia de receptores UV, SW y MW, siendo pocos los estudios que reportan receptores en longitudes de onda más allá de los 600 nm (i.e. LW), en ese sentido Briscoe y Chittka (2001) sugieren una escasa presencia de receptores LW en insectos, y hasta donde conocemos el insecto cuya visión presenta el pico más alto registrado es un escarabajo (*Amphicoma sp.*) con  $\lambda_{\max} = 630\text{nm}$  (Briscoe & Chittka, 2001), por lo que la contribución de color en longitudes de onda más allá de éste rango en la visión de un insecto parece ser relativamente subjetiva en relación a lo que percibiría un animal con una discriminación visual más adecuada para percibir colores más allá de ese rango (i.e. tonalidades de rojo para los humanos).

Uno de los objetivos principales de éste trabajo es abordar desde diferentes aproximaciones la interpretación del uso y la variación en la coloración alar en especies del género *Hetaerina* usando para ello un modelo visual de odonato. Desafortunadamente no existe mucha información sobre la especialización en los sistemas visuales de Zygopteros, y la poca información generada hasta ahora describe sistemas tricromáticos (UV, SW y MW, Huang et al., 2014; Outomuro et al., 2016) en que la contribución de receptores en longitudes de onda largas en la visión no es considerada (i.e. LW). *Sympetrum* es un género de Anisópteros cuyo sistema visual y su conducta han sido estudiados a profundidad en los últimos años (Meinertzhagen et al., 1983; Armet-Kibel & Meinertzhagen, 1983;



Labhart & Nilsson, 1995; Convey, 1989; Michiels & Dhondt, 1990; Futahashi *et al.*, 2015). Dentro del género, *Sympetrum rubicundulum* representa un sistema visual tetracromático con  $\lambda_{\max}$  en 340, 410, 490-540 y 620 nm (Meinertzhagen *et al.*, 1983) cuya sensibilidad espectral incluye desde UV hasta LW y lo hacen el sistema ideal para estudiar la coloración roja típica en las alas de las diferentes especies del género *Hetaerina*. La aproximación general de este trabajo se sustenta en comparar los colores usando el modelo de visión desarrollado por Vorobyev y Osorio, 1998 conocido como “Receptor Noise Limited Model” (RNL) el cual se basa en distancias cromáticas y acromáticas (i.e. color;  $\Delta S$  y brillo;  $\Delta L$ , respectivamente) entre dos objetos con colores similares a fin de predecir si éstos son diferenciables en términos de la proporción de la señal y del ruido de cada canal o fotorreceptor en condiciones fotópicas (i.e. en luz de día, fig. 3). El modelo es ideal en ese sentido, ya que la conducta reproductiva en *Hetaerina* es realizada en buenas condiciones de iluminación.

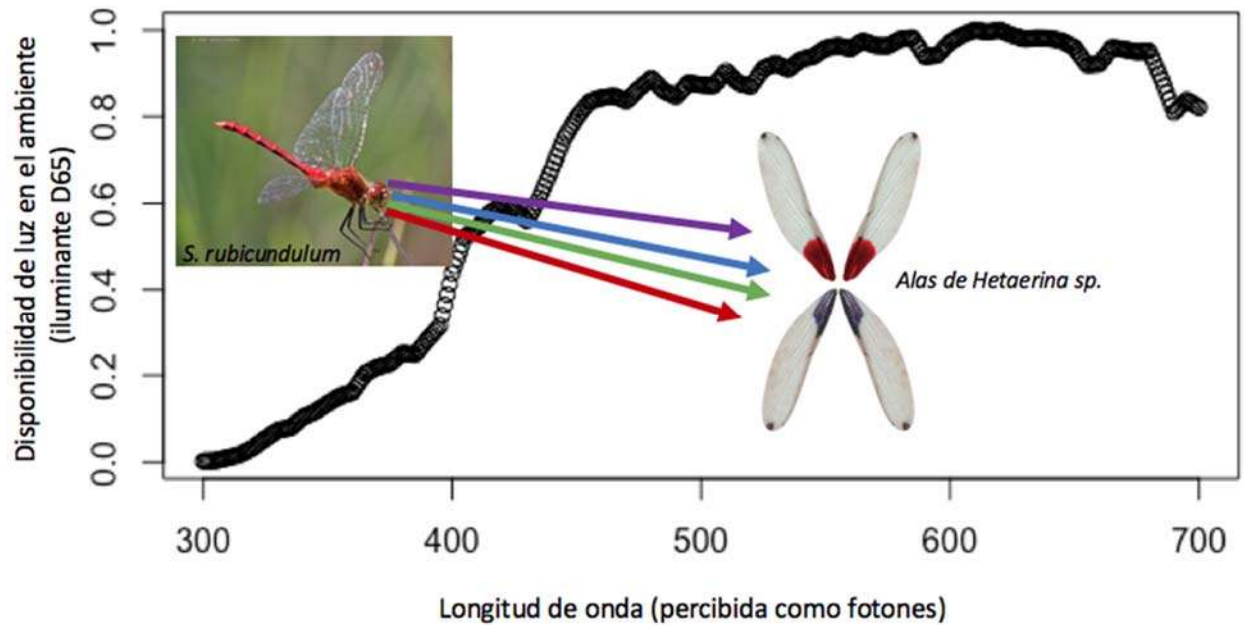


Fig. 3. Representación general del sistema visual usado en éste trabajo y su operación para determinar variaciones en la coloración alar de *Hetaerina*

### 1.3 El sistema de apareamiento en *Hetaerina*

En diversas especies de *Hetaerina* los machos presentan un sistema de apareamiento poligínico tipo lek (Córdoba-Aguilar *et al.* 2009). Los leks están conformados por agregaciones de machos territoriales quienes mantienen y defienden espacios pequeños (i.e. 2x2 m<sup>2</sup>) contra machos intrusos, éstos sitios no presentan ningún tipo de beneficio para las hembras a diferencia de lo que ocurre en otros calopterígididos (e.g. sitios de oviposición) por lo que aparentemente el único recurso para las hembras es la obtención de apareamientos (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009; Córdoba-Aguilar & González-Tokman, 2014, pero ver Guillermo-Ferreira & Del Claro, 2011, Chávez-Chávez, datos no publicados). En ese contexto, el éxito reproductivo de los machos es definido empleando diversas estrategias alternativas de apareamiento (i.e

territorialidad, no territorialidad, alternancia de ambas; Raihani *et al.*, 2007, Castillo- Ayala, 2012) siendo los machos territoriales quienes obtienen un mayor número de cópulas (Serrano Meneses *et al.*, 2007; Contreras Garduño *et al.*, 2008). Las hembras arriban a los leks y son capturadas por los machos, por lo que se ha sugerido que no hay elección femenina, sin embargo, las hembras al arribar a los sitios lek estarían asegurando aparearse con los machos capaces de defender éstos sitios. Una vez que un macho intercepta una hembra la cópula ocurre si ella accede, el tiempo para que la hembra acceda a la cópula es variable, por lo cual el macho puede realizar varios intentos al doblar su abdomen acercando a la hembra mientras despliega sus alas, algunos autores han especulado sobre un posible proceso de selección femenina pre y post-cópula, dados los casos de elección críptica femenina en otros calopterigidos (Contreras-Garduño *et al.*, 2007). Una vez ocurrida la cópula, la pareja en tándem vuela en busca de un sitio para que la hembra oviposite, este comportamiento es diferente al que realizan muchos otros odonatos territoriales quienes no abandonan sus sitios de defensa para acompañar a la hembra, en este lapso de tiempo la pareja puede ser acosada por otros machos, los cuales intentan separar a la pareja para poder copular con la hembra, (Alcock, 1982). Posterior a la cópula, los machos pueden o no vigilar a la hembra mientras ésta oviposita, independientemente de si estén o no dentro de su territorio y a pesar de que al estar sumergida no puede ser capturada o aparearse con otros machos (Johnson, 1961). Sin embargo, el resguardo post-cópula es común en la mayoría de especies de *Hetaerina*

estudiadas (e.g. *H. americana*, *H. cruentata*, *H. titia* y *H. vulnerata*, Alcock, 1982; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2007;2009)

#### 1.4 Función de la coloración en *Hetaerina*

Se han propuesto diversas hipótesis sobre la información presente en las manchas alares de los machos en *Hetaerina*, algunos estudios han sugerido que en términos de selección sexual el tamaño de la pigmentación alar tiene un rol importante en la competencia entre machos (Grether, 1996a), ya que aumentando experimentalmente el tamaño, los machos mantuvieron por más tiempo su territorio (Grether, 1996). Sin embargo, también se ha propuesto que el tamaño de las manchas puede representar una desventaja, porque al ser más conspicuas reducen la frecuencia de captura de presas (Grether & Grey, 1996). Serrano-Meneses y colaboradores (2007), encontraron relación entre la mancha alar como un indicador de la capacidad de defensa territorialidad de los machos en *H. americana*, siendo los machos más agresivos, los más grandes y con mayor proporción en su pigmentación alar; esto establece la posibilidad de que los combatientes se “evalúen” simultáneamente utilizando la información transmitida tanto por el tamaño, como por los patrones de la pigmentación alar. En otros grupos cercanos se ha establecido que la evaluación competitiva de los individuos puede ser definida a través de guerras de desgaste (Marden & Waage, 1990) en donde los contendientes realizan vuelos ritualizados escalonados sin

tener contacto físico hasta que uno de ellos llega a un umbral de restricción fisiológica y abandona la contienda.

Recientemente se ha propuesto que la señalización intra-específica puede estar sujeta al reconocimiento de las señales enviadas por los machos de *H. americana*, González Santoyo y colaboradores (2014) demostraron experimentalmente (i.e. cubriendo las manchas de machos territoriales con marcadores azules), que un "desajuste" en el reconocimiento de las señales enviadas en las disputas territoriales incrementa las respuestas de agresividad hacia los machos manipulados experimentalmente, disminuyendo su supervivencia. En términos de interacciones inter-específicas, se ha propuesto para algunas especies de *Hetaerina* que la agresión inter-específica está involucrada en el desplazamiento de caracteres (Anderson & Grether, 2010), lo cual explica la variación de la pigmentación en especies simpátricas, y se sugiere la ausencia de reconocimiento inter-específico a través de la pigmentación alar de los machos por parte de las hembras (Drury & Grether, 2014). Sin embargo, pocos de estos trabajos se han enfocado en describir las características del color y su papel como señal; en general no se ha encontrado evidencia que indique que las características de la coloración de los machos en este género de odonatos se relacionen con alguna señal honesta de calidad (Contreras Garduño *et al.*, 2007). Además, a diferencia de lo que se ha reportado en otros calopterígidos (*M. pruinosa*; Hooper *et al.*, 1999, *M. pudica*; Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014), en *H. americana* se sugiere que ninguna característica del color de las alas (i.e.

saturación, brillo, croma), actúa como una señal indicadora de la edad o de la condición corporal que pueda ser utilizada en la resolución de conflictos durante la competencia intra-sexual (Contreras Garduño *et al.*, 2007). En insectos, son pocos los casos en los que los parches de coloración roja se emplean como señal agonística, lo que podría explicar por qué en este grupo es raro encontrar receptores y opsinas sensibles a longitudes de onda largas (LW) (Briscoe & Chittka, 2001, pero ver Futahashi *et al.*, 2015).

En *Hetaerina*, los machos realizan sus conductas sexuales bajo buenas condiciones de iluminación cuando sus colores son más conspicuos y la comunicación de sus señales es más eficiente. En éste trabajo utilizamos una aproximación con modelos visuales para explorar las implicaciones de la coloración de ambos pares de alas en éste grupo de odonatos en términos de competencia intra-específica y en el reconocimiento inter-específico. Evidencia reciente sugiere que puede ocurrir evolución independiente en alas posteriores para incrementar los despliegues sexuales de coloración en algunos calopteríidos, sin embargo, ya que no existen hasta ahora estudios dedicados a determinar la variación de la coloración en alas anteriores y posteriores en *Hetaerina*, el primer capítulo de éste trabajo está dedicado a explorar dicha variación en distintas edades reproductivas en machos adultos de *Hetaerina* y las posibles implicaciones como señales de las capacidades metabólicas presentes en machos senescentes, así como el papel de la coloración ultravioleta en la resolución de interacciones agonísticas entre machos. En el segundo

capítulo ampliamos la descripción de la variación a un nivel inter-específico dentro del género y mediante el uso de los modelos visuales analizamos la capacidad de reconocimiento inter-específico a través de la variación de color presente en 5 especies de *Hetaerina*. Por lo que este trabajo, representaría hasta donde sabemos la primer evidencia de variación intra- e inter-específica de la coloración reportada para *Hetaerina* y su posible efecto en el reconocimiento en ambientes lumínicos contrastantes.

## **2. Hipótesis:**

- 1) La variación en las propiedades de coloración alar de diversas edades reproductivas en machos de *H. cruentata* se encuentra asociada a su condición metabólica por lo que esperamos una relación negativa en el nivel de reflectancia de los individuos asociado a una disminución en el metabolismo a edades senescentes.
- 2) Las especies de *Hetaerina* presentan firmas espectrales específicas para diversos ambientes lumínicos en donde pueden o no coexistir, dadas éstas combinaciones esperamos que existan umbrales óptimos de reconocimiento y discriminación cuando las especies coexisten.
- 3) La probable especialización del sistema visual en *Hetaerina* bien podría contribuir a que la variación intra e inter-específica de la coloración permita el reconocimiento entre edades y entre especies. El uso de un modelo visual consistente en la interpretación de datos de coloración

puede ser una herramienta eficiente para demostrar cambios sutiles y graduales de la coloración.

### **3. Objetivo general:**

Determinar si las características de color de las manchas alares en *Hetaerina* representan señales visuales que pueden determinar las interacciones antagonistas intra-específicas y si permiten el reconocimiento inter-específico en diversos escenarios ecológicos.

#### 3.1 Objetivos particulares:

- 1) Analizar si la variación de coloración alar en machos reproductivamente activos de *Hetaerina* podría representar una señal honesta de calidad de los machos.
- 2) Determinar si existe relación entre las cualidades de la coloración alar y la condición metabólica de machos de diferentes edades reproductivas.
- 3) Analizar el efecto de la coloración ultravioleta en el reconocimiento intra-específico en *H. cruentata*.
- 4) Estudiar la variación inter-específica de la coloración alar y determinar la existencia de firmas espectrales en el género *Hetaerina*
- 5) Describir si las señales de color de las distintas especies al ser desplegadas en ambientes lumínicos contrastantes puede modificar la percepción y discriminación del sistema visual de un odonato.



