

Tesis doctoral

REYNALDO ELÍAS VARGAS VARGAS

**Contribución de la personalidad en la
variación fonotípica y un impacto sobre
la biología del pez cebra**

Pel meu fill Reynaldo

*Sueña y serás libre en espíritu,
lucha y serás libre en vida*

Ernesto *Che* Guevara



RESUMEN



En esta tesis doctoral se evaluó la variación individual sobre la personalidad animal, empleando el pez cebra (*Danio rerio*), una especie modelo con aplicaciones en diversos campos de la investigación. Se utilizó la prueba de toma de riesgo en grupos para separar los individuos con patrones alternativos de respuestas y generar un programa de selección individual. Para ello estudiamos: (i) **el efecto que la selección por personalidad tiene en la morfología** (ii) **la consistencia de la personalidad en el tiempo y a través de contextos** y sus **implicaciones en la flexibilidad de comportamientos** y (iii) **el efecto que la personalidad provoca en la fitness individual**.

Para el estudio del efecto que la selección por personalidad tiene en la morfología del individuo, se realizó un programa bidireccional de selección de líneas de familias empleando la prueba de toma de riesgo en grupos para separar los individuos con comportamientos extremos. Los resultados del incremento del porcentaje de individuos con la personalidad objeto de selección en cada una de las líneas demuestran el éxito del programa. Sin embargo los resultados también reflejan que las líneas responden de manera diferente a la selección. La línea R mostró un incremento significativo en el porcentaje de individuos en la generación 1(G1) comparado con la G0, y no mostró incrementos en G2 comparado con G1, por el contrario la línea P mostró un decrecimiento en G1 comparado con G0 y un incremento en G2 comparado con G1. Los datos de las variables morfológicas demuestran que la selección por personalidad selecciona a su vez por rasgos morfológicos. La línea P mostró un mayor diámetro de orbitas oculares que la línea R. Este resultado demuestra que los individuos con mayor disposición a explorar ambientes nuevos están equipados con adaptaciones morfológicas que le permiten una mejor evaluación del ambiente. Sin embargo la diferencia solo se observó en animales machos mostrando que la mejor visión esta asociada a la mayor disposición a explorar mostrada por los machos de *D. rerio*.

Los resultados demuestran que *D. rerio* es consistente en el comportamiento en el tiempo y a través de contextos. Los resultados de la reprobación de toma de riesgo en grupos aplicada 10 meses después de la primera prueba demuestran que el 75% de los individuos de ambas conductas son consistentes en sus respuestas de comportamientos. Ambas líneas mostraron consistencia entre contextos, sin embargo mostraron diferencias en la fortaleza de la consistencia. La línea P mostró mayor consistencia que la línea R. Los datos reflejan diferencias en la respuesta a estímulos ambientales y formación de rutinas que demuestran la diferencia en flexibilidad de comportamientos en las líneas. La línea R mostró una mayor flexibilidad de comportamientos que la línea P mostrando que esta línea prospera mejor bajo fluctuaciones ambientales, en tanto la línea P muestra un mejor desempeño cuando las condiciones ambientales son estables. En cuanto al efecto de la personalidad en la fitness se realizó un estudio del éxito reproductivo de hembras y machos de la G1 del programa de selección. Los datos demuestran que la personalidad tiene un efecto en la dinámica reproductiva de *D. rerio*. Los datos de las variables reproductivas estudiadas demuestran que la línea P presenta mejores valores reproductivos que la línea R. Además, los resultados demuestran que la personalidad paterna tiene un efecto en la fitness mostrada por las crías en esta especie.

En conclusión demostramos la importancia de incluir evaluaciones de la personalidad en los programas de selección realizados en acuicultura así como en otros estudios realizados habitualmente con pez cebra.

PALABRAS CLAVE: personalidad, selección de líneas, variación individual, consistencia, flexibilidad, morfometría, toma de riesgo en grupos, *Danio rerio*, fitness.

ABSTRACT

In this PhD thesis, zebra fish (*Danio rerio*), a well-established animal model used in the biological sciences, were used to evaluate individual variation in animal personality. The risk taking in groups assay was used to screen animals with different response patterns and to generate an individual selection program. For that purpose we studied: (i) *the effect of personality selection on morphology*, (ii) *the consistency of personality over time and through contexts* and their *implications on phenotypic plasticity* and (iii) *the effect of personality on individual fitness*.

To study the effect of personality selection on individual morphology, we performed a two-way (bidirectional) selection program for family lines using screening for risk taking in groups to identify individuals at behavioural extremes. An increase in the percentage of individuals with each personality in the respective selected lines highlighted the success of the program. However, results also showed that lines respond differently to selection. The R line showed a significant increase in the percentage of individuals in the generation 1(G1) compared to G0, and did not show any increase in G2 compared to G1 whereas in contrast P lines showed a decrease in G1 compared with G0 and an increase in G2 compared to G1. Morphometric data from each generation supported personality selection where the P line showed a greater ocular orbital diameter. This result suggests that proactive individuals may be equipped with morphological adaptations related to a better assessment of their environment. However, the difference was only observed in males suggesting that increased ocular precision may be associated with increased willingness to explore novel environments in males of *D. rerio*.

The results demonstrate that personality traits in *D. rerio* are consistent over time and across contexts. The results of the repeated test of risk taking in groups applied 10 months after the initial test show that 75% of individuals are consistent in their behavioural responses. Both lines showed consistency across contexts; however they showed differences in the strength of consistency. The P line showed greater consistency than the R line. Data reflected differences in response to environmental stimuli and training routines that demonstrated differences in behavioural flexibility between the lines. Line R showed greater behavioural flexibility than line P, reinforcing the idea that these individuals may thrive best under environmental fluctuations. In contrast line P showed better performance when environmental conditions were stable. As for the effect of personality on fitness, a study of reproductive success of males and females of the G1 generation was performed. Data showed that personality had an effect on the reproductive dynamics of *D. rerio*. Reproductive data demonstrated that P line individuals show better reproductive performance than the R line. Furthermore, the results show that paternal personality has an effect on the fitness reflected in the offspring of this species.

In conclusion we demonstrate the importance of including personality assessments in selection programs conducted in aquaculture as well as in other studies usually performed with zebra fish.

KEYWORDS: personality, line selection, individual variation, consistency, phenotypic flexibility, morphometric selection, screening for risk taking in groups, *Danio rerio*, fitness.



ÍNDICE



1. Introducción general [15]

- Variación individual [17]
- Consistencia [17]
- Correlación de rasgos [18]
- Flexibilidad [19]
- Proactivo-reactivo: estilo de afrontamiento [20]
- Personalidad y morfología [21]
- Personalidad y *fitness* [21]
- Personalidad y acuicultura [22]
- Especie modelo [23]

Objetivos generales [25]

2. Establecimiento de un programa bidireccional de selección de líneas de familias de pez cebra (*Danio rerio*) por su personalidad y en relación con su morfología [29]

Introducción [31]

Materiales y Métodos [32]

- Diseño experimental [32]
- Población base [36]
- Proceso de selección para obtener los reproductores de G0 [36]
 - Procedimiento de selección [36]
 - Selección fenotípica* [36]
 - Registro de variables morfométricas (WT-UAB, WT-I)* [37]
 - Selección por personalidades (prueba de toma de riesgo en grupos)* [38]
 - Registro de variables morfométricas (P y R)* [39]
 - Índices morfofuncionales* [39]
 - Estrategia reproductiva para producir G1 [40]
 - Esquema de reproducción de WT-UAB puesta en masas* [40]
 - Alimentación de los reproductores
 - Equipo
 - Puestas

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

Esquema de reproducción de WT-I, adaptación de los métodos de apareamiento en parejas y el método anidado [42]

Alimentación de los reproductores

Equipo

Puestas

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

Manejo durante las diferentes fases del ciclo de vida [44]

Fase Embrionaria (Desde la fertilización hasta 72 horas post fertilización (hpf))

Fase Larvaria (72hpf-30 días pos-fertilización (dpf))

Fase Juvenil (30-90dpf)

Procedimiento de selección WT-UAB y WT-I [45]

Selección fenotípica

Registro de variables morfométricas

Selección por personalidades (prueba de toma de riesgo en grupos)

Prueba de campo abierto

Registro de variables morfométricas

Índices morfofuncionales

Estrategia reproductiva para producir G2 [46]

Esquema de reproducción [46]

Apareamiento en parejas (WT-UAB, WT-I) [46]

Alimentación de los reproductores (WT-UAB, WT-I)

Equipo

Puestas

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

Manejo durante las diferentes fases del ciclo de vida (WT-UAB, WT-I) [47]

Fase embrionaria

Fase Larvaria

Fase Juvenil

Procedimiento de selección para obtener G2 [48]

Análisis estadístico [48]

Resultados [49]

Selección fenotípica [49]

Selección por personalidad (distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos) [49]

Selección por personalidad (línea entre generaciones) [51]

Línea P

Línea R

Selección por personalidad (comparación de las líneas por generación) [52]

Selección por personalidad (comparación de fenotipos de color por generación) [52]

Selección por personalidad (latencias para dejar el refugio, línea entre generaciones) [53]

Línea P

Línea R

Selección por personalidad (comparación de latencias entre las líneas y por generaciones) [54]

Registro de variables morfométricas [55]

Registro de variables morfométricas por fenotipo de color [55]

Registro de variables morfométricas
(Datos normalizados por el promedio del factor de condición de Fulton) [58]

Registro de variables morfométricas por fenotipos de color
(Datos normalizados por el factor de condición de Fulton) [58]

Registro de variables morfométricas por sexo
(Datos normalizados por el promedio del factor de condición de Fulton) [60]

Registro de variables morfométricas de cada fenotipo de color por sexo
(Datos normalizados por el promedio del factor de condición de Fulton) [61]

Discusión [64]

Selección fenotípica [64]

Selección por personalidad [64]

Registro de variables morfométricas [65]

Relación entre Personalidad y Morfología [65]

3. Estabilidad y consistencia de la personalidad en el Tiempo y/o Contextos [69]

Introducción [71]

Materiales y Métodos [72]

Peces, estabulación y manejo [72]

Parámetros físico-químicos del agua y fotoperiodo [72]

Diseño del experimento [72]

Selección conductual [74]

Toma de riesgo en grupos [74]

Consistencia en el tiempo [74]

Toma de riesgo en grupos [74]

Registro de variables morfométricas [74]

Consistencia a través de contextos [75]

Actividad [75]

Agresividad [76]

Alimentación [76]

Análisis estadístico [77]

Resultados [77]

Consistencia en el tiempo [77]

Registro de variables morfométricas [80]

Estabilidad de las líneas a través de contextos [80]

Actividad [80]

Agresividad [81]

Alimentación [82]

Consistencia de las líneas a través de contextos [82]

Discusión [84]

Consistencia en el tiempo de la personalidad [85]

Estabilidad a través de los contextos [85]

Consistencia a través de contextos [86]

4. Respuesta a estímulos ambientales y formación de rutinas en líneas de pez cebra seleccionadas por su personalidad [89]

Introducción [91]

Materiales y Métodos [92]

Peces, manejo y estabulación [92]

Diseño experimental [92]

Toma de riesgo en grupos [93]

Registro de variables morfométricas [93]

Tanque de prueba [93]

Latencia para reasumir la alimentación después de una situación estresante [94]

Periodo de entrenamiento [95]

Objeto nuevo (respuesta a estímulos ambientales) [95]

Periodo de refuerzo [95]

Reversión de la zona de alimentación (formación de rutinas) [95]

Análisis estadístico [96]

Resultados [96]

Registro de variables morfométricas [96]

Latencias para reasumir la alimentación después de una situación estresante [96]

Periodo de entrenamiento [98]

Objeto nuevo [99]

Reversión de la zona de alimentación [100]

Consistencia de las líneas a través de situaciones [102]

Discusión [103]

Periodo de entrenamiento [104]

Objeto nuevo [104]

Reversión de la zona de alimentación [105]

Consistencia de las líneas [105]

5. Efecto de la personalidad en el éxito reproductivo del pez cebra (*Danio rerio*) y su importancia en la *fitness* de la especie [107]

Introducción [109]

Materiales y Métodos [110]

Reproductores, estabulación y manejo [110]

Parámetros físico-químicos del agua y fotoperiodo [110]

Diseño del experimento [111]

Registro de variables morfométricas [111]

Puestas [111]

Recolección, limpieza y manejo de las puestas [111]

Variables analizadas [112]

Fase embrionaria [112]

Fase larvaria [112]

Análisis estadístico [113]

Resultados [113]

Registro de variables morfométricas [113]

Registro de variables morfométricas (diferencias entre fenotipos de color) [113]

Línea P

Línea R

Fase reproductiva [114]

Tasa de puestas [114]

Tasa de puestas (diferencias entre fenotipos de color) [115]

Línea P

Línea R

Promedio de tamaño de puestas exitosas [116]

Promedio de tamaño de puestas exitosas (diferencias entre fenotipos de color) [116]

Línea P

Línea R

Porcentaje de viabilidad [117]

Porcentaje de viabilidad (diferencias entre fenotipos de color) [118]

Línea P

Línea R

Fase embrionaria [118]

Viabilidad embrionaria [119]

Viabilidad embrionaria (diferencias entre fenotipos de color) [119]

Fase larvaria [119]

Viabilidad larvaria [119]

Viabilidad larvaria (diferencias entre fenotipos de color) [120]

Crecimiento larvario [120]

Crecimiento larvario (diferencias entre fenotipos de color) [121]

Discusión [121]

Éxito reproductivo [122]

Supervivencia y crecimiento de las larvas [123]

6. Discusión general y conclusiones [125]

Conclusiones [131]

Anexo [133]

Pruebas preliminares de anestesia [135]

Bibliografía [137]

Agradecimientos [151]



**INTRODUCCIÓN
GENERAL**

1

Los individuos de una misma población varían en sus respuestas a desafíos ambientales. Estas variaciones en respuestas conductuales son ampliamente reconocidas en la literatura (Coleman and Wilson, 1998; Wilson, 1998). Por ejemplo algunos individuos muestran una mayor disposición a asumir riesgo para explorar ambientes nuevos mientras que otros de la misma especie prefieren permanecer en la seguridad que le brinda un ambiente familiar (Bell and Stamps, 2004).

VARIACIÓN INDIVIDUAL

La variación individual es considerada como un fundamento básico para la evolución (Budaev and Zworykin, 2002; Koolhaas et al., 2010), y puede ser el resultado de **factores genéticos**. Por ejemplo, en ratones (*Mus musculus domesticus*), las diferencias observadas en poblaciones salvajes en latencias de ataque se utilizaron como rasgo conductual para desarrollar un programa de selección bidireccional por corta y larga latencia de ataque (SAL, LAL respectivamente). Después de cinco generaciones de selección las líneas SAL se estabilizaron en sus latencias de ataque (Oortmerssen and Bakker, 1981). De la misma manera Gerlai and Csányi (1994) observaron un fuerte componente genético en la variación individual entre líneas de pez del paraíso *Macropodus opercularis*, seleccionadas por su divergencia en la interrupción de nado en una nueva situación “staccato movement”.

Las variaciones individuales en comportamiento también pueden ser el resultado de **la interacción ambiental**: Bell (2005) reportó el efecto de la interacción ambiental en las diferencias individuales entre dos poblaciones de *Gasterosteus aculeatus*, una cohabitando con un depredador y la otra sin depredador. La autora sugiere que la depredación tiene un efecto en la variabilidad individual dentro de la población y en las diferencias mostradas en algunos rasgos de comportamientos entre poblaciones.

Por muchos años las variaciones individuales se consideraron como variaciones al azar que debían reducirse en lo posible en los diseños de investigación (Koolhaas et al., 2010; Réale et al., 2010). Actualmente la percepción de la importancia de tomar en cuenta las variaciones individuales en comportamientos en la experimentación ha cambiado drásticamente, mayormente por las evidencias de su papel en importantes procesos ecológicos y evolutivos (Wolf and Weissing, 2012). Esta visión es apoyada por resultados de investigaciones obtenidos en poblaciones de diferentes especies que muestran que las variaciones individuales muchas veces son consistentes en el tiempo y a través de contextos y/o situaciones y se conocen en la literatura como personalidad animal (Gosling, 2001; Dall et al., 2004), temperamento (Réale et al., 2007) o estilo de afrontamiento *coping style* (Koolhaas et al., 1999). Cuando las diferencias individuales son correlacionadas sobre el tiempo y las diferencias son consistentes a través del tiempo y a través de contextos y/o situaciones se denominan **síndrome de comportamiento** (Sih et al., 2004a).

CONSISTENCIA

Actualmente existe mucho debate con respecto a si la personalidad es consistente sobre el tiempo y a través de contextos y/o situaciones. El termino consistencia se refiere a **comportamientos que se caracterizan por una alta previsibilidad o correlación durante medidas repetidas (estabilidad temporal o continuidad) o a través de varias situaciones incluso si el nivel promedio general de esta medida cambia** (Budaev and Zworykin, 2002). Consistencia en personalidad no significa que el valor del rasgo medido no cambia con la edad o condiciones ambientales, por el contrario sugiere que aún se sucedan cambios las diferencias individuales en gran parte se mantienen (Réale et al., 2007).

Consistencia en variaciones individuales se han reportado en mamíferos, aves, peces, reptiles, anfibios, insectos, (Gosling, 2001). Por ejemplo Huntingford (1976) en un estudio con *Gasterosteus aculeatus*, reportó consistencia entre agresividad y *bold* medido como la disposición a explorar en una situación peligrosa. De la misma manera Budaev et al., (1999) reportaron consistencia en el comportamiento en el tiempo de *Steatocranus casuarius*, en edad adulta cuando fueron evaluados un mes después de la primera prueba a pesar de no haber mostrado consistencia en la reprobación cuando fueron evaluados en fase juvenil, con lo que los autores sugieren que la consistencia se alcanza con la edad. En *Parus major* Carere et al., (2005) en un estudio realizado con líneas seleccionadas por su lenta o rápida exploración, reportaron consistencia solo entre líneas en el tiempo y a través de situaciones, en donde la línea de rápida exploración mantuvo una mayor consistencia; por el contrario la línea de lenta exploración mostró un comportamiento mas flexible.

En años recientes algunas hipótesis sugieren que la personalidad es en parte el resultado del metabolismo energético. El argumento principal se basa en que la energía es el combustible que el cuerpo emplea en procesos fisiológicos que generan nueva biomasa y otros procesos fisiológicos que sustentan la vida (Careau et al., 2008, Biro and Stamps, 2010). En línea con estos autores, Biro and Stamps (2008) argumentan que consistentes diferencias en tasas metabólicas en reposo pueden generar consistentes diferencias en crecimiento y fecundación, en donde individuos con mayor tasa de exploración y agresión característica de individuos proactivos mostraran mayores tasas metabólicas en reposo. Martins et al., (2011), en un estudio con *Solea senegalensis*, evaluaron la relación entre metabolismo energético y estilo de afrontamiento, los autores reportaron que las variaciones observadas en el consumo de oxígeno se relacionan con las diferencias en estilos de afrontamientos mostrado por los individuos en la prueba conductual y en las variables fisiológicas evaluadas.

CORRELACIÓN DE RASGOS

Otro aspecto de la personalidad que llama la atención de muchos investigadores es la correlación entre comportamientos conocida como **síndrome de comportamientos** (Sih et al., 2004a), por sus implicaciones ecológicas y evolutivas (Conrad et al., 2011). La existencia de correlaciones entre comportamientos se ha descrito en varias especies de peces por ejemplo Moretz et al., (2007a) en un estudio con dos cepas de laboratorio y una cepa salvaje de *Danio rerio*, reportaron la existencia de un síndrome entre audacia-agresión, y la existencia de un síndrome de domesticación en algunas de las cepas estudiadas. De la misma forma Sundström et al., (2004) en un estudio con *Salmo trutta*, de dos semanas de edad, reportaron la relación entre audacia y dominancia, sugiriendo que estos comportamientos son parte de un mismo fenotipo propenso a la agresividad reforzado por la selección en cautiverio. En otros estudios los investigadores se han interesado por la correlación entre rasgos de personalidad con variables fisiológicas (Øverli et al., 2007; Huntingford et al., 2010; Silva et al., 2010).

También se ha reportado el efecto de factores ambientales como disponibilidad de recursos o el nivel de depredación como factores causales de algunas correlaciones de comportamientos encontradas, por ejemplo en un estudio realizado por Dingemanse et al., (2007) para examinar la existencia de posibles síndromes de comportamientos, los autores reportaron que la existencia de síndromes de comportamientos solo fue presente en aquellas poblaciones con alto nivel de depredación. De la misma manera Bell and Sih (2007) reportaron que en una población de *Gasterosteus aculeatus*, cuyo niveles de depredación eran bajos no mostraba correlaciones entre rasgos de comportamiento. Después de ser expuestas a un nivel de depredación la población mostró la existencia de un síndrome de comportamiento

Estos síndromes pueden generar situaciones ventajosas bajo algunos gradientes ambientales pero también situaciones desventajosas en otros. Por ejemplo el síndrome de agresividad-exploración: un individuo que muestra mayor agresividad también muestra una mayor disposición para explorar ambientes nuevos, en donde las diferencias ambientales (alta o baja depredación), pueden ser ventajosas o desventajosas. Esta correlación entre rasgos de comportamientos puede ser ventajosa en un ambiente de baja depredación en donde una mayor exploración puede significar mayor adquisición de recursos los cuales puede defender exitosamente por sus nivel de agresión y de esta manera incrementar sus tasas de crecimiento o reproducción. Por el contrario en un ambiente de alta depredación la mayor disposición a explorar puede ser desventajosa para este tipo de comportamientos. ***Con este escenario dos teorías tratan de explicar la evolución de los síndromes de comportamiento: la hipótesis de la restricción y la hipótesis adaptativa.***

La **hipótesis de la restricción** postula que los comportamientos que constituyen un síndrome de comportamiento no pueden evolucionar de forma independiente. Se basa en que las correlaciones de comportamientos son el resultado del efecto pleiotrópico de los genes o de algunos efectos hormonales (Sih et al., 2004a; Bell, 2005). La hipótesis de la restricción asume que los mecanismos básicos de rasgos correlacionados no pueden evolucionar fácilmente porque esto requiere cambios genéticos o la evolución de diferentes componentes hormonales (Bell, 2005). Esta hipótesis es respaldada por las correlaciones genéticas que se han encontrado entre diferentes rasgos de comportamientos (van Oers et al., 2005; van Oers and Mueller, 2010). La existencia de controles neuroendocrinos en diferentes rasgos de personalidad también se ha descrito como posible efecto causal de la correlación de rasgos de comportamientos (Koolhaas et al, 1999; Carere et al., 2003; Øverli et al., 2007).

Por el contrario la **hipótesis adaptativa** postula que la selección debe favorecer rasgos de comportamientos que son ventajosos en un determinado contexto o situación (Wilson 1998; Bell, 2005). Por ejemplo en un estudio realizado por Hedrick (2000) con machos de *Gryllus intiger*, que emiten un largo llamado el cual es captado por hembras y también por depredadores toman más tiempo en dejar la seguridad del refugio que machos que emiten un corto llamado, de esta forma la correlación entre cortejo y comportamiento en contra del depredador es adaptativo (Bell, 2005). Esta hipótesis es apoyada por las evidencias que muestran que las correlaciones de comportamientos pueden ser el resultado de la exposición a diferentes gradientes ambientales y la flexibilidad frente a los cambios ambientales (Bell and Sih 2007; Dingemanse and Wolf, 2013).

FLEXIBILIDAD

Las variaciones individuales no siempre muestran consistencia y en muchos casos los patrones de respuestas son variables en el tiempo y entre contextos y/o situaciones y se conocen como **plasticidad** (Dingemanse et al., 2007) o flexibilidad de comportamientos (Coppens et al., 2010). La flexibilidad refleja el efecto que tiene el ambiente para alterar la consistencia de rasgos de personalidad (Dingemanse and Wolf, 2013). Por ejemplo Magnhagen and Staffan (2005), en un estudio realizado con percas juveniles (*Perca fluviatilis*), los autores reportaron que a pesar de que el rasgo de comportamiento puede ser innato, también puede ser modificado por las influencias de otros miembros del grupo y por la habituación al ambiente. De la misma forma Frost et al., (2007), en un estudio con trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), reportaron que los individuos previamente seleccionados por personalidad, modificaron sus patrones de respuestas después de observar el comportamiento de otro individuo de la misma especie.

La relación entre flexibilidad de comportamientos y personalidad se ha estudiado en diferentes tipos de animales incluyendo moluscos (Wilson et al., 2012), reptiles (Carter et al., 2012), insectos (Kralj-Fišer and Schneider, 2012), aves (Dingemanse et al., 2012), mamíferos (Martin and Réale, 2008) y peces (Adriaenssens and Johnsson, 2013; Sørensen et al., 2013).

La flexibilidad de comportamiento se define como la habilidad de un individuo para directamente responder y ajustar su comportamiento a estímulos ambientales (Coppens et al., 2010). Esta definición sugiere que personalidad y flexibilidad de comportamiento son términos incompatibles (Neff and Sherman, 2004). Los estímulos ambientales pueden tener un efecto sobre el comportamiento de corta o larga duración. El efecto de corta duración ocurre cuando el comportamiento es totalmente determinado por las condiciones ambientales actuales. Por el contrario el efecto de larga duración ocurre cuando el comportamiento es totalmente determinado por condiciones ambientales pasadas (Dingemanse and Wolf, 2013).

PROACTIVO-REACTIVO: ESTILO DE AFRONTAMIENTO

La variación individual en el comportamiento se ha asociado a otros aspectos de la personalidad como el estilo de afrontamiento proactivo-reactivo (Morand-Ferron et al., 2011). El concepto de estilo de afrontamiento se ha utilizado en una amplia variedad de especies animales, facilitado por el desarrollo de programas de selección de líneas con valores extremos de personalidad. Varios autores sugieren que los extremos de estas variaciones en rasgos de personalidad tienen una elevada *fitness* si los comparamos con individuos de conductas intermedias (Wilson, 1998, Koolhaas et al., 1999). Estos programas de selección se han desarrollado basándose en las diferencias en rasgos conductuales en grupos tales como, mamíferos (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, Oortmerssen and Bakker, 1981, Benus et al., 1987), aves (*Parus major*, Verbeek et al., 1994) y peces, (*Macropodus opercularis*, Gerlai and Csányi, 1994) y otros en variables fisiológicas en aves (*Gallus gallus*, Edens and Siegel, 1975; *Coturnix japonica*, Carsia et al., 1988; Satterlee and Johnson, 1988) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Pottinger et al., 1992).

Las variaciones en los estilos de afrontamiento pueden estar condicionadas en parte por un **componente genético**. Mackenzie et al., (2009) en un estudio realizado con carpa común (*Cyprinus carpio*), reportaron diferencias entre proactivos y reactivos en la expresión génica, y en 80% de la respuesta de los genes investigados. También se ha demostrado que las diferencias en comportamiento mostrada por individuos proactivos-reactivos esta correlacionada a parámetros fisiológicos o neuroendocrinos (Koolhaas et al., 1999; van Riel et al., 2004; Carere et al., 2003; Feldker et al., 2003; Sluyter et al., 2003; Veenema et al., 2003; Øverli et al., 2006).