## Capítulo I

### **Wing spot coloration contrasts and competitive status in the territorial damselfly *Hetaerina cruentata***

Pedro Castillo-Ayala & Luis Mendoza-Cuenca

Laboratorio de Ecología de la Conducta, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Fco. J. Múgica S/N, 58030, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán

#### **Abstract**

Colour change is a common mechanism in Odonata involved in several adaptive contexts, including thermoregulation, sex colour polymorphism and nuptial colouration. To efficiently display colours, damselflies generally do it under good lightning conditions when their colours are more conspicuous and signal communication is more efficient. However, nuptial colour differences in secondary sexual traits have not been reported in territorial damselflies such as *Hetaerina*. We compared different views of the wing-spot colouration in two reproductive ages in males of *Hetaerina cruentata*. We evaluated colour differences in young and old males using a model of odonate visual system, and compared their relative condition during two metabolic rate experiments. Finally, we investigated if different colour cues may be used in intra-sexual recognition by experimentally modifying spot colours in behavioural tests. We found that a colour change occurs in *H. cruentata* males as they age. Such differences

represent independent colour cues in hind and forewings and are negatively related to a decrease in metabolic rate. The behavioural tests showed the possible use of short- wave range colours (i.e. UV and SW) to detect competitors. We also found intra-sexual responses between colour modified males and territorial males. We conclude that, given the variation among colour and metabolic rate, male competitive signals might involve the use of colour cues to optimize energetic costs through ontogeny. This new approach for colour comparisons in visual signalling in *Hetaerina* allows to study the discarded use of colour signals in closely related species.

*Keywords: Colour contrast, wing- spot colouration, Hetaerina, senescence, mating strategies*

## **1. Introduction**

Evolutionary theory predicts the existence of life history trade-offs between current and future reproductive opportunities (Sterns, 1992), based on continuous assessment of individuals' phenotypic signals associated with reproductive success and competitive status (Booth, 1990), across the ontogenetic stages involved in sexual selection (Johnstone, 1995; Kokko, 1997; Kokko *et al.*, 2002). Such signals must be reliable for receivers whose behavioural responses optimize opponent evaluation and their own mating opportunities (Bradbury & Vehrencamp, 1998). In this context, negative effect

on metabolic rate, mating status or any other fitness component associated with senescence or aging that are followed by a decrease in the signalling properties of the phenotypes (Finch & Kirkwood, 2000). These signals could be used by mates and rivals as an indicator mechanism to assess the quality of individuals and determine their behavioural responses (Kokko, 1998; Andersson *et al.*, 2002).

*Hetaerina* is a genus of territorial damselflies with conspicuous sexual dimorphism where males have a red spot at the base of their four wings (Garrison, 2006). This spot takes on average two weeks to reach a terminal size and colour after emergence, and once reaches sexual maturity will be fixed (Córdoba-Aguilar & Cordero Rivera, 2005). Wing spot in *Hetaerina* has evolved by intra-sexual competition (Grether, 1996), where size correlates with different physiological condition like fat content and muscle mass (Contreras-Garduño *et al.*, 2008). The size of the spot is larger in territorial males compared to non-territorial males (Grether, 1996; Serrano-Meneses *et al.* 2007; Contreras-Garduño *et al.*, 2007, 2008). Although experimental manipulations of wing colouration suggest that some red wing spot characteristics (i.e. fullness; Grether, 1996) predict fighting ability. This may serve as a signal to reduce aggression from mature males and plays an important role for sex recognition (Grether *et al.*, 2015). Other aspects of wingspot coloration, such as hue, saturation and chroma, do not seem to change with age, and are not related with territorial status or mating success (Contreras-Garduño *et al.*, 2007). Other studies have proven that colour is indeed useful to communicate fighting ability,

and changes in its properties may have negative effects on physiological condition and survival among males (González-Santoyo *et al.*, 2014). The use of visual colour cues during aggressive and sexual communication resemble a complex colour signal that may be an informative trait considering different physical colour properties in the wing- spots of *Hetaerina*. Recently, Stavenga *et al.*, (2013) found that longwave (LW) colouration in *H. americana* is in fact enhanced in terms of its refractive index in relation to the shortwave (SW) absorbing pigments, this effect in the refractive index may have been unadvertised in previous research as well as UV colouration associated to SW colours in the wing spots of *Hetaerina* species.

We investigated colour differences in males of two reproductive ages as well as their metabolic condition during two metabolic tests (see methods for details) and carried-out behavioural observations to test if such colour differences are involved in intra and intersexual recognition. To test for differences in colour aspect in wing spots, we compared chromatic (i.e. colour) and achromatic (i.e. brightness) contrasts between wing spots and ages by modelling colours using the visual system of a well-studied odonate, *Sympetrum rubicundulum*. This model has been used previously to study odonate colour contrasts between species and background discrimination (Fincke & Schultz, 2013) and given its tetrachromatic visual system phenotype, we surmised that red coloration could be an effective trait used by this species in individual recognition. Since we expected physical colour properties to change with age, we

predicted metabolic rate effects related to male senescence in terms of physiological constraints explained by differences in metabolism. We discuss our findings in the light of multicomponent signals and signal honesty.

## **2. Materials and Methods**

### **(a) Study species and age classification for colour comparisons and metabolic rate measurements.**

The study was conducted on the Pixquiac river, near Xalapa city in the state of Veracruz, Mexico (19°29'26.37" N, 96°56'41.54" O) using a wild population of *Hetaerina cruentata* (Odonata: Calopterygidae). We used marking-recapture methods to determine territorial and non-territorial individuals, as well as the number of days they remained in the population. During two consecutive days, we marked 90 males using a unique combination of three colours in abdominal segments 3-5 (following Anderson *et al.*, 2011) and categorised them by age following previous descriptions for calopterygid damselflies (Plaistow & Siva-Jothy, 1996; Contreras- Garduño *et al.*, 2008). We used young and old reproductively active males; young males have bright body colouration, wings are flexible and highly transparent and old males have darker and pale colouration, abundant pruinosity and wings are less flexible and more fragile, with dark to pale coloration (Contreras- Garduño *et al.*, 2008). For age comparisons, on the third and fourth day we collected 17 young territorial males

that fulfilled both phenotypic description for category 2 (Contreras-Garduño *et al.*, 2008) and aggressive behaviour; these set of young males (n=17) was our first cohort for metabolic measurements (see below). Eight and nine days later we collected 13 old males (i.e. category 3; Contreras- Garduño *et al.*, 2008) that had been marked during the first two days and were observed as territorial males at the beginning of our sampling but that turned to be outside the sites where territorial aggression was more common (i.e. lekking sites where we collected young males). These individuals (n=13) represented our sample of old males. We selected 8 young and 8 old males for colour comparisons using the Multi Spectral Image Analysis (MICA toolbox) for ImageJ following Troscianko & Stevens (2015) to show chromatic and achromatic variation between ages. Animals were killed by freezing after the metabolic tests and we dissected the wings from the base in order to measure spot coloration.

### **(b) Colour comparison analysis**

We used an Olympus Pen E-PM2 camera which was converted to full spectrum (Lifepixel.com) together with a UV transmitting 50mm lens with aperture capacity of 4.5-22 *f*. We took two photographs of the four wings together (i.e. visible and UV) using a fixed aperture (*f* /4.5) and optimizing the exposure of each photo between visible and UV photos. The source of light was controlled using an Iwasaki EYE Color arc lamp (70 W 1.0 A; Venture Lighting Europe Ltd. Hertfordshire, UK) whose UV filter was removed allowing a complete range of

illumination (~300-700 nm), a white flat reflectance piece of PTFE Teflon was used as background. After processing each multispectral image, we selected 4 regions of interest ROI (i.e. each wing spot) for each male (fig. 1). We compared 8 young males with 8 old males and analysed their colours using the MICA toolbox for ImageJ (Troscianko & Stevens 2015). We used pseudo images to show wings colour variation between old and young males. Colour channels were shifted one waveband down so that SW colours (blue) represent ultraviolet coloration while the red channel was ignored (fig. 1). Colour analysis was performed by modelling colours to a specific visual system of interest. Since we didn't have physiological information of the visual system of *H. cruentata*, we modelled colours as perceived by *S. rubicundulum*, which represents an adequate approach given the presence of photoreceptors UV, SW, MW and LW. We used the spectral sensitivities provided in Meinertzhagen *et al.*, 1983, which were included in the MICA software together with cone proportions calculated from Armet-Kibel & Meinertzhagen, 1983 for each photoreceptor type. Chromatic contrast analysis in the MICA toolbox are based on the Receptor Noise Limited Model developed by Vorobyev & Osorio (1998) and a modification of it (Siddiqi *et al.*, 2004) allows for achromatic contrast calculations. We used a Weber fraction of 0.12 in the model to calculate both chromatic and achromatic contrasts given there is no behavioural information regarding receptor noise for any odonate and the MW channel to represent the luminance channel following Spaethe *et al.*, (2001) for achromatic calculations. Our approach here emulated other studies which used this value in accordance to the receptor noise in *Apis mellifera*

(Hempel De Ibarra *et al.*, 2000; Vorobyev *et al.*, 2001; Schultz & Fincke, 2013). We analysed chromatic and achromatic contrast in an experimental set up by testing the probability that *S. rubicundulum* could discriminate between two stimuli. First we investigated the discrimination level if the receiver would compare within age categories of wing spots (i.e. young males only), and second we determined if it would make any difference if the receiver would compare between age categories (i.e. young males against old males) for each wing class measured. Both stimuli were compared using Wilcoxon two-sample tests in JMP 9.0, SAS Institute (fig. 2). Results represent the mean *JND* value (just noticeable difference) and error bars are standard errors. The results are provided in *JND* units (Just Noticeable Differences) and are based on a discrimination threshold (Vorobyev *et al.*, 2001) but here we took a conservative approach for interpretation of psychophysical discrimination relative to known discrimination thresholds (Renoult *et al.*, 2015).

### **(c) Experimental design for metabolic rate**

To have an estimate of metabolic rate (i.e. CO<sub>2</sub> production in ppm) we used a short range respirometer Q-Box RP1LP (Qubit systems), we measured 17 young males and 13 old males during 10 minutes in two different tests. The first day after collection, we measured the basal metabolic rate (BMR1) and 2 hours later after an endurance flight test (EFT1). Animals were kept in a butterfly net for the next 2 days and the experiment was replicated (BMR2-EFT2). The 10 minute CO<sub>2</sub>



recorded data was integrated using LoggerPro V 0.3. We first analysed individual weight and used correlations to explore relations between weight and metabolic rate and performed ANCOVAs in R Software V. 1.0.136 (R development core team, 2016). We used weight as our covariate to correct for body mass differences that could bias the metabolic rate in age classes by metabolic tests (i.e. basal metabolic rate and metabolic rate after an endurance flight test).

#### **(d) Behavioural tests**

Using a thin coat of sunscreen, we modified the wing spot such that LW colouration was retained and UV-SW colouration was reduced in order to test if male communication in *H. cruentata* requires colour cues not totally dependent on LW (red) colouration (Apéndice 1, fig. 1). We carried out two types of territorial intrusion tests, which consisted on either one the following; the first type consisted of manipulated males with thin coats of sunscreen applied on the four wing spots, the second type were non- manipulated males (i.e. no sunscreen applied) using the same procedure when applying the sunscreen but using a clean swap. We used a modified fishing pole and 40 cm of transparent nylon to tether males using a small drop of dry-fast liquid silicone and recorded behavioural responses during 2 minutes per test. We compared the aggressive responses of territorial males to tethered manipulated and non- manipulated males flown within 50 cm of the territory holder's perch range. Experimental males were captured and held in a mesh container ca. 20 min before the trials reproducing previous behavioural approaches (Anderson & Grether, 2010; Guillermo- Ferreira *et al.*, 2014). We made 10 tests for non-manipulated males

and 10 tests for experimentally UV-SW reduced males using a P20 Riemann quick-drying liquid sunscreen (SPF 15). Experiment treatment order was determined randomly and was unique for each territorial male tested. Territorial intrusions were performed by the same person. We registered 4 behavioural responses; (1) Highest flight inversion during the 2-minute test (i.e. the longest territorial flight measured in seconds), (2) number of displayed aggressive events (i.e. independent of length), (3) number of short chases (i.e. short recognition flights, <2 seconds) and (4) total amount of aggressive behaviour (i.e. the sum of the three categories described before during the 2-minute experimental window). Territorial males' chasing time was  $\log(x + 0.01)$  transformed for analysis and two- sample Wilcoxon tests were used to compare differences in aggression between UV- SW manipulated and non- manipulated males during our two minute tests.

### **3. Results**

#### ***Colour contrasts in two ages of *H. cruentata****

In our colour analysis, we found that odonate visual systems (*S. rubicundulum*) can potentially discriminate chromatic and achromatic contrasts in different age classes. Our visual model could discriminate forewings in both chromatic and achromatic contrasts (external achromatic forewing view;  $Z = -7.0044$ ,  $p < 0.0001$ , internal chromatic forewing view;  $Z = -4.2795$ ,  $p < 0.0001$ ). For hindwings, we only found differences in achromatic contrast for the external view

( $Z=-3.7952$ ,  $p<0.0001$ ) but not for the internal chromatic view ( $Z=-1.5965$ ,  $p=0.1104$ ). This wing spot view is characterized for presenting a high amount of black pigment (fig. 2).

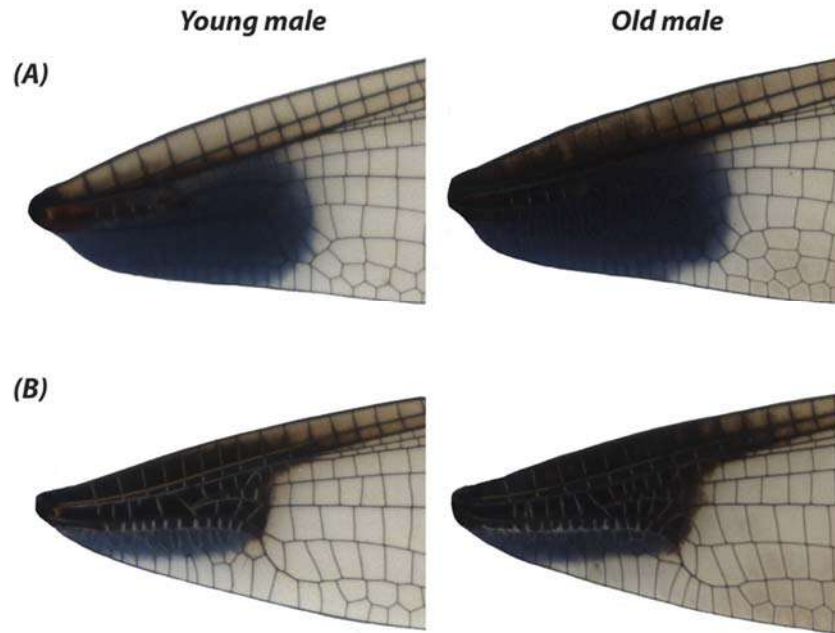


Fig. 1. Wing spot colouration of young and old adults of *H. cruentata* males using a pseudo image to illustrate change in ultraviolet colouration. Colour channels were shifted one waveband down so that SW colours (blue) represent ultraviolet coloration. (A) forewings and (B) hindwings.

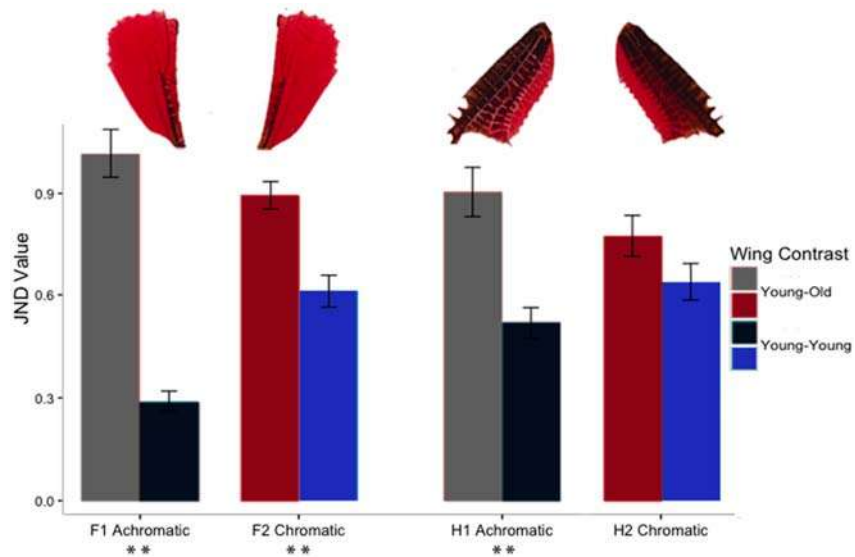


Fig. 2. Comparison of contrast differences within (black-blue bars) and between (grey-red bars) reproductive ages for forewings (F1-F2, external and internal view, respectively) and hindwings (H1-H2, external and internal view, respectively), higher levels of *JND* value represent higher discrimination probability for the visual system. \*\*  $p < 0.0001$

### **Age differences in metabolic condition**

There were no significant differences in weight in relation to age (Student's *t* test;  $t_{28} = -1.66$ ,  $p = 0.1065$ ). We checked for differences in age and metabolic rate (corrected by weight and correlations for weight and metabolic rate) using ANCOVAs during the four tests. For the two tests in day one, we found differences during the basal metabolic rate by age (BMR1;  $t_{27} = -2.2044$ ,  $p < 0.0362$ ) and a positive relation to weight ( $R^2 = 0.2752$ ,  $p < 0.0130$ ) but not during the endurance flight test (EFT1;  $t_{27} = -0.4937$ ,  $p = 0.6255$ ,  $R^2 = 0.0867$ ,  $p = 0.2939$ ). For our tests during the third day, we found the same pattern, our second basal metabolic rate explained differences by age (BMR2;  $t_{27} = -2.6914$ ,  $p < 0.0121$ ) and also a positive relation to weight ( $R^2 = 0.2160$ ,  $p < 0.0374$ ) but no differences during the second endurance flight test (EFT2;  $t_{27} = -1.7976$ ,  $p = 0.0834$ ,  $R^2 = 0.1945$ ,  $p = 0.0539$ , fig. 3).

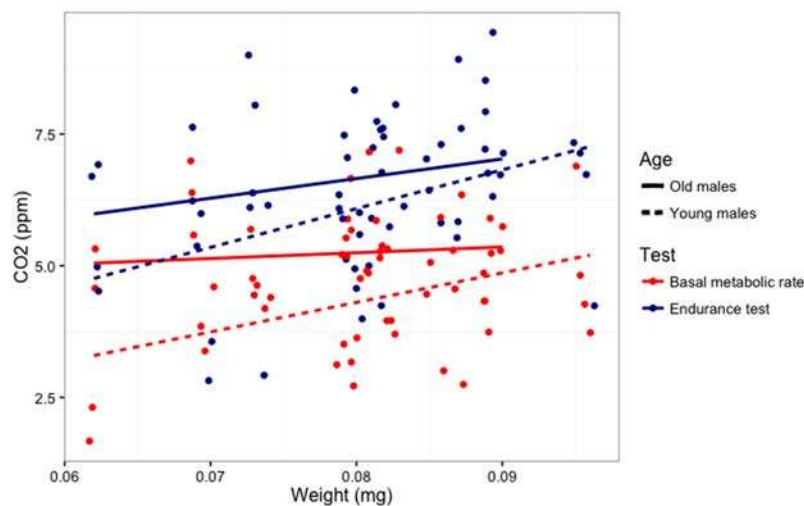


Fig. 3. Correlation in weight and metabolic rate (CO<sub>2</sub> ppm) in relation to reproductive age (young males and old males) during two metabolic tests. Solid lines are old males and dashed lines young males. Blue lines represent basal metabolic rate and red lines represent metabolic rates during the 2-minute endurance flight tests.

### ***SW effect on behavioural contests***

We found differential aggressive responses when we reduced the UV-SW colour in wing spots during our behavioural tests compared to non-manipulated males (fig. 5). Three of our aggression categories were significantly and negatively different (number of displayed aggression events;  $Z= 3.3256$ ,  $p<0.0009$ , longest display;  $Z=2.7090$ ,  $p<0.0067$ , total amount of aggression;  $Z=3.1229$ ,  $p<0.0018$ ) except for the short chase category ( $Z=-1.9050$ ,  $p=0.0568$ ).

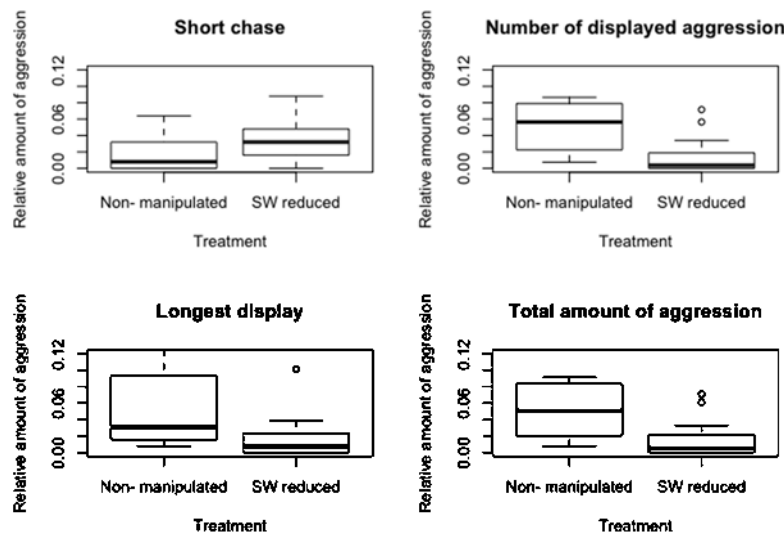


Fig. 5. Results of relative aggression time for non-manipulated behavioural tests (i.e. colour non manipulated) and SW treatment (i.e. colour manipulation using sunscreen to reduce reflection in UV and SW bands)

## **4. Discussion**

Here we report the first evidence for nuptial colour change in senescent males in *H. cruentata*. We found evidence that young reproductive males go through a colour change during their senescence, which is detectable by a model of odonate colour vision under daylight conditions. Previous research compared wing spot colour characteristics in three different adult ages in *H. americana* and also during an immune challenge and a no food treatment but failed to find any change in colour properties across any of these comparisons (Contreras-Garduño et al., 2007). This study states that pigmentation amount allocation is more important than colour aspects related to the spot because it correlates with fat reserves at an age when males are more likely to be territorial (Contreras-Garduño et al., 2006). Nevertheless, this study only measured differences between anterior wings focusing on explaining differences in red chroma values, hue (maximum percentage reflectance values within the red chroma zone; i.e. 600-700 nm) and brightness measured as the total reflectance within the measured range (i.e. 360-740 nm). To the best of our knowledge maximum “red” peaks for anterior wings (forewings) is reached at  $\lambda_{\max} = 655-660$  nm (Castillo-Ayala et al., in prep.), which is out of the LW range perception for any insect reported (Briscoe & Chittka, 2001) so arguing that colour variation between ages only considering this range might not be totally informative. Also, forewings in *Hetaerina* present very little variation in colour properties compared to spectra found in hindwings (Castillo-Ayala et al., in prep.). In this respect, recent evidence has suggested that shape and colour displayed in hindwings is more

informative in a sexual context in calopterygids (Outomuro et al., 2011; Outomuro et al., 2013). Our results suggest that the main variation in colour properties is not found within the LW range of wing spot colours (i.e. LW) but in the UV-SW range (Apéndice 1, fig. 2). The importance of red refractive index in LW colours has been recently explained (Stavenga et al., 2013) showing that the SW colours in the wing spot in *H. americana* enhance reflection of LW. The information provided by short wavelength colours in *Hetaerina* species might be indeed more informative than the information within the LW range given the prevalence of UV-SW-MW opsins and photoreceptors found in the Odonata (Briscoe & Chittka, 2001; Bybee et al., 2012; Futahashi et al., 2015).

We found that the nuptial colouration change that occurs in senescent males is related to an increase in metabolic rate suggesting a possible role in the reproductive behaviour of this damselfly. Recent studies on senescence in males of *H. americana* tested changes in behaviour by challenging the immune system of two age classes with a nylon implant (González-Tokman et al., 2013). This study suggests that resource allocation is stronger for mature males compared to young ones. Such resource allocation differences are explained by the terminal investment hypothesis that males will deal with trade-offs related to resource optimization in relation to future reproductive opportunities in order to maximize life-time reproductive success (Sterns, 1992). We found that old males' metabolic rate after an endurance flight test does not differ from young males but basal metabolic rate does. This can be interpreted as a strategy of terminal investment

because old males invest their energy and time to obtain copulations using a more conservative territorial behaviour (i.e. sneaking) because their chances or mortality are higher compared to young males (González-Tokman *et al.*, 2013b). In this respect, in *Hetaerina*, coexistence of alternative mating strategies (i.e. territorial and non-territorial behaviour, is common; Córdoba-Aguilar & Cordero-Rivera, 2005) and alternation between both strategies is known to occur (Raihani *et al.*, 2007). This, in theory, suggests that there are different capacities of physiological recovery over time by some males which could be related to age and could explain why some males are able to optimize their energetic expenditure and perhaps live longer than other males. If the male's condition correlates with aspects of male quality, it would be adaptive to communicate this advantage to females through their wing spot colouration as happens in other calopterygids (Plaistow & Siva Jothy, 1996; Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014). Certainly we would need to investigate further senescent effects in both sexes relative to their fitness and independent selection pressures to provide information regarding the possible effects of this colour change.

It has been argued that conspicuousness of the spot size might be a disadvantage during prey (Grether & Grey, 1996). However, spot size is related to body condition, which has been shown to have a substantial effect in mating success in highly territorial males (Serrano-Meneses *et al.*, 2006; Contreras-Garduño *et al.*, 2007). This trade-off might also include a colour cue associated to reproductive age identification which could reflect competitive status



evaluation by physiological constraints related to overall condition. If SW colours in the wing spot in *H. americana* enhance reflection of LW, thus, it is necessary to investigate if these colour dependencies and its variation is accumulated by mechanical use of the wings during life history. For example, it could be a by-product of differences in mating strategy investment of highly territorial males (i.e. young territorial males) or reflects colouration of non- territorial males (i.e. old non- territorial males) that can reach a senescent age. Animals reaching a senescent age might be an indicative of viability for females but it would be important to detect what behavioural conditions and physiological constraints promotes males reaching this age. For example, males might go through hormonal changes related to senescence which could be related to changes in foraging activity. This idea was experimentally tested and explained an increase in lifespan and territorial activity in *H. americana* (González- Tokman et al., 2013). Such changes in behaviour can be explained by the places where we found old males, which were outside the lekking sites were most territorial confrontations occurred, suggesting an alternative mating strategy by resource constraints caused by senescent effects.

Here, we proved that there are two important stages of colour cues indicated during two reproductive ages of *H. cruentata* males. Males of different ages represent different trade-offs accumulated during their life history and their behaviours are associated to different colour properties; young teneral males have a characteristic brightness and reduced wing spot colour in their wings and

their behaviour is dedicated to foraging until approximate the tenth day of life when they become territorial (Grether *et al.*, 2015), while senescent males present pale wings and reduction in territorial behaviour as well as wing spot colour properties referenced against middle aged males as shown here. It has been proved that the effect of early stage development in naiads of *Hetaerina* has an effect on the size of the wing spot when animals reach their adulthood (Álvarez *et al.*, 2013), which is important in territorial interactions, but size alone might not be a net efficient selective character given that reproductive success shows a disruptive pattern with small and large males being relatively successful (Serrano- Meneses *et al.*, 2007). Wing red spot colouration of immature males may serve as an honest signal to reduce aggression from mature males and also is an important trait for sex recognition. For example, it has been tested if experimentally manipulated females were attacked at the same rate as mature males when they had they wings painted red simulating an intruder. In some cases, these females were even clasped which suggest that other factors other than the red spot influence male responses (Grether *et al.*, 2015). We found three cases where territorial males clasped our UV-SW manipulated intrusion males, which supports the idea that other visual signals not related to red colours may have an important role in sex recognition. In this context, our results in behavioural tests suggests the existence of possible cues reflected by both wings differentially in terms of their chromaticity and achromaticity in relation to the use of UV-SW colours.

## **References**

- Álvarez HA, Serrano-Meneses MA, Reyes-Márquez I, JiménezCortés JG, Córdoba-Aguilar A. 2013 Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (Calopterygidae: Hetaerina). *Biological Journal of the Linnean Society*. 108: 521–533.
- Anderson CN, Córdoba-Aguilar A, Drury JP, Grether GF. 2011 An assessment of marking techniques for odonates in the family Calopterygidae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 141: 258–261.
- Anderson CN, Grether GF. 2010 Interspecific aggression and character displacement of competitor recognition in Hetaerina damselflies. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 277: 549–555.
- Andersson M. 1994 Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Andersson S, Pryke S, Ornborg J, Lawes M, Andersson M. 2002 Multiple Receivers, Multiple Ornaments, and a Trade-off between Agonistic and Epigamic Signaling in a Widowbird. *American Naturalist*, 160 683–691.
- Armet-Kibel C, Meinertzhagen IA. 1983 Structural organization of the ommatidium in the ventral compound eye of the dragonfly *Sympetrum*. *Journal of Comparative Physiology*. 151: 285- 294.
- Booth C. 1990. Evolutionary significance of ontogenetic colour change in animals. *Biol. Journal of the Linnean Society*. 40: 125-163.
- Bradbury JW, Vehrencamp SL. 1998 Principles of animal communication. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Contreras-Garduño J, Buzatto BA, Abundis L, Nájera-Cordero K, Córdoba-Aguilar A. 2007 Wing color properties do not reflect male condition. *Ethology*. 113: 944– 952.
- Contreras-Garduño J, Buzatto BA, Serrano-Meneses MA, Nájera-Cordero K, Córdoba-Aguilar A. 2008 The red wing spot of the American rubyspot (*Hetaerina americana*) as a heightened condition-dependent ornament. *Behavioral Ecology*. 19: 724–732.
- Córdoba-Aguilar A, Cordero-Rivera A. 2005 Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotropical Entomology*. 34: 861–879.
- Córdoba-Aguilar A. 1993 Cambios de coloración en adultos de *Hetaerina cruentata* (Rambur) (Odonata: Calopterygidae). *Brenesia*. 40: 181-183.
- Finch CE, Kirkwood TBL. 2000 Chance, Development, and Ageing. Oxford University Press, Oxford.