El estilo de **afrontamiento proactivo** se caracteriza por una estrategia de lucha-huida *fight-flight*, con altos niveles de agresión, dispuestos a asumir riesgos, control territorial, exploración rápida y superficial. Por el contrario los individuos **reactivos** muestran una estrategia de conservación-retirada *conservation-withdrawal*, con bajos niveles de agresión y congelamiento en presencia de una amenaza, evitando asumir riesgos, explorando el ambiente a fondo y con cautela (Koolhaas et al., 1999, Korte et al., 2005; Øverli et al., 2007; Silva et al., 2010).

A nivel fisiológico los individuos proactivos se caracterizan por baja reactividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en el caso de mamíferos o hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI) en peces, que se traduce en bajos niveles de cortisol. Los individuos reactivos muestran una alta reactividad del eje HPI con altos niveles basales de cortisol (Meager et al., 2012). A nivel neurológico los

individuos proactivos muestran una alta reactividad simpática y una baja reactividad parasimpática; por el contrario los reactivos muestran una baja reactividad simpática y una alta reactividad parasimpática (Korte et al., 2005).

Otro componente del proactivo-reactivo estilo de afrontamiento es su divergencia en respuestas a estímulos ambientales y la formación de rutinas. Los individuos proactivos muestran poco interés por las modificaciones ambientales con conductas poco flexibles y rutinarias, por el contrario los reactivos se muestran más sensibles a los estímulos externos, mostrando una alta flexibilidad en sus conductas y poco rutinarios en sus comportamientos (Benus et al., 1987; Bolhuis et al., 2004; Ruiz-Gómez et al., 2011). A nivel ecológico ambas conductas muestran patrones diferentes, los individuos proactivos prosperan en condiciones estables con abundancia de recursos y en altas densidades, por el contrario los reactivos prosperan en escasez de recursos cuando las situaciones son variables y a bajas densidades (Korte et al., 2005; Mackenzie et al., 2009).

PERSONALIDAD Y MORFOLOGÍA

Según la teoría de la restricción se ha demostrado que muchos rasgos no pueden evolucionar solos (Bell, 2005), en esos casos diferentes combinaciones de rasgos deben ser ventajosos en diferentes ambientes (Sih et al., 2004a; Bell, 2005). Además de las diferencias conductuales entre poblaciones, existen también diferencias en morfología (Nicieza, 1995; Salonem, 2005). La morfología tiene una gran importancia funcional en peces (Svanbäck and Eklöv, 2004). Diferencias en personalidad pueden estar relacionadas a diferencias en rasgos morfológicos (Robinson and Wilson, 1994; Imre et al., 2002; Wilson and Mclaughlin, 2007). Varios estudios han demostrado la **relación entre personalidad y morfología** por ejemplo Brown and Braithwaite (2004), en un estudio con *Brachyraphis episcopi* provenientes de sitios con diferentes regimenes de depredación reportaron una relación entre tamaño del cuerpo y el tiempo para dejar el refugio; sus resultados reflejaron que los peces pequeños dejaban mas rápido el refugio. En línea con esto Brown et al., (2007), en un estudio con las mismas poblaciones de *Brachyraphis episcopi*, reportaron una correlación significativa entre masa del cuerpo, longitud total y audacia *bold*, en donde los peces audaces tienen una mayor masa por unidad de longitud que los peces tímidos.

PERSONALIDAD Y FITNESS

Los rasgos de historia de vida incluyendo supervivencia y mortalidad son considerados como elementos claves para determinar la *fitness* o eficacia biológica de una especie (Wolf and Weissing, 2012). También se ha sugerido que los rasgos pueden variar y ser adaptativos si los individuos de los extremos de la distribución de personalidades tienen una mayor *fitness* que individuos intermedios (Wilson, 1998). Otros estudios sugieren que la *fitness* de determinado tipo de personalidades es dependiente de ciertas modificaciones ambientales, incluyendo depredación, disponibilidad de recursos y condición social (Réale and Festa-Bianchet, 2003; Dingemanse et al., 2004; Both et al., 2005).

A nivel de mortalidad varios trabajos han mostrado el efecto que la depredación tiene en la *fitness* de la especie. En ovejas de cuerno largo (*Ovis canadensis*), se reportó el efecto de la depredación en la supervivencia de las ovejas: el primer año con baja depredación de *Puma concolor* la supervivencia fue alta y no se relacionó con la audacia *bold*, pero en los años siguientes que aumento el nivel de depredación, las ovejas audaces sobrevivieron mejor que las ovejas tímidas (Réale and Festa-Bianchet, 2003). Otros estudios han mostrado que el ambiente genera relaciones entre *fitness* y

personalidad que son dependientes del sexo, por ejemplo en *Parus major*, la abundancia de alimento genera una *fitness* para sexos con personalidades opuestas. En inviernos con abundancia de alimento hay mayor supervivencia de machos de rápida exploración y hembras de lenta exploración, en inviernos con limitadas fuentes de alimentación ocurre el fenómeno inverso, hay mayor supervivencia de machos de lenta exploración y hembras de rápida exploración (Dingemanse et al., 2004).

La relación entre reproducción y rasgos de personalidad en la *fitness* se ha estudiado en diferentes especies, por ejemplo Janczak et al., (2003) evaluaron la relación entre el miedo y la ansiedad como rasgos de personalidad en respuesta a la proximidad de un humano y un objeto nuevo y el éxito reproductivo en cerdas. Los autores reportaron una relación negativa entre las cerdas que mostraban mayor miedo y ansiedad característica de los individuos tímidos y el éxito reproductivo. En ovejas de cuerno largo, Réale et al., (2000) reportaron que las ovejas audaces se reprodujeron primero y tuvieron un mayor éxito de destete que las ovejas tímidas. Un estudio con pez cebra, *Danio rerio*, realizado por Ariyomo et al., (2012) revela la relación entre rasgos de personalidad y éxito reproductivo: los autores reportaron que individuos con conducta audaz y agresiva tuvieron un mayor éxito reproductivo, sin embargo el estudio solo comprendió la evaluación de individuos machos.

PERSONALIDAD Y ACUICULTURA

Incluir estudios de personalidad en la acuicultura, puede tener importantes implicaciones en la producción (Huntingford, 2004; Biro and Post, 2008), manejo (McDougall et al., 2005) y bienestar animal (Huntingford and Adams, 2005; Muller and Schrader, 2005; Rodenburg et al., 2008). Estudios de personalidad se han realizado en varias especies de peces de interés comercial, incluyendo *Oncorhynchus mykiss* (Øverli et al., 2006), *Salmo trutta* (Sundström et al., 2004; Brelin et al., 2005), *Clarias ariepinus* (van de Nieuwegeissen et al., 2008), *Hippoglossus hippoglossus* (Kristiansen and Fernö, 2007), *Solea senegalensis* (Silva et al., 2010), *Cyprinus carpio* (Mackenzie et al., 2009; Huntingford et al., 2010) y *Oreochromis niloticus* (Martins et al., 2011).

Las relaciones entre variables de importancia para la acuicultura se ha documentado en algunas especies de peces, por ejemplo Øverli et al., (2002) evaluaron la relación entre personalidad y el tiempo para reanudar la alimentación, reportando que los individuos con conducta audaz reasumieron la alimentación mas rápido; esto tiene importantes consecuencias para la acuicultura en donde los animales son sometidos a diferentes situaciones estresantes como puede ser el cambio de tanques por fases de crecimiento y aquellos animales que reanuden la alimentación mas rápido mostraran mayores tasas de crecimiento. En línea con esto Silva et al., (2010) en un estudio con *Solea senegalensis*, reportaron una relación entre diferencias en conducta, respuestas al estrés y crecimiento.

Las actividades acuícolas se caracterizan por prácticas de manejo como presencia humana, altas densidades, transporte que generan estrés a las especies cultivadas, en donde una selección previa por personalidad puede incrementar la eficiencia del sistema de producción, seleccionando aquellos individuos que muestren una mayor aptitud para la producción, salvaguardando el bienestar animal.

ESPECIE MODELO

Danio rerio es un pequeño ciprínido originario de los ríos de Pakistán, India y Bangladesh (Spence et al., 2006). Las líneas azules y doradas que corren longitudinalmente en ambos lados del cuerpo y en las aletas anal y caudal se consideran la característica más importante de la especie y de donde se origina su nombre (Fang, 2000; Pritchard, 2001).

Entre sus ventajas principales como especie modelo está su reducido tamaño, lo cual permite tener grandes poblaciones en espacios reducidos, abaratando los costos en instalaciones y manejo. Muestran alta fecundidad, ya que un solo par puede producir hasta 200 huevos viables por día, rápida maduración, alcanzando la edad adulta a los tres meses, embrión transparentes lo cual permite seguir en vivo los diferentes estadios de desarrollo y su genoma está totalmente secuenciado, con la disponibilidad comercial de *microarrays* (Hill et al., 2005; Helmut, 2009).

Todas estas ventajas han convertido al pez cebra en una de las especies modelo utilizadas en diferentes campos de la investigación, incluyendo la respuesta inmune (Pressley et al., 2005; Sullivan and Kim, 2008), la biología del desarrollo y genética (Grunwald and Eisen, 2002), drogas (Barros et al., 2008),), drogas terapéuticas (Rubinstein, 2003; Rubinstein, 2006), evolución (Cañestro et al., 2007), toxicología y envenenamiento (Amanuma et al., 2000; Liu et al., 2006) y acuicultura (Ulloa et al., 2011).

El pez cebra también se ha convertido en una de las especies más importantes para el estudio de la conducta. Varios aspectos de la conducta del pez cebra se han investigado, entre ellas su comportamiento gregario (Engeszer et al., 2007), agresión (Wright et al., 2003; Larson et al., 2006), dominancia y jerarquía (Dahlbom et al., 2011; Filby et al., 2010; Paull et al., 2010), toma de riesgo (Dugatkin et al., 2005), comportamiento reproductivo (Spence et al., 2007; Castranova et al., 2011), aprendizaje (Bilotta et al., 2005; Sison and Gerlai, 2010) comportamiento y morfología (Wright et al., 2006), evolución del comportamiento (Moretz et al., 2007a), comportamiento y reproducción (Ariyomo and Watt, 2012) y genética del comportamiento (Ariyomo et al., 2013).



OBJETIVOS



El objetivo principal de esta tesis es caracterizar a nivel conductual y morfológico la variación individual en la personalidad entre los individuos de pez cebra (*Danio rerio*), su importancia ecológica en la *fitness* de la especie y la aplicación en acuicultura. Más específicamente se exploraron los siguientes aspectos:

En el **CAPÍTULO 2** el objetivo principal fue establecer un programa genético de selección bidireccional de líneas de familias de pez cebra por su personalidad frente a la prueba de riesgo en grupos y evaluar si la selección por rasgos de personalidad selecciona por rasgos morfológicos. Estos objetivos fueron desarrollados de acuerdo a las siguientes hipótesis:

Existen patrones alternativos de respuestas frente a desafíos ambientales en una población de *D. rerio*.

La prueba de toma de riesgo en grupos es un indicador fiable para separar poblaciones en diferentes personalidades.

Existe relación entre la personalidad y la morfología en individuos de diferentes personalidades.

La variación morfológica mostrada por las líneas está relacionada con el sexo.

En el **CAPÍTULO 3** el objetivo principal fue evaluar la estabilidad y consistencia de un conjunto de comportamientos a través de diferentes contextos (**consistencia a través de contextos**), en peces que previamente se evaluaron por la prueba de toma de riesgo en grupos, 10 meses después de la primera prueba (**consistencia en el tiempo**). Para alcanzar estos objetivos desarrollamos las siguientes hipótesis.

La diferencia en personalidad dentro de la población en el pez cebra se mantiene en el tiempo.

Existe diferencias en el porcentaje de personalidades entre la población base y las subpoblaciones posteriores demostrando una fijación del comportamiento.

Existe estabilidad a través de los contextos en cada una de las subpoblaciones a nivel intra-poblacional (familias proactivas/reactivas).

Existe consistencia de comportamiento a través de los contextos dentro de las líneas y también a nivel intra-individual para según que comportamientos.

En el **CAPÍTULO 4** el objetivo principal fue investigar si los individuos proactivos (P) y reactivos (R) de *D. rerio* difieren en sus respuestas a estímulos ambientales y en la formación de rutinas. Este objetivo se alcanzó desarrollando las siguientes hipótesis.

Existen diferencias en la flexibilidad del comportamiento entre P y R frente a estímulos ambientales.

Existen diferencias en la capacidad de desarrollar un comportamiento rutinario entre P y R.

Hay diferencia en consistencia entre P y R en diferentes situaciones en un mismo contexto.

En el **CAPÍTULO 5** nos planteamos como objetivo principal evaluar el efecto que la personalidad de hembras y machos tiene en el éxito reproductivo. Un segundo objetivo fue investigar si la personalidad de los padres tiene un papel en la supervivencia y el crecimiento larvario de las crías. Estos objetivos fueron alcanzados desarrollando las siguientes hipótesis.

Individuos con personalidad P y R tienen estrategias reproductivas diferentes.

Los individuos P tienen un mayor éxito reproductivo que los individuos R.

La personalidad parental tiene un efecto en el desempeño de las crías.

Las crías de padres P muestran una mejor *fitness* que las crías de padres R.

Existen diferencias entre los fenotipos de color (WT-UAB/WT-I) en individuos de una misma personalidad.

En el **CAPÍTULO 6** discutimos de forma general el resultado de los capítulos anteriores (2-5), con énfasis principal en la importancia de la personalidad en la ecología y la necesidad de su implementación en los programas de selección desarrollados en acuicultura.



ESTABLECIMIENTO
DE UN PROGRAMA BIDIRECCIONAL
DE SELECCIÓN DE LÍNEAS DE FAMILIAS
DE PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)
POR SU PERSONALIDAD
Y EN RELACIÓN CON SU MORFOLOGÍA

2

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las poblaciones están enfrentadas a constantes cambios ambientales. Las estrategias empleadas para mantener la estabilidad frente a estas alteraciones ambientales son diferentes entre individuos de una misma población (Korte *et al.*, 2005; Réale *et al.*, 2007). Estas diferencias en muchos casos son consistentes en el tiempo y a través de contextos o situaciones (Sih *et al.*, 2004) y determinan la personalidad (Gosling, 2001; Dall *et al.*, 2004), temperamento (Réale *et al.*, 2007) o estilo de afrontamiento (Koolhaas *et al.*, 1999) del individuo. **Varios autores sugieren que los extremos de estas variaciones en rasgos de personalidad tienen una mayor fitness si los comparamos con individuos de conductas intermedias** (Wilson, 1998, Koolhaas *et al.*, 1999). En diferentes grupos de vertebrados como: mamíferos (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, Oortmerssen and Bakker, 1981, Benus *et al.*, 1987), aves (*Parus major*, Verbeek *et al.*, 1994) y peces, (*Macropodus opercularis*, Gerlai and Csányi, 1994) se han realizado con éxito programas de selección bidireccional empleando las variaciones extremas en rasgos de personalidad frente a algunos desafíos ambientales.

Uno de los rasgos de personalidad más importantes que caracteriza a las poblaciones en su manera de interactuar con el ambiente, es la exploración, con algunos individuos más dispuestos a tomar riesgos y explorar ambientes nuevos, mientras otros prefieren la seguridad que les brindan su ambiente actual. La disposición de explorar nuevos ambientes tiene importantes beneficios para los individuos como puede ser la oportunidad de colonizar y acaparar nuevas zonas de alimentación que pueden incrementar su crecimiento y reproducción. Sin embargo pueden existir desventajas asociadas con una mayor disposición a asumir riesgos de exploración como son los costos energéticos incurridos (Biro y Stamps, 2010) y la probabilidad de ser depredado (Fraser *et al.*, 2001). De esta manera la disposición de explorar un ambiente nuevo tiene importantes repercusiones en la vida y la *fitness* individual (Smith and Blumstein, 2008; Dall *et al.*, 2012). Una de las pruebas con mayor éxito para seleccionar individuos por su disposición a explorar un ambiente nuevo es la prueba de toma de riesgo que se ha empleado en ambientes naturales (Brown *et al.*, 2004) y en condiciones de laboratorio (Brydges *et al.*, 2008). La prueba de toma de riesgo en grupos tiene la ventaja de brindar la oportunidad al individuo de reaccionar con patrones alternativos de respuesta (Treit, 1989) que son fácilmente cuantificable a través de las latencias para dejar un área segura (Huntingford and Coyle, 2007), y puede ser aplicada grupalmente en especies que muestran un fuerte comportamiento gregario (Mackenzie *et al.*, 2009; Huntingford *et al.*, 2010).

La selección por un rasgo de personalidad puede seleccionar individuos por otros rasgos morfológicos y fisiológicos (Falconer and Mackay, 2006). En peces algunos estudios reportan la relación entre las preferencias de los depredadores por presas con algunas características morfológicas, por ejemplo Weber *et al.*, (2012), reportaron la relación entre las preferencias del depredador por individuos con ciertas características morfológicas de acuerdo al tipo de ambiente. De la misma manera Dingemans *et al.*, (2009) reportaron la relación entre personalidad y variables morfológicas en un estudio realizado en dos poblaciones de *Gasterosteus aculeatus* con diferentes regímenes de depredación.

Con estos antecedentes nosotros planteamos como un primer objetivo de este estudio **establecer un programa genético de selección bidireccional de líneas de familias de pez cebra por su personalidad frente a la prueba de riesgo en grupos**. Un segundo objetivo fue **evaluar si la selección por rasgos de personalidad selecciona por rasgos morfológicos**. Estos objetivos fueron desarrollados de acuerdo a las siguientes hipótesis:

Existen patrones alternativos de respuestas frente a desafíos ambientales en una población de *D. rerio*.

La prueba de toma de riesgo en grupos es un indicador fiable para separar poblaciones en diferentes personalidades.

Existe relación entre la personalidad y la morfología en individuos de diferentes personalidades.

La variación morfológica mostrada por las líneas está relacionada con el sexo.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Aquí de forma general se explicará el diseño experimental propuesto; mayores detalles del mismo serán ampliados en cada sección. Antes de iniciar la parte experimental se descartaron aquellos individuos con patrones de color diferentes al patrón salvaje y aquellos con algún tipo de deformidad. La **generación 0** (de aquí en adelante **G0**), se obtuvo siguiendo un riguroso sistema de selección. La población original total o **población base** (de aquí en adelante **PB**) se dividió en **dos categorías fenotípicas de color** basado en las diferencias en los patrones de color (**WT-UAB grupo homogéneo** y **WT-I grupo heterogéneo**). A cada categoría fenotípica de color se le registraron 8 variables morfométricas, adicionalmente se les registró el peso y se determinó el sexo. Los dos fenotipos de color se dividieron en tres categorías de toma de riesgo en grupos, **proactivos** (de aquí en adelante **P**), **intermedios** (de aquí en adelante **I**) y **reactivos** (de aquí en adelante **R**). Los I se descartaron. Los peces P y R de cada categoría fenotípica de color se les registraron las mismas 8 variables morfométricas previas a la prueba de toma de riesgo en grupos, igualmente se les registró el peso y se determinó el sexo. En este punto del experimento se diseñó la estrategia de reproducción para ambas categorías fenotípicas de color. Un resumen de los pasos realizados para obtener G0 es presentado en la **FIGURA 2.1**.

La **generación 1** (de aquí en adelante **G1**) del fenotipo WT-UAB se obtuvo de una puesta en masas de sus progenitores (machos n= 9; hembras n=32), en donde todas las categorías de toma de riesgo en grupos se mezclaron para conseguir el número máximo posible de individuos mostrando el fenotipo de color adecuado (patrón de coloración salvaje homogéneo). La **generación 2** (de aquí en adelante **G2**) del fenotipo WT-UAB se obtuvo en grupos de familias. Se generaron 6 familias P y 5 familias R, siguiendo un apareamiento en parejas dentro de P y R (ver **FIGURA 2.2**).

El **esquema de reproducción** empleado para obtener las generaciones G1 y G2 del fenotipo WT-I fue el de familias. En la generación G1 se obtuvieron 6 familias P y 6 familias R. El esquema de apareamiento empleado es el de parejas en P y R. Sin embargo para obtener la generación G1 se apareó un macho y dos hembras (relación 1:2), con la finalidad de asegurar la progenie (ver **FIGURA 2.3**).

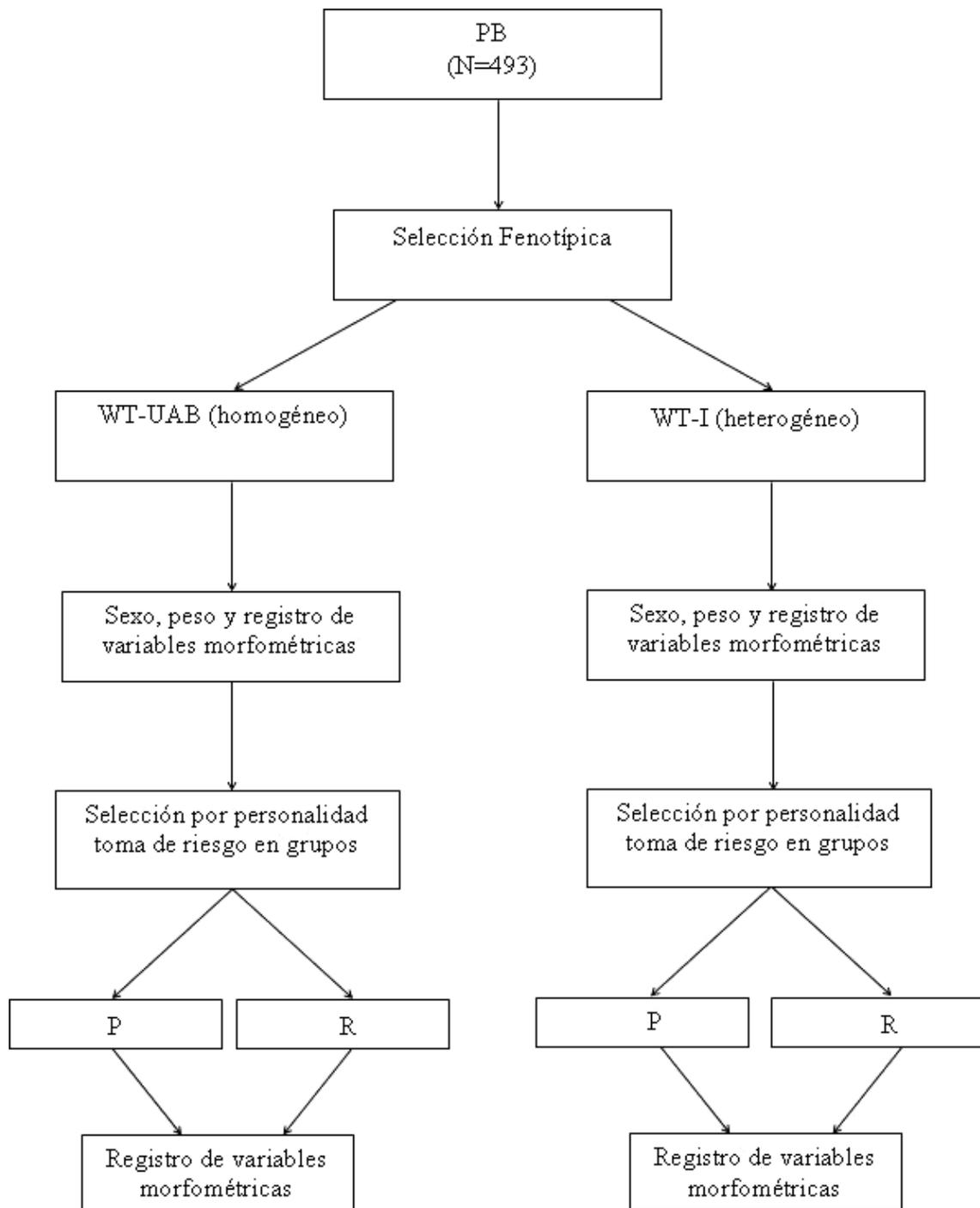


FIGURA 2.1. ESQUEMA DEL FLUJO EXPERIMENTAL, para generar los reproductores desde la generación G0 hasta G2.

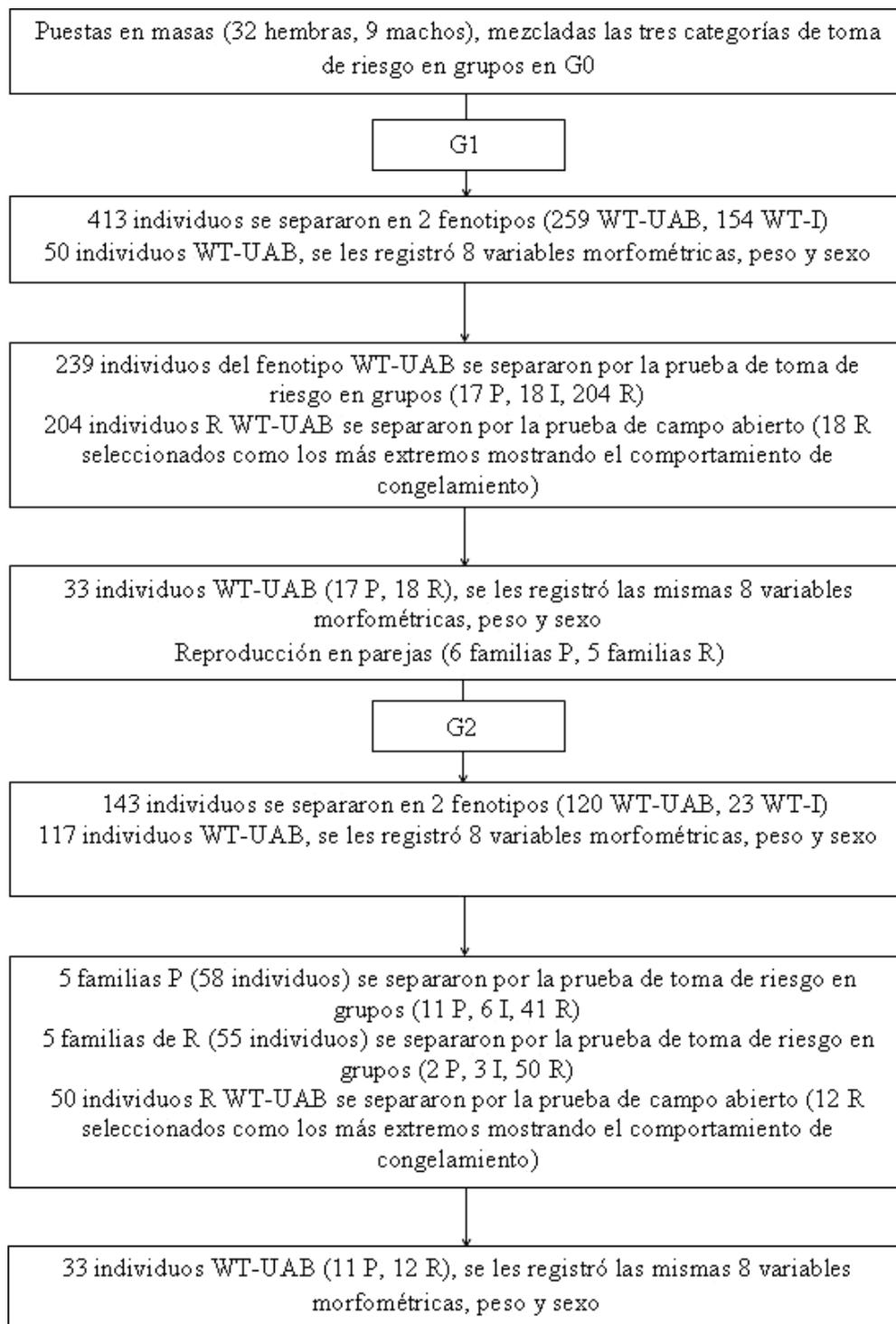


FIGURA 2.2. ESQUEMA DE REPRODUCCIÓN Y SELECCIÓN de WT-UAB desde G0 hasta G2.