- Garrison RW. 2006 A Synopsis of the genera *Mnesarete* Cowley, *Bryoplathanon* gen. nov., and *Ormenoplebia* gen. nov. (Odonata: Calopterygidae). Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles. *Contributions in Science*. 506: 1–84.
- González- Tokman DM, González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. 2013 Mating success and energetic condition effects driven by terminal investment in territorial males of a short-lived invertebrate. *Functional Ecology*. 27: 739-747.
- González- Tokman DM, González-Santoyo I, Munguía- Steyer R, Córdoba-Aguilar A. 2013b Effect of juvenile hormone on senescence in males with terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology*. 26: 2458-2466.
- González-Santoyo I, González-Tokman DM, Munguía Steyer RE, Córdoba-Aguilar A. 2014 A mismatch between the perceived fighting signal and fighting ability reveals survival and physiological costs for bearers. *Plos one*. 9, e84571.
- Grether GF, Drury JP, Berlin E, Anderson CN. 2015 The role of wing coloration in sex recognition and competitor recognition in rubyspot damselflies (*Hetaerina* spp.) *Ethology*. 121: 674–685.
- Grether GF, Grey RM. 1996 Novel cost of a sexually selected trait in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*: conspicuousness to prey. *Behavioral Ecology*. 7: 465—473.
- Grether GF. 1996 Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution*. 50: 1949–1957.
- Guillermo-Ferreira R, Therezio EM, Gehlen MH, Bispo PC, Marletta A. 2014 The role of wing pigmentation, UV and fluorescence as signals in a neotropical damselfly. *Journal of Insect Behaviour*. 27: 67—80.
- Hempel De Ibarra N, Vorobyev M, Brandt R, Giurfa M. 2000 Detection of bright and dim colours by honeybees. *Journal of Experimental Biology*. 203: 3289-3298.
- Johnstone RA. 1995 Sexual selection, honest advertisement and the handicap principle: Reviewing the evidence. *Biological Reviews*. 70: 1-65.
- Kokko H, Brooks R, McNamara JM, Houston AI. 2002 The sexual selection continuum. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 269: 1331–1340.
- Kokko H. 1997 Evolutionary stable strategies of age- dependent sexual advertisement. *Behavioural Ecology and Sociobiology*. 41: 99–107.
- Kokko H. 1998 Good genes, old age and life-history trade-offs. *Evolutionary*

*Ecology*. 12: 739-750.

Meinertzhagen IA, Menzel R, Kahle G. 1983 The identification of spectral receptor types in the retina and lamina of the dragonfly *Sympetrum rubicundulum*. *Journal of Comparative Physiology A*. 151: 295-310.

Plaistow SJ, Siva-Jothy MT. 1996 Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proceedings of the Royal Society of London B*. 263: 1233–1239.

Raihani G, Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A. 2007 Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Animal Behaviour*. 75: 1851-1860.

Renoult JP, Kelber A, Schaefer MH. 2015 Colour spaces in ecology and evolutionary biology. *Biological Reviews* doi: 10.1111/brv.12230.

Schultz TD, Fincke OM. 2013 Lost in the crowd or hidden in the grass: signal apparency of female polymorphic damselflies in alternative habitats. *Animal Behaviour*. 86: 923–931.

Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen SJ, Székely T. 2007 Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Animal Behaviour*. 73: 987–997.

Siddiqi A, Cronin TW, Loew ER, Vorobyev M, Summers K. 2004 Interspecific and intraspecific views of color signals in the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*. *Journal of Experimental Biology*. 207: 2471–2485.

Spaethe J, Tautz J, Chittka L. 2001 Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 3898- 3903.

Stavenga DG, Leertouwer HL, Wilts BD. 2013 Quantifying the refractive index dispersion of a pigmented biological tissue using Jamin-Lebedeff interference microscopy. *Light: Science and Applications*. 2, e100.

Stearns SC. 1992 *The Evolution of Life Histories*. Oxford: Oxford Univ. Press

Troscianko J, Stevens M. 2015. Image calibration and analysis toolbox – a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. *Methods in Ecology and Evolution*. 6: 1320–1331.

Vorobyev M, Brandt R, Peitsch P, Laughlin SB, Menzel R. 2001 Colour thresholds and receptor noise: behaviour and physiology compared. *Vision Research*. 41: 639- 653.

Vorobyev M, Osorio D. 1998 Receptor noise as a determinant of colour threshold. *Proceedings of the Royal Society B*. 265: 351-358.

Xu M, Fincke OM. 2015 Ultraviolet wing signal affects territorial contest outcome in a sexually dimorphic damselfly. *Animal Behaviour*. 101: 67-74.

## Capítulo II

### **Variación inter-específica en la coloración alar en *Hetaerina*; una aproximación usando modelos visuales y escenarios de Selección.**

#### **Resumen**

La diversificación de colores de un grupo de animales puede explicar procesos de adaptación a diversos ambientes lumínicos asociados a la eficiencia en la comunicación de señales de coloración en diversos contextos ecológicos y evolutivos. En el género *Hetaerina* los machos de todas las especies presentan manchas alares que representan parches distintivos de coloración conformados por un entrelazado de venas y complejos estructurales que albergan diversos pigmentos y forman la mancha roja conspicua distintiva del género. En éste estudio investigamos la existencia de firmas espectrales específicas para cinco especies de *Hetaerina* y mediante un modelo visual de odonato comparamos la conspicuidad en los colores de las manchas alares y el cambio en su percepción de color en condiciones lumínicas contrastantes. Encontramos que la venación blanca presente en alas posteriores involucra un alto nivel de reflectancia en el rango ultravioleta y azul (UV-SW) el cual puede ser igual o incluso mayor que la reflectancia el espectro visible para algunas especies. Los resultados del ajuste del modelo de visión sugiere la existencia de coloración independiente en alas anteriores y posteriores que forman firmas espectrales especie- específicas

dentro de un rango entre 360 a 700 nm y su conspicuidad es dependiente de las condiciones lumínicas de los dos ambientes. Proponemos que la señalización de color en *Hetaerina* es un rasgo adaptativo a nivel local, que es afectado tanto por el micro-hábitat lumínico, como por la coexistencia con co-específicos, heteroespecíficos y depredadores. Este proceso antagonista pudiera haberse originado mediante selección sexual pero podría involucrar costos y beneficios asociados a presiones de depredación en diversos ambientes lumínicos.

Palabras clave: Diversificación de color, firmas espectrales, coloración ultravioleta, sistema visual, *Hetaerina*.

## **Introducción**

La increíble diversificación en el grupo de los insectos ha acompañado una extraordinaria variedad de colores e innovaciones fisiológicas asociadas a la producción de colores de distinta naturaleza (i.e. pigmentarios y estructurales) y al sistema visual de éste grupo de animales (Nilsson & Kelber, 2007; Vukusic & Chittka, 2013, Futahashi *et al.*, 2015). La variación en la percepción de una señal de color incluye diferentes componentes físicos y visuales tales como la interacción de las diversas longitudes de onda que componen la luz presente en el hábitat, su intensidad relativa, el medio por el que se desplazan y la forma como llegan a un receptor potencial (Endler, 1990). Cuando alguno de éstos componentes es modificado, la percepción espectral de luz que llega al ojo cambia y la señal de color se altera en una magnitud que depende de los atributos del sistema visual del observador (Endler, 1993; e.g. Fuller, 2002).

La visión animal, puede tener varias funciones pero dos de los más importantes son la supervivencia y la reproducción; en el primero la visión se involucra en mecanismos de evasión de depredadores (Endler, 1990; Stevens & Merilaita, 2011), mientras que en el segundo la visión puede determinar la evolución del dimorfismo sexual (Darwin, 1871), de señales honestas (Zahavi,

1975), o de caracteres sexuales secundarios extravagantes (Fisher, 1958; Kirckpatrick, 1982) entre algunas otras. La visión de color puede dirigir la evolución de comportamientos tan diversos como el forrajeo, la evasión de depredadores, el reconocimiento inter-específico y la elección de pareja, convirtiéndose así en una de las modalidades sensoriales de mayor importancia en términos de adecuación (Stevens, 2013). La capacidad de cualquier sistema visual para discriminar de manera óptima la información contenida en una señal de color con respecto al ruido de fondo depende esencialmente de la sensibilidad visual de las especies como de las condiciones lumínicas del ambiente (Renoult *et al.*, 2015). Por lo que para entender las presiones selectivas involucradas en la evolución de los rasgos de color presentes en los animales y su eficiencia para convertirse en señales, es necesario estudiar la capacidad del sistema visual de una especie en las condiciones ecológicas relevantes (Revisado en Kelber *et al.*, 2003).

Por ejemplo, en especies polimórficas como el género *Enallagma*, la aparición de hembras andromorfas parece ser un mecanismo para disminuir el acoso sexual y aumentar la tasa reproductiva optimizando el tiempo de maduración sexual de las hembras pero presentando un trade-off en la adecuación ya que la coloración andromorfa también aumenta el riesgo de depredación (Fincke, 1994). También se ha demostrado la importancia de la coloración polimórfica en el reconocimiento inter-específico en diferentes hábitats lumínicos, permitiéndole a las hembras ser crípticas contra el fondo de la vegetación y disminuir el riesgo de depredación mientras no son receptivas, lo cual sugiere la existencia de selección disruptiva sobre la coloración de las hembras guiada por la densidad y acoso de los machos y por presiones de depredación por conspicuidad de coloración para las aves (Schultz & Fincke, 2013). Otro ejemplo reciente de selección sexual sobre la coloración ha sido desarrollado usando libélulas polimórficas de la especie *Ischnura heterosticta*, donde de manera integral se describen las características de los receptores del ojo de ésta especie encontrando un sistema visual tricromático ultravioleta, azul



y verde-amarillo (UV, SW y MW) y su potencial para discriminar diferentes morfos contra la vegetación de fondo, en ese caso se sugiere que la función de la coloración corporal está implicada en la elección directa de parejas entre libélulas polimórficas (Huang *et al.*, 2014). En una aproximación similar Schultz y colaboradores en 2008, investigaron los cambios en la incidencia de luz a lo largo del día y los patrones de presencia de diversas especies de *Enallagma* para determinar cómo es que los colores de diversos animales son ajustados a diferentes condiciones lumínicas, ellos encontraron que los individuos incrementan su conspicuidad de coloración en diferentes horas del día cuando ciertas longitudes de onda son predominantes en el ambiente, por lo que argumentan que el color tiene una función en el reconocimiento inter-específico e inter-sexual el cual es optimizado por las especies conforme la luz cambia. Algunos otros ejemplos sugieren la existencia de selección sobre la pigmentación de manchas alares más conspicuas en *Calopteryx splendens*, la cual es dependiente de la condición, siendo los machos con mayor intensidad de pigmentación más depredados pero presentando mejores sistemas inmunológicos y mayor éxito reproductivo así como mejores adaptaciones morfológicas para el vuelo (Rantala *et al.*, 2010). Adicionalmente, cuando *C. splendens* se encuentra en simpatria con *C. virgo*, las características de tamaño y conspicuidad de la pigmentación de *C. virgo* representan una mayor tasa de depredación (Svensson & Friberg, 2007). En ese sentido se ha propuesto que puede existir desplazamiento agonístico de caracteres en especies simpátricas en los géneros *Calopteryx* y *Hetaerina* (Tynkkynen *et al.*, 2004; Anderson & Grether, 2010, respectivamente). La coexistencia de especies relacionadas supone un alto grado de similitud en sus caracteres fenotípicos (i.e. color) y conductuales, por lo que si las ganancias en términos de éxito reproductivo están asociada a las señales de color, se esperarían fuertes presiones selectivas sobre los aspectos de la señalización implicados en el reconocimiento de señales, la recepción de las mismas y la elección del microhábitat.

Por lo anterior, en éste estudio llevamos a cabo una comparación entre la coloración de 5 especies de *Hetaerina*, 4 de estas especies que pueden ser encontradas en simpatria (i.e. *H. americana*-*H. titia* y *H. cruentata*-*H. occisa*) y otra sólo se encuentra en alopatria (i.e. *H. rudis*), analizamos la variación del color en alas anteriores y posteriores, así como el efecto que ocurre en el color de las alas de las 5 especies cuando se modelan en ambientes lumínicos con propiedades espectrales contrastantes (i.e. cielo abierto y bajo un dosel), que representan las condiciones potenciales en las que estas especies pueden estar presentes. Comparamos la conspicuidad de dichos colores usando un modelo de visión de odonato (*Sympetrum rubicundulum*) para determinar cuál sería la variación de la coloración entre especies en términos de reconocimiento inter-específico usando un modelo de discriminación cromática (i.e. color) y acromática (i.e. brillo) para comparar el grado de diferenciación entre los dos pares de especies en simpatria y un caso hipotético de discriminación inter-específica si *H. rudis* se encontrara en simpatria con alguna de las otras especies.

## **Métodos y materiales**

### *Especies de estudio*

Las especies encontradas en simpatria son *H. titia* y *H. americana* y fueron colectadas en la localidad de Agua Caliente, Veracruz (19°18'53.64"N y 96°38'41.45"O), mientras que *H. cruentata* y *H. occisa* se encontraron en simpatria en Coetzalan, Veracruz (19°18'50.14"N y 96°42'02.39"O). La única especie cuya población se encontró en alopatria fue *H. rudis*, y fue colectada en El Triunfo, Chiapas (15°39'16.75"N y 92°48'24.59"O).

### *Espectrofotometría*

Para medir el color en las alas, utilizamos un espectrofotómetro Ocean Optics USB2000 equipado con una lámpara de pulsos de xenón (PX2) en un rango UV-VIS de 220nm a 750nm y un estándar blanco Ocean Optics (WS-1) de reflectancia difusa como referencia. Como fondo usamos un gris estándar de 80% marca ColourWorker (X-rite) y se tomaron 2 lecturas por individuo de cada especie (i.e. Una en alas anteriores y otra en alas posteriores) usando un soporte RPH para la fibra óptica en un ángulo de 45° (Ocean Optics, Dunedin, FL) y obtuvimos medidas de 4 individuos de cada especie con lo cual obtuvimos firmas espectrales independientes para alas anteriores y posteriores (fig. 1). Su manejo y análisis fue realizado mediante el software *PAVO* V. 1.0 (Perceptual Analysis, Visualization and Organization of Spectral Color Data in R, Maia *et al.*, 2013) para la plataforma R versión 3.3.1 (R Development Core Team, 2016). El uso de éste software nos permitió representar la variación de la coloración en un espacio tetracromático a partir de los espectros de coloración obtenidos para el modelo de odonato en dos ambientes lumínicos.