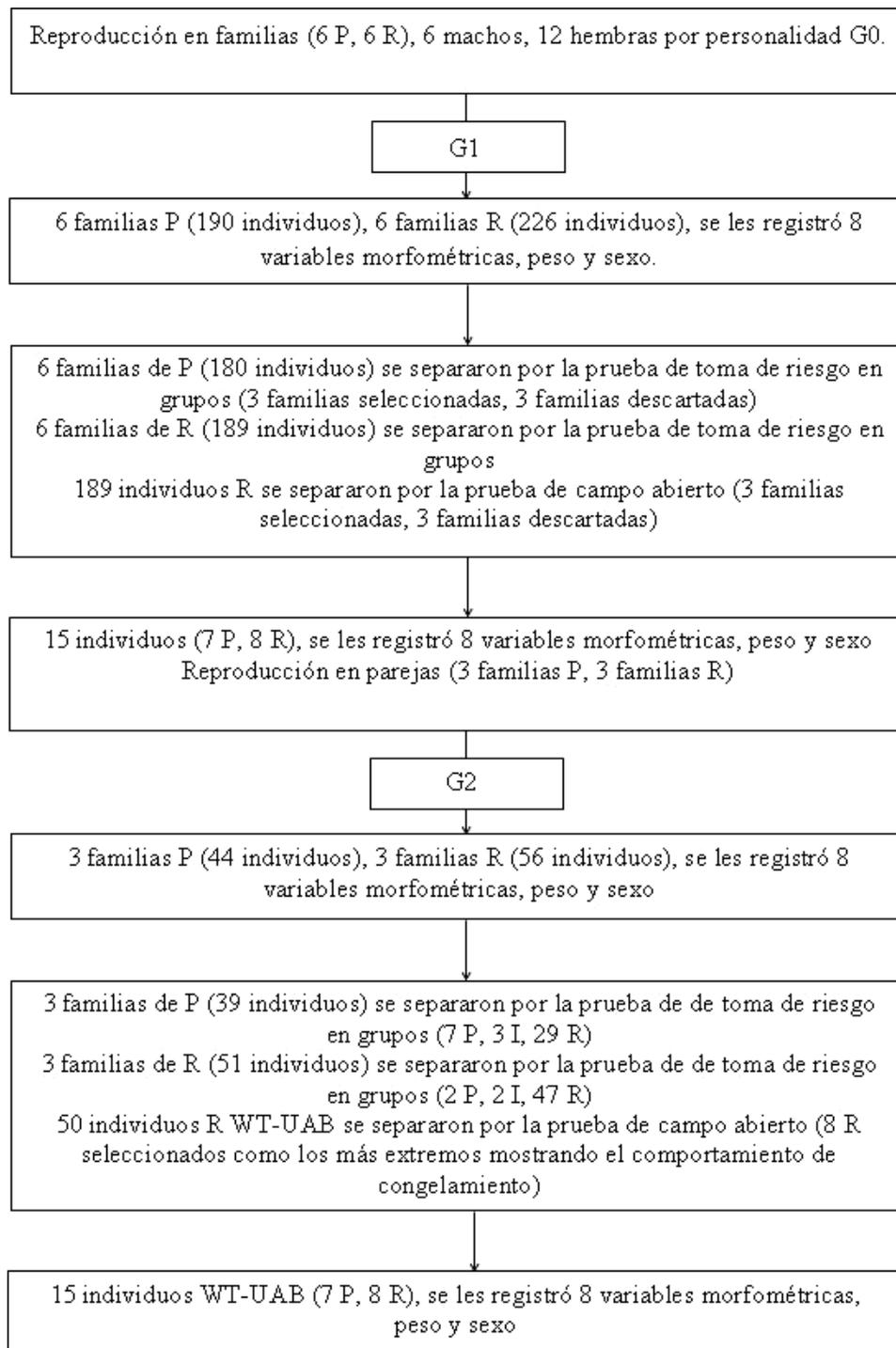


FIGURA 2.3. ESQUEMA DE REPRODUCCIÓN Y SELECCIÓN de WT-I desde G0 hasta G2.

POBLACIÓN BASE

La PB de pez cebra (*Danio rerio*), utilizada para desarrollar este programa de selección de líneas de familias por sus rasgos de personalidad se adquirió en diciembre de 2009 en un distribuidor local ubicado en Parets del Vallés, Barcelona, España. Se estabularon en tanques de 30 litros, colocados en estanterías en una sala con ambiente controlado ubicada dentro del acuario de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). La densidad máxima se determinó en 30 peces por tanque (densidad máx. 1pez/litro, Lawrence, 2007). El suministro de agua se realizó con agua de grifo previamente filtrada a través de un sistema mecánico de carbón activo granulado (filter cartidge CTO®, Water Quality Association, Lisle, IL, USA). Cada estante se equipó con un sistema cerrado de recirculación con un sistema de filtración física y biológica. La temperatura del agua se mantuvo en $27,06 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$, (media \pm desviación estándar), las concentraciones de oxígeno fueron de $5,47 \pm 0,26\text{mg/L}$ (miligramos x litro), ambas mediciones se realizaron diariamente con un oxímetro (OxyGuard®, Handy Polaris, OxyGuard International, Denmark). El continuo flujo de agua mantuvo las concentraciones adecuadas de oxígeno. Para mantener la calidad del agua, semanalmente se sustituyó 30% del volumen total de agua de cada estantería. Semanalmente se realizaron controles de Amoniac, Nitrito y Nitrato (Sera Test Kit®, New Tech, Wateringbury, Kent, UK). El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 14:10 (0600-2000 horas). Los peces se alimentaron hasta la saciedad dos veces al día, en la mañana con un pienso seco y en la tarde con un pienso húmedo de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Zfbiolabs®; ver www.Zfbiolabs.com).

PROCESO DE SELECCIÓN PARA OBTENER LOS REPRODUCTORES DE GO

Se indican los diferentes procedimientos utilizados para establecer las bases del programa genético de selección de líneas de familias por su personalidad. Sin embargo información de interés en el momento de desarrollar un programa genético de selección como son procedencia geográfica, edad exacta y tiempo de permanencia en cautiverio no pudieron ser establecidas.

PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN

Antes de iniciar la parte experimental todos los peces se clasificaron, descartando aquellos individuos con patrón de color diferente al patrón salvaje (leopardos, velares), y aquellos individuos con deformidades que comprometieran los resultados de las pruebas. También se descartaron aquellos peces que presentaron lesiones propias de enfermedades o lesiones de tipo mecánicas.

Como un primer paso de nuestro programa de selección separamos la PB en dos subpoblaciones, de acuerdo al fenotipo de color (WT-UAB y WT-I). WT-UAB con un patrón de color homogéneo en todos los individuos y WT-I con diferentes arreglos del patrón de color formando una subpoblación heterogénea (McClure, 1999; Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002; Parichy y Johnson, 2001; Parichy, 2006).

Selección fenotípica

La selección fenotípica se inició en el mes de abril del 2010. El tanque de prueba consistió en un tanque de vidrio de 9 litros (Largo x Ancho x Altura: 30 x 15 x 20 centímetros), cubierto en tres de sus lados con papel blanco para aumentar el contraste y así facilitar la observación, y solo la parte frontal se dejó descubierta para permitir la observación. Aproximadamente 500 individuos *D. rerio* mayores de 6 meses se separaron en dos categorías fenotípicas de color de acuerdo al procedimiento descrito a continuación. Grupos de aproximadamente 70 individuos por día, se transfirieron

desde su tanque stock al tanque de habituación de 38 litros (50 x 25 x 30), dejados durante 10 minutos para que se recobrarán del manejo. Grupos de 3 peces a la vez se transfirieron desde su tanque de habituación, al tanque de prueba, la separación fenotípica se realizó de forma visual siguiendo un orden de observación de una serie jerárquica de criterios establecidos para clasificar entre ambas categorías de color (TABLA 2.1).

ORDEN DE OBSERVACIÓN DE LOS CRITERIOS	CRITERIOS	
	WT-UAB (HOMOGÉNEA)	WT-I (HETEROGÉNEA)
Uniformidad de color en ambos lados del cuerpo	Si	No
Líneas (azules y doradas) bien definidas en ambos lados del cuerpo	Si	No
Correcta inserción de las líneas del cuerpo en la aleta caudal	Si	No
Líneas bien definidas y rectas en la aleta anal.	Si	No

TABLA 2.1. ORDEN DE OBSERVACIÓN Y CRITERIOS utilizados para clasificar entre fenotipos de color en grupo de tres peces. Homogeneidad en los criterios utilizados se consideró como WT-UAB, y la heterogeneidad como WT-I. El orden de observación de los criterios para discernir entre categorías de color se estableció desde aspectos generales hasta aspectos específicos del individuo y de esta manera aumentar la eficacia de clasificación.

Registro de variables morfométricas (WT-UAB, WT-I)

El peso y todas las variables morfométricas se registraron sobre individuos vivos. Para realizar el registro se inmovilizó a los peces reduciendo su temperatura corporal (ver ANEXO). Cada individuo se transfirió desde su tanque de stock a un vaso de precipitado conteniendo 300 ml de agua, colocado dentro de una bandeja con hielo. Cuando los peces mostraron signos de inmovilidad se colocaron sobre su lado izquierdo en una esponja cubierta de papel de aluminio con una ligera película de agua. Cada uno de los individuos se sexó de acuerdo al dimorfismo de características mostradas entre ambos sexos: a) hembras con abdomen abultado, papila genital visible y una coloración amarilla en el borde de la aleta dorsal, pectoral y caudal, b) machos con cuerpos fusiformes, puntos naranja heterogéneamente distribuidos en diferentes zonas de la aleta caudal (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002; von Krogh *et al.*, 2010). El peso en gramos, se registró utilizando una balanza tipo ADP 210/L, confiabilidad de 0,001 gr, (Wilmington, California, USA). A cada individuo se le registraron ocho variables morfométricas (Rodríguez y Granado, 1988; Pineda Santis, *et al.*, 2004; Goetz *et al.*, 2010), con un pie de rey convencional, precisión de 0,01mm, (Ehliis®, S.A. Barcelona, España) (ver, TABLA 2.2, FIGURA 2.4).

VARIABLE	DESCRIPCIÓN
Longitud Total (LT)	Desde la punta del maxilar superior hasta la punta superior de la aleta caudal
Longitud Estándar (LE)	Desde la punta del maxilar superior hasta el centro del pedúnculo caudal
Longitud Cefálica (LC)	Desde la punta del maxilar superior hasta la punta del opérculo
Longitud Preocular (LPO)	Desde la punta del maxilar superior hasta el borde delantero de la orbita ocular
Longitud de la Base de la Aleta Anal (LBAA)	Desde la inserción anterior de la aleta anal hasta la inserción posterior de la aleta anal
Longitud de la Aleta Pectoral (LAP)	Desde el origen de la aleta pectoral hasta la punta de la aleta pectoral
Diámetro de las Orbitas Oculares (DOO)	Desde el borde delantero de la orbita ocular hasta el borde posterior de la orbita ocular
Distancia Interorbitaria (DIO)	Desde el borde superior de la orbita ocular derecha hasta el borde superior de la orbita ocular izquierda

Fuente: Adaptado de Rodríguez y Granado, 1988.

TABLA 2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS registradas a cada uno de los individuos.

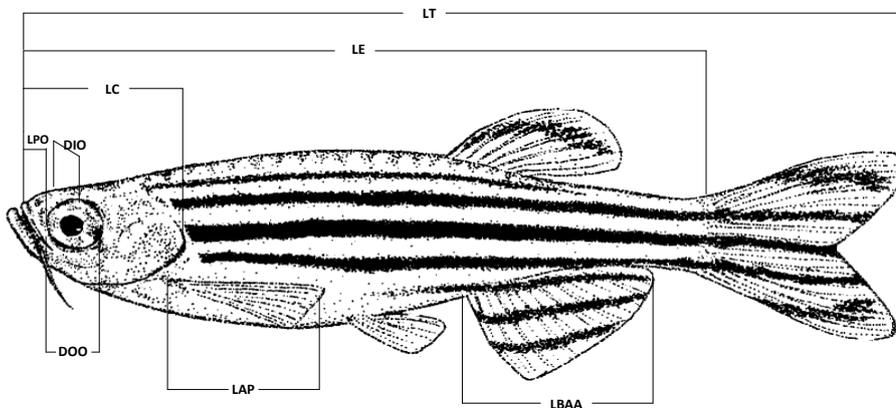


FIGURA 2.4. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS registradas a cada individuo (adaptado de Pritchard, 2001).

Selección por personalidades (prueba de toma de riesgo en grupos)

Finalizado el registro de las variables morfológicas (aproximadamente después de 2 semanas de reposo), los peces de cada fenotipo de color se separaron por sus estilos de afrontamiento frente a la prueba de toma de riesgo en grupos. Toma de riesgo en grupos se midió como el tiempo tomado por un individuo para dejar un grupo en la seguridad de un refugio. Representa la disposición de explorar un ambiente nuevo y potencialmente peligroso (Huntingford and Coyle, 2007).

El tanque de prueba consistió en un tanque de 20 litros (40x20x25cm), el lado opuesto y los lados laterales al observador se cubrieron con papel blanco, así como también el lado de observación se cubrió en 3/4 partes para reducir el estrés y aislar del medio externo. Se dividió 1/3 de su longitud, con un separador negro de PVC, formando un área de refugio en uno de los extremos. El separador se equipó con un agujero de 3 centímetros de diámetro en el centro, ubicado a 10 cm del fondo del tanque. El nuevo ambiente consistió en el restante espacio abierto del tanque.

Un día antes de la prueba de toma de riesgo en grupos los peces se transfirieron desde su tanque de stock al tanque de habituación de 60 litros (50x40x30cm), provisto de grava en el fondo y plantas de plástico para acuarios, la temperatura y la concentración de oxígeno se mantuvo similar a las del tanque stock. Utilizamos una modificación del protocolo descrito por Mackenzie *et al.*, (2009) para carpa común (*Cyprinus carpio*). Los criterios establecidos para separar entre las diferentes categorías de toma de riesgo en grupos se desarrollaron en una prueba piloto preliminar, separando según la secuencia de emergencia de cada pez del refugio con un límite de tiempo de una hora.

Un grupo de nueve peces se transfirieron del tanque de habituación y se colocaron en el área de refugio del tanque de prueba, cubriendo la parte superior con papel blanco, el agujero del separador se cubrió con una lámina negra corrediza de un material similar al del separador de PVC espumado, dejando los animales 10 minutos para reducir el estrés de manipulación. El ensayo se dividió en dos fases de observación. Finalizados los 10 minutos el separador que cubría el agujero se retiró suavemente, permitiendo a cada pez elegir entre permanecer en el refugio o salir y entrar en el nuevo ambiente, iniciando la primera fase de observación de 10 minutos. Los tres primeros peces que entraron al nuevo ambiente, o los peces con latencias inferiores a 10 minutos se seleccionaron como P registrando la latencia total de cada individuo. El agujero de salida se cubrió con la lámina y los peces que emergieron se trasladaron a un tanque con las mismas condiciones descritas para los tanques de stock, debidamente rotulado (P), registrando el tiempo real. El separador se retiró nuevamente iniciando un segundo periodo de observación de 15 minutos. Los tres primeros peces que entraron al nuevo ambiente o si menos de tres peces entraron en 15 minutos se seleccionaron como I, registrando la latencia total de salida de cada individuo. Nuevamente se cerró el agujero de salida del separador y se colocaron los individuos en un tanque previamente rotulado (I), posteriormente fueron descartados. Los restantes tres peces o todos los peces que aun permanecieron en el refugio después de la segunda fase de 15 minutos se clasificaron como R y se colocaron en un tanque previamente rotulado (R).

Registro de variables morfométricas (P y R)

Después de finalizada la prueba de toma de riesgo en grupos una muestra al azar de P y R peces de cada fenotipo de color (WT-UAB, N= 16; WT-I, N= 40), se sexaron, pesaron y se les registraron las variables morfométricas previamente descritas (ver apartado ***Registro de variables morfométricas (WT-UAB, WT-I)***).

Índices morfofuncionales

Los datos brutos del peso y todas las variables morfométricas se transformaron a índices morfofuncionales. La relación entre peso y longitud total se determinó por el factor de condición de Fulton, según la siguiente fórmula:

$$K=W \times 100000/L^3$$

En donde W representa el peso en gramos, L es la longitud total y 10000 es un factor empleado para ajustar los datos (Carlander, 1950).

El resto de las variables morfométricas, se transformaron a índices dividiendo el valor del dato bruto de cada individuo entre el factor de condición de Fulton promedio del grupo (Blackwell *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2000; Stevenson and Woods, 2006) (ver **TABLA 2.3**).

VARIABLES	SIGNIFICADO MORFOFUNCIONAL	ÍNDICES
$W/L^3 \times 100000$	Relación volumétrica	K_{Total}
Longitud Cefálica/K	Forma de la cabeza	$LC/K_{Promedio}$
Longitud de la Base de la Aleta Anal/K	Estabilidad en movimiento	$LBAA/K_{Promedio}$
Longitud de la aleta Pectoral/K	Estabilidad y propulsión en movimiento (maniobrabilidad)	$LAP/K_{Promedio}$
Longitud Preocular/K	Visibilidad	$LPO/K_{Promedio}$
Diámetro de las Orbitas Oculares/K	Visibilidad	$DOO/K_{Promedio}$
Distancia Interorbitaria/K	Visibilidad	$DIO/K_{Promedio}$

TABLA 2.3. RELACIÓN DE LOS ÍNDICES utilizados y significado morfofuncional.

ESTRATEGIA REPRODUCTIVA PARA PRODUCIR G1

Debido a la diferencia en el método de reproducción elegido para obtener la G1 en WT-UAB y WT-I, cada uno se explicará por separado.

Esquema de reproducción de WT-UAB puesta en masas

El resultado de la prueba de toma de riesgo en grupos que se realizó al fenotipo WT-UAB mostró pocos individuos con personalidad P haciendo de este modo difícil obtener un número representativo de parejas para generar familias con esta personalidad (ver **TABLA 2.4**). De este modo la totalidad de los individuos de cada categoría de toma de riesgo en grupos (P, I, R) se mezclaron formando dos subgrupos de reproductores. Cada subgrupo contenía el mismo porcentaje de peces de cada una de las categorías de toma de riesgo en grupos. Se aparearon utilizando el método de puesta en masas en donde varios machos y hembras maduras son mantenidos juntos en el tanque de puesta (Gjedrem, 2005). Los peces de cada subgrupo se colocaron juntos en el tanque de puesta. La meta de este método de reproducción es expandir la población mostrando este tipo de patrón de color para incrementar la cantidad de posibles reproductores dentro de cada personalidad en la siguiente generación, y de aquí en adelante realizar una reproducción en familias.

WT-UAB (N= 41)		
CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO	HEMBRA	MACHO
P	6	2
I	3	0
R	23	7

TABLA 2.4. DISTRIBUCIÓN DE SEXOS de cada categoría de toma de riesgo en grupos dentro del fenotipo WT-UAB.

Alimentación de los reproductores

Una semana antes de iniciar la reproducción, los reproductores se separaron por sexos y personalidad en tanques de 20 litros. El horario de alimentación se modificó durante este periodo adicionando una tercera comida al mediodía. En la mañana se les suministró alimento húmedo, al mediodía y en la tarde alimento seco siguiendo las recomendaciones de la casa proveedora ZF Bio-Labs® S.L (ver [www. Zfbiolabs.com](http://www.Zfbiolabs.com)).

Equipo

Se emplearon dos tanques de vidrio de 38 litros, con dimensiones de 50x25x30cm para cada subgrupo. Cada tanque se equipó con un calentador y un sistema de aireación. Ambos acuarios se cubrieron en sus 4 lados con papel blanco para reducir el estrés y proveer un aislamiento del medio externo. Se confeccionaron 2 cestas (una para cada subgrupo), de malla plástica blanca de 4x4mm, con las siguientes dimensiones: (22x25x37cm), modificando el modelo propuesto por Rocha *et al.*, (2002). Cada cesta se le adicionó una planta plástica para peceras para reducir estrés. En el fondo del tanque de puesta se colocaron 4 parideras flotantes (15x10x10cm).A cada paridera se le adicionó una capa de canicas simulando un sustrato para estimular la puesta y evitar que los peces se coman la puesta.

Puestas

Las puestas se realizaron en el mes de junio de 2010, por un periodo de dos semanas consecutivas. Se utilizó un tanque para la alimentación y el otro para la puesta. El objetivo de usar dos tanques es evitar en lo posible afectar la calidad de los huevos por excretas y residuos de alimento que promueven el crecimiento de hongos y bacterias (McGowan, 2001). Un día antes de iniciar el apareamiento se colocó un calentador y un sistema de aireación en los tanques de alimentación. La temperatura se fijó en 28°C para el tanque de alimentación y el tanque de puesta. El ciclo de luz-oscuridad se estableció en 14:10h. La cesta se colocó dentro del tanque de alimentación con vegetación artificial para peceras. Cada subgrupo de 20 individuos se transfirió dentro de la cesta y se dejó 24 horas para su habituación. El horario de alimentación durante el periodo de puestas se modificó a dos comidas y la última se suministró a las 1500 horas con la finalidad de que los individuos excretaran la mayor cantidad posible antes de ser transferidos al tanque de puesta. Después de 24 horas, aproximadamente a las 1700-1800, la cesta con los individuos se removió y transfirió dentro del tanque de puesta. El volumen de agua se mantuvo 10 cm sobre el fondo de la cesta para evitar el consumo de los huevos al momento de la puesta por los reproductores. En la mañana cada cesta con los individuos se transfirió de vuelta al tanque de alimentación, el proceso se repitió de lunes a viernes por dos semanas consecutivas (ver **FIGURA 2.5**).



FIGURA 2.5. FOTOGRAFÍA MOSTRANDO UN TANQUE DE PUESTA EMPLEADO EN WT-UAB. El grupo de peces listos para desovar. Bajo la cesta se aprecia las parideras con las canicas para recolectar los huevos.

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

En la mañana (0800-1000h), después de retirar los reproductores, las parideras del tanque de puesta se retiraron y examinaron para verificar la presencia de huevos. Los huevos se extrajeron con la ayuda de una pipeta Pasteur de 3 mililitros, se colocaron en una placa Petri de 95mm, cualquier resto de comida o excreta se retiró al igual que algún huevo que mostrara malformaciones o color opaco. Para la limpieza se utilizó agua previamente filtrada con una temperatura similar a la del tanque de puesta, vertida empleando una botella a presión. Los huevos limpios se colocaron en un tanque de 50x25x30cm, con un tercio de su volumen de agua y temperatura de 28°C. Las puestas semanales se colocaron en tanques separados. No realizamos ningún tipo de conteo del total de las puestas. Los tanques de puesta y alimentación se limpiaron cada día y se renovó la totalidad del volumen de agua.

Esquema de reproducción de WT-I adaptación de los métodos de apareamiento en parejas y el método anidado

Se emplearon 12 hembras y 6 machos, por cada personalidad. Las hembras seleccionadas mostraban signos evidentes de estar aptas para la puesta (hembras con vientres abultados indicando presencia de huevos). Para asegurar la continuidad de las familias un macho se apareó al mismo momento con 2 hembras de la misma personalidad (relación 1:2), empleando una modificación de los métodos en parejas y anidado (Gjedrem, 2005). En el pez cebrá la hembra dominante inhibe la puesta de la hembra subordinada a través de la liberación de feromonas por lo que existe la posibilidad de que una sola hembra realizara el desove (Gerlach, 2006). El objetivo en este fenotipo de color es obtener 6 familias P y 6 R.

Alimentación de los reproductores

El tipo de alimento, los horarios y la metodología son las mismas empleadas con el otro fenotipo de color.

Equipo

Se emplearon 12 tanques de vidrio de 6 litros con dimensiones de (25,5x14x17cm) para cada una de las personalidades. Se utilizaron dos tanques de 38 litros equipados con un calentador y un sistema de aireación, para acondicionar el agua necesaria para los tanques de puesta y alimentación. Cada tanque de puesta contenía una paridera flotante (15x10X10 cm), equipada con canicas simulando un sustrato para estimular la puesta.

Puestas

Las puestas se realizaron en el mes de junio de 2010, por un periodo de dos semanas consecutivas. Se utilizó un tanque para la alimentación y el otro para la puesta. Ambos tanques se etiquetaron con la letra de la personalidad (P o R), y el número de la familia correspondiente. Un día antes de iniciar la puesta se colocó un calentador y un sistema de aireación en dos tanques de vidrio de 38 litros, para preparar el agua necesaria para ser utilizada en los tanques de reproducción. La temperatura y el ciclo luz-oscuridad son similares a los descritos en WT-UAB. En la tarde a las 1500h cada tanque de puesta se llenó con 5 litros de agua, se colocó dentro una paridera previamente equipada con canicas. Entre las 1700-1800h, cada familia compuesta de 1 macho y 2 hembras se transfirió dentro del tanque de apareamiento, colocando una tapa para evitar que los individuos saltasen fuera. En la mañana cada grupo de reproductores de cada familia se transfirió al tanque de alimentación y se le suministró la primera comida, los peces permanecieron durante el día en este tanque. El proceso seguido durante las dos semanas de reproducción es similar al descrito en WT-UAB (ver **FIGURA 2.6**).

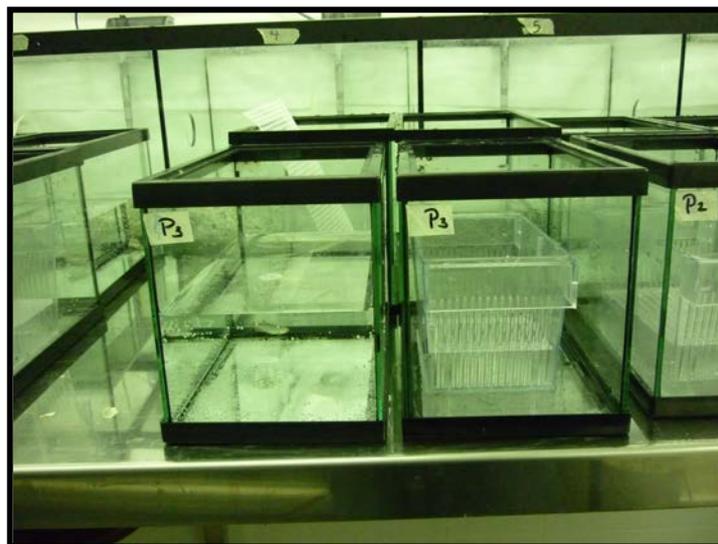


FIGURA 2.6. FOTOGRAFÍA MOSTRANDO LOS PECES DE UNA FAMILIA EN EL TANQUE DE ALIMENTACIÓN, al lado se aprecia el tanque de desove con una paridera dentro.