### *Modelo de visión y ambientes lumínicos*

Utilizamos el script *pavo* para R y mediante la función (*vismodel*) generamos un modelo visual dentro de los parámetros de la función incluimos los datos de sensibilidad tetracromática (UV, SW, MW, LW) obtenidos de Meinertzhagen *et al.*, 1983 con  $\lambda$  máximos en 340nm (i.e. ultravioleta), 410nm (i.e. azul), 540nm (i.e. verde) y 620 nm (i.e. rojo) para cada fotoreceptor respectivamente. Se utilizó como receptor acromático el cono MW (i.e. receptor sensible para el brillo relativo) usado en aproximaciones similares (Hempel De Ibarra *et al.*, 2000; Vorobyev *et al.*, 2001; Schultz & Fincke, 2013) dado que no existe información conductual directa de éste mecanismo en odonatos. La información recibida por los fotoreceptores es en términos de la energía absorbida por los 4 receptores del ojo del animal (captura cuántica de conos), y puede ser modelada en un tetraedro de color usando la función *colspace* de

PAVO, donde las distancias entre puntos y la ubicación de los puntos de color representan a cada una de las especies, y los 4 ejes del tetraedro representan magnitudes de diferencia de color (i.e. entre más alejados estén los puntos entre sí, son más diferentes). Dentro de los parámetros *vismodel* es posible utilizar información lumínica real obtenida de ambientes lumínicos contrastantes en su composición espectral, los cuales en teoría tienen efecto en cómo son percibidos los colores de las manchas alares. Para ilustrar la variación de los colores modelamos un tetraedro, el cual representa el modelo de visión de un odonato en dos ambientes lumínicos contrastantes y entre alas anteriores y posteriores y usamos pseudo-imágenes generadas en el MICA Toolbox (Troscianko & Stevens, 2015) para ImageJ para ilustrar la variación en coloración ultravioleta de las alas de las 5 especies (fig. 2). Agregamos polígonos de diferentes colores para representar la envoltura convexa de los colores en los ejes X, Y y Z dentro del tetraedro para representar las diferencias entre colores de alas anteriores y posteriores usando *tcsvol*. La información de los ambientes lumínicos fue obtenida de Endler, 1993 y está incluida en el paquete PAVO como “bluesky” y “forest-shade”, a los cuales nos referiremos como ambiente lumínico abierto y ambiente lumínico cerrado, respectivamente. Usamos éstos dos ambientes ya que representan contrastes en la disponibilidad de luz que ingresa a los sitios donde se establecen los territorios de los machos de *Hetaerina*. El primer ambiente lumínico presenta una alta contribución de longitudes de onda ultravioleta y SW (un ambiente más azulado), mientras que el segundo es una representación de la iluminación con alta contribución de longitudes de onda medias y largas (un ambiente con mayor contribución de colores verdes, naranjas y rojos). Ambos tipos de ambiente son utilizados diferencialmente por algunas especies de *Hetaerina* (Vega-Sanchez *et al.*, 2013), y fueron seleccionados porque no existe información específica de los datos lumínicos de los microhábitats donde éstas libélulas pueden encontrarse en alopatria o en simpatria.

#### *Análisis de los datos de coloración*

La modelación empleando el tetraedro de color, nos permitió obtener la ubicación para cada punto en coordenadas Cartesianas (X, Y, Z), y ángulos teta y phi ( $h.\theta$ ,  $h.\phi$ ) en radianes, los cuales sirven para determinar el matiz del color, el vector  $r$  ( $r.\text{vec}$ ), el cual mide la saturación o distancia desde el centro acromático, el máximo vector realizable  $r$  ( $r.\text{max}$ ) para el matiz del color y el vector realizado ( $r.\text{achieved}$ ) el cual es la distancia relativa  $r$  del centro acromático en relación a la distancia máxima realizable ( $r.\text{vec}/r.\text{max}$ ). Éstas son variables céntricas de los receptores que representan los espectros de reflectancia en el espacio de color tetraédrico para el sistema visual de odonato y de ave (Maia *et al.*, 2013). Los datos fueron analizados usando MANOVAs para alas anteriores y posteriores usando las variables céntricas de color y las especies como factores para cada ambiente, y posteriormente analizamos cada variable independientemente usando ANOVAs de una vía en R. En adición al modelo visual de odonato, incluimos un análisis de coloración para el sistema visual de un posible depredador y una presa usando como modelos al ave *Sturnus vulgaris* y la mosca de la fruta *Drosophila sp.* (Apéndice 2, fig 1). Para analizar las diferencias en los contrastes de discriminación usamos el modelo desarrollado por Vorobyev & Osorio, 1998 conocido como “Receptor Noise Limited Model” (RNL) el cual se basa en distancias cromáticas y acromáticas ( $\Delta S$  y  $\Delta L$ , respectivamente) entre dos objetos de colores similares y predice si éstos son discriminables en términos de la proporción de señal- ruido de cada canal o fotorreceptor y son calculados en PAVO usando las funciones *vismodel* para obtener datos de la captura cuántica de conos a partir de los espectros de las alas y el sistema visual de *S. rubicundulum*. En éste caso estandarizamos todas las medidas bajo el iluminante D65 (CIE) correspondiente a las condiciones de iluminación al medio día en Europa Occidental. Posteriormente usamos la función *coldist* para obtener datos expresados como JND (*just noticeable difference*) que definen la distancia de color entre los dos objetos en comparación (entre más alto el valor JND, los objetos en comparación son más distintos). Finalmente usamos pruebas pareadas no paramétricas de Wilcoxon para el

análisis de los datos JND.

## Resultados

Los resultados de las mediciones con el espectrofotómetro, muestran patrones específicos de reflectancia (i.e. firmas espectrales) para alas anteriores y posteriores de las 5 especies. El espectro de reflectancia de alas anteriores en las 5 especies se encuentra en picos máximos entre 665 nm y 670 nm para longitudes largas, entre 410 y 415 para longitudes cortas y contribución de ultravioleta en 310 y 390 nm. Mientras que para las alas posteriores entramos picos máximos entre 655 y 660 nm en longitudes largas, no se encontraron picos notables en las longitudes de onda cortas pero al igual que en alas posteriores encontramos contribución de reflectancia ultravioleta en el rango de 310 y 390 nm (fig. 1).

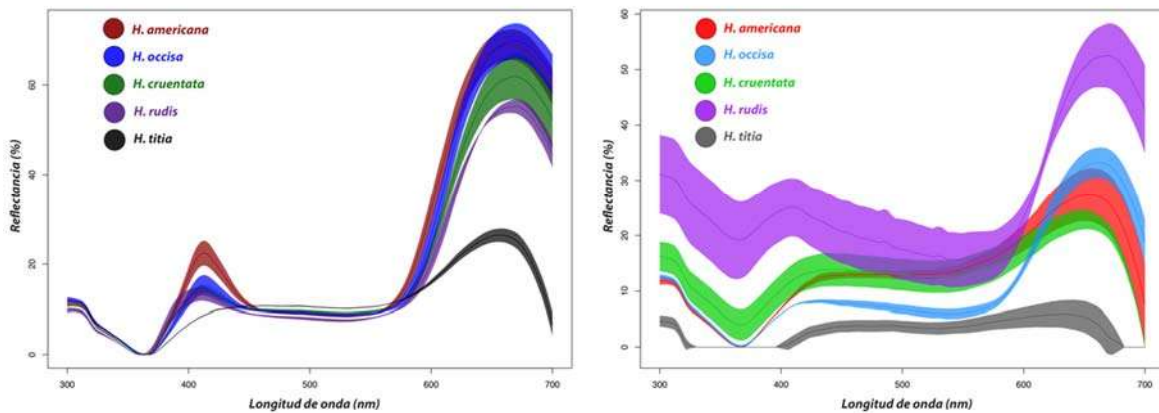


Figura 1. Porcentaje de reflectancia de los espectros normalizados y suavizados para las 5 especies de *Hetaerina*, la sombra de color representa la desviación estándar. A la izquierda se presentan los espectros de alas anteriores y a la derecha los espectros de alas posteriores. Cada especie esta señalizada por una combinación de color específico representada por círculos de colores.

### *Análisis del color de alas anteriores y posteriores*

Encontramos diferencias significativas en las variables céntricas de color de alas anteriores para el sistema visual *S. rubicundulum* entre las 5 especies y los dos ambientes lumínicos (MANOVA; Wilk's Lambda= 0.0032,  $F_{4,20}= 20.12$ ,  $p<0.0001$ ) y también para las variables céntricas de color de alas posteriores (MANOVA; Wilk's Lambda= 0.0006,  $F_{4,20}=36.25$ ,  $p<0.0001$ ; fig. 2)

Realizamos análisis de varianza de una vía para comparar los resultados obtenidos de las variables céntricas para cada ambiente lumínico y para alas anteriores y posteriores. En todos los casos encontramos diferencias significativas ( $p<0.0001$ ), sin embargo la variación de color encontrada en alas posteriores en ambos ambientes lumínicos sugiere que la señalización del color alar en *Hetaerina* está compuesta por dos firmas espectrales independientes, con coeficientes de variación mayor en las alas posteriores (datos no mostrados). Los datos obtenidos para todas las variables céntricas del color están representados en la figura 3 para el ambiente abierto y en la figura 4 para el ambiente cerrado.

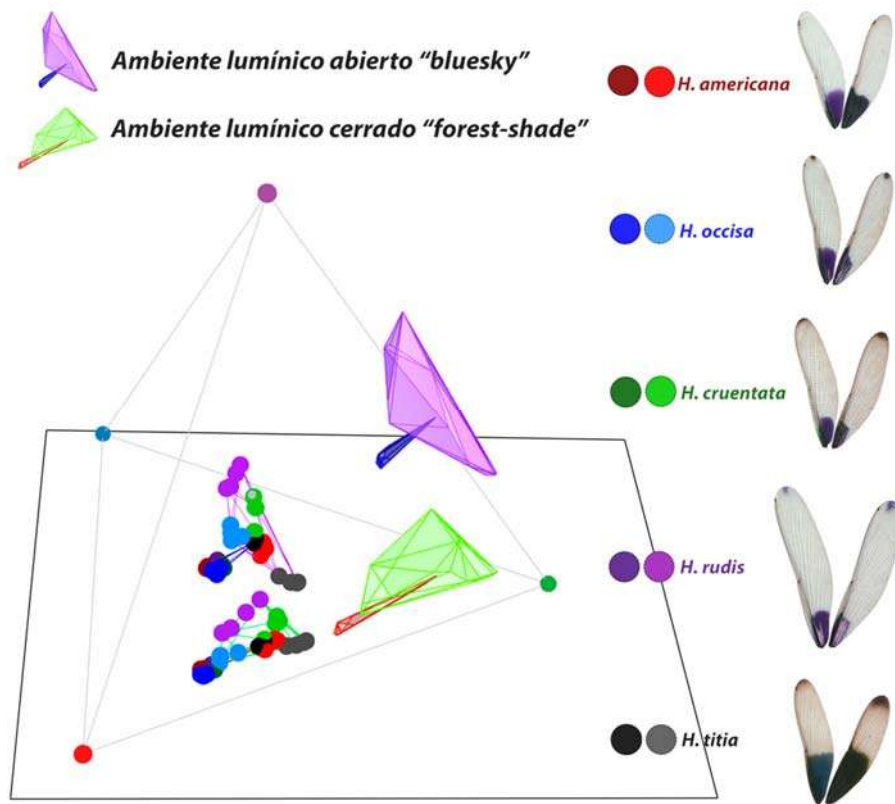


Figura 2. Discriminación inter-específica de color en *Hetaerina*. Se muestran las pseudo-imágenes generadas mediante fotografías multispectrales y la representación tetraédrica de los colores de 5 especies de *Hetaerina* empleando el modelo de visión del odonato (*S. rubicundulum*) en dos ambientes lumínicos contrastantes. Los polígonos azul y púrpura representan los colores de las 5 especies en el ambiente lumínico abierto para alas anteriores y posteriores respectivamente, y los polígonos rojo y verde representan los colores de las 5 especies en el ambiente lumínico cerrado para alas anteriores y posteriores respectivamente. Cada especie está señalizada por una combinación de color específico representada por círculos de dos tonalidades, el tono más saturado (izquierda) es el ala anterior y el menos saturado (derecha) es el ala posterior.

En condiciones de ambiente abierto el polígono de color azul que representa la variación del color en alas anteriores, es mucho más pequeño y con menor variación que el polígono púrpura, el cual representa la variación del color de las alas posteriores (fig. 3F).

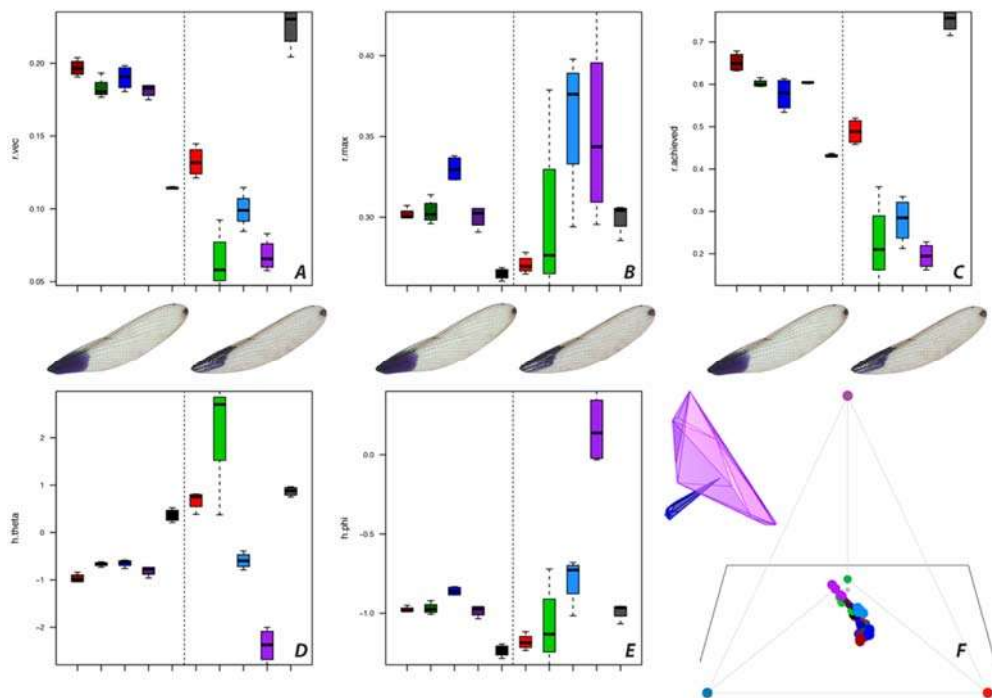


Figura 3. Discriminación inter-específica de las 5 especies de las variables céntricas de los receptores del sistema visual de *S. rubicundulum* en el ambiente lumínico abierto, A-C representan variables céntricas del cromatismo (saturación) y D-E representan ángulos relacionados al matiz del color de cada especie. La línea punteada separa los valores de alas anteriores



(izquierda) y posteriores (derecha). A cada especie corresponde la nomenclatura de color usada en las fig. 1 y 2.

De igual forma, para el ambiente lumínico cerrado el polígono rojo representa la variación y dispersión de los puntos de alas anteriores mientras que el polígono de color verde representa la variación y dispersión de los colores de las alas posteriores (fig. 4F). En ambos casos la representación tetraédrica de los colores de las 5 especies se ha girado de forma que se pudiera apreciar la contribución de los canales UV, SW y LW en la discriminación de las especies.

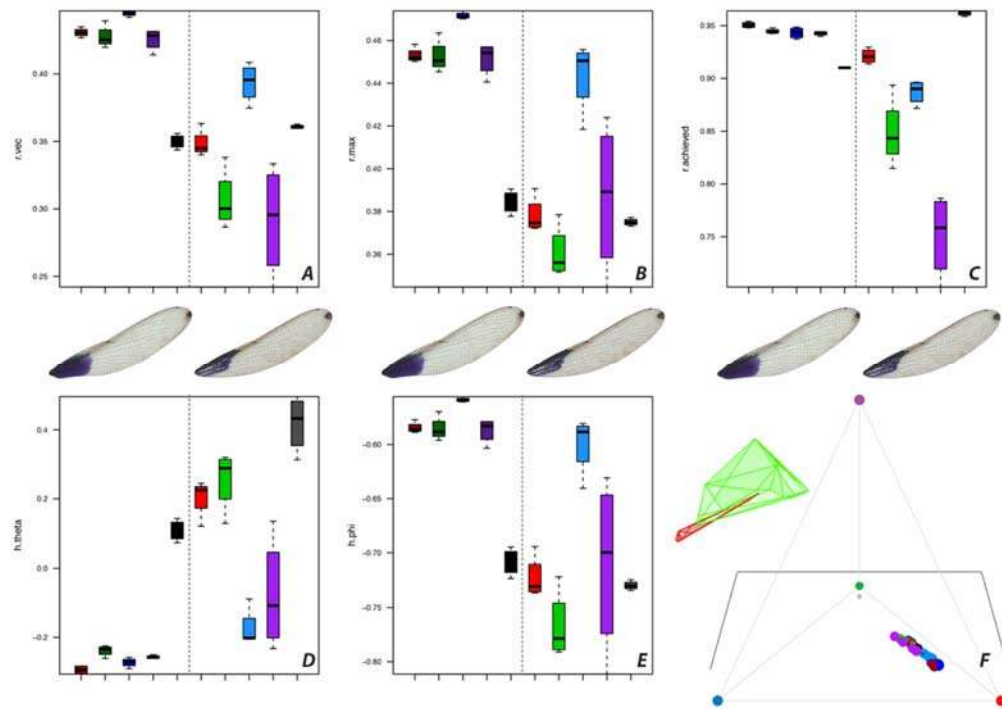


Figura 4. Discriminación inter-específica de las 5 especies de las variables céntricas de los receptores del sistema visual de *S. rubicundulum* en el ambiente lumínico cerrado, A-C representan variables céntricas del cromatismo y D-E representan ángulos relacionados al matiz del color de cada especie. La línea punteada separa los valores de alas anteriores (izquierda) y posteriores (derecha). A cada especie corresponde la nomenclatura de color usada en las fig. 1 y 2.

### *Análisis de la coloración alar en especies simpátricas y alopátricas*

Utilizando el sistema de visión de *S. rubicundulum* y asumiendo un ambiente fotópico en luz de día (i.e. D65) la mayor discriminación a través de alas anteriores es entre *H. americana* y *H. titia* en comparación con los colores de *H. cruentata* y *H. occisa*. Lo cual sugiere que cuando *H. cruentata* y *H. occisa* se encuentran en simpatria, pueden ocurrir más frecuentemente errores en el reconocimiento visual en términos cromáticos y acromáticos entre éstas especies (contraste cromático en alas anteriores Wilcoxon y promedio JND  $\pm$  sd; *H. americana*-*H. titia* y *H. cruentata*- *H. occisa*;  $Z=-4.8053$ ,  $p<0.0001$ , promedios  $6.71 \pm 0.51$  y  $1.36 \pm 0.45$  respectivamente para cada par de especies). Los contrastes para alas posteriores también mostraron diferencias significativas; contraste cromático  $Z=-4.8053$ ,  $p<0.0001$ , promedios  $16.68 \pm 1.80$  y  $5.87 \pm 1.53$  para *H. americana*-*H. titia* y *H. cruentata*-*H. occisa* respectivamente y el contraste acromático  $Z=-4.7676$ ,  $p<0.0001$  promedios;  $11.26 \pm 2.21$  y  $4.55 \pm 1.72$ , también respectivamente para cada par de especies simpátricas.

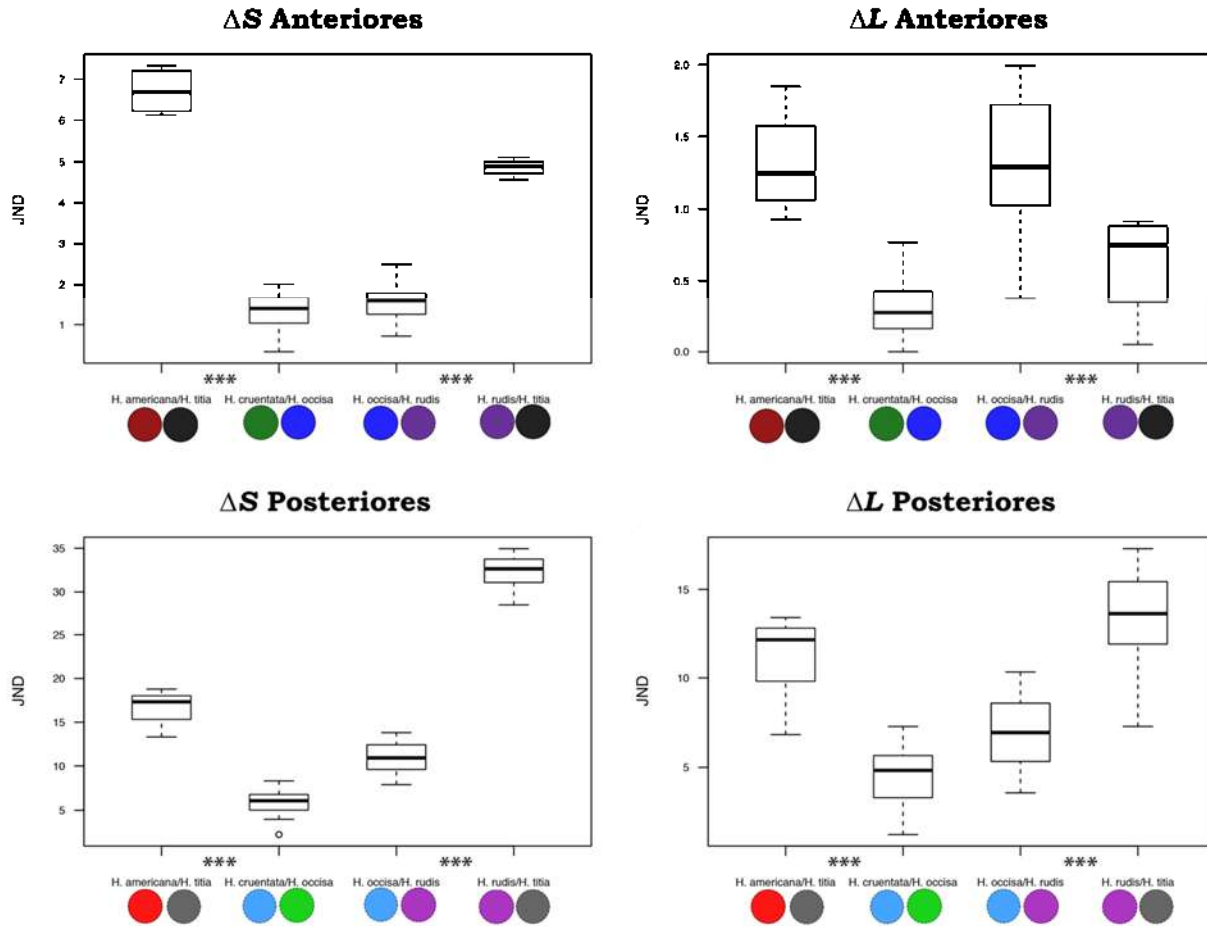


Fig. 5 Discriminación inter-específica de especies en simpatria con el modelo visual de *S. rubicundulum* (*H. americana*- *H. titia* y *H. cruentata*- *H. occisa*) y también se muestra una comparación hipotética si *H. rudis* se encontrara en simpatria con *H. occisa* y con *H. titia* y el grado de discriminación que existiría para ambos casos, \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## Discusión

El estudio de especies en que el nivel de complejidad de señalización es modulado por componentes de coloración en términos de selección sexual tiene especial importancia en especies de amplia distribución que pueden estar en alopatria o coexistir en simpatria en diferentes ambientes lumínicos, y en las que las características de color son relevantes en el reconocimiento intra-sexual e inter-específico. Con anterioridad se ha sugerido que la fuerza de la selección

sexual es particularmente importante en la divergencia de especies ecológicamente similares (McPeck & Brown, 2000). Las alas representan estructuras fundamentales para la comunicación de diversos ornamentos (Svensson & Gosden, 2007) y se ha sugerido que en Odonata la presencia de ornamentos coloridos implica especies cuya cinemática de vuelo es diferente a la de especies sin coloración (i.e. especies más coloridas hacen más pausas en su vuelo que especies hialinas; Ruppell & Ruppell, 2013). Dentro de éste esquema, es importante resaltar que la mayor variación en la coloración en nuestro estudio se encuentra en las alas posteriores de todas las especies *Hetaerina*. En este sentido el análisis de coloración de las cinco especies en condiciones de alopatria y simpatria y en 2 condiciones lumínicas contrastantes, sugiere que son las adaptaciones locales a las características lumínicas de los microhábitats seleccionados por las especies lo que podría explicar la variación en la coloración alar observada sobre las alas posteriores en *Hetaerina*. Recientemente se ha propuesto para diversos calopterígididos que la forma y los ornamentos de coloración en las alas posteriores están involucrados en procesos de señalización independientemente de las alas posteriores para optimizar los despliegues de coloración y minimizar la interferencia inter-específica de caracteres (Outomuro *et al.*, 2013; Outomuro *et al.*, 2014). La expectativa sería que especies con coloración alar similar se encuentren en poca frecuencia en simpatria de forma que se eviten costos energéticos por competencia inter-específica innecesaria e interferencia reproductiva no viable. Algunos autores sugieren una relación entre la proporción de la densidad poblacional y el nivel de agresividad entre los machos (Anderson & Grether, 2010) lo cual provoca desplazamiento agonístico de caracteres, sin embargo no existe registro de la variación inter-específica de la coloración entre esas especies en poblaciones con diferentes características ambientales. Otros trabajos recientes resaltan la ausencia de reconocimiento inter-específico a través de la pigmentación alar de los machos por parte de las hembras (Drury & Grether, 2014) lo cual sugiere la existencia de firmas espectrales únicas para cada especie que pueden servir como indicios visuales para el reconocimiento entre sexos.

Aunque nuestros resultados provienen solo de dos pares de poblaciones en simpatría, sugieren que la posibilidad de interferencia en la comunicación visual en especies con firmas espectrales muy similares (i.e. *H. cruentata*- *H. occisa*, fig. 5), hace que la correcta identificación de competidores pueda verse comprometida. Mientras que en otros casos la discriminación puede ser optimizada dada la variación contrastante de la coloración en las manchas alares (i.e. *H. americana*- *H. titia*, fig. 5). Incluso, recientemente se ha sugerido variación intra-específica en la pigmentación alar en otros calopterígidos en relación a cambios latitudinales a escala continental (Hassell, 2014), por lo que es conservador asumir que la firma espectral asociada a la pigmentación alar en *Hetaerina* se mantenga en diversos hábitats, y podemos sugerir la existencia de adaptaciones locales que pueden presentar diferentes grados de discriminación en especies simpátricas dada la variación en sus firmas espectrales.

Ante la amplia evidencia de que las presiones selectivas que depredadores y presas pueden tener sobre la evolución de señales de color para diferentes calopterígidos (i.e. Grether & Grey, 1996; Outomuro *et al.*, 2016), en éste estudio incluimos dos figuras (Apéndice 2, fig 6) que representan la percepción de un depredador (e.g. un ave) y una presa (e.g. una mosca). Nuestros resultados en ese sentido no proporcionan información relevante sobre el efecto que podría tener la conspicuidad de los colores de las manchas alares en *Hetaerina* en su adecuación, sin embargo reflejan un posible antagonismo por la percepción diferencial del sistema visual de una presa y un depredador.

En el caso de *Hetaerina* los machos presentan un sistema de apareamiento poliginico tipo lek, donde los machos forman agregaciones donde mantienen y defienden territorios que no representan ningún tipo de beneficio para las hembras y donde aparentemente el único recurso para ellas es obtener apareamientos. Sin embargo, no existe evidencia de la importancia lumínica que

pueden tener los territorios de éstos machos y cómo puede ser percibida la coloración en especies donde los ambientes lumínicos pueden ser contrastantes. Recientemente evidencia experimental aunada a modelos visuales en *H. cruentata*, ha mostrado que dentro de la mancha, las señales en longitudes cortas del espectro (i.e. UV y SW) muestran mayor reflectancia en los machos reproductivos presentes en los leks en comparación con machos más viejos que optan por estrategias alternativas de apareamiento, (Castillo-Ayala & Mendoza-Cuenca, en prep.). En ese sentido, se ha demostrado que la variación en UV y SW (short-wave) modifica la reflectancia de las longitudes de onda largas de la mancha (i.e. rojo; Stavenga et al. 2013) y en teoría su contribución en la coloración alar permitiría discriminar entre las especies del género *Hetaerina* presentes en condiciones de simpatria y alopatria en diversos ambientes lumínicos (Castillo-Ayala, datos no publicados). La variación en la incidencia lumínica a través del día, de la temporada reproductiva y de los distintos ambientes sugieren un factor interesante para investigar los costos y beneficios de la transmisión de señales agonísticas y sexuales en *Hetaerina* y poner a prueba diversas hipótesis sobre la evolución de la coloración en este género.

## **Bibliografía**

Anderson, C. N., & Grether, G. F. (2010). Character displacement in the fighting colours of *Hetaerina* damselflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20100935.

Darwin, C. (1871). The descent of man. *The Great Books of the Western World*, 49, 320.

De Ibarra, N. H., Vorobyev, M., Brandt, R., & Giurfa, M. (2000). Detection of bright and dim colours by honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 203(21), 3289-3298.

Drury, J. P., & Grether, G. F. (2014). Interspecific aggression, not interspecific mating, drives character displacement in the wing coloration of male rubyspot damselflies (*Hetaerina*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281(1796), 20141737.

- Endler, J. A. (1990). On the measurement and classification of colour in studies of animal colour patterns. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41(4), 315-352.
- Endler, J. A. (1993). The color of light in forests and its implications. *Ecological monographs*, 63(1), 1-27.
- Fincke, O. M. (1994). Female colour polymorphism in damselflies: failure to reject the null hypothesis. *Animal Behaviour*, 47(6), 1249-1266.
- Fisher, R. A. (1958). *The genetic theory of natural selection*. Dover.
- Fuller, R. C. (2002). Lighting environment predicts the relative abundance of male colour morphs in bluefin killifish (*Lucania goodei*) populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1499), 1457-1465.
- Futahashi, R., Kawahara-Miki, R., Kinoshita, M., Yoshitake, K., Yajima, S., Arikawa, K., & Fukatsu, T. (2015). Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1247-E1256.
- Grether, G. F., & Grey, R. M. (1996). Novel cost of a sexually selected trait in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*: conspicuousness to prey. *Behavioral Ecology*, 7(4), 465-473.
- Hassall, C. (2014). Continental variation in wing pigmentation in *Calopteryx* damselflies is related to the presence of heterospecifics. *PeerJ*, 2, e438.
- Hilfert-Rüppell, D., & Rüppell, G. (2013). Do coloured-winged damselflies and dragonflies have flight kinematics different from those with clear wings? *International Journal of Odonatology*, 16(2), 119-134.
- Huang, S. C., Chiou, T. H., Marshall, J., & Reinhard, J. (2014). Spectral sensitivities and color signals in a polymorphic damselfly. *PloS one*, 9(1), e87972.
- Kelber, A., Vorobyev, M., & Osorio, D. (2003). Animal colour vision—behavioural tests and physiological concepts. *Biological Reviews*, 78(1), 81-118.
- Kirkpatrick, M. (1982). Sexual selection and the evolution of female choice. *Evolution*, 1-12.
- Maia, R., Eliason, C. M., Bitton, P. P., Doucet, S. M., & Shawkey, M. D. (2013). pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(10), 906-913.