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

El procedimiento empleado para la recolección limpieza y manejo de los huevos es el mismo descrito para WT-UAB. Sin embargo el número total de huevos puestos por cada familia se registró. Después del registro de la puesta total por familia se seleccionaron los huevos fertilizados (transparentes al observador), se dejaron en placa de Petri de 95 mm. En la mañana siguiente se eliminaron los huevos infértiles y se registró este dato. Los huevos fértiles de cada familia se colocaron por separado en un tanque de vidrio de 20 litros, previamente etiquetado con los datos de la familia. La temperatura se mantuvo en 28°C. Los tanques de puesta y alimentación se limpiaron cada día y se renovó la totalidad del volumen de agua.

Manejo durante las diferentes fases del ciclo de vida

El manejo empleado desde la fecundación hasta alcanzar la edad adulta (90 días), es el mismo en ambos fenotipos de color, de este modo las diferentes practicas zootécnicas aplicadas en las fases embrionaria, larvaria y juvenil son explicadas en forma conjunta.

Fase Embrionaria (Desde la fertilización hasta 72 horas post fertilización (hpf))

Los huevos del fenotipo WT-UAB se incubaron en dos tanques de 40 litros. En el caso del fenotipo WT-I las puestas de cada familia se incubaron por separado. Se realizaron controles diarios de temperatura y de las concentraciones de oxígeno para evitar diferencias entre las 12 familias y entre ambos fenotipos de color ($28\pm 1^\circ\text{C}$.; $5,45\pm 0,15\text{mg/L}$ respectivamente). El ciclo de luz-oscuridad durante este periodo se mantuvo en 14:10h. Los embriones eclosionaron entre los 2-3dpf. El corion se retiró con la ayuda de una pipeta de 20ml. Durante este periodo no se realizó ningún tipo de conteo sobre la supervivencia embrionaria.

Fase Larvaria (72hpf-30 días pos-fertilización (dpf))

Esta fase tiene una duración de 27 días. Es la fase más complicada de la cría de pez cebrá, y es donde se presenta una alta mortalidad. Para facilitar el manejo la fase larvaria se dividió en dos periodos. El primer periodo comprendido desde el día tres hasta el día 15dpf. En este periodo no se realizó ningún cambio de agua a los tanques de cría. A partir de 5-6dpf, se inició la alimentación en el momento que las larvas mostraron un movimiento activo y fueron capaces de capturar el alimento. Se suministraron seis comidas durante el día que representaron aproximadamente el 20% del peso vivo de las larvas. Se utilizó un pienso seco indicado para esta fase de desarrollo (ver [www. Zfbio-labs.com](http://www.Zfbio-labs.com)). El segundo periodo comprendido de 16-30dpf. Durante este periodo de la fase larvaria cuidadosamente cada día se renovó un pequeño volumen de agua que semanalmente representó cerca de un tercio del volumen total de los tanques de cría. La alimentación se suministró por lo menos cuatro veces al día (aproximadamente un 10-15% de su peso vivo). Igual que en la fase embrionaria se realizaron controles diarios de temperatura y la concentración de oxígeno para evitar diferencias entre los diferentes tanque de cría ($28\pm 1^\circ\text{C}$.; $5,48\pm 0,12\text{mg/L}$ respectivamente). El fotoperiodo es similar al de la fase embrionaria (14:10h). No se utilizaron sistemas auxiliares de oxigenación. El exceso de comida, excretas y larvas muertas se retiraron cada día con la ayuda de una pipeta Pasteur de 20ml.

Fase Juvenil (30-90dpf)

Durante esta fase la temperatura, la concentración de oxígeno y el fotoperiodo se mantuvieron similares a las etapas anteriores ($28\pm 1^\circ\text{C}$; $5,48\pm 0,08\text{mg/L}$; 14:10h, respectivamente). Semanalmente

un tercio del volumen de agua se renovó y se suministró un sistema de aireación a baja capacidad. A cada uno de los tanques de cría se le adicionó en el fondo aproximadamente 1cm de grava para pecera. A partir del inicio de este periodo se sustituyó gradualmente la fórmula para alimentar larvas a una fórmula para juveniles. La cantidad de alimento por día se ajustó hasta aproximadamente un 5% de su peso vivo al final del periodo. Además se sustituyó la mitad del tipo de pienso de seco a húmedo, suministrando en la mañana pienso seco y en la tarde pienso húmedo, siempre siguiendo las recomendaciones establecidas por el proveedor (ver [www. Zfbiolabs.com](http://www.Zfbiolabs.com)). Durante esta fase se realizó la técnica de tamaño de gradiente donde los individuos de cada tanque se separaron de acuerdo a su tamaño (cabezas y colas). Esta técnica permite reducir la alometría y facilita a los animales con crecimiento inferior alcanzar el crecimiento promedio del grupo (Doyle and Talbot, 1986). Durante esta fase se mantuvo la misma densidad en los tanques de cría. Al final de la fase juvenil se realizó un descarte de aquellos individuos que mostraron algún tipo de deformidad así como los que mostraban un tamaño muy reducido.

Procedimiento de selección WT-UAB y WT-I

Después de eliminar aquellos individuos que mostraron algún tipo de lesión mecánica o signos de enfermedad se procedió a establecer el esquema de selección para generar los reproductores en ambos fenotipos de color.

Selección fenotípica

Solo la categoría WT-UAB se sometió a una selección fenotípica. La selección fenotípica se inició en el mes de noviembre del 2010. El equipo, el procedimiento y los criterios establecidos son similares a los empleados para seleccionar los reproductores en G0.

Registro de variables morfométricas

Una muestra al azar de 50 individuos del fenotipo WT-UAB y la totalidad de las familias del fenotipo WT-I se sexaron, pesaron y se registraron las mismas variables morfométricas previamente descritas. El equipo y el procedimiento empleado son similares a los descritos para el registro de las variables morfométricas en G0.

Selección por personalidades (prueba de toma de riesgo en grupos)

Finalizado el registro de las variables morfométricas (aproximadamente 2 semanas), los peces de cada fenotipo de color se separaron por sus estilos de afrontamiento frente a la prueba de toma de riesgo en grupos. El equipo y el procedimiento empleado son similares a los descritos para G0.

Prueba de campo abierto

Todos los peces R en la prueba de toma de riesgo en grupos se sometieron a una segunda prueba conductual denominada de campo abierto (Budaev, 1997; Bell, 2004; Harcourt *et al.*, 2009). El objetivo de esta segunda prueba es el de obtener los individuos con un comportamiento R más extremo para utilizarlos en nuestro programa de reproducción. La prueba es contextualmente similar a la de toma de riesgo en grupos, solo con la diferencia que es una prueba individual, facilitando observar comportamientos característicos de la conducta R que no se pueden apreciar en pruebas grupales. El tanque de prueba consistió en un tanque de vidrio de 20 litros (40x20x25cm), el lado opuesto y los lados laterales al observador se cubrieron con papel blanco, así como también el lado de observación se cubrió en 1/4 de su longitud para reducir el estrés y aislar del medio externo. Además el

lado del observador 3/4 partes fueron marcados externamente con cinta adhesiva blanca formando 4 cuadrantes de áreas similares, en el extremo no marcado correspondiente a 1/3 de la longitud del tanque de prueba se colocó un separador negro de PVC formando un área de refugio. El nuevo ambiente consistió del restante espacio abierto del tanque. Un día antes de la prueba los peces se transfirieron desde su tanque stock al tanque de habituación de 60 litros (50x40x30cm), provisto de grava en el fondo y plantas de plástico para acuarios. La temperatura y la concentración de oxígeno se mantuvieron similares a los del tanque stock. Los ensayos se realizaron entre las 9000-1500h. Cada individuo se transfirió del tanque de habituación y se colocó en el área de refugio del tanque de prueba, se dejó 10 minutos para su habituación, el refugio se cubrió en su parte superior con papel blanco. Finalizado el periodo de habituación el separador se retiró suavemente en su totalidad dejando cubierta solo la parte superior del refugio y se observó el comportamiento del individuo por 5 minutos. Nosotros utilizamos el comportamiento de congelamiento, para seleccionar los peces R para utilizar en el programa de reproducción. Congelamiento se definió como la ausencia total de movimientos excepto para las branquias y los ojos (Egan, *et al.*, 2009) Se seleccionaron aquellos individuos que mostraron un comportamiento de congelamiento *freezing* de forma consecutiva igual o mayor de 30 segundos (seg.). Los individuos que no mostraron este comportamiento o mostraron comportamiento de congelamiento no consecutivos menores de 30seg se descartaron en el programa de reproducción. El comportamiento de congelamiento en peces es interpretado por su semejanza con el comportamiento de congelamiento mostrado por muchos taxones en diferentes hábitats en presencia de un depredador, refleja un estado de estrés agudo característico de la conducta R (Templeton and Shriner, 2004; Burns, 2008). Finalizada la prueba la totalidad del agua se sustituyó para evitar algún tipo de señales químicas.

Registro de variables morfométricas

El procedimiento y las variables registradas son las mismas previamente descritas.

Índices morfofuncionales

Los índices morfofuncionales registrados son los mismos que se elaboraron para evaluar la G0.

ESTRATEGIA REPRODUCTIVA PARA PRODUCIR G2

Las estrategias empleadas para producir G2 son las mismas en ambos fenotipos de color, de esta forma los diferentes procedimientos serán explicado en forma conjunta.

Esquema de reproducción

En ambos fenotipos de color se empleo el apareamiento en parejas, para generar las familias. En el fenotipo WT-UAB se obtuvieron 6 familias P y 5 R. En el fenotipo WT-I se continuó con el esquema de apareamiento en familias, solo 3 familias de cada personalidad mostraron consistencia frente a la prueba de toma de riesgo en grupos en este fenotipo.

Apareamiento en parejas (WT-UAB, WT-I)

Los individuos P y R del fenotipo WT-UAB, se separaron de acuerdo al sexo para generar las familias necesarias. Cada hembra se apareó con un solo macho para generar la siguiente generación. En el fenotipo WT-I cada hembra se apareó con un solo macho de la misma familia (hermanos completos). Una semana antes de iniciar el apareamiento cada hembra y cada macho se colocaron por

separado en tanques de metacrilato de 1,3 litros (Panlab®), conectados a un sistema de recirculación.

Alimentación de los reproductores (WT-UAB, WT-I)

Los piensos empleados y el horario de alimentación son similares a los descritos en G0 y G1 previo a la reproducción. Sin embargo los reproductores recibieron dos veces por semana *Artemia* (*Artemia sp.*) con el objetivo de mejorar la calidad de las puestas.

Equipo

Para cada familia se emplearon 2 tanques de vidrio de 6 litros. Cada tanque de puesta estaba equipado con una paridera flotante (15x10X10), con canicas en el fondo simulando un sustrato para estimular la puesta.

Puestas

Las puestas se realizaron a partir del mes de abril de 2011. Se utilizó un tanque para la alimentación y el otro para la puesta. Ambos tanques se etiquetaron debidamente con las claves de la personalidad y familia correspondiente. El equipo y el procedimiento empleado son similares a los descritos en G0 y G1.

Recolección, limpieza y manejo de las puestas

Después de transferir los reproductores de cada familia del tanque de puesta al tanque de alimentación. Se retiraron y examinaron las parideras para ver la presencia de huevos. Los huevos se extrajeron vertiendo medio E3 (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002), con la ayuda de una botella a presión en una malla fina para acuario. Luego se colocaron dentro de una placa de Petri de 140mm. Con la ayuda de una pipeta Pasteur de 3ml, se retiró cualquier residuo de comida o heces. Además los huevos con malformaciones o con color opaco se eliminaron. Los huevos limpios se transfirieron a una placa de Petri de 95mm, conteniendo medio E3, etiquetada igual al tanque de puesta, se dejaron por 24 horas para verificar la viabilidad. En la mañana siguiente se eliminaron los huevos infértiles y se registró este dato. Los huevos fértiles de cada familia se colocaron en grupo de 30 en una placa de Petri de 55mm, conteniendo medio E3, etiquetada con los datos de la familia. La temperatura se mantuvo a 28°C y el ciclo de luz-oscuridad en 14:10h.

Manejo durante las diferentes fases del ciclo de vida (WT-UAB, WT-I)

El manejo empleado desde la fecundación hasta alcanzar la edad adulta es el mismo previamente descrito.

Fase embrionaria

Los huevos de cada familia se incubaron separadamente en placas de Petri de 55mm. Las placas de Petri contenían 11ml de medio E3. Se estableció una densidad de 30 embriones por cada placa de Petri (2.72 embriones/ml). Se realizó un control diario de la temperatura de la habitación (28±1°C). El ciclo de luz-oscuridad se mantuvo en 14:10h. Finalizadas las 72hpf., se registró la supervivencia embrionaria. Las larvas vivas se transfirieron a placas de Petri de 55ml, conteniendo medio E3.

Fase Larvaria

En esta fase cada familia de hermanos completos se mantuvo separada. Sin embargo las condiciones de temperatura y concentración de oxígeno se mantuvieron similares para todas las familia (28.5°C ; $5,46\pm 0,12\text{mg/L}$ respectivamente). La densidad también se ajustó igualando en lo posible el número de individuos en cada familia. Para facilitar el manejo y el registro de datos nosotros separamos la fase larvaria total comprendida desde tres hasta 29dpf en tres sub etapas de esta manera. Primera sub etapa (3-5dpf): Durante esta fase las larvas permanecieron en las placas de Petri, mientras inflaban su vejiga natatoria y reabsorbían el saco vitelino. Las placas de Petri se examinaron cada día, y cualquier larva muerta se eliminó y se registró este dato. No se suministró ningún tipo de alimentación. Segunda sub-etapa (6-15dpf). Las larvas se transfirieron a un tanque de cría o *nursery* de 6 litros debidamente rotulado con los datos similares a los registrados en la placa de Petri correspondiente. Se le adicionó agua proveniente de un sistema de filtrado. La densidad se estableció en 60 larvas por litro de agua. Durante esta fase del desarrollo larval se inició la alimentación con Liquifry¹, un producto comercial en forma de micropartículas en suspensión, para facilitar la captura del alimento por parte de las larvas. Administrando dos a tres gotas tres veces al día (recomendaciones suministradas por la casa fabricante INTERPET), aproximadamente 12-15dpf iniciamos una fase de transición, sustituyendo paulatinamente el alimento en suspensión por una formula seca especial para la fase larvaria (ver [www. Zfbiolabs.com](http://www.Zfbiolabs.com)). A partir de la tercera sub-etapa (16-29dpf) se adicionaron pequeños volúmenes de agua al tanque y al menos dos veces a la semana se eliminó cualquier residuo existente (excretas, excedente de comida). Las larvas se alimentaron 5 veces al día con un pienso seco especial para fase larvaria. Paralelamente se inició el suministro de *Artemia*, dos veces por semana.

Fase Juvenil

Durante esta fase de crecimiento, la temperatura, la concentración de oxígeno y el fotoperiodo fueron similares en todas las familias ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$; $5,46\pm 0,12\text{mg/L}$; 14:10h respectivamente). Las familias de hermanos completos se transfirieron a un sistema de recirculación. La densidad se estableció en 1 pez/litro de agua. La alimentación se sustituyó gradualmente de alimento de larvas a una formula para juveniles. El número de comidas se redujo gradualmente desde cuatro hasta dos. El resto de las prácticas zootécnicas son las mismas descritas en G1.

Procedimiento de selección para obtener G2

Los criterios para la selección fenotípica son similares a los utilizados en G0 y G1. Las variables morfológicas realizadas a cada individuo son las mismas realizadas en las generaciones anteriores. La metodología empleada para realizar la selección por personalidad es similar a la descrita en G0 y G1. Las condiciones físico químicas del agua, el control de metabolitos así como el fotoperiodo son similares a los valores de las generaciones anteriores. El equipo empleado, así como los horarios de alimentación y desempeño de las pruebas son los mismos empleados en G0 y G1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias a nivel de fenotipo de color se evaluaron utilizando el análisis Pearson Chi- cuadrado (χ^2). Las diferencias en el porcentaje de categorías de toma de riesgo en grupos entre personalidades, generaciones y fenotipos se evaluaron utilizando el análisis Pearson Chi- cuadrado (χ^2). Las latencias para dejar el refugio así como las variables morfológicas evaluadas se examinaron por la

prueba de Levene de homogeneidad de varianzas para verificar si mostraban una distribución normal. Aquellas variables no normales se normalizaron empleando el logaritmo 10 ($var.+1$). Las comparaciones de las variables morfométricas entre líneas con distribución normal se realizaron a través de la prueba de t de Student. Aquellas variables que permanecieron con una distribución no normal después de la transformación logarítmica se evaluaron empleando las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney. Diferencias en las latencias para dejar el refugio entre generaciones se evaluaron empleando la prueba de Kruskal Wallis. Resultados significantes fueron evaluados con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn`s.

RESULTADOS

SELECCIÓN FENOTÍPICA

Los resultados de la selección fenotípica en G0 (n=493) G1 (n=413) y G2 (n=143) muestran que el porcentaje de individuos con fenotipo homogéneo se incrementó en el fenotipo de color WT-UAB de 8 hasta 63 y 84% respectivamente. La **FIGURA 2.7**, muestra que existen diferencias significantes en el porcentaje de peces con fenotipo WT-UAB entre G0, G1 y G2 ($\chi^2= 123,4$, DF=2 $p<0,0001$). Existen diferencias en el porcentaje de individuos con fenotipo homogéneo entre G1 y G0 ($\chi^2= 66,06$, DF=1 $p<0,0001$). Existe un mayor porcentaje de individuos con fenotipo homogéneo en G2 comparado con G1 y G0 ($\chi^2= 11,32$, DF=1 $p=0,0008$; $\chi^2= 116,3$, DF=1 $p<0,0001$, respectivamente).

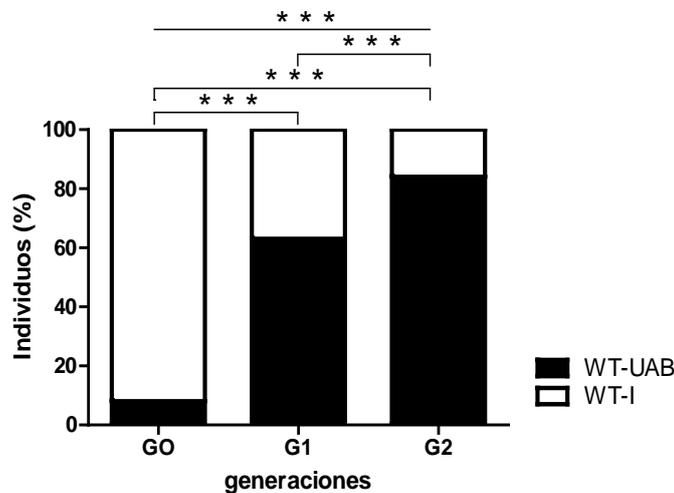


FIGURA 2.7. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE PECES DE AMBOS FENOTIPOS DE COLOR dentro del programa de selección fenotípica establecido para generar individuos WT-UAB.

*** $p < 0,001$.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE CATEGORÍAS DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS)

La **FIGURA 2.8** muestra que de forma general no existen diferencias en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre P (n=763) y R (n=781) ($\chi^2= 0,68$, DF=2 $p=0,71$). La comparación entre generaciones muestra que existen diferencias significantes en la distribución de

categorías de toma de riesgo en grupos entre G0 (n=247), G1(n= 608) y G2 (n=203) ($\chi^2= 33,39$, DF=4 p<0,0001). Existe un mayor porcentaje de peces P en la G0 comparado con la G1 y G2 ($\chi^2= 26,18$, DF=2 p<0,0001; $\chi^2= 18,21$, DF=2 p=0,0001, respectivamente). No existe diferencia en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre G1 y G2. ($\chi^2= 1,114$, DF=2 p=0,57, ver FIGURA 2.9). A nivel de fenotipo de color no existe diferencia en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre WT-UAB (n= 393) y WT-I (n=665) ($\chi^2= 1,588$, DF=2 p=0,45, ver FIGURA 2.10).

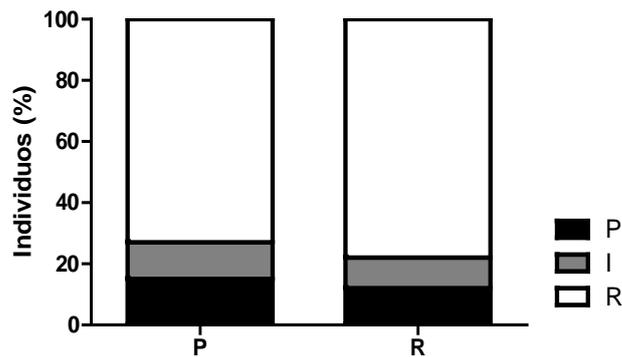


FIGURA 2.8. PORCENTAJE DE CATEGORÍAS DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS EN CADA UNA DE LAS LÍNEAS CONDUCTUALES. Datos de ambos fenotipos de color y de tres generaciones.

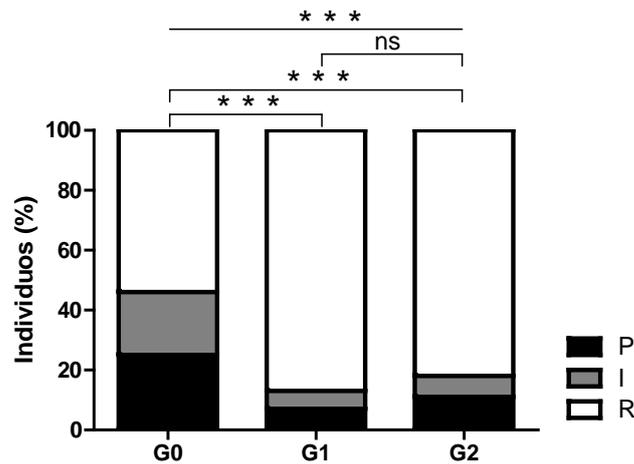


FIGURA 2.9. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR GENERACIÓN. Datos de ambos fenotipos de color y de las dos líneas conductuales. ns= sin diferencias significativas; ***p< 0,001.

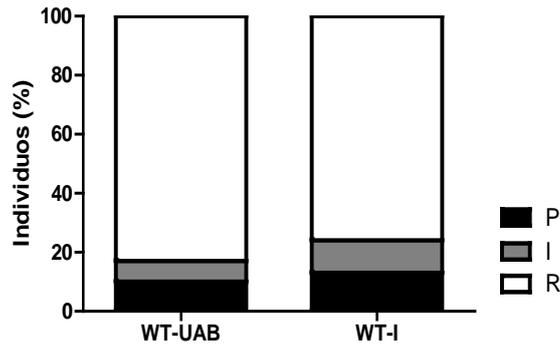


FIGURA 2.10. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR FENOTIPO DE COLOR WT-UAB, WT-I. Datos de tres generaciones.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (LÍNEA ENTRE GENERACIONES)

Línea P

La FIGURA 2.11 muestra que existen diferencias significativas en la distribución porcentual de las categorías de toma de riesgo en grupos de la línea P entre G0, G1 y G2 ($\chi^2 = 26,46$, DF=4 $p < 0,0001$). El porcentaje de individuos mostrando una personalidad P disminuyó 18 y 6% en G1 y G2 respectivamente comparado con G0 ($\chi^2 = 24,44$, DF=2 $p = 0,0001$; $\chi^2 = 8,190$, DF=2 $p = 0,016$). El porcentaje de individuos P se incremento en G2 12% comparado con G1 ($\chi^2 = 7,029$, DF=2 $p = 0,029$).

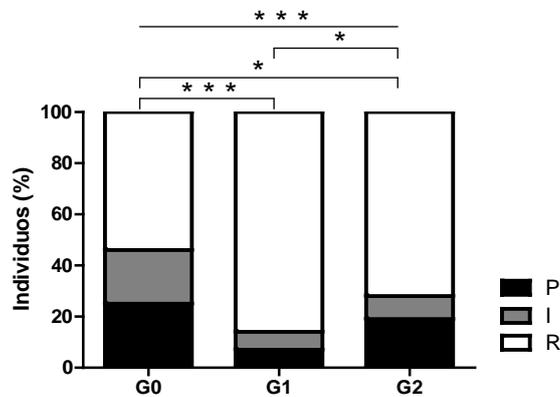


FIGURA 2.11. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR GENERACIÓN EN LA PERSONALIDAD P. Datos de ambos fenotipos de color. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Línea R

Existe diferencia significativa en la distribución porcentual de las categorías de toma de riesgo en grupos de la línea R entre G0, G1 y G2 ($\chi^2 = 47,23$, DF=4 $p < 0,0001$). El porcentaje de individuos mostrando una personalidad R aumentó en G1 33 y 37% en G2 comparado con G0 ($\chi^2 = 26,18$, DF=2 $p < 0,0001$; $\chi^2 = 39,42$, DF=2 $p < 0,0001$). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de individuos R entre G1 y G2 ($\chi^2 = 0,99$, DF=2 $p = 0,606$) (ver FIGURA 2.12).

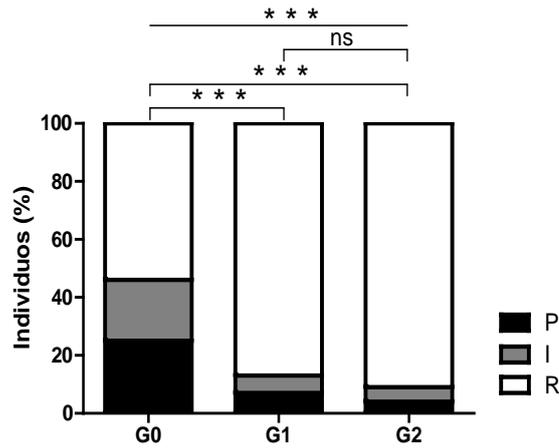


FIGURA 2.12. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR GENERACIÓN EN LA PERSONALIDAD R. Datos de ambos fenotipos de color. ns= sin diferencias significativas;***p<0,001.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (COMPARACIÓN DE LAS LÍNEAS POR GENERACIÓN)

Los resultados muestran que existen deferencias significativas en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre P y R en G2 ($\chi^2= 13,14$, DF=2 p=0,001). No existe diferencia entre P y R en G0 y G1 ($\chi^2= 0,00$, DF=2 p=1,00; $\chi^2= 0,082$, DF=2 p<0,95, respectivamente, ver FIGURA 2.13).

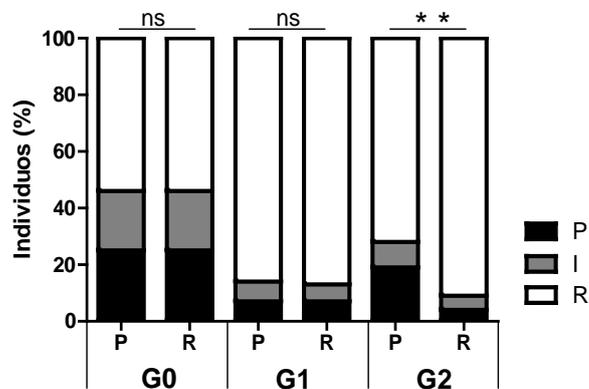


FIGURA 2.13. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR LÍNEA CONDUCTUAL EN CADA GENERACIÓN. Datos de ambos fenotipos de color. ns= sin diferencias significativas; **p<0,01.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (COMPARACIÓN DE FENOTIPOS DE COLOR POR GENERACIÓN)

La FIGURA 2.14 muestra que existe diferencia en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre los fenotipos de color por generación en G0 ($\chi^2= 13,22$, DF=2 p=0,001). En

G1 y G2 no se encontraron diferencias en la distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos entre ambos fenotipos de color ($\chi^2 = 0,744$, DF=2 p=0,689; $\chi^2 = 0,565$, DF=2 p=0,753, respectivamente).

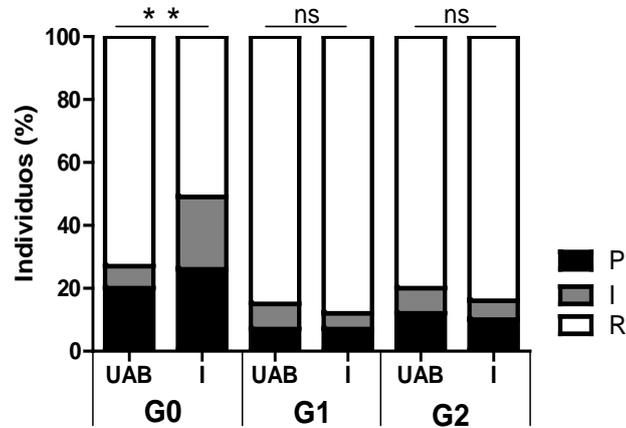


FIGURA 2.14. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO EN GRUPOS POR FENOTIPO DE COLOR EN CADA GENERACIÓN. UB= WT-UAB, I= WT-I. ns= sin diferencias significativas, **p<0,01.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (LATENCIAS PARA DEJAR EL REFUGIO, LÍNEA ENTRE GENERACIONES)

Línea P

La FIGURA 2.15 muestra que la línea P difiere significativamente en las latencias para dejar el refugio entre generaciones (Kruskall Wallis= 78,3, DF= 3 p<0,0001). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn`s, muestra que existen diferencias significativas en las latencias para dejar el refugio entre G0 y las generaciones G1, G2 (Comparación de Dunn`s p< 0,001; p< 0,05 respectivamente). Además existen diferencias significativas entre las generaciones G1 y G2 (Comparación de Dunn`s p< 0,01).

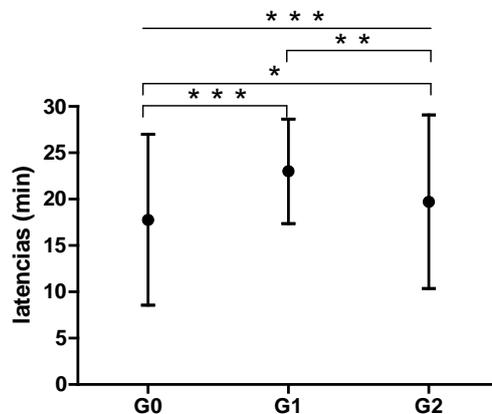


FIGURA 2.15. MEDIA (\pm DE), DE LA LATENCIA EN MINUTOS PARA DEJAR EL REFUGIO EN PECES DE LA LÍNEA CONDUCTUAL P POR GENERACIÓN. Datos de ambos fenotipos de color. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Línea R

La FIGURA 2.16 muestra que la línea R difiere significativamente en las latencias para dejar el refugio entre generaciones (Kruskall Wallis= 113,2, DF= 3 $p < 0,0001$). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn`s, muestra que existen diferencias significativas en las latencias para dejar el refugio entre G0 y las generaciones G1, G2 (Comparación de Dunn`s $p < 0,001$; $p < 0,001$ respectivamente). Sin embargo no existen diferencias significativas entre las generaciones G1 y G2.

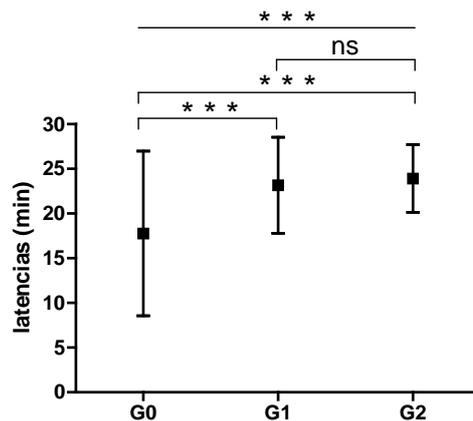


FIGURA 2.16. MEDIA (\pm DE), DE LA LATENCIA EN MINUTOS PARA DEJAR EL REFUGIO EN PECES DE LA LÍNEA CONDUCTUAL R POR GENERACIÓN. Datos de ambos fenotipos de color. ns= sin diferencias significativas, *** $p < 0,001$.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD (COMPARACIÓN DE LATENCIAS ENTRE LAS LÍNEAS Y POR GENERACIONES)

Mann Whitney U Test muestra que no existe diferencia entre P y R en la G0 y G1 ($U=30500$ $p=0,99$; $U=88190$ $p=0,488$, respectivamente). En G2 los peces P tuvieron una latencia (min) menor para dejar el refugio que los peces R (ver FIGURA 2.17).

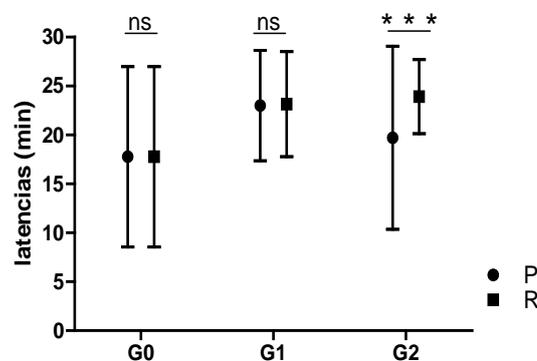


FIGURA 2.17. MEDIA (\pm DE), DE LA LATENCIA EN MINUTOS PARA DEJAR EL REFUGIO POR LÍNEA CONDUCTUAL EN CADA GENERACIÓN. Datos de ambos fenotipos de color. ns= sin diferencias significativas; *** $p < 0,001$.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

La FIGURA 2.18 muestra que de forma general los peces de la línea P presentan un mayor DOO que los peces de la línea R ($t=3,71$ $p=0,0002$ $DF=140$). La TABLA 2.5 muestra que no existen diferencias entre P y R en peso, L T, LE, LC, LPO, LBAA, DIO y LAP.

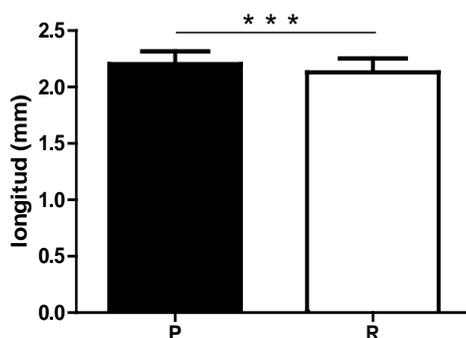


FIGURA 2.18. MEDIA (\pm DE) DE DOO EN P Y R. Datos de ambos fenotipos de color y de tres generaciones. *** $p<0,001$.

VARIABLES	P	R	t	p
Peso	0,758 \pm 0,271	0,793 \pm 0,317	-0,714	0,476
LT	40,72 \pm 4,09	40,64 \pm 5,01	0,105	0,915
LE	33,44 \pm 3,40	33,24 \pm 4,20	0,307	0,758
LC	7,56 \pm 0,85	7,42 \pm 0,82	1,013	0,312
LPO	1,61 \pm 0,21	1,57 \pm 0,19	1,102	0,272
LBAA	7,95 \pm 0,99	7,86 \pm 1,04	0,544	0,586
DIO	4,50 \pm 0,49	4,36 \pm 0,57	1,488	0,138
LAP	5,65 \pm 0,86	5,64 \pm 0,93	0,105	0,916

TABLA 2.5. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T PARA LA COMPARACIÓN DE PESO (G), LT (mm), LE (mm), LC (mm), LPO (mm), LBAA (mm), DIO (mm), LPA (mm) entre P y R.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS POR FENOTIPO DE COLOR

La FIGURA 2.19 muestran que los peces P tienen un mayor DOO que los peces R, en el fenotipos de color WT-UAB ($t=2,77$ $p=0,025$ $DF=70$).

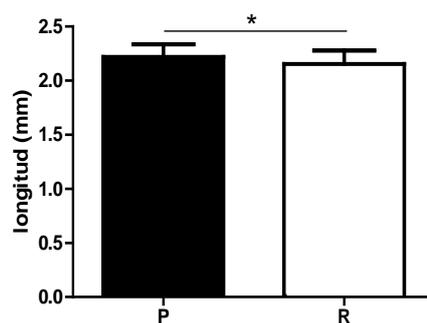


FIGURA 2.19. MEDIA (\pm DE) DE DOO EN P Y R DEL FENOTIPO DE COLOR WT-UAB. Datos de tres generaciones. * $p < 0,05$.

El resultado de la prueba t (ver TABLA 2.6) muestra que no existen diferencias significativas entre P y R en el resto de las variables morfométricas, en el fenotipo de color WT-UAB.

VARIABLES	CONDUCTA	WT-UAB (N=72)	
		MEDIA(\pm DE)	<i>p</i>
Peso	P	0,224 \pm 0,065	t=-1,23
	R	0,246 \pm 0,083	p=0,22
LT	P	39,54 \pm 4,34	t=-0,94
	R	40,56 \pm 4,80	p=0,34
LE	P	32,43 \pm 3,59	t=-0,88
	R	33,24 \pm 4,12	p=0,37
LC	P	7,27 \pm 0,88	t=-0,66
	R	7,40 \pm 0,77	p=0,51
LPO	P	1,63 \pm 0,21	t=0,00
	R	1,63 \pm 0,23	p=0,99
LBAA	P	7,91 \pm 0,96	t=-0,53
	R	8,04 \pm 1,01	p=0,59
DIO	P	4,57 \pm 0,50	t=1,26
	R	4,40 \pm 0,58	p=0,20
LAP	P	5,32 \pm 0,83	t=-1,03
	R	5,55 \pm 1,07	p=0,30

TABLA 2.6. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T PARA LA COMPARACIÓN DE LOG DE PESO (G), LT (mm), LE (mm), LC (mm), LPO (mm), LBAA (mm), DIO (mm), LPA (mm) entre P y R, en el fenotipo WT-UAB.

La **FIGURA 2.20** muestra que los peces P tienen un mayor DOO que los peces R, en el fenotipo de color WT-I ($t=-3,05$ $p=0,003$ $DF=68$).

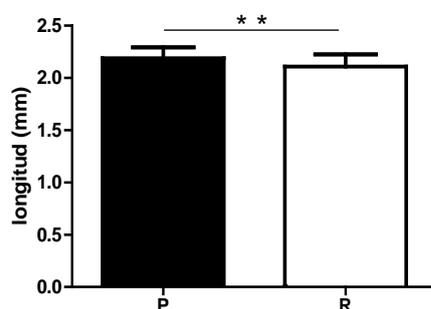


FIGURA 2.20. MEDIA (\pm DE) DE DOO EN P Y R DEL FENOTIPO DE COLOR WT-I. Datos de tres generaciones. $**p<0,01$.

Los resultados de Mann-Whitney muestran que no existen diferencias significativas entre P y R en LT y LE ($U=559,00$ $p=0,533$; $U=531,00$ $p=0,341$, respectivamente). La **TABLA 2.7** muestra los resultados de la prueba t donde los peces P tienen una mayor LC que los peces R, los resultados de la prueba t muestran que no existen diferencias significativas en peso, LPO, LBAA, DIO, LAP entre P y R.

VARIABLES	CONDUCTA	WT-I (N=70)	
		MEDIA \pm DE	<i>p</i>
Peso	P	0,822 \pm 0,270	$t=-0,46$
	R	0,792 \pm 0,285	$p=0,64$
LC	P	7,87 \pm 0,70	$t=-2,22$
	R	7,45 \pm 0,87	$p=0,02^*$
LPO	P	1,59 \pm 0,22	$t=-1,80$
	R	1,51 \pm 0,13	$p=0,07$
LBAA	P	7,99 \pm 1,03	$t=-1,26$
	R	7,67 \pm 1,06	$p=0,20$
DIO	P	4,42 \pm 0,47	$t=-0,82$
	R	4,32 \pm 0,57	$p=0,41$
LAP	P	5,99 \pm 0,75	$t=-1,49$
	R	5,72 \pm 0,76	$p=0,13$

TABLA 2.7. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T para la comparación de peso (g), LC (mm), LPO (mm), LBAA (mm), DIO (mm), LPA (mm) entre P y R, en el fenotipo WT-I. (Asterisco indica diferencias significativas entre P y R. $*p<0,05$).

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS (DATOS NORMALIZADOS POR EL PROMEDIO DEL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON)

La FIGURA 2.21 muestra los resultados de la prueba t donde los peces P presentan un mayor índice DOO/K que los peces R ($t=3,71$ $p=0,0002$).

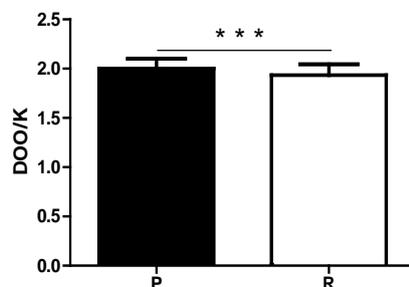


FIGURA 2.21. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R. Datos de ambos fenotipos de color y de tres generaciones. *** $p<0,001$.

Los resultados de la prueba t (ver TABLA 2.8) muestran que no existen diferencias significativas entre P y R en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K.

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,08 \pm 0,21	1,12 \pm 0,21	-0,903	0,367
LE/K	30,35 \pm 3,09	30,17 \pm 3,81	0,307	0,758
LC/K	6,87 \pm 0,77	6,74 \pm 0,74	1,01	0,312
LPO/K	1,46 \pm 0,19	1,42 \pm 0,18	1,10	0,272
LBAA/K	7,22 \pm 0,90	7,13 \pm 0,95	0,54	0,586
DIO/K	4,08 \pm 0,44	3,96 \pm 0,52	1,48	0,138
LAP/K	5,13 \pm 0,78	5,12 \pm 0,84	0,10	0,916

TABLA 2.8. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T para la comparación K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K entre P y R.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS POR FENOTIPOS DE COLOR (DATOS NORMALIZADOS POR EL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON)

La FIGURA 2.22 muestra los resultados de la prueba t donde los peces P presentan un mayor índice DOO/K que los peces R en el fenotipo de color WT-UAB ($t=2,77$ $p=0,02$).

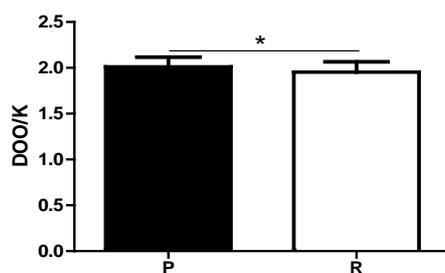


FIGURA 2.22. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R, del fenotipo de color WT-UAB. Datos de tres generaciones. * $p < 0,05$.

La **TABLA 2.9** con los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K, en el fenotipo de color WT-UAB.

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,08 \pm 0,23	1,11 \pm 0,20	-0,626	0,532
LE/K	29,41 \pm 3,26	30,15 \pm 3,74	-0,888	0,377
LC/K	6,59 \pm 0,80	6,71 \pm 0,70	-0,660	0,511
LPO/K	1,47 \pm 0,19	1,47 \pm 0,21	0,001	0,998
LBAA/K	7,18 \pm 0,87	7,29 \pm 0,91	-0,535	0,594
DIO/K	4,14 \pm 0,45	3,99 \pm 0,52	1,265	0,209
LAP/K	4,83 \pm 0,75	5,04 \pm 0,97	-0,030	0,306

TABLA 2.9. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T para la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R del fenotipo de color WT-UAB.

La **FIGURA 2.23** muestra los resultados de la prueba t donde los peces P presentan un mayor índice DOO/K que los peces R en el fenotipo de color WT-I ($t = -3,05$ $p = 0,003$).

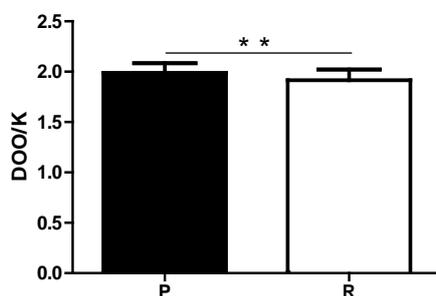


FIGURA 2.23. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R, DEL FENOTIPO DE COLOR WT-I. Datos de tres generaciones. * $p < 0,05$.

Los resultados de Mann-Whitney muestran que no existen diferencias significativas entre P y R en LE/K, en el fenotipo de color WT-I ($U = 531,00$ $p = 0,341$). La Tabla 2.10 con los resultados de la

prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K, en el fenotipo de color WT-I.

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,08±0,19	1,11±0,19	0,643	0,521
LC/K	7,15±0,63	6,77±0,79	-2,22	0,029*
LPO/K	1,44±0,20	1,37±0,11	-1,80	0,074
LBAA/K	7,26±0,93	6,97±0,96	-1,26	0,209
DIO/K	4,02±0,43	3,92±0,52	-0,82	0,410
LAP/K	5,45±0,69	5,20±0,69	-1,49	0,139

TABLA 2.10. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R del fenotipo de color WT-I. (Asterisco indica diferencias significativas entre P y R. * $p < 0,05$).

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS POR SEXO (DATOS NORMALIZADOS POR EL PROMEDIO DEL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON)

La TABLA 2.11 con los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R hembras en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LAP/K.

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,20±0,20	1,19±0,18	0,231	0,817
LE/K	28,69±2,78	28,78±3,26	-0,139	0,889
LC/K	6,39±0,71	6,36±0,60	0,220	0,826
LPO/K	1,34±0,17	1,31±0,15	0,857	0,393
LBAA/K	6,32±0,68	6,43±0,82	-0,681	0,497
DOO/K	1,82±0,08	1,79±0,10	1,252	0,213
DIO/K	3,78±0,41	3,70±0,48	0,805	0,422
LAP/K	5,17±0,57	5,11±0,58	0,475	0,635

TABLA 2.11. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R hembras.

La FIGURA 2.24 muestra los resultados de la prueba t donde los peces P machos presentan un mayor índice DOO/K que los peces R ($t=4,35$ $p<0,001$).

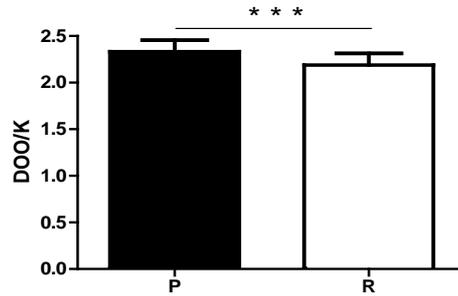


FIGURA 2.24. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R, MACHOS. Datos de tres generaciones.
*** $p<0,001$.

La TABLA 2.12 con los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R machos en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K.

VARIABLES	P	R	t	p
K	0,93 \pm 0,09	0,98 \pm 0,13	-1,522	0,133
LE/K	33,76 \pm 3,37	32,52 \pm 4,17	1,227	0,225
LC/K	7,80 \pm 0,88	7,41 \pm 0,93	1,576	0,120
LPO/K	1,68 \pm 0,23	1,64 \pm 0,24	0,650	0,518
LBAA/K	8,84 \pm 1,00	8,53 \pm 1,15	1,094	0,278
DIO/K	4,66 \pm 0,51	4,43 \pm 0,58	1,556	0,125
LAP/K	5,19 \pm 0,53	5,00 \pm 0,68	1,145	0,257

TABLA 2.12. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R machos.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE CADA FENOTIPO DE COLOR POR SEXO (DATOS NORMALIZADOS POR EL PROMEDIO DEL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON)

Los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R hembras en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LAP/K, en los fenotipos de color WT-UAB y WT-I (ver TABLAS 2.13 y 2.14 respectivamente).

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,29±0,19	1,22±0,19	1,083	0,286
LE/K	26,07±3,18	27,16±3,55	-0,945	0,350
LC/K	5,78±0,71	5,98±0,62	-0,876	0,386
LPO/K	1,31±0,15	1,30±0,17	0,151	0,880
LBAA/K	5,82±0,55	6,27±0,90	-1,689	0,100
DOO/K	1,74±0,08	1,73±0,10	0,365	0,717
DIO/K	3,71±0,38	3,59±0,52	0,787	0,436
LAP/K	4,72±0,66	4,92±0,71	-0,838	0,407

TABLA 2.13. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R hembras, del fenotipo de color WT-UAB.

VARIABLES	P	R	t	p
K	1,13±0,20	1,16±0,18	0,405	0,686
LE/K	30,61±2,14	30,07±2,99	-0,733	0,466
LC/K	6,83±0,65	6,66±0,59	-0,974	0,334
LPO/K	1,37±0,19	1,31±0,10	-1,284	0,205
LBAA/K	6,69±0,75	6,54±0,72	-0,688	0,494
DOO/K	1,88±0,09	1,84±0,09	-1,477	0,146
DIO/K	3,85±0,42	3,79±0,44	-0,493	0,624
LAP/K	5,50±0,46	5,25±0,44	-1,914	0,061

TABLA 2.14. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R hembras, del fenotipo de color WT-I.

Las FIGURAS 2.25 y 2.26 muestran los resultados de la prueba t donde los peces P machos presentan un mayor índice DOO/K que los peces R en los fenotipos de color WT-UAB y WT-I ($t=2,88$ $p=0,007$; $t=-3,537$ $p=0,002$, respectivamente). Los peces P en el fenotipo de color WT-I muestran un mayor índice LC/K que los peces R ($U=17,00$ $p=0,012$).

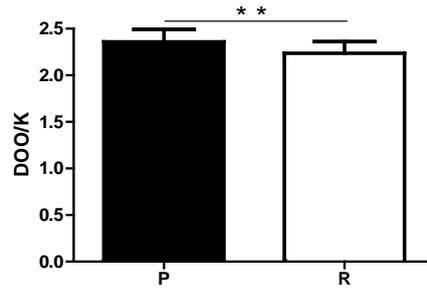


FIGURA 2.25. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R, MACHOS, del fenotipo de color WT-UAB. Datos de tres generaciones. ** $p < 0,01$.

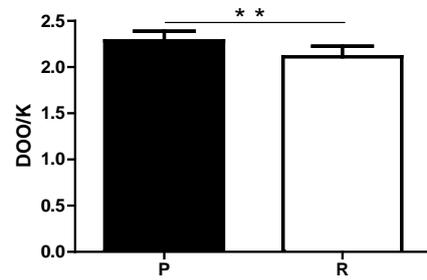


FIGURA 2.26. MEDIA (\pm DE) DE DOO/K EN P Y R, MACHOS, del fenotipo de color WT-I. Datos de tres generaciones. ** $p < 0,01$.

La **TABLA 2.15** con los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R machos en K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K, en el fenotipo de color WT-UAB.

VARIABLES	P	R	t	p
K	0,92 \pm 0,08	0,97 \pm 0,08	-1,751	0,088
LE/K	33,92 \pm 3,52	33,82 \pm 3,62	0,085	0,932
LC/K	7,66 \pm 0,95	7,63 \pm 0,81	0,081	0,935
LPO/K	1,70 \pm 0,24	1,71 \pm 0,27	-0,057	0,9154
LBAA/K	8,81 \pm 0,95	8,70 \pm 0,84	0,0380	0,705
DIO/K	4,73 \pm 0,54	4,50 \pm 0,47	1,378	0,177
LAP/K	5,13 \pm 0,47	4,99 \pm 0,69	0,684	0,498

TABLA 2.15. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R machos, del fenotipo de color WT-UAB.

La **TABLA 2.16** con los resultados de la prueba t, muestran que no existe diferencias significativas entre P y R machos en K, LE/K, LPO/K, LBAA/K, DIO/K, LAP/K, en el fenotipo de color WT-I.

VARIABLES	P	R	t	p
K	0,95±0,11	0,99±0,20	0,571	0,574
LE/K	33,50±3,23	30,44±4,66	-1,708	0,104
LPO/K	1,65±0,23	1,54±0,16	-1,270	0,220
LBAA/K	8,92±1,11	8,25±1,55	-1,110	0,281
DIO/K	4,52±0,48	4,31±0,74	-0,720	0,480
LAP/K	5,33±0,61	5,01±0,70	-1,074	0,296

TABLA 2.16. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de la comparación de K, LE/K, LC/K, LPO/K, LBAA/K, DOO/K, DIO/K, LPA/K entre P y R machos, del fenotipo de color WT-I.

DISCUSIÓN

Los resultados principales de este estudio muestran que la selección por personalidad también selecciona por morfología. Los peces P y R presentan diferencias morfológicas en el diámetro de las orbitas oculares. Las líneas de ambos fenotipos de color muestran el mismo patrón de variación morfológica. Las diferencias observadas en el diámetro ocular son consistentes en datos brutos y en índices morfofuncionales. Las diferencias observadas en índices morfofuncionales entre ambas líneas esta asociada al sexo.

SELECCIÓN FENOTÍPICA

Las líneas longitudinales de color son consideradas la característica más distintiva en *D. rerio*. (Fang, 2000; Pritchard, 2001a; Maderspacher, 2012). El protocolo de selección fenotípica desarrollado por nuestro grupo utilizó como herramienta principal para separar la población en dos fenotipos de color, la uniformidad de las líneas longitudinales azules y doradas presentes en ambos lados del cuerpo, así como en las aletas anal y caudal. Nosotros demostramos la efectividad del uso de las líneas longitudinales del pez cebra como rasgo para la selección fenotípica por patrones de color, esto se refleja en el incremento en el porcentaje de peces WT-UAB entre generaciones de menos de 10% en G0 hasta 60 y 80% en G1 y G2 respectivamente.

SELECCIÓN POR PERSONALIDAD

La prueba de toma de riesgo en grupos se ha utilizado con éxito para estudiar rasgos de personalidad en varias especies de peces (Yoshida *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2009; Huntingford *et al.*, 2010) en ambientes naturales y en condiciones de laboratorio (Brown *et al.*, 2004, Brydges *et al.*, 2008). En este estudio una serie de resultados apoya la importancia del empleo de la prueba de toma de riesgo en grupos en el estudio de la personalidad animal, entre ellos tenemos: (1) **incremento del porcentaje de la personalidad seleccionada en ambas líneas** (mayor porcentaje de individuos

con la personalidad P en la G2 de la línea P, comparado con la G1 de la misma línea, mayor porcentaje de individuos R en la G1 y G2 de la línea R comparados con la G0 de la misma línea), (2) **igual distribución porcentual de categorías de toma de riesgo en grupos en ambos fenotipos de color en la G2**, (3) **variación de las latencias en ambas líneas** (en la línea R hay un incremento de la latencia para dejar el refugio en G1, en la línea P a pesar de registrar un incremento en la G1 en las latencias para dejar el refugio se reduce significativamente en G2) y (4) **las líneas son significativamente diferentes en las latencias para dejar el refugio en G2**. Estas observaciones muestran que el programa de selección desarrollado separa adecuadamente la población en diferentes categorías de toma de riesgo en grupo y que incrementan el porcentaje de peces con la personalidad por la cual se selecciona dentro de cada línea, todos estos resultados validan el uso de la prueba de toma de riesgo en grupos como una prueba conductual apropiada para establecer un programa genético de selección bidireccional por personalidades.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

La morfometría tradicional se ha empleado con éxito para evaluar taxonómicamente diferentes especies (Mitteoecker and Gunz, 2009). En peces la morfometría se ha utilizado principalmente para evaluar diferencias taxonómicas (Rodríguez y Granada, 1988; Torres, 2010), sexuales (Pritchard, 2001; Pineda *et al.*, 2004) fenotípicas (Goetz *et al.*, 2010) y de comportamiento (Imre *et al.*, 2002; Adams and Huntingford, 2004).