- McPeck, M. A., & Brown, J. M. (2000). Building a regional species pool: diversification of the *Enallagma* damselflies in eastern North America. *Ecology*, *81*(4), 904-920.
- Meinertzhagen, I. A., Menzel, R., & Kahle, G. (1983). The identification of spectral receptor types in the retina and lamina of the dragonfly *Sympetrum rubicundulum*. *Journal of comparative physiology*, *151*(3), 295-310.
- Nilsson, D. E., & Kelber, A. (2007). A functional analysis of compound eye evolution. *Arthropod structure & development*, *36*(4), 373-385.
- Outomuro, D., Dijkstra, K. D., & Johansson, F. (2013). Habitat variation and wing coloration affect wing shape evolution in dragonflies. *Journal of evolutionary biology*, *26*(9), 1866-1874.
- Outomuro, D., Rodríguez-Martínez, S., Karlsson, A., & Johansson, F. (2014). Male wing shape differs between condition-dependent alternative reproductive tactics in territorial damselflies. *Animal Behaviour*, *91*, 1-7.
- Outomuro, D., Söderquist, L., Johansson, F., Ödeen, A., & Nordström, K. (2016). The price of looking sexy: visual ecology of a three-level predator-prey system. *Functional Ecology*.
- Rantala, M. J., Honkavaara, J., & Suhonen, J. (2010). Immune system activation interacts with territory-holding potential and increases predation of the damselfly *Calopteryx splendens* by birds. *Oecologia*, *163*(4), 825-832.
- Renoult, J. P., Kelber, A., & Schaefer, H. M. (2015). Colour spaces in ecology and evolutionary biology. *Biological Reviews*.
- Sánchez, Y. M. V., Morales, E. C., Chassin-Noria, O., & Cuenca, L. M. (2013). Efecto del tipo de hábitat, genética y selección sexual sobre la morfología alar en *Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae). *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, *14*(1), 53-60.
- Schultz, T. D., & Fincke, O. M. (2013). Lost in the crowd or hidden in the grass: signal apparency of female polymorphic damselflies in alternative habitats. *Animal Behaviour*, *86*(5), 923-931.
- Schultz, T. D., Anderson, C. N., & Symes, L. B. (2008). The conspicuousness of colour cues in male pond damselflies depends on ambient light and visual system. *Animal Behaviour*, *76*(4), 1357-1364.



Stavenga, D. G., Leertouwer, H. L., & Wilts, B. D. (2013). Quantifying the refractive index dispersion of a pigmented biological tissue using Jamin–Lebedeff interference microscopy. *Light: Science & Applications*, 2(9), e100.

Stevens, M. (2013). *Sensory ecology, behaviour, and evolution*. Oxford University Press.

Stevens, M., & Merilaita, S. (Eds.). (2011). *Animal camouflage: mechanisms and function*. Cambridge University Press.

Svensson, E. I., & Friberg, M. (2007). Selective predation on wing morphology in sympatric damselflies. *The American Naturalist*, 170(1), 101-112.

Svensson, E. I., & Gosden, T. P. (2007). Contemporary evolution of secondary sexual traits in the wild. *Functional Ecology*, 21(3), 422-433.

Troscianko J, Stevens M. 2015. Image calibration and analysis toolbox – a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. *Methods in Ecology and Evolution*. 6: 1320–1331.

Tynkkynen, K., Kotiaho, J. S., Luojumäki, M., & Suhonen, J. (2005). Interspecific aggression causes negative selection on sexual characters. *Evolution*, 59(8), 1838-1843.

Vorobyev, M., & Osorio, D. (1998). Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1394), 351-358.

Vorobyev, M., Brandt, R., Peitsch, D., Laughlin, S. B., & Menzel, R. (2001). Colour thresholds and receptor noise: behaviour and physiology compared. *Vision research*, 41(5), 639-653.

Vukusic, P., & Chittka, L. (2013). Visual signals: color and light production. *The Insects: Structure and Function*, edited by SJ Simpson and AE Douglas. Cambridge University Press,, 8.

Zahavi, A. (1975). Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*, 53(1), 205-214.

#### **4. Apéndice 1**

## 4.1 Imágenes multiespectrales

Utilizamos una cámara Olympus Pen E-PM2 la cual fue convertida a espectro completo (Lifepixel.com) en conjunto con un lente de 50 mm con capacidad de apertura de 4.5-22 f. Para fotografiar las alas de las libélulas usamos una apertura fija (f/4.5) y optimizamos la exposición de cada foto mediante la velocidad de obturación y el tiempo de integración de forma que las fotos no fueran subexpuestas o sobreexpuestas. Las 4 alas de cada individuo fueron fotografiadas dos veces: primero se obtuvo una fotografía en el rango visible mediante el uso de un filtro UV/IR que transmite la luz en el rango de ~400-700 nm y la siguiente foto fue en el rango ultravioleta y se tomó segundos después de la primera cambiando a un filtro Badder que permite el paso de luz UV e IR que bloquea el rango visible y transmite la luz en el rango de ~300-400 nm. Se utilizó una lámpara marca Iwasaki EYE Color arc lamp (70 W 1.0 A; Venture Lighting Europe Ltd. Hertfordshire, UK) a la cual se le removió el filtro UV de forma que la fuente de luz sobre las alas abarcara el rango completo de luz (~300-700 nm). Todas las fotos fueron tomadas en condiciones controladas de laboratorio colocando las 4 alas sobre una lámina de teflón de reflectancia plana (PTFE) haciendo uso de dos estándares Spectralon como referencias de reflectancia al 7% y al 93% colocados en el mismo plano que las alas. Las fotos fueron tomadas en formato RAW para evitar pérdidas de información por compresión (Stevens *et al.*, 2007) y fueron analizadas mediante el plugin Multispectral Image Calibration and Analysis Toolbox (MICA; Troscianko & Stevens, 2015) para ImageJ v. 1.49 (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012).

De cada par de fotografías (visible+ultravioleta) obtuvimos cuatro capas correspondientes a cuatro canales de coloración que responden a la sensibilidad de la cámara en las siguientes longitudes de onda: ultravioleta (uv: 330-400 nm,  $\lambda_{\max}$ =369), longitud corta (sw: 400-540 nm,  $\lambda_{\max}$  =477), longitud media (mw: 420-620 nm,  $\lambda_{\max}$ = 556) y longitud larga (lw: 530-690 nm,  $\lambda_{\max}$ = 596) (Robledo-Ospina *et al.*, 2016). En ese sentido, cada imagen es linearizada según

las respuestas de la cámara y los colores de cada canal son ecualizados en el toolbox con respecto a la intensidad de luz disponible basado en las respuestas de la cámara a los dos estándares usados en cada fotografía.

Lo anterior proporciona las bases necesarias para el análisis de la coloración independientemente de cualquier sistema visual en términos de las propiedades físicas de los parches de coloración roja en las alas de las libélulas. En nuestro caso investigamos si las propiedades de color de cada ala diferían en machos jóvenes y en machos viejos usando un modelo de visión que simulara una aproximación teórica de cómo un odonato podría percibir las diferencias entre los diferentes parches de coloración que representan las manchas alares vistas desde diferentes ángulos (fig. 2, capítulo 1) entre machos de diferentes edades reproductivas.

#### 4.2 Análisis de coloración usando a *Sympetrum rubicundulum* como modelo visual

Usamos las especificaciones del sistema visual tetracromático de *Sympetrum rubicundulum* para diferenciar colores en términos de contrastes cromáticos (i.e. color) y acromáticos (i.e. brillo). Los valores de coloración obtenidos inicialmente en nuestros análisis (i.e. fotografía multiespectral y espectrofotometría) fueron convertidos en captura cuántica de conos usando las respuestas electrofisiológicas encontradas en Meinertzhagen *et al.*, 1983, donde los valores ajustados de  $R^2$  entre la sensibilidad de la cámara y los valores predichos de las respuestas de los fotorreceptores proporcionan la confiabilidad del sistema visual a modelar (Troscianko & Stevens, 2015). Para nuestro sistema tetracromático (i.e. UV, SW, MW y LW) se encontraron ajustes dentro del rango de  $R^2= 0.996$  y  $R^2= 0.999$  para el mapeo de captura de conos, por lo que las respuestas espectrales de la cámara y la predicción de las respuestas de los fotorreceptores con un iluminante D65 sugieren un buen ajuste para realizar análisis de coloración usando este sistema visual.

### 4.3 Comparación cromática

Nuestra aproximación para determinar diferencias de coloración se basó en el modelo desarrollado por Vorobyev & Osorio, 1998 conocido como “Receptor Noise Limited Model” (RNL) el cual se basa en distancias de color ( $\Delta S$ ) entre dos objetos de colores similares y predice si éstos son discriminables en términos de la proporción de señal- ruido de cada canal o fotoreceptor y son calculados en el MICA Toolbox para ImageJ al igual que el script pavo para R. El modelo es útil para comparar colores en condiciones fotópicas (i.e. en luz de día) sobre la percepción de contrastes cromáticos y una variación del modelo permite calcular contrastes acromáticos (Siddiqi *et al.*, 2004) usando como referencia el sistema visual del receptor (i.e. *S. rubicundulum*), la iluminación del ambiente (i.e. iluminante D65) y la reflectancia de un objeto (i.e. manchas anteriores y posteriores de *H. cruentata*) en unidades conocidas como *JND* (Just Noticeable Difference) que definen la distancia de color entre los dos objetos en comparación.

Para establecer la conversión de colores a captura de conos ( $Q_i$ ) el plugin hace uso de la fórmula (1) del RNL:

$$Q_i = \int_{300}^{700} R(\lambda)I(\lambda)S_i(\lambda)d(\lambda)$$

Donde  $R(\lambda)$  es el espectro de reflectancia del objeto de interés (e.g. valor de reflectancia de la mancha en el ala anterior),  $I(\lambda)$  es el espectro de irradiación de luz al medio día (i.e. D65), y  $S_i(\lambda)$  es la sensibilidad de cada fotoreceptor  $i$  en el sistema visual a modelar.

Es necesario calcular la proporción entre la señal y el ruido de cada canal, para lo cual se requiere conocer la proporción de los receptores y el ruido presentes en el modelos visual; la proporción fue calculada a partir de la información morfológica encontrada en Armet-Kibel & Meinertzhagen (1983),

que muestran que el acomodo celular de los fotoreceptores está en una secuencia -3-2-2-1- a manera de circunferencia, lo cual es generalizado para todas las retículas en odonatos (Laughlin & McGinness, 1978). Usamos una proporción 2:2.5:2.5:1 con una fracción Weber (i.e. desviación estándar de ruido) de 0.12 ya que no contamos con información conductual para nuestro sistema de estudio ni para otros odonatos por lo que usamos la información conductual de *Apis mellifera* (Hempel De Ibarra *et al.*, 2000; Vorobyev *et al.*, 2001) y que se ha usado anteriormente para investigar distancias cromáticas entre distintas especies de libélulas del género *Enallagma* (Schultz & Fincke, 2013).

Para obtener la proporción de señal y ruido de nuestros fotoreceptores usamos la fórmula (7) en Vorobyev y Osorio, 1998.

$$e_i = v_i/\sqrt{n_i}$$

Donde  $e_i$  es la desviación estándar del ruido de cada canal  $i$ , el cuál es el cociente de la fracción Weber ( $v_i$ ), en nuestro caso de 0.12, y la raíz cuadrada de cada una de las proporciones relativas de cada fotoreceptor.

Finalmente, usamos la fórmula (5) para un sistema tetracromático disponible en Vorobyev y Osorio, 1998 para calcular la diferencia en unidades *JND* entre las comparaciones de interés, en nuestro caso analizamos si nuestro modelo visual sería capaz de diferenciar entre alas anteriores y posteriores entre las dos edades reproductivas.

$$(\Delta S^t)^2 = \frac{((e_1 e_2)^2 (\Delta_{q4} - \Delta_{q3})^2 + (e_1 e_3)^2 (\Delta_{q4} - \Delta_{q2})^2 + (e_1 e_4)^2 (\Delta_{q3} - \Delta_{q2})^2 + (e_2 e_3)^2 (\Delta_{q4} - \Delta_{q1})^2 + (e_2 e_4)^2 (\Delta_{q3} - \Delta_{q1})^2 + (e_3 e_4)^2 (\Delta_{q2} - \Delta_{q1})^2)}{((e_1 e_2 e_3)^2 + (e_1 e_2 e_4)^2 + (e_1 e_3 e_4)^2 + (e_2 e_3 e_4)^2)}$$

Donde  $\Delta q_i$  es el logaritmo de la distancia cromática de la captura de fotones percibida por el fotoreceptor  $i$  de una mancha alar (i.e. anterior) y otra (i.e.

posterior), o entre edades reproductivas (i.e. ala anterior de un macho territorial y ala anterior de un macho no territorial).

$$\Delta_{qi} = \ln(Q_{anterior, i} / Q_{anterior, i})$$

#### 4.4 Comparación acromática

Para calcular diferencias acromáticas entre las alas y edades usamos la siguiente fórmula:

$$\Delta S_Q = \ln \left| \frac{\int_{300}^{700} R_A(\lambda) I(\lambda) S_Q(\lambda) d\lambda}{\int_{300}^{700} R_B(\lambda) I(\lambda) S_Q(\lambda) d\lambda} \right| / e$$

Donde A y B representan ala anterior de macho joven y ala anterior de macho viejo o especie A y especie B según sea la comparación,  $S_Q$  es la sensibilidad espectral del fotorreceptor que detecta diferencias en el brillo (i.e. MW) y  $e$  es el ruido del receptor en cuestión. En el caso de nuestro modelo visual, usamos el fotorreceptor MW (530 nm) ya que se ha descrito que la función de discriminación acromática en abejas es percibida por éste fotorreceptor (Spaethe *et al.* 2001) ya que esta información no se encuentra disponible para ningún odonato.

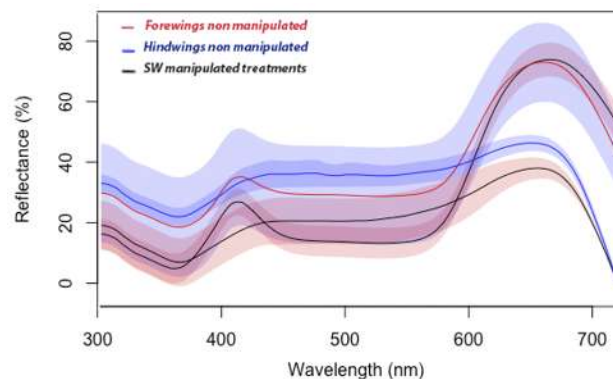


Fig. 1. Mean spectra reflectance of male forewings (red line), hindwings (blue line) and their respective effects after applying a thin coat of sunscreen to reduce SW colours (black lines), shades represent standard deviation.