En el estudio actual nosotros demostramos la importancia del empleo de la morfometría tradicional para identificar las diferencias morfológicas entre peces con distintas personalidades. Esto se apoya en las siguientes observaciones:

- (1) *el método determinó diferencias morfométricas entre peces P y R en el diámetro de las orbitas oculares a nivel de datos brutos,*
- (2) *las diferencias fueron persistentes en las mismas variables cuando los datos se normalizaron por el promedio del factor de condición de Fulton, y*
- (3) *el mismo patrón de variación morfológica se observó en los dos fenotipos de color evaluadas por separado, sugiriendo que las diferencias morfológicas van mas allá de diferencias por la alometría individual.*

RELACIÓN ENTRE PERSONALIDAD Y MORFOLOGÍA

En el estudio actual los peces P mostraron un mayor diámetro de orbitas oculares que los peces R. Estos resultados sugieren que la selección por personalidades divergentes selecciona a la vez por ciertos rasgos morfológicos. Las diferencias entre líneas a nivel fenotípico y en los datos normalizados sugieren la existencia de un fuerte **componente genético**, y posiblemente algo de **plasticidad fenotípica** que explica parte de esta variación a nivel de personalidad y morfología. La mayor contribución de la genética o el ambiente en el polimorfismo mostrado por algunas especies de peces ha generado numerosos debates, por ejemplo Goetz *et al.*, (2010) en un estudio realizado con dos morfotipos simpátricos de truchas *wild lean* y *siscowet* de la especie *Salvelinus namaycush*, que muestran diferencias morfológicas en estado salvaje, cuando fueron criadas en forma conjuntas bajo las mismas condiciones de laboratorio, mostraron diferencias morfológicas similares a las descritas en la especie en estado salvaje. Con estos resultados los autores concluyen que al estar iguala-

das las condiciones de crianza, las diferencias expresadas a nivel fenotípico tienen un fuerte componente genético y no son solo el resultado de la plasticidad ambiental. En nuestro estudio a pesar que los peces se mantuvieron en tanques separados por la imposibilidad para identificarlos individualmente, las condiciones ambientales fueron similares para ambas líneas en la medida que ambos grupos crecieron en un mismo sistema de recirculación donde la ubicación de los tanques de cría se hizo al azar, la velocidad de entrada del agua, densidad, alimentación, temperatura y concentración de oxígeno se mantuvieron en condiciones similares para ambas líneas, por lo que podemos suponer que existe un fuerte componente genético en las diferencias por personalidad y por lo tanto a nivel morfológico mostrada por las líneas. Sin embargo no podemos descartar un **componente ambiental** en la variación mostrada en la morfología de ambas líneas; así lo sugieren Adams and Huntingford (2004), en un estudio empleando dos morfotipos simpátricos de *Salvelinus alpinus*, los autores compararon la morfología de la cabeza de individuos criados en el laboratorio con la de sus padres en estado salvaje, concluyendo que la mayor parte de la variación en morfología entre ambos morfotipos criados en condiciones idénticas de laboratorio es atribuida a la plasticidad mostrada en el ambiente de crianza.

Ambos estudios citados anteriormente no exploran directamente si las diferencias encontradas entre los morfotipos están asociadas a la personalidad; en esta línea Dingemans *et al.*, (2009), en un estudio realizado con dos poblaciones de *Gasterosteus aculeatus*, una cohabitando con un depredador y la otra libre de depredación, reportaron el efecto que el depredador tiene en la heredabilidad de algunos rasgos relacionados con personalidad y morfometría.

En este estudio nosotros encontramos que las diferencias en personalidad seleccionan por diferencias en morfología entre las dos líneas, probablemente pueden estar asociadas a las diferentes interacciones experimentadas por *D. rerio* en su hábitat natural, las cuales son transmitidas a través de las generaciones y que generan diferentes personalidades dentro de la especie, cada una equipada con diferencias morfológicas que le otorgan una ventaja durante su historia de vida. Podemos apoyar esta sugerencia en el hecho, que el pez cebra vive en zonas con una estacionalidad marcada por la influencia de las lluvias monzónicas (McClure *et al.*, 2006; Spence *et al.*, 2006), en época seca muchas poblaciones se separan en pequeños lagunas donde existen diferentes gradientes de depredación y de disponibilidad de alimento (Pritchard, 2001). Estos gradientes seleccionan aquellos individuos con la personalidad más apropiada. Al momento de reproducirse individuos provenientes de diferentes interacciones ambientales se cruzan entre si, manteniendo el equilibrio de las diferentes conductas dentro de la población que se fijan con el paso de las generaciones.

Las diferencias morfológicas observadas entre ambas líneas en el diámetro de las orbitas oculares tiene importantes implicaciones en la visión. El diámetro de las orbitas oculares se ha relacionado con la calidad de la visión en peces (Shand, 1997). Una mejor capacidad visual esta relacionada con dos aspectos importantes que son la sensibilidad y la agudeza visual, la sensibilidad se refiere a la capacidad de los individuos para responder a estímulos en condiciones de poca luz, mientras la agudeza visual se refiere a la capacidad para descifrar detalles (Goatley and Bellwood, 2009; Goatley *et al.*, 2010). Individuos con diámetros oculares mas grandes tienen mayor capacidad de capturar luz al poseer retinas y cristalinos mas grandes mejorando la sensibilidad y la agudeza visual (Shand, 1997; Goatley and Bellwood, 2009). Esta mayor capacidad visual puede tener importantes implicaciones en el desempeño de los individuos con diferentes personalidades. Por ejemplo una mayor capacidad visual puede ser ventajosa en individuos con comportamientos P, caracterizados por una mayor disposición a asumir riesgos para explorar nuevos ambientes, en donde la sensibilidad y agudeza visual pueden representar la diferencia entre mejorar o decrecer su *fitness* (Schmitz and

Wainwright, 2011). En línea con esta sugerencia Bishop and Brown, (1992), en un estudio donde evaluaron la disposición de larvas de *Gasterosteus aculeatus* para forrajear en presencia de depredadores de diferentes tamaños, concluyeron que las larvas gastaron menos tiempo forrajear cerca de depredadores medianos y grandes cuando se compararon con el tiempo forrajear cerca de depredadores pequeños. Similarmente Chivers *et al.*, (2001), reportaron que *Cottus cognatus* expuestos a un depredador simpátrico *Salvelinus fontinalis* responden de forma diferente cuando solo son expuestos a señales químicas que cuando tienen contacto visual con el depredador. En nuestro caso una ventaja en la visión le permite a un individuo tomar decisiones que tienen importantes implicaciones para su fitness, por ejemplo en la necesidad de forrajear en la presencia de un depredador, si el individuo solo tiene la posibilidad de detectarlo por señales químicas, no podrá evaluar si realmente representa una amenaza, en cambio si el mismo depredador es evaluado visualmente el individuo puede determinar otros aspectos del depredador como puede ser su tamaño y determinar si realmente representa una amenaza o puede asumir el riesgo de ir a forrajear e incrementar su *fitness* (Lima and Dill, 1990, Brown *et al.*, 2009; Chapman *et al.*, 2010; Schmitz and Wainwright, 2011)

En nuestro estudio las diferencias en el diámetro de las orbitas oculares solo se observó entre machos de las diferentes líneas. La existencia de diferencia solo entre machos de ambas líneas puede estar relacionada a los diferentes papeles que juega cada sexo en el mantenimiento de la estructura social de la población. Por ejemplo en esta especie existen diferencias entre sexos en el comportamiento exploratorio en donde los machos muestran una mayor disposición que las hembras a tomar riesgo para explorar ambientes nuevos (Moretz *et al.*, 2007a; Dahlbom *et al.*, 2012). A nivel de la dinámica reproductiva de la especie existen diferencias en el comportamiento reproductivo entre hembras y machos por ejemplo las hembras prefieren aparearse con individuos mas grandes (Pyrton, 2003), o individuos que controlan territorios con sitios de puesta de mejor calidad (Spence and Smith, 2005). De esta manera la oportunidad de reproducirse del macho esta asociada a su mayor disposición a explorar ambientes nuevos en donde una mejor capacidad visual puede incrementar la fitness del sexo.

En conclusión nuestro estudio ha demostrado que ***la prueba de toma de riesgo en grupo es una herramienta adecuada para separar la población en diferentes categorías conductuales y fue la piedra angular para desarrollar un programa exitoso de líneas genéticas con divergentes personalidades***. Líneas seleccionadas por su divergencia en personalidades muestran diferencias a nivel morfológico en variables relacionadas con la visión. Este estudio nos muestra además que ***la selección por divergencia en personalidades selecciona por diferencias en la capacidad visual solo en machos***.



**ESTABILIDAD Y CONSISTENCIA
DE LA PERSONALIDAD
EN EL TIEMPO Y/O CONTEXTOS**

3

INTRODUCCIÓN

Estudiosos del comportamiento animal reconocen que los individuos dentro y entre poblaciones difieren en las respuestas a cambios ambientales (Magurran, 1993; Wilson, 1998, Bell, 2007). Cuando las diferencias son consistentes a través del tiempo y/o contexto, se dice que existe un **síndrome de comportamiento** (Sih *et al.*, 2004 a,b), también conocido con otros términos como: estilo de afrontamiento o ***coping style*** (Koolhaas *et al.*, 1999), **temperamento** (Réale *et al.*, 2007), o **personalidad animal** (Gosling, 2001; Dall *et al.*, 2004; Briffa and Greenaway, 2011).

A nivel de comportamiento las diferencias en personalidades entre proactivos (P) y reactivos (R) se pueden caracterizar por la diferencia en el estilos de afrontar desafíos ambientales con individuos P mostrando conductas activas para escapar de un estresor, alta motivación en un ambiente nuevo, asumiendo mas riesgo y con una mayor disposición a explorar, son más agresivos durante encuentros con conespecíficos, cuando son comparados con la conducta mostrada por individuos R (Øverli *et al.*, 2004, 2006, 2007; Frost *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010).

Las variaciones en personalidad puede estar condicionada en parte por un componente genético (van Oers *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2009; van Oers and Mueller, 2010), está correlacionada a parámetros fisiológicos o neuroendocrinos (Koolhaas *et al.*, 1999; van Riel *et al.*, 2002; Carere *et al.*, 2003; Feldker *et al.*, 2003; Sluyter *et al.*, 2003; Veenema *et al.*, 2003; Øverli *et al.*, 2006), y tiene importantes implicaciones en la producción (Huntingford, 2004; Biro and Post, 2008), manejo, conservación (McDougall *et al.*, 2006) y bienestar animal (Huntingford and Adams, 2005; Muller and Schrader, 2005; Rodenburg *et al.*, 2008). Existen evidencias que la correlación de comportamientos tiene implicaciones ecológicas y evolutivas, donde algunas correlaciones de comportamientos en determinados contextos puede ser ventajosa, pero pueden ser mal adaptativas bajo otros contextos (Sih *et al.*, 2004a; Colléter and Brown, 2011; Conrad *et al.*, 2011).

La existencia de correlaciones entre comportamientos se ha descrito en ciertas especies de peces tales como: *Salmo trutta* (Sundström *et al.*, 2004); *Danio rerio* (Moretz *et al.*, 2007a); *Gasterosteus aculeatus* (Bell, 2005; Bell and Sih, 2007; Dingemans *et al.*, 2007); *Lepomis macrochirus* (Wilson and Godin, 2009); *Melanotaenia duboulayi* (Colléter and Brown, 2011); *Salvelinus fontinalis* (Wilson and Mclaughlin, 2007); también con parámetros fisiológicos como: niveles de cortisol y comportamiento *Solea solea* (Siva *et al.*, 2010); *Oncorhynchus mykiss* (Øverli *et al.*, 2007); tasa metabólica en reposo y comportamiento *Cyprinus carpio* (Huntingford *et al.*, 2010); o reactividad emocional y comportamiento *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2011).

El pez cebra es una especie apropiada para estudiar la estabilidad y consistencia de comportamientos a través del tiempo y/o contextos, por ser un organismo modelo utilizado en muchos campos de las ciencias como: biología del desarrollo y genética (Grunwald and Eisen, 2002), farmacología (Barros *et al.*, 2008), evolución (Cañestro *et al.*, 2007), comportamiento (Larson *et al.*, 2006; Filby *et al.*, 2010; Paull *et al.*, 2010; Ariyomo and Watt, 2012) y acuicultura (Ulloa *et al.*, 2011). Moretz *et al.*, (2007a), utilizando tres cepas de esta especie reportó la existencia de un síndrome de comportamiento. Además se ha reportado que la selección previa por individuos atrevidos *bold* puede predecir su estatus social (Dahlbom *et al.*, 2011). Sin embargo no conocemos la existencia de ningún estudio que haya evaluado la estabilidad y consistencia de la conducta a través del tiempo y a la vez en diferentes contextos empleando el mismo grupo de individuos, en *D. rerio*. Con estos antecedentes se evaluó la estabilidad y consistencia de un conjunto de comportamientos a través de diferentes contextos (consistencia a través de contextos), en peces que previamente se evaluaron por la prueba

de toma de riesgo en grupos, 10 meses después de la primera prueba (consistencia en el tiempo). Para alcanzar estos objetivos nosotros nos planteamos una serie de hipótesis.

La diferencia en personalidad dentro de la población en el pez cebra se mantiene en el tiempo.

Existe diferencias en el porcentaje de personalidades entre la población base y las subpoblaciones posteriores demostrando una fijación del comportamiento.

Existe estabilidad a través de los contextos en cada una de las subpoblaciones a nivel intra-poblacional (familias proactivas/reactivas).

Existe consistencia de comportamiento a través de los contextos dentro de las líneas y también a nivel intra-individual para según qué comportamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

PECES, ESTABILACIÓN Y MANEJO

Los peces cebras (*Danio rerio*), utilizados para desarrollar este experimento de consistencia de la personalidad en el tiempo y/o contextos eran adultos mayores de tres meses adquiridos en diciembre de 2009 en un distribuidor local ubicado en Parets del Vallés, Barcelona, España. Se estabularon en tanques de 30 litros, arreglados en estanterías en una sala con ambiente controlado (condiciones estándar), ubicada dentro del acuario de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona. La densidad se estableció en 1 pez/litro de agua. Se alimentaron hasta la saciedad dos veces al día, en la mañana con un pienso seco y en la tarde con un pienso húmedo de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Zfbiolabs®, ver www.zfbiolabs.com). Se aclimataron por cinco meses antes de iniciar la primera parte del experimento.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA Y FOTOPERIODO

El suministro de agua se realizó con agua de grifo previamente filtrada (The body of the C1 filter is filled with granular activated carbon) (filter cartridge CTO®, Water Quality Association, Lisle, IL, USA). Cada estante está equipado con un sistema cerrado de recirculación con un sistema de filtración física y biológica (ZFbiolabs®). Semanalmente se recambió el 30% del volumen de agua de cada estante. La temperatura del agua se mantuvo en $27,06 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$, (media \pm desviación estándar, temperatura exterior: 28°C), las concentraciones de oxígeno se mantuvieron en $5,47 \pm 0,26\text{mg/L}$ (miligramos x litro), ambas mediciones se realizaron diariamente con un oxímetro (OxyGuard®, Handy Polaris, OxyGuard International, Denmark). Adicionalmente se realizaron controles semanales de Amoniac, Nitrito, Nitrato y pH (Sera Test Kit®, New Tech, Watlington, Kent, UK). El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 14:10 (0600-2000 horas).

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Se explicará de forma general el flujo del experimento (ver **FIGURA 3.1**), y los detalles de cada prueba serán explicados en su sección correspondiente. Durante el ensayo el registro de los datos se realizó a través de un sistema de video, y de forma manual. Los datos de la prueba de actividad se extrajeron posteriormente empleando un sistema de video, para el resto de las pruebas, el registro de los datos se realizó en tiempo real por un solo observador (RV).

El experimento se diseñó para probar la consistencia de la personalidad en el tiempo (Koolhaas, *et al.*, 1999, Dall *et al.*, 2012), y/o contextos (Sih, *et al.*, 2004a). Se emplearon peces cebras (*Danio re-*

rio), adultos de ambos sexos mayores de 6 meses. La primera parte del experimento se desarrolló entre los meses de abril y mayo de 2010. Los individuos se separaron por la prueba de toma de riesgos en grupos en tres categorías conductuales, proactivos (P), intermedios (I) y reactivos (R) (adaptado de Mackenzie *et al.*, 2009 previamente descrito en el **CAPÍTULO 2**). La categoría I se descartaron en este experimento. Los peces P y R se estabularon separadamente en grupos de ambos sexos, en tanques de 30 litros, ubicados dentro del acuario de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, España (**FIGURA 3.1A**).

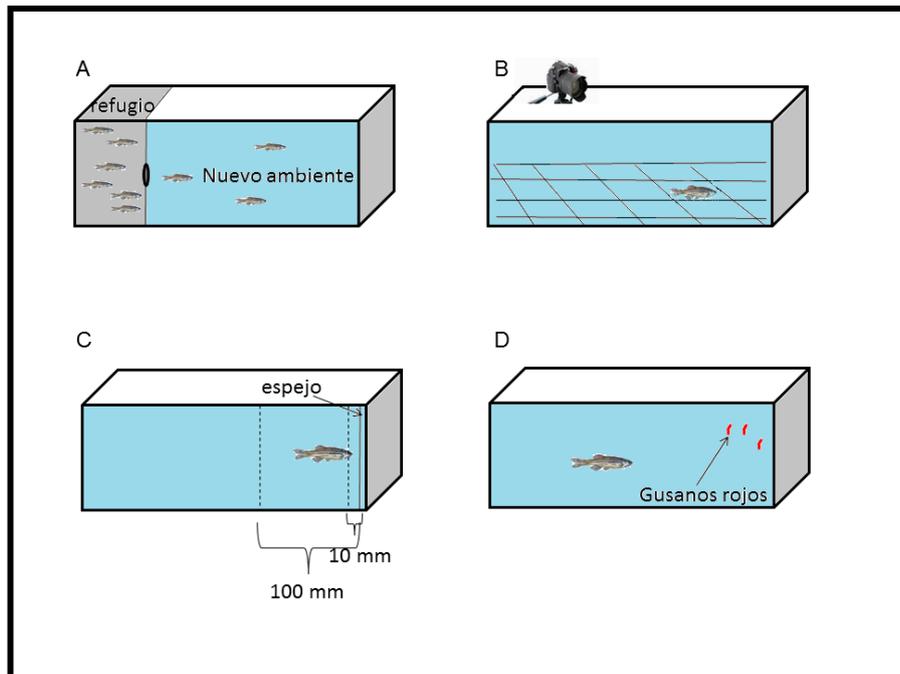


FIGURA 3.1. DIAGRAMA MOSTRANDO EL FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL. (A) toma de riesgo en grupos prueba 1 y re prueba 10 meses después, (B) prueba individual de actividad en un ambiente familiar; (C) prueba individual de agresividad frente a la imagen reflejada en un espejo; (D) prueba de alimentación, latencia para reasumir la alimentación después de una situación estresante.

Diez meses después de realizarse la prueba de toma de riesgos en grupos se inicio la segunda fase del experimento, se seleccionaron al azar 36 individuos de cada categoría conductual (que se encontraban en tanques separados por conducta) y se evaluaron nuevamente por la prueba de toma de riesgos en grupos (consistencia de la personalidad en el tiempo). Diez individuos con igual proporción de sexos que mostraron consistencia en la prueba de riesgo en grupos se seleccionaron para la segunda fase del experimento, registrándoles el peso, longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton (Carlander, 1950). En cada uno de los individuos se registró las diferencias existentes en los patrones de coloración con el fin de ser identificados individualmente en cada una de las pruebas conductuales, evitando así alterar su comportamiento con ningún marcaje interno o externo. Los individuos seleccionados se habituaron por un periodo de tiempo de una semana a un cambio de alimento, sustituyendo el pienso seco y húmedo por larvas descongeladas de gusanos rojos (*Chironomid Ocean Nutrition*®, Esse, Belgium). Finalizado el periodo de habituación al nuevo tipo de alimento se trasladaron a la habitación de estudio de comportamiento de peces. Se estabula-

ron en tanques de vidrio de 20 litros previamente equipados con calentadores y un sistema de aireación, con condiciones similares a los tanques stock. Una semana después se evaluó su comportamiento individual en la prueba de actividad empleando un sistema de video de uso para estudiar comportamiento en mamíferos (roedores), validada por nuestro grupo para ser utilizada en peces (Smart, Panlab®, FIGURA 3.1B). Finalizada la prueba de actividad, los individuos se estabularon en tanques similares a los descritos previamente. Posteriormente una semana después de practicada la prueba de actividad, los individuos se evaluaron en la prueba de agresividad, empleando el método del espejo (Oliveira *et al.*, 2011) (FIGURA 3.1C). Inmediatamente finalizada la prueba de agresividad se evaluó la latencia de los individuos para reasumir la alimentación, después de una situación estresante (Øverli *et al.*, 2007) (FIGURA 3.1D).

SELECCIÓN CONDUCTUAL

TOMA DE RIESGO EN GRUPOS

Los peces se separaron por sus personalidades, mediante la prueba de toma de riesgo en grupos y se categorizaron como P, I y R. Este método se ha descrito previamente en el **CAPÍTULO 2**, por lo que aquí se mencionará el procedimiento brevemente.

El tanque de prueba consistió en un tanque de vidrio de 20 litros (40x20x25cm), el lado opuesto y los lados laterales al observador se cubrieron con papel blanco, así como también el lado de observación se cubrió en 3/4 partes para reducir el estrés y aislar del medio externo. Se dividió 1/3 de su longitud, con un separador negro de PVC, formando un área de “refugio” en uno de los extremos. El separador presentaba un agujero de 3 centímetros de diámetro en el centro, el agujero quedaba ubicado a 10 cm del fondo del tanque. El nuevo ambiente consistió en el restante espacio abierto del tanque.

Grupos de nueve peces se separaron a la vez. Se transfirieron del tanque de habituación y se colocaron en el área de refugio del tanque de prueba, dejados 10 minutos para reducir el estrés de manipulación. Los criterios utilizados para separar entre categorías de toma de riesgo en grupos son los mismos descritos en el **CAPÍTULO 2**. Los individuos de cada categoría conductual se colocaron por separado en tanques previamente acondicionados. Finalizada la prueba de toma de riesgo en grupos, la categoría I se descartó. Los individuos P y R se colocaron por separado en grupos de ambos sexos, en los tanques de stock con las mismas condiciones de estabulación descritas arriba.

CONSISTENCIA EN EL TIEMPO

TOMA DE RIESGO EN GRUPOS

Diez meses después de la prueba de toma de riesgo en grupos, 36 individuos de cada categoría conductual (subpoblaciones P y R) se evaluaron nuevamente por la misma prueba, siguiendo el mismo procedimiento y horario descrito anteriormente.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Diez individuos, con comportamientos consistentes en sus estilos de afrontamiento frente a la toma de riesgo en grupos se seleccionaron para la segunda fase del estudio, se sexaron, se les registró el peso y la longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton para cada uno de ellos (Carlander, 1950; Blackwell *et al.*, 2000). Se estabularon de acuerdo a la conducta en grupos de ambos

sexos, en tanque de vidrio de 20 litros. Se sometieron a un periodo de habituación de una semana para sustituir el pienso seco y húmedo por larvas descongeladas de gusanos rojas (*Chironomid*, Ocean Nutrition®, Esse, Belgium). La temperatura, la concentración de oxígeno y el fotoperiodo eran similares a los de los tanques stock.

CONSISTENCIA A TRAVÉS DE CONTEXTOS

ACTIVIDAD

Una semana después de la prueba de toma de riesgo en grupos los individuos se trasladaron a la habitación de filmación de comportamiento de peces, para ser evaluados por su nivel de actividad. Se alojaron en tanques de vidrio de 20 litros (40 x 20 x 25 cm, largo x ancho x profundidad), de acuerdo a su categoría conductual en grupos de ambos sexos. Los tanques de alojamiento estaban provistos de grava, un calentador y un sistema auxiliar de oxigenación, para mantener la temperatura y la concentración de oxígeno similares a los del tanque stock. El fotoperiodo fue de 14:10 horas similar al establecido en el acuario. Se alimentaron hasta la saciedad, con larvas de gusanos rojos siguiendo el mismo horario establecido durante el periodo de habituación.

El tanque de prueba consistió en un tanque de vidrio de 20 litros con dimensiones similares a los tanques de alojamiento (40 x 20 x 25 cm), el lado opuesto al observador, los lados laterales y el fondo del tanque se cubrieron con una lámina de PVC espumada de color negro, insertadas dentro del tanque para facilitar la filmación. Una lámpara de 30 watt colocada por encima del tanque de prueba suministró luz uniforme a todo el tanque y facilitó al programa de filmación el seguimiento del individuo. El tanque de prueba se separó virtualmente en 16 áreas (5 x 10 cm) para seguir el movimiento horizontal del individuo y 5 áreas en la periferia superior, necesarias para seguir el individuo, cuando se mueve verticalmente en la columna de agua. Las filmaciones se realizaron desde arriba del tanque de prueba empleando el programa de filmación SMART (Panlab® versión 2,5) herramienta tecnológica de uso en roedores adaptada por nuestro grupo para la filmación y el análisis automatizado del comportamiento de peces. Los datos de actividad se extrajeron y analizaron posteriormente.

Cada pez se evaluó individualmente. La secuencia de filmaciones se realizó siguiendo una serie alternada, iniciando con R seguido de P, hasta filmar la mitad de los individuos en donde la secuencia de la serie se invirtió evaluando primero un P seguido de un R, hasta culminar la totalidad de la prueba.

Cada individuo se transfirió del tanque de habituación y se colocó en el tanque de prueba, dejado 10 minutos para reducir el estrés de manipulación, permitiéndole mostrar patrones de comportamiento normales. El nivel de actividad es mejor observarlo en un ambiente familiar en el cual el animal muestre los patrones de comportamientos normales (Réale *et al.*, 2007; Colléter and Brown, 2011; Conrad *et al.*, 2011). Finalizados los 10 minutos de habituación, se inició la filmación del comportamiento durante 5 minutos. Nosotros registramos las siguientes variables: el número de transiciones, la distancia total recorrida, velocidad promedio, y el número de áreas usadas. Una transición se definió como el desplazamiento horizontal que un pez realiza para pasar de un rectángulo a otro. Finalizada la prueba los individuos se transfirieron a sus tanques de alojamiento debidamente etiquetados con la categoría conductual correspondiente. Al final de cada prueba la totalidad del agua se renovó, evitando señales químicas que interfieran con el comportamiento del siguiente individuo.

AGRESIVIDAD

Una semana después de la prueba de actividad los peces se evaluaron por su nivel de agresividad en la prueba de espejo (Budaev, 1997; Budaev *et al.*, 1999; Archard and Braithwaite, 2011). El tanque de prueba consistió en un tanque de vidrio de 9 litros (30 x 15 x 20 cm, largo x ancho x profundidad), con un espejo (15 x 20 cm), insertado en uno de los extremos del tanque. Un separador negro espumado de PVC se colocó frente al espejo, el separador estaba equipado con un cordón (hilo) en su parte superior unido a una polea, facilitando su retiro desde atrás del tanque. El lado opuesto al observador y los lados laterales del tanque se cubrieron con papel blanco para reducir el estrés y aislar del medio externo. En la parte exterior del tanque del lado de observación se dibujaron dos líneas en sentido vertical, la primera a una distancia de 10 milímetros (mm) del espejo y la segunda a una distancia de 100 mm del espejo.

Los peces se transfirieron individualmente del tanque de habituación al tanque de prueba, el espejo estaba cubierto con el separador negro espumado de PVC. El **periodo de habituación** se estableció en 10 minutos, periodo que le permite al pez reducir el estrés de la manipulación y adaptarse al nuevo ambiente. Al finalizar el periodo de habituación el separador se elevó desde atrás a través de un sistema de poleas para evitar interferir en el comportamiento, iniciando el periodo de prueba de 5 minutos. Nosotros registramos las siguientes variables: **latencia para realizar el primer enfoque**, el **número de mordiscos que el pez realizó a la imagen**, el **número de comportamientos agresivos** y el **porcentaje del tiempo que el pez permaneció inmóvil** (congelamiento). Latencia para realizar el primer enfoque se definió como el tiempo que tarda el pez en enfocar la imagen y mostrar un comportamiento agresivo a una distancia horizontal entre 10 y 100 mm de la imagen del espejo. Un mordisco se consideró cuando la cabeza del pez atraviesa la línea de 10 mm de distancia horizontal de la imagen del espejo. El número de comportamientos agresivos se definió como la suma de repetidos acercamientos a la imagen sin sobrepasar la línea de 10 mm, mostrando nado paralelo a la imagen y curvamientos del cuerpo hacia la imagen (animal adopta la forma de la letra c con la cabeza y la región caudal curvada hacia uno de los flancos) (Oliveira *et al.*, 2011). Congelamiento se definió como la ausencia total de movimientos excepto para las branquias y los ojos. Finalizado el periodo de prueba los peces permanecieron en el tanque de prueba para ser inmediatamente evaluados en la prueba de alimentación.

ALIMENTACIÓN

Finalizada la prueba de agresividad, se inició inmediatamente la prueba de alimentación. El tanque de prueba es el mismo utilizado para la prueba de alimentación. Inmediatamente el espejo se retiró del tanque de prueba, el pez se capturó con una red para peceras de 8 x 6 cm, reteniéndolo en la superficie del agua en uno de los extremos del tanque por un periodo de tiempo de 1 minuto. Tres gusanos rojos se colocaron en el agua en el mismo momento que el pez se liberó en el extremo opuesto del tanque. Se evaluó la **latencia para reasumir el comportamiento de alimentación después de una situación estresante** (Moretz *et al.*, 2007a), y el tiempo que el pez permanece inmóvil (congelamiento). La latencia para reasumir la alimentación se definió como el tiempo que el pez tarda en capturar el primer gusano. Al final de la prueba la totalidad del agua se cambió, evitando señales químicas que interfieran con el comportamiento del siguiente individuo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables evaluadas para determinar consistencia de comportamientos en el tiempo y entre contextos se examinaron por la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas para verificar si mostraban una distribución normal. Aquellas variables no normales se normalizaron empleando el logaritmo 10 ($var.+1$). Las variables con distribución normal se analizaron empleando la prueba de t de Student, aquellas variables que permanecieron con una distribución no normal después de la transformación logarítmica se evaluaron empleando las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney para dos grupos o Kruskal Wallis para más de dos grupos. Diferencias en el porcentaje de individuos P, I y R en la primera prueba de toma de riesgo en grupos y la reprobación se determinaron utilizando el análisis Pearson Chi-cuadrado (χ^2). Diferencias en las latencias para dejar el refugio en la prueba de toma de riesgo en grupos en los tres grupos se evaluaron empleando la prueba de Kruskal Wallis. Resultados significantes se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. Las diferencias en variables morfométricas entre P y R se evaluaron por la prueba de t de Student. Interacción entre la conducta y el tiempo se analizaron empleando la prueba de Kruskal Wallis. Resultados significantes se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's, Las diferencias entre P y R en los tres contextos (actividad, 4 variables; agresividad, 4 variables; alimentación, 2 variables), se evaluaron por la prueba de t de Student o Mann-Whitney según sea el caso. Correlaciones de comportamientos entre contextos se analizaron empleando el coeficiente de Spearman para cada categoría conductual por separado. Las correlaciones significantes se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

RESULTADOS

CONSISTENCIA EN EL TIEMPO

Los resultados muestran que existen diferencias en el porcentaje de individuos dentro de cada categoría conductual, entre la primera prueba de toma de riesgo en grupos aplicada a la población base (PB, n= 206), y la segunda prueba aplicada 10 meses después a subpoblaciones de individuos que permanecieron separados de acuerdo a su categoría conductual, en grupos proactivos (P, n=36), y grupo de reactivos (R, n=36), ($\chi^2= 95,16$, DF= 4 p= 0,0001). Existe un mayor porcentaje de individuos P en la subpoblación P, comparado con PB y R ($\chi^2= 44,50$, DF= 2 p= 0,0001; $\chi^2= 94,38$, DF= 2 p= 0,0001 respectivamente). La subpoblación R muestra mayor porcentaje de individuos mostrando un comportamiento R comparado con PB ($\chi^2= 15,00$, DF= 2 p= 0,0006) (ver Figura 3.2). Existen diferencias significantes en el porcentaje de individuos dentro de cada categoría conductual de acuerdo a las latencias en minutos para dejar el refugio en la primera prueba de toma de riesgo en grupos aplicada a PB y la segunda prueba aplicada 10 meses después a las subpoblaciones P y R ($\chi^2= 132,1$, DF= 4 p= 0,000). El porcentaje de individuos P es mayor en la subpoblación P que en la población BP y la subpoblación R ($\chi^2= 69,80$, DF= 2 p= 0,0001; $\chi^2= 130,6$, DF= 2 p= 0,0001, respectivamente). La subpoblación R muestra mayor porcentaje de individuos mostrando un comportamiento R comparado con la PB ($\chi^2= 18,97$, DF= 2 p= 0,0001) (ver FIGURA 3.3).

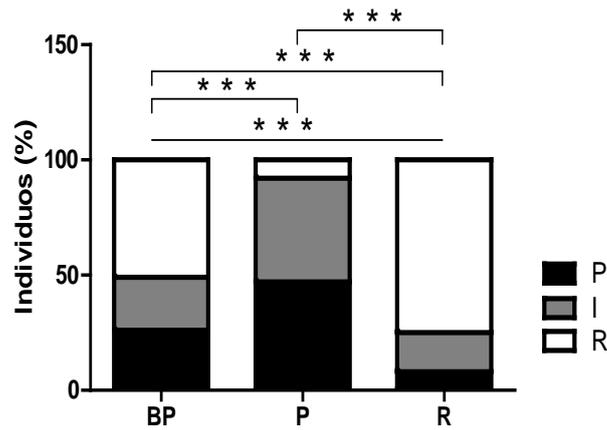


FIGURA 3.2. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO en grupos, en PB, y los subpoblaciones P y R, evaluados 10 meses después. *** $p < 0,001$.

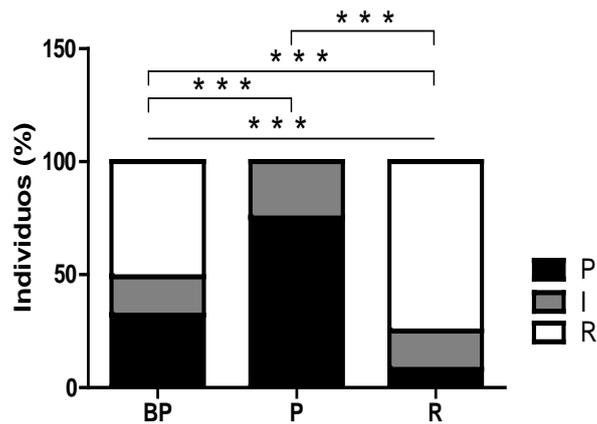


FIGURA 3.3. PORCENTAJE DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO en grupos, de acuerdo a la latencia para dejar el refugio en PB, y las subpoblaciones P y R, evaluados 10 meses después. *** $p < 0,001$.

La **FIGURA 3.4** muestra que existen diferencias en las latencias de salida en minutos de animales de la PB sometido a la prueba de toma de riesgo en grupos y los subpoblaciones P y R establecidos separadamente y evaluados por la misma prueba 10 meses después (Kruskall Wallis= 48,78, DF= 2 $p < 0,0001$). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn's, muestra que existen diferencias significativas en las latencias para dejar el refugio entre PB y la subpoblación P, PB y la subpoblación R (Comparación de Dunn's $p < 0,001$; $p < 0,01$ respectivamente). Además existen diferencias significativas entre las subpoblaciones P y R (Comparación de Dunn's $p < 0,001$).

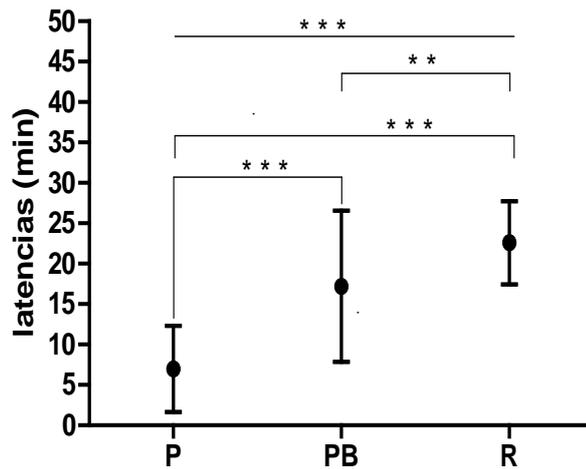


FIGURA 3.4. MEDIA (\pm DE), DE LA LATENCIA EN MINUTOS DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO en grupos, en PB, y las subpoblaciones P y R, evaluados 10 meses después. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados de Kruskal Wallis, muestran una interacción significativa de la conducta con el tiempo (Kruskal Wallis= 201,78, DF= 3 $p < 0,0001$). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn`s, muestra que no existen diferencias significativas en las latencias para dejar el refugio en ninguna de las dos categorías conductuales entre la primera prueba y la reprueba de toma de riesgo (ver FIGURA 3.5).

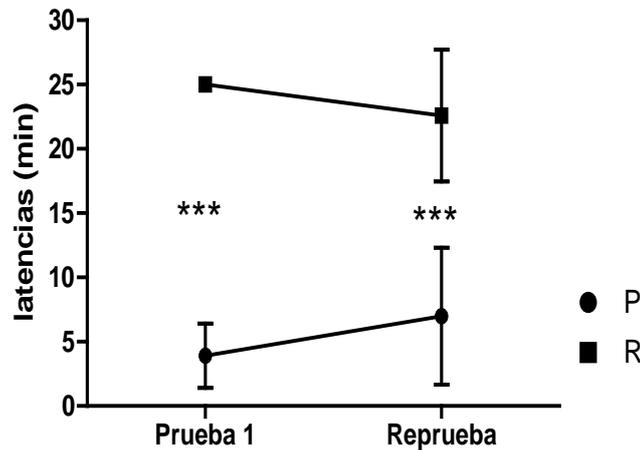


FIGURA 3.5. MEDIA (\pm DE), DE LA LATENCIA EN MINUTOS DE PECES EN CADA CATEGORÍA DE TOMA DE RIESGO en grupos, en la prueba 1 y en la reprueba. Asterisco indica diferencias significativas en la interacción conducta tiempo entre las subpoblaciones. *** $p < 0,001$.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

La TABLA 3.1 con los resultados de la prueba t muestra que no existen diferencias significativas en el peso, longitud total y factor de condición de Fulton en los peces P y R después de permanecer 10 meses separados por conducta y evaluados nuevamente por la prueba de toma de riesgo en grupos.

P (N=10)		R (N=10)		
VARIABLES	MEDIA±DE	MEDIA±DE	t	p
Peso	0,866±0,16	0,906±0,18	-0,526	p=0,606
Longitud Total	42,13±0,96	42,22±1,13	-0,198	p=0,845
K	0,98±0,17	1,02±0,18	-0,482	p=0,635

TABLA 3.1. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de peso (g), longitud total (LT, mm) y factor de condición de Fulton (K), en peces cebras P y R, alojados separadamente y evaluados 10 meses después por la prueba de toma de riesgo en grupos (asterisco indica diferencias significativas entre P y R. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

ESTABILIDAD DE LAS LÍNEAS A TRAVÉS DE CONTEXTOS

ACTIVIDAD

La TABLA 3.2 con los resultados de la prueba t muestra que no existen diferencias significativas en el número total de transiciones, velocidad promedio, distancia total recorrida y áreas usadas del tanque entre P y R.

P (N=10)		R (N=10)		
VARIABLES	MEDIA±DE	MEDIA±DE	t	p
Número total de transiciones	323,70±124,74	340,60±60,48	-0,385	p=0,704
Velocidad promedio (cm/seg)	8,60±3,30	8,91±1,49	-0,267	p=0,792
Distancia total recorrida (cm)	1976,24±631,95	2253,32±454,84	-1,326	p=0,201
Áreas usadas	19,10±1,72	18,80±1,81	0,378	p=0,709

TABLA 3.2. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T para el número total de transiciones, velocidad promedio, distancia total recorrida y áreas usadas entre individuos P y R (asterisco indica diferencias significativas entre P y R, *p<0,05; **p<0,01. ***p<0,001).

AGRESIVIDAD

La **TABLA 3.3** con los resultados de la prueba t muestran que los individuos P tienen una menor latencia para enfocar la imagen e iniciar comportamientos agresivos y realizan mas mordidas que los individuos R. Los peces P muestran de forma general un comportamiento mas agresivo que los peces R (Mann-Whitney $U=22,50$ $p=0,03$). La **FIGURA 3.6**, muestra que existen diferencias significativas entre P y R en el tiempo que los individuos permanecen inmóviles en congelamiento (Mann-Whitney $U= 0,00$ $p= 0,0001$).

P (N=10)		R (N=10)		
VARIABLES	MEDIA±DE	MEDIA±DE	t	p
Log, de la latencia para realizar el primer enfoque	1,19±0,26	1,59±0,20	-3,773	p=0,001**
Log, del número de mordidas	1,18±0,19	0,93±0,15	3,218	p=0,004**

TABLA 3.3. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de logaritmo de la latencia para realizar el primer enfoque y logaritmo del número de mordidas entre individuos P y R (asterisco indica diferencias significativas entre P y R. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

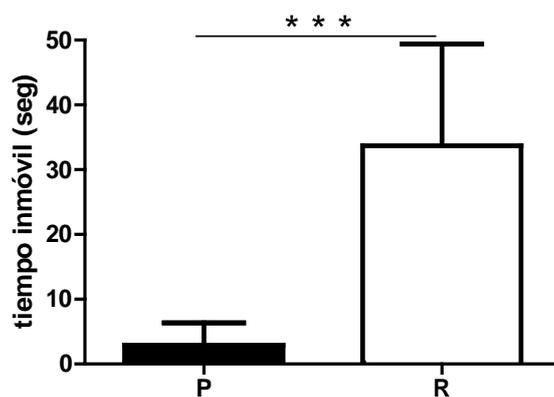


FIGURA 3.6. MEDIA (± DE), DE TIEMPO INMÓVIL de individuos P y R sometidos a la prueba de agresividad del espejo. *** $p< 0,001$.

ALIMENTACIÓN

La **FIGURA 3.7** muestra que existen diferencias significativas en el tiempo en reasumir la alimentación después de una situación estresante entre P y R ($t=-2,13$, $p= 0,044$, $DF=18$). En forma general los peces R permanecieron mas tiempo mostrando un comportamiento de congelamiento que los peces P (Mann-Whitney $U= 27,50$ $p= 0,036$, ver **FIGURA 3.8**).

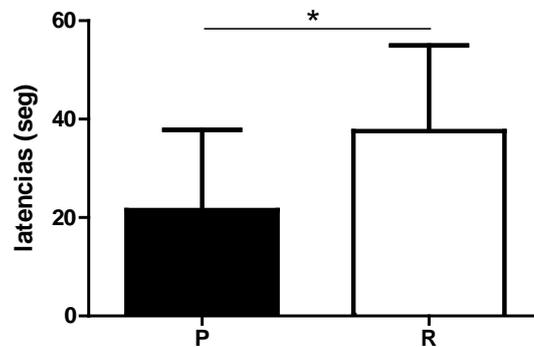


FIGURA 3.7. MEDIA (\pm DE), DE LAS LATENCIAS para reasumir la alimentación de individuos P y R después de una situación estresante, en la prueba de alimentación. * $p<0,05$.

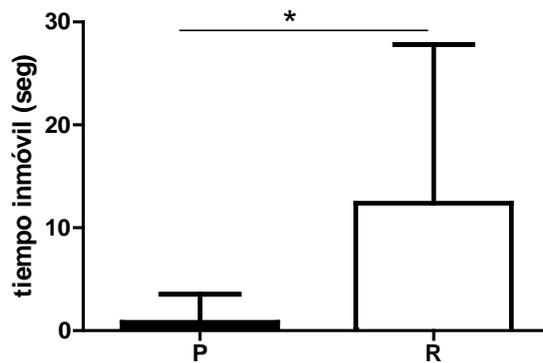


FIGURA 3.8. MEDIA (\pm DE), DE TIEMPO INMÓVIL de individuos P y R en la prueba de alimentación. * $p<0,05$.

CONSISTENCIA DE LAS LÍNEAS A TRAVÉS DE CONTEXTOS

Los resultados del coeficiente de correlación de Spearman de todas las variables en los tres contextos evaluadas separadamente por conducta, muestran en individuos P una alta significancia entre una de las variables de agresividad y alimentación, además muestran significancia entre actividad y agresividad (ver **TABLA 3.4**). Los R muestran significancia entre variables de actividad y alimentación al igual que entre variables de agresividad y alimentación (ver **TABLA 3.5**).

PRUEBA	ACTIVIDAD				AGRESIVIDAD				ALIMENTACIÓN	
	TRANS	VELO	DIST	AUSA	LPEN	MORD	COAGR	CONG	LREA	CONG
ACTIVIDAD										
TRANS	1,00	0,54	0,89* *	-0,15	-0,33	0,52	0,27	-0,15	0,04	0,17
VELO	0,54	1,00	0,50	0,27	-0,22	0,23	-0,16	0,08	0,01	-0,17
DIST	0,89* *	0,50	1,00	0,00	-0,33	0,28	0,41	-0,01	0,21	0,17
AUSA	-0,15	0,27	0,00	1,00	0,55	-0,71* *	-0,55	-0,14	-0,34	0,06
AGRESIVIDAD										
LPEN	-0,33	-0,22	-0,33	0,55	1,00	-0,60	-0,83** **	-0,15	-0,78* *	-0,41
MORD	0,52	0,23	0,30	-0,71* *	-0,60	1,00	0,44	-0,06	0,36	0,06
COAGR	0,27	-0,16	0,41	-0,54	-0,83** **	0,44	1,00	0,02	0,83* *	0,41
CONG	-0,15	0,08	-0,01	0,14	-0,15	-0,06	0,02	1,00	0,21	0,43
ALIMENTACIÓN										
LREA	0,04	0,01	0,21	-0,34	-0,78* *	0,36	0,83** **	0,21	1,00	0,41
CONG	0,17	-0,17	0,17	0,06	-0,41	0,06	0,41	0,43	0,41	1,00

Actividad: Trans (número de transiciones), Velo (cm/seg) (velocidad promedio cm/seg), Ausa (áreas usadas); **Agresividad:** Lpen (seg) (latencia en segundos al primer enfoque), Mord (número de mordiscos), Coagr (comportamientos agresivos), Cong (seg) (tiempo en segundos mostrando congelamiento); **Alimentación:** Lrea (seg) (latencia en segundos para realimentarse), Cong (seg) (tiempo en segundos mostrando congelamiento). Cuadros grises indican consistencias entre contextos.

TABLA 3.4. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN, para los diferentes contextos en individuos P de ambos sexos (asterisco indica relaciones que son estadísticamente significantes entre contextos. *p<0,05; **p<0,01).

PRUEBA	ACTIVIDAD				AGRESIVIDAD				ALIMENTACIÓN	
	TRANS	VELO	DIST	AUSA	LPEN	MORD	COAGR	CONG	LREA	CONG
ACTIVIDAD										
TRANS	1,00	0,36	0,71*	0,15	0,49	0,12	-0,19	-0,54	-0,47	-0,43
VELO	0,36	1,00	0,70*	-0,30	0,45	0,21	0,13	-0,36	-0,55	-0,72*
DIST	0,71*	0,70*	1,00	-0,34	0,59	-0,05	-0,12	-0,62	-0,59	-0,43
AUSA	0,15	-0,30	-0,34	1,00	-0,02	-0,12	-0,17	-0,22	-0,25	-0,26
AGRESIVIDAD										
LPEN	0,49	0,45	0,59	-0,03	1,00	-0,45	-0,74*	-0,82**	-0,77*	-0,45
MORD	0,12	0,21	-0,06	-0,12	-0,45	1,00	0,60	0,65*	0,14	-0,23
COAGR	-0,19	0,13	-0,12	-0,17	-0,74*	0,60	1,00	0,67*	0,53	0,16
CONG	-0,54	-0,36	-0,62	-0,22	-0,82**	0,65*	0,67*	1,00	0,72*	0,42
ALIMENTACIÓN										
LREA	-0,46	-0,55	-0,59	-0,25	-0,77*	0,14	0,53	0,72*	1,00	0,78*
CONG	-0,43	-0,72*	-0,43	-0,26	-0,45	-0,23	0,16	0,42	0,78*	1,00

Actividad: Trans (número de transiciones), Velo (cm/seg) (velocidad promedio cm/seg), Ausa (áreas usadas); **Agresividad:** Lpen (seg) (latencia en segundos al primer enfoque), Mord (número de mordiscos), Coagr (comportamientos agresivos), Cong (seg) (tiempo en segundos mostrando congelamiento); **Alimentación:** Lrea (seg) (latencia en segundos para realimentarse), Cong (seg) (tiempo en segundos mostrando congelamiento). Cuadros grises indican consistencias entre contextos.

TABLA 3.5. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN, para los diferentes contextos en individuos R de ambos sexos (asterisco indica relaciones que son estadísticamente significantes entre contextos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio revelan que *la prueba de toma de riesgo en grupos es una prueba adecuada para evaluar el comportamiento de los individuos a través del tiempo y en diferentes contextos*. La importancia de seleccionar una prueba adecuada que separe a los individuos con diferentes comportamientos es crucial, para no enmascarar los resultados de evaluaciones de la personalidad en el mismo contexto y situación o en diferentes contextos o situaciones (Sih *et al.*, 2004a; Burns, 2008). La toma de riesgo en grupos se ha utilizado con éxito para separar individuos que han

mostrado consistencia en la personalidad en diferentes contextos (Huntingford, 1976), comportamiento y parámetros fisiológicos (Huntingford *et al.*, 2010), comportamiento y tamaño del cuerpo (Brown and Braithwaite, 2004) y para la interpretación de datos moleculares de individuos con diferentes personalidades (Mackenzie *et al.*, 2009).

No existe evidencia en nuestro estudio de que las diferencias en comportamientos observadas a través de contextos en ambas subpoblaciones este relacionada con diferencias en peso, longitud total o el factor de condición de Fulton, como se ha descrito en la literatura para otras especies de peces como por ejemplo en poecillidos (Brown *et al.*, 2007).

CONSISTENCIA EN EL TIEMPO DE LA PERSONALIDAD

En nuestro estudio nosotros no podemos hablar de estabilidad de la conducta de P y R en el tiempo ya que al trabajar con una especie que muestra un comportamiento gregario *shoals*, los peces no permanecieron separados individualmente o pudieron ser marcado con algún tipo de señal que permitiera la identificación individual al momento de realizar la re prueba 10 meses después (Budaev *et al.*, 1999). Sin embargo, los peces de las subpoblaciones P y R mostraron estabilidad en cada contexto y consistencia entre contextos 10 meses después de la primera prueba de toma de riesgo en grupos (re prueba), lo que nos hace pensar que también existe algún tipo de consistencia en el tiempo (Budaev and Zworykin, 2002; Toms *et al.*, 2010). Apoyamos nuestras afirmaciones basadas en los siguientes aspectos:

- (1) *El porcentaje de individuos de la conducta P y R fueron mayores en las subpoblaciones P y R que en PB, cuando se evaluaron en la re prueba 10 meses después,*
- (2) *no existen peces R en la subpoblación P de acuerdo a las latencias de salida del refugio en la re prueba y solo existe un 8% de peces proactivos en la subpoblación R, en la re prueba,*
- (3) *el promedio de la latencia grupal de la subpoblación P es menor que la de PB indicando un alto porcentaje de individuos P, y la latencia grupal de R es mayor que la de PB, indicando un mayor porcentaje de individuos R y*
- (4) *el análisis de la interacción de las subpoblaciones con el tiempo (prueba, re prueba) muestra que las diferencias en latencias se mantiene entre subpoblaciones cuando realizamos la re prueba 10 meses después, además no existe diferencias en las latencias entre la primera prueba y la re prueba en ninguna de los dos grupos conductuales.*

ESTABILIDAD A TRAVÉS DE LOS CONTEXTOS

Las dos subpoblaciones mostraron estabilidad en comportamiento, cuando se evaluaron en diferentes contextos (Budaev and Zworykin, 2002), similares a los descritos en la literatura para el proactivo-reactivo *coping style* (Koolhaas *et al.*, 1999; Réale and Festa-Bianchet, 2003; Korte *et al.*, 2005). Ambas subpoblaciones mostraron variaciones en el comportamiento en las pruebas excepto en la de actividad. En la prueba de actividad una probable explicación de la falta de diferencia puede ser que los individuos durante el periodo de habituación tuvieron acceso a la totalidad del tanque de prueba, familiarizándose con el ambiente nuevo y reduciendo los efectos estresantes del nuevo ambiente al momento de registrar las variables (Leussis and Bolivar, 2006; Steward *et al.*, 2013). Por

otro lado probablemente la falta de diferencia en comportamiento entre ambas conductas esté apoyada por el hecho que el concepto de personalidad indica que el individuo puede reaccionar con patrones alternativos de respuesta (Treit, 1989; Veenema *et al.*, 2005), y en nuestro estudio la evaluación del nivel de actividad se realizó sin confrontar el individuo con un desafío que le otorgara la posibilidad de elegir patrones alternativos de respuesta. Adicionalmente otras limitaciones de carácter técnico impidieron el registro del comportamiento del individuo a nivel vertical. El uso de las diferentes zonas de la columna de agua por el pez cebra se ha utilizado como medida para medir el grado de estrés de los individuos, con individuos más estresados (reactivos), ocupando las zonas del fondo del tanque de prueba y con individuos menos estresados (proactivos), desplazándose por la totalidad de la columna de agua (Barcellos *et al.*, 2007).

La **agresividad** es uno de los componentes más importante que son utilizados para evaluar diferencias entre individuos a nivel de comportamiento (Bakker, 1986; Wilson *et al.*, 1994), y se ha empleado como un patrón de comportamiento para seleccionar líneas genéticas conductuales (Oortmerssen and Bakker, 1981). En nuestro estudio los peces P mostraron altos niveles de agresión cuando se confrontaron con su propia imagen en la prueba del espejo estos resultados son consistentes a los reportes de la literatura para individuos P (Budaev, 1997; Budaev *et al.*, 1999; Moretz *et al.*, 2007a, 2007b; Archard and Braithwaite, 2011; Riebli *et al.*, 2011). Por otro lado los peces R también mostraron comportamientos que se corresponden con los descritos en la prueba del espejo para individuos R, mostrando comportamientos poco agresivos hacia el reflejo de su propia imagen y sobre todo alta inmovilidad lo que en la literatura se denomina comportamiento de congelamiento o “freezing”, característico del individuo reactivo (Templeton and Shriner, 2004; Blaser and Gerlai, 2006; Burn, 2008).