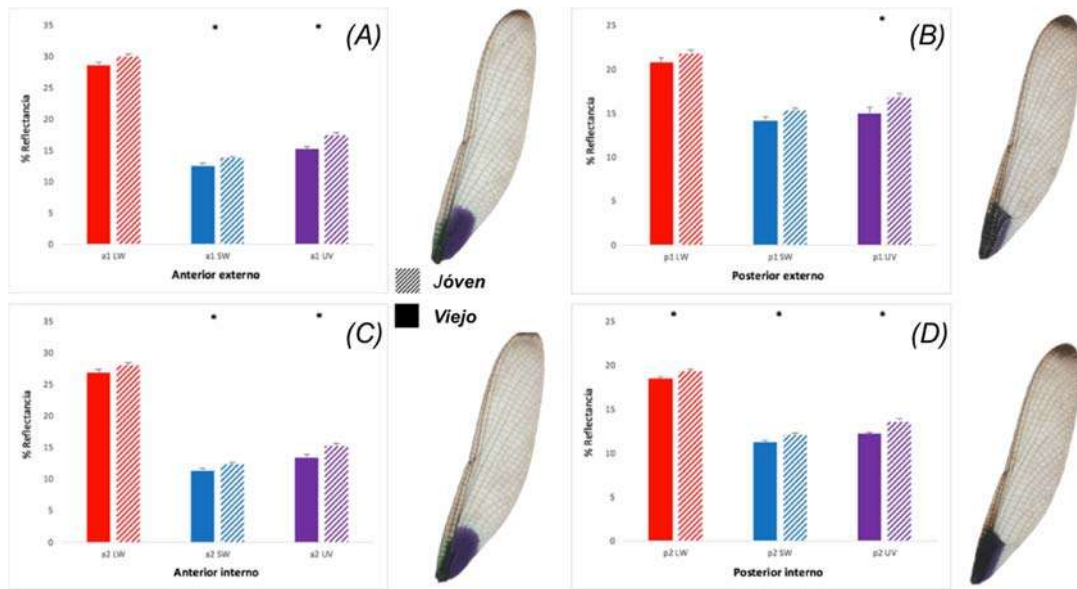


Fig. 2. Wing spot colour variation between two reproductive ages. Striped bars are young males and solid bars are old males. Red bars represent LW reflectance values, blue bars are SW and purple are UV reflectance values for forewings (A-C) and hindwings (B-D). \* denotes significant differences using ANOVA.

## 5. Apéndice 2

### 5.1 Tetraédros del modelo de visión presa y depredador

Usamos la metodología descrita en el capítulo 2 para generar dos modelos tetraédricos de la variación del color alar ante la visión de un depredador (un ave) y también una posible presa (mosca).

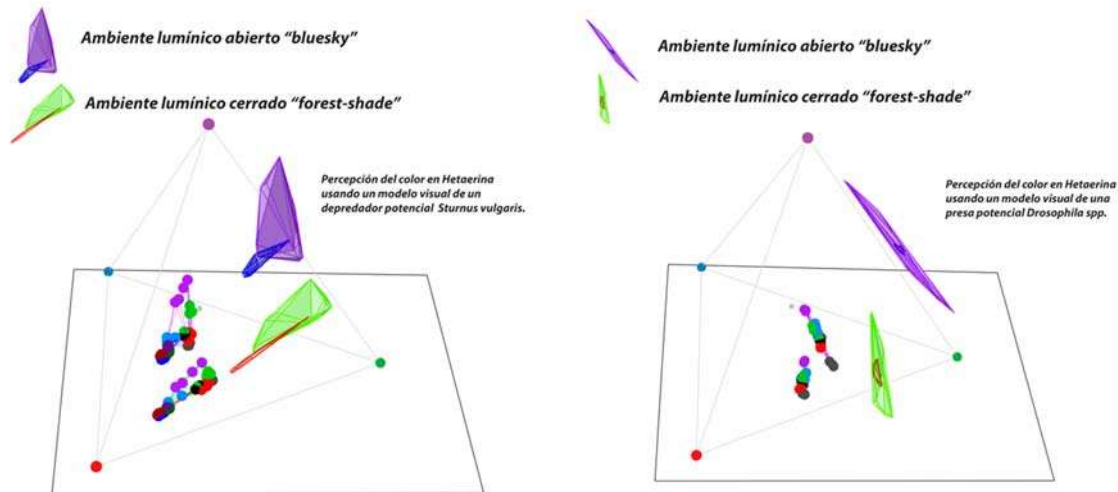


fig. 6 Variación en la percepción del color de *Hetaerina* utilizando una representación tetraédrica en dos ambientes lumínicos contrastantes percibidos por un depredador potencial (i.e. un ave tetracromática) y una presa potencial (i.e. una mosca tetracromática).

## 6. Discusión general

En éste estudio reportamos evidencia sobre la amplia variación en la coloración alar presente en el género *Hetaerina* y su potencial uso como señales en la competencia intra-específica y en el reconocimiento inter-específico entre especies simpátricas. Contrario a lo sugerido anteriormente para *H. americana* (Córdoba-Aguilar & Cordero Rivera, 2005; Contreras-Garduño *et al.*, 2007), presentamos evidencia sobre un cambio en la coloración alar en machos adultos de *H. cruentata*, el cual sugiere estar relacionado con aspectos del metabolismo de los individuos. Estos resultados demuestran variación cromática y acromática entre machos de distintas edades reproductivas (i.e. machos jóvenes y machos viejos) lo cual es explicado principalmente por variación en los niveles de reflectancia de longitudes cortas (i.e. SW y UV). En ese contexto, nuestras pruebas de conducta sugieren el uso del color ultravioleta como señal tanto en



las interacciones agresivas, como en el reconocimiento sexual, lo que es coherente con los resultados obtenidos en estudios similares donde se han pintado de negro la mancha roja (Grether *et al.*, 2015). El uso de la coloración ultravioleta como señal de reconocimiento y discriminación de edades si ha sido reportado con anterior para otras especies dentro de la familia Calopterygidae (Guillermo-Ferreira *et al.*, 2014) y también para otras especies de Zygoptera (Xu & Fincke, 2015), reforzando nuestros resultados respecto a la importancia de la coloración UV en Odonata. Lo anterior hace necesario evaluar si éstas diferencias contribuyen en el apareamiento selectivo entre distintas edades reproductivas de machos y hembras y determinar si las señales de coloración UV pueden servir como indicios de color en el reconocimiento entre sexos. La variación encontrada en la coloración entre edades reproductivas podría servir como una señal de condición en la competencia intra-sexual y como indicio visual en el reconocimiento inter-sexual.

Evidencia reciente sugiere que la forma y el color diferencial entre alas anteriores y posteriores en calopterígididos parece promover la evolución diferencial en alas posteriores en términos de selección sexual para optimizar despliegues de coloración (Outomuro *et al.*, 2013; Outomuro *et al.*, 2014). Nuestros análisis apoyan la idea de que las alas posteriores al presentar coloraciones más diversas en comparación con los colores en alas anteriores podrían representar aspectos especializados de señalización, particularmente importantes en el reconocimiento inter- específico dentro del linaje de *Hetaerina*,

lo cual sugiere adaptaciones locales a las características lumínicas de los microhábitats donde pueden coexistir o no las distintas especies. Dentro del análisis de coloración en especies simpátricas, nuestros resultados sugieren la posibilidad de distintos niveles de interferencia en la comunicación visual en especies con distintas firmas espectrales, donde especies con firmas espectrales similares presentarían fallas en el reconocimiento (e.g. intra- sexual e inter- sexual) más frecuentemente que especies con firmas espectrales más contrastantes. Lo anterior apoya la hipótesis del desplazamiento agonístico de caracteres (Anderson & Grether, 2010) con información sobre la variación lumínica a nivel local donde co-existen poblaciones de *Hetaerina* en simpatria, aunado a esto sería importante incluir datos de las densidades poblacionales, de forma que sea posible detectar el nivel de discriminación visual que pueden tener conjuntos de especies simpátricas en diferentes localidades y también cuando las poblaciones se encuentran alopátricamente.

La variación de coloración encontrada sugiere aspectos importantes para investigar la evolución de la coloración alar en éste grupo de libélulas para investigar los procesos de selección que han modulado los costos y beneficios de comunicar eficientemente éstas señales en un contexto agonístico y sexual.

## **7. Bibliografía**

Alcock, J. (1982). Post-copulatory mate guarding by males of the demselfly *Hetaerina vulnerata* Selys (Odonata: Calopterygidae). *Animal Behaviour*, 30(1), 99-107.

Armet-Kibel, C. & Meinertzhagen, I. A. 1983. Structural organization of the

ommatidium in the ventral compound eye of the dragonfly *Sympetrum*. *Journal of Comparative Physiology*, 151, 285- 294.

Briscoe, A. D., & Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*, 46(1), 471-510.

Bybee, S. M., Johnson, K. K., Gering, E. J., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2012). All the better to see you with: a review of odonate color vision with transcriptomic insight into the odonate eye. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(3), 241-250.

Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press.

Contreras-Garduño, J., Buzatto, B. A., Serrano-Meneses, M. A., Nájera-Cordero, K., & Córdoba-Aguilar, A. (2008). The size of the red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament. *Behavioral Ecology*, 19(4), 724-732.

Convey, P. (1989). Post-copulatory guarding strategies in the non-territorial dragonfly *Sympetrum sanguineum* (Müller)(Odonata: Libellulidae). *Animal behaviour*, 37, 56-63.

Córdoba-Aguilar, A., & González-Tokman, D. M. (2014). The behavioral and physiological ecology of adult rubyspot damselflies (Hetaerina, Calopterygidae, Odonata). *Advances in the Study of Behavior*, 46, 311-341.

Córdoba-Aguilar, A., Leshner-Treviño, A. C., & Anderson, C. N. (2007). Sexual selection in *Hetaerina titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour*, 144(8), 931-952.

Córdoba-Aguilar, A., Raihani, G., Serrano-Meneses, M. A., & Contreras-Garduño, J. (2009). The lek mating system of *Hetaerina* damselflies (Insecta: Calopterygidae). *Behaviour*, 146(2), 189-207.

Cronin, T. W., Johnsen, S., Marshall, N. J., & Warrant, E. J. (2014). *Visual ecology*. Princeton University Press.

Darwin, C. (1859). On the origin of the species by natural selection.

Eguchi, E. (1971). Fine structure and spectral sensitivities of reticular cells in the dorsal sector of compound eyes in the dragonfly *Aeschna*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 71(2), 201-218.

Endler, J. A. (1980). Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 76-91.

- Endler, J. A. (1992). Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *The American Naturalist*, 139, S125-S153.
- Endler, J. A., & McLellan, T. (1988). The processes of evolution: toward a newer synthesis. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1), 395-421.
- Grether, G. F. (1996). Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution*, 1939-1948.
- Grether, G. F. (1997). Survival cost of an intrasexually selected ornament in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 264(1379), 207-210.
- Guillermo-Ferreira, R., & Del-Claro, K. (2011). Resource defense polygyny by *Hetaerina rosea* Selys (Odonata: Calopterygidae): influence of age and wing pigmentation. *Neotropical entomology*, 40(1), 78-84.
- Guillermo-Ferreira, R., Therézio, E. M., Gehlen, M. H., Bispo, P. C., & Marletta, A. (2014). The role of wing pigmentation, UV and fluorescence as signals in a Neotropical damselfly. *Journal of insect behavior*, 27(1), 67-80.
- Hadot, P. (1993). Plotinus or the Simplicity of Vision, trans. *Michael Chase (Chicago: University of Chicago Press, 1993)*, 74-96.
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218(4570), 384-387.
- Hooper, R. E., Tsubaki, Y., & Siva-Jothy, M. T. (1999). Expression of a costly, plastic secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiological Entomology*, 24(4), 364-369.
- Johnson, C. (1961). Breeding behaviour and oviposition in *Hetaerina americana* (Fabricius) and *H. titia* (Drury) (Odonata: Agriidae). *The Canadian Entomologist*, 93(04), 260-266.
- Labhart, T., & Meyer, E. P. (1999). Detectors for polarized skylight in insects: a survey of ommatidial specializations in the dorsal rim area of the compound eye. *Microscopy research and technique*, 47(6), 368-379.
- Labhart, T., & Nilsson, D. E. (1995). The dorsal eye of the dragonfly *Sympetrum*: specializations for prey detection against the blue sky. *Journal of Comparative Physiology A*, 176(4), 437-453.
- Laughlin, S. B. (1976). The sensitivities of dragonfly photoreceptors and the voltage gain of transduction. *Journal of comparative physiology*, 111(3), 221-247.

- Lythgoe, J. N. (1972). The adaptation of visual pigments to the photic environment. In *Photochemistry of vision* (pp. 566-603). Springer Berlin Heidelberg.
- Lythgoe, J. N. (1979). *Ecology of vision*. Clarendon Press.
- Marden, J. H., & Waage, J. K. (1990). Escalated damselfly territorial contests are energetic wars of attrition. *Animal Behaviour*, 39(5), 954-959.
- Marshall, N. J., Jennings, K., McFarland, W. N., Loew, E. R., & Losey, G. S. (2003). Visual biology of Hawaiian coral reef fishes. III. Environmental light and an integrated approach to the ecology of reef fish vision. *Copeia*, 2003(3), 467-480.
- Merilaita, S., Tuomi, J., & Jormalainen, V. (1999). Optimization of cryptic coloration in heterogeneous habitats. *Biological Journal of the Linnean Society*, 67(2), 151-161.
- Meyer, E. P., & Labhart, T. (1993). Morphological specializations of dorsal rim ommatidia in the compound eye of dragonflies and damselfies (Odonata). *Cell and tissue research*, 272(1), 17-22.
- Michiels, N. K., & Dhondt, A. A. (1990). Costs and benefits associated with oviposition site selection in the dragonfly *Sympetrum danae* (Odonata: Libellulidae). *Animal behaviour*, 40(4), 668-678.
- Peisker, H., & Gorb, S. N. (2010). Always on the bright side of life: anti-adhesive properties of insect ommatidia grating. *Journal of Experimental Biology*, 213(20), 3457-3462.
- Pritchard, G. (1966). On the morphology of the compound eyes of dragonflies (Odonata: Anisoptera), with special reference to their role in prey capture. *Physiological Entomology*, 41(1-3), 1-8.
- Ruck, P. (1964). Retinal structures and photoreception. *Annual Review of Entomology*, 9(1), 83-102.
- Ryan, M. J. (1990). Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford surveys in evolutionary biology*, 7, 157-195.
- Rydberg, H. (1959). Optical Interference as the Basis of the Mechanism of Vision. *Acta ophthalmologica*, 37(4), 305-324.
- Shichida, Y., & Matsuyama, T. (2009). Evolution of opsins and phototransduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1531), 2881-2895.

Vukusic, P., & Chittka, L. (2013). Visual signals: color and light production. *The Insects: Structure and Function*, edited by SJ Simpson and AE Douglas. Cambridge University Press,, 8.

Vukusic, P., & Stavenga, D. G. (2009). Physical methods for investigating structural colours in biological systems. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(Suppl 2), S133-S148.