En la **prueba de alimentación** los peces mostraron patrones divergentes de comportamiento, con los peces P reasumiendo la alimentación significativamente más rápido que los peces R. Un patrón similar de comportamiento se ha descrito para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), en donde individuos seleccionados por bajos niveles de cortisol basal (LR), con patrones de comportamiento similares a los peces P, reasumen más rápido la alimentación después de ser sometidos a una situación estresante (Øverli *et al.*, 2002; Øverli *et al.*, 2007; Basic *et al.*, 2012). Los mismos resultados se han reportado en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), de un programa de selección de grupos de familias desarrollado por Norwegian commercial breeding company (Kittilsen *et al.*, 2009). Los peces R pasaron más tiempo mostrando comportamiento de congelamiento, lo que sugiere que las condiciones estresantes les afectan más aunque no representen un riesgo potencial para ellos, lo que posiblemente se relaciona a un mayor reactividad del eje Hipotalamo-pituitaria-interrenal (HPI por sus siglas en inglés) (Koolhaas *et al.*, 1999; Meager *et al.*, 2012). Estos resultados de las diferencias en comportamientos entre contextos pueden tener importantes implicaciones en el campo de la acuicultura en donde las condiciones ambientales generadas por el proceso de producción propician ciertas situaciones como la abundancia de comida que favorecen a individuos con alta agresividad y con mayor disposición a realimentarse después de algún estrés característicos de la conducta P (Mueller and Diamond, 2001).

CONSISTENCIA A TRAVÉS DE CONTEXTOS

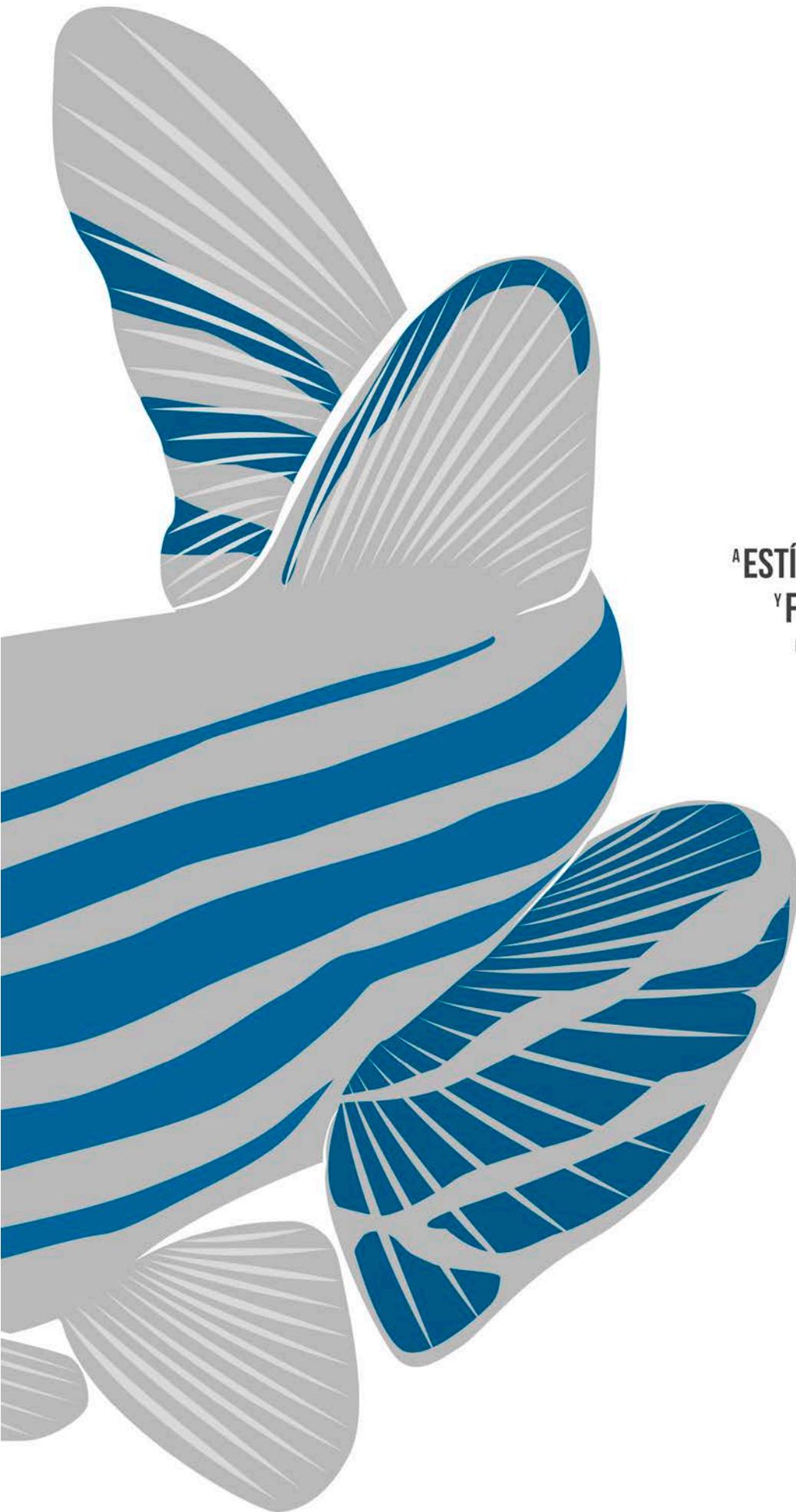
En nuestro estudio mostramos consistencia de la personalidad de ambas subpoblaciones entre contextos. En los peces P existe una correlación positiva significativa ($r=0,83$, $p<0,01$), entre comportamientos agresivos y tiempo para reasumir la alimentación después de una situación estresante. Los

peces R mostraron una correlación positiva mas débil entre agresividad y latencia para reasumir la alimentación ($r=0,72 < 0,05$).

Una relación positiva entre agresividad y latencias para reasumir la alimentación después de una situación estresante en peces se ha reportado en la literatura en poblaciones juveniles no seleccionadas de trucha arco iris (Øverli *et al.*, 2004). Similares resultados fueron encontrados en poblaciones de trucha arco iris seleccionadas por bajos y altos niveles de cortisol (Øverli *et al.*, 2007). Sin embargo en pez cebrá de tres cepas diferentes no se encontró correlación entre agresividad y latencia para reasumir la alimentación (Moretz, *et al.*, 2007a).

Estos resultados sugieren que a pesar de que ambas líneas muestran consistencias a través de diferentes contextos, existen diferencias en la expresión de las consistencias. Los peces P muestran una consistencia mucho más fuerte entre agresividad y latencia para reasumir la alimentación que los peces R, la débil correlación entre contextos mostrada por lo peces R, puede indicar que ajustan su comportamiento a través de los contextos, indicando una mayor plasticidad (Frost *et al.*, 2007). A pesar de no poder evaluar consistencia en el tiempo, nosotros encontramos consistencia a través de los contextos 10 meses después de iniciado el estudio, lo que sugiere consistencia en el tiempo, por lo que nuestros resultados de manera indirecta coinciden con los resultados obtenidos por Carere *et al.*, (2005), en donde las líneas de aves (*Parus major*), seleccionadas conductualmente por lenta exploración mostraron un comportamiento variable a través del tiempo.

En conclusión este es el primer estudio que muestra consistencia de la personalidad en el tiempo y entre contextos en el mismo grupo de individuos en el pez cebrá (D. rerio). Nuestros resultados muestran diferencias entre las dos subpoblaciones en la personalidad. Los peces R de manera general mostraron mayores síntomas de estrés, esto es importante pues en el caso de acuicultura donde existen condiciones que propician el estrés como, altas densidades, diferentes técnicas de manejo y alimentación, individuos que se estresan fácilmente, pueden tener mayor susceptibilidad a las enfermedades y por lo tanto menores tasas de crecimiento (Koolhaas *et al.*, 2007; Koolhaas, 2008, Strand *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010). En cambio los peces P mostraron menos susceptibilidad a las situaciones estresantes, lo que los hace mas apropiados para las condiciones de acuicultura, en donde individuos que reasumen mas rápido la alimentación y son mas agresivos pueden alcanzar mejores tasas de crecimiento (Øverli *et al.*, 2002; Biro and Stamp, 2008) Sin embargo hay que tomar en cuenta que individuos agresivos pueden presentar una mayor tasa de lesiones mecánicas que puedan afectar tasas de crecimiento (Strand *et al.*, 2007). La incorporación de la prueba de toma de riesgo en grupos en los programas de selección empleados en acuicultura puede ser una herramienta apropiada para seleccionar individuos que presenten bajos niveles de estrés, resistencia a enfermedades y altas tasas de crecimiento características económicamente deseables. ***A nivel de las implicaciones ecológicas los resultados de nuestro estudio deben ser tomados con cautela, ya que existen otras variables ambientales que pueden condicionar la consistencia mostrada como puede ser el nivel de depredación, abundancia de recursos y competición*** (Lahti *et al.*, 2002; Dingemans *et al.*, 2009).



**RESPUESTA
A ESTÍMULOS AMBIENTALES
Y FORMACIÓN DE RUTINAS
EN LÍNEAS DE PEZ CEBRA
SELECCIONADAS
POR SU PERSONALIDAD**

4

INTRODUCCIÓN

Los individuos presentan variaciones en las respuestas de comportamiento para afrontar estímulos ambientales; en muchos casos estas variaciones en respuestas son consistentes a través del tiempo y en diferentes contextos o situaciones (Koolhaas *et al.*, 1999; Gosling, 2001; Sih *et al.*, 2004a; Reale *et al.*, 2007), en otros casos no existe tal consistencia, y los individuos son flexibles en sus patrones de respuestas (Briffa *et al.*, 2008; Stamps and Groothuis, 2010). Estos patrones de respuesta tienen importantes implicaciones ecológicas y evolutivas (Johansen *et al.*, 2012; Chapman *et al.*, 2010), que pueden ser ventajosas en algunos contextos y desventajosas en otros (Dall *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2007).

El término ***flexibilidad de comportamiento se define como la habilidad de un individuo para responder directamente y ajustar su comportamiento a estímulos ambientales*** (Coppens *et al.*, 2010). La flexibilidad de comportamiento puede estar determinada por las experiencias previas en el ambiente de crianza (Sinn *et al.*, 2008), o en el momento en que el animal es desafiado (Briffa *et al.*, 2008). La flexibilidad refleja la influencia del estímulo ambiental en el comportamiento mostrado por un individuo (Stamps and Groothuis, 2010). La relación entre flexibilidad de comportamientos con otros rasgos de la personalidad se ha estudiado en diferentes grupos taxonómicos como moluscos (Wilson *et al.*, 2012), reptiles (Carter *et al.*, 2012), insectos (Kralj-Fišer and Schneider, 2012), aves (Dingemanse *et al.*, 2012), mamíferos (Martin and Réale, 2008) y peces (Chapman *et al.*, 2010, Ruiz-Gómez *et al.*, 2011; Heatwole and Fulton, 2013; Adriaenssens and Johnsson, 2013; Sørensen *et al.*, 2013).

Estos patrones de respuesta a estímulos ambientales también se han estudiado en animales modelos provenientes de programas de selección bidireccional o en individuos separados previamente por una prueba de comportamiento. La divergencia en las respuestas ha sido consistente en las líneas de las diferentes especies: por un lado los individuos P prestan poca atención al estímulo ambiental, su respuesta está organizada internamente de forma bastante rígida y son más propensos a desarrollar rutinas. Contrariamente, los individuos R sus respuestas están más condicionadas a estímulos ambientales ajustando sus patrones de comportamiento mostrando mayor flexibilidad (Coppens *et al.*, 2010; Koolhaas *et al.*, 2010). Ratas y ratones machos, provenientes de un programa de selección bidireccional de comportamiento se sometieron a pequeñas variaciones interiores o exteriores del aparato de prueba que modificaban las condiciones ambientales aprendidas durante el proceso de entrenamiento y en ambos grupos los machos P prestaron poca atención al cambio y siguieron normalmente la rutina aprendida, por el contrario los R mostraron respuestas al estímulo ambiental tomando más tiempo en desempeñar las tareas aprendidas (Benus *et al.*, 1990). Así mismo Bolhuis *et al.*, (2004), reportaron que cerdos separados previamente como P y R en *resistance back test* se entrenaron para alimentarse en uno de los brazos de un laberinto T, cuando la zona de alimentación se revertió los cerdos P tenían mayor dificultad en ajustar su comportamiento que los cerdos R. Con estas observaciones la autora sugiere que las respuestas de comportamiento de los cerdos P están basadas en experiencias previas y por lo tanto son más rutinarios.

En el caso de peces, líneas de trucha arco iris seleccionadas por bajo o altos niveles basales de cortisol (LR, HR respectivamente), se han reportado diferencias entre LR y HR en sus respuestas a estímulos ambientales y por lo tanto en el nivel de flexibilidad. Ruiz-Gómez *et al.*, (2011), reportaron diferencias en las latencias para alimentarse cuando los peces se confrontaron con un objeto nuevo o cuando la comida se colocó fuera de la zona de alimentación, la latencia de LR fue baja en presen-

cia del objeto nuevo, pero alta cuando la comida se cambió de posición comparada con HR, por lo que la autora sugiere que LR es más propensa a desarrollar rutinas y por el contrario HR sus respuestas son condicionadas por el estímulo ambiental.

Nuestro laboratorio ha desarrollado un programa bidireccional de selección de líneas de pez cebra por sus personalidades frente a la toma de riesgo en grupos (Mackenzie *et al.*, 2009), el cual muestra patrones de comportamiento similares a los descritos para trucha arco iris seleccionada por sus niveles basales de cortisol. En un estudio anterior (ver **CAPÍTULO 3**) demostramos que existe consistencia en los estilos de afrontamiento de ambas líneas probadas en diferentes contextos, sin embargo la fortaleza de la consistencia fue diferente, P mostró una consistencia mayor que R, lo que parece apuntar a que R presenta mayor flexibilidad en el comportamiento.

Con estos antecedentes nos planteamos como objetivo principal de este estudio investigar si P y R de *D. rerio*, difieren en sus respuestas a estímulos ambientales y en la formación de rutinas, para alcanzar este objetivo nos planteamos las siguientes hipótesis.

Existen diferencias en la flexibilidad del comportamiento entre P y R frente a estímulos ambientales.

Existen diferencias en la capacidad de desarrollar un comportamiento rutinario entre P y R.

Hay diferencia en consistencia entre P y R en diferentes situaciones en un mismo contexto.

MATERIAL Y MÉTODOS

PECES, MANEJO Y ESTABILACIÓN

Se emplearon un total de veinte individuos (N=20), diez de cada personalidad, con una relación hembra macho de 1,5:1. Los peces experimentales provenían de la primera generación del programa de selección bidireccional por personalidades con edades aproximadas de 7 meses. El experimento se desarrolló en la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona. Las condiciones de estabulación, manejo, alimentación, temperatura, concentración de oxígeno, fotoperiodo y control de los parámetros de calidad del agua son las mismas descritas en el **CAPÍTULO 2** de este trabajo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se diseñó para evaluar la respuesta a estímulos ambientales y la formación de rutinas en pez cebra *Danio rerio* previamente seleccionados por su personalidad. Se adaptó de los experimentos realizados en mamíferos de granja (Bolhuis, *et al.*, 2004), roedores (Benus, *et al.*, 1987) y otras especies de peces (Frost *et al.*, 2007, Ruiz-Gómez *et al.*, 2011). Se seleccionaron peces adultos de ambos sexos mayores de 7 meses. Dos semanas antes de realizar el experimento los individuos se separaron por la prueba de toma de riesgos en grupos en tres categorías conductuales, **proactivo (P)**, **intermedio (I)** y **reactivo (R)** (Mackenzie *et al.*, 2009). Los peces I se descartaron en este experimento. Diez peces P y diez de R se estabularon en tanques de vidrio de 20 litros debidamente etiquetados con la categoría conductual correspondiente. Cada tanque se equipó previamente con grava en el fondo, calentadores y un sistema de aireación, igualando las condiciones a los tanques stock. Una semana antes de iniciar el experimento se determinó el sexo (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002; Spence *et al.*, 2006; von Krogh *et al.*, 2010), se pesaron, se registró la longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton (Carlander, 1950; Goetz *et al.*, 2010), de cada uno de los individuos experimentales. El experimento consistió en un periodo inicial de entrenamiento,

donde la mitad de los individuos de cada tipo de personalidad se entrenaron para alimentarse en el lado derecho y la otra mitad en el lado izquierdo del tanque de prueba, suministrando dos comidas al día, consistente en tres larvas de gusanos rojos. Una vez los individuos alcanzaron el correcto desempeño de las tareas de aprendizaje se sometieron a una modificación ambiental introduciendo un objeto nuevo desconocido para ellos en la trayectoria de nado para alimentarse. Después de la exposición al objeto nuevo los individuos se reforzaron con 5 comidas consecutivas, siguiendo el mismo protocolo del periodo de entrenamiento. Finalizado el periodo de refuerzo, la posición de alimentación se revertió durante 6 comidas consecutivas. Durante la totalidad del desarrollo del experimento se evaluaron las mismas variables; latencia para alimentarse, tiempo en el refugio y número de errores cometidos (ver FIGURA 4.1).

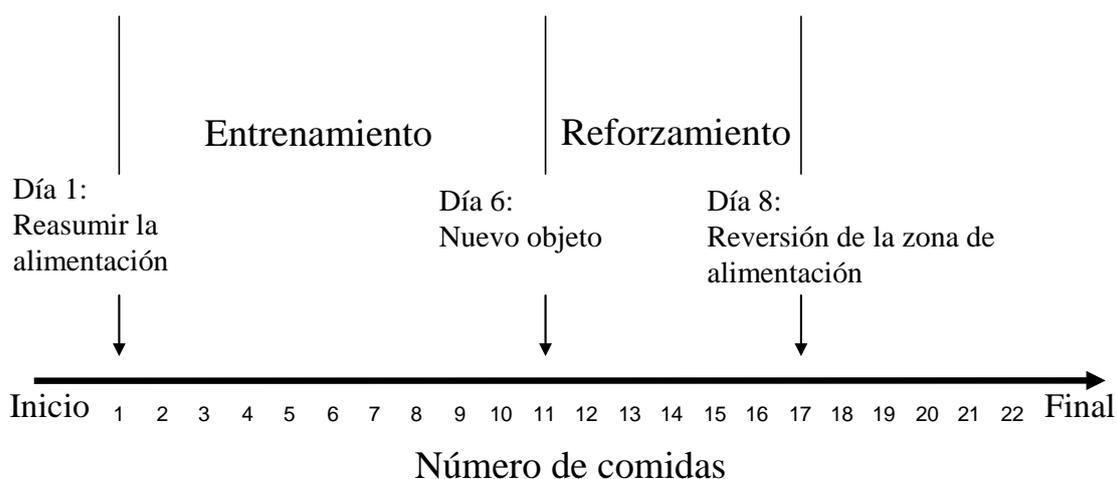


FIGURA 4.1. FLUJO DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL, para establecer respuestas a estímulos ambientales y formación de rutinas en peces P y R.

TOMA DE RIESGO EN GRUPOS

Los peces se separaron por sus estilos de afrontamiento, mediante la prueba de toma de riesgo en grupos siguiendo la misma metodología y criterios descritos en el **CAPÍTULO 2**, para separar por tres categorías de toma de riesgo, P, I y R. Los peces I se descartaron para este experimento.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Diez individuos P y diez R (6 hembras y 4 machos) se pesaron, se registró su longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton para cada uno de ellos. Se estabularon de acuerdo a la personalidad en grupos de ambos sexos, en tanque de vidrio de 20 litros. Se sometieron a un periodo de habituación de una semana para sustituir el pienso seco y húmedo por larvas descongeladas de gusanos rojos (*Chironomid*, Ocean Nutrition®, Esse, Belgium). La temperatura, la concentración de oxígeno y el fotoperiodo se mantuvieron con valores similares a los de los tanques stock.

TANQUE DE PRUEBA

El tanque de prueba consistió en un tanque de plástico gris de 40 litros (ver **FIGURA 4.2**). Internamente se dividió en dos secciones. La primera sección se estableció en uno de los extremos del tanque,

aproximadamente en $\frac{1}{4}$ de su longitud, colocando un separador negro de PVC y un cristal, formando un área de refugio, esta permaneció cubierta durante la totalidad de la prueba. El extremo de la segunda sección del tanque (ambiente nuevo), se dividió en dos secciones, un área abierta y una zona de alimentación establecida en el extremo opuesto al refugio. La zona de alimentación se dividió en una zona derecha y otra izquierda con un separador negro de PVC de 18,5 cm de largo insertado herméticamente al tanque de prueba. Cada una de las zonas de alimentación se equipó con una placa de Petri de 55 milímetros utilizada para colocar el alimento.

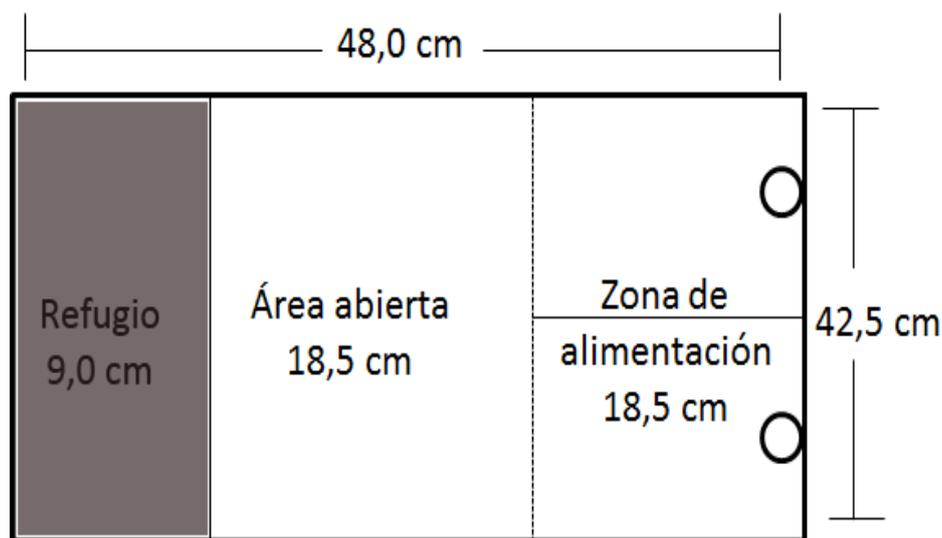


FIGURA 4.2. DIAGRAMA DEL TANQUE EXPERIMENTAL empleado mostrando el área de refugio y las dos subdivisiones del ambiente nuevo formadas por el área abierta y la zona de alimentación. La línea entrecortada marca el inicio de la zona de alimentación, cada zona de alimentación estaba equipada con una placa de Petri.

LATENCIA PARA REASUMIR LA ALIMENTACIÓN DESPUÉS DE UNA SITUACIÓN ESTRESANTE

La primera parte del experimento se diseñó para medir la respuesta de los individuos a un ambiente nuevo (*novel environment test*). Cada pez se evaluó individualmente. Las secuencias de observaciones se realizaron siguiendo una serie alterna en base a la personalidad, iniciando con P seguido de R hasta culminar la totalidad de la prueba. Los individuos de cada personalidad se separaron en dos grupos con igual proporción de sexos. Cada grupo (mitad de los individuos de cada personalidad) se alimentó en la zona derecha o izquierda del tanque. Cada pez se transfirió individualmente del tanque de habituación a la zona de refugio del tanque de prueba. El periodo de habituación se estableció en 10 minutos, periodo que le permitió al pez reducir el estrés de la manipulación. Finalizado los primeros 5 minutos del periodo de habituación el separador negro de PVC se retiró permitiéndole al pez tener contacto visual con el área abierta del tanque. Transcurrido 8 minutos del periodo de habituación, tres gusanos rojos (*Chironomid*) se liberaron con la ayuda de una pipeta Pasteur en la columna de agua de la zona de alimentación asignada, permitiéndole al pez establecer contacto visual con el alimento. Al finalizar el periodo de habituación el separador de cristal se elevó desde atrás a través de un sistema de poleas, iniciando el periodo de prueba de 5 minutos.

Evaluamos la *latencia para reasumir el comportamiento de alimentación* después de una situación estresante, *tiempo de permanencia* en el refugio y el *número de errores* cometidos. La latencia para reasumir la alimentación se definió como el tiempo que el pez tarda en capturar el primer gusano. Tiempo de permanencia en el refugio se definió como el tiempo que el individuo permanece bajo el área cubierta de uno de los extremos del tanque que funciona como refugio durante el periodo de habituación. Un error se definió como el número de veces que el individuo sobrepasa en una longitud de su cuerpo una línea imaginaria trazada al inicio de la zona de alimentación incorrecta. Finalizada la prueba los individuos se transfirieron individualmente a tanques de vidrio de 6 litros (25,5x14x17cm) debidamente etiquetados con la personalidad correspondiente, y la zona de alimentación asignada (derecha/izquierda). La totalidad del agua del tanque de prueba se cambió entre cada prueba, evitando señales químicas que interfieran con el comportamiento del siguiente individuo.

PERIODO DE ENTRENAMIENTO

Todos los peces se alimentaron dos veces al día siguiendo el orden de la primera alimentación. A partir de la segunda alimentación (primer día en la tarde), hasta el final del experimento, el alimento se suministró en la placa de Petri, colocado previamente al momento de transferir el pez al refugio. Sin embargo los peces podían mantener contacto visual con el alimento dentro de la placa Petri al momento que el separador negro es retirado durante el periodo de habituación. El periodo de habituación y prueba son similares a los establecidos en la primera alimentación. Los criterios empleados para definir si los individuos han realizado correctamente el proceso de aprendizaje se estableció de la siguiente manera, que atrapen el primer gusano antes de 10 segundos, y no cometan ningún error para encontrarlo. Durante el periodo de entrenamiento evaluamos las mismas variables registradas durante la observación de reasunción de la alimentación.

OBJETO NUEVO (RESPUESTA A ESTÍMULOS AMBIENTALES)

Finalizado el proceso de aprendizaje los peces se sometieron a una modificación ambiental consistente en la inserción de un objeto nuevo en la trayectoria seguida por los individuos para alimentarse. El objeto nuevo consistió de una figura de Lego® de color rojo (6 x 3 x 2,5 mm, largo, ancho, altura, milímetros), el cual se suspendió en la mitad de la columna de agua, 5 centímetros detrás de la línea imaginaria trazada al inicio de la zona de alimentación. La prueba solo se evaluó durante la alimentación de la mañana. El procedimiento seguido es similar al descrito en el periodo de entrenamiento. Las variables evaluadas son las mismas registradas durante el proceso de entrenamiento. Terminada la sesión el objeto nuevo se retiró y la totalidad del agua se cambió.

PERIODO DE REFUERZO

Una vez el objeto nuevo se retiró los peces se sometieron a un periodo de refuerzo donde se alimentaron siguiendo las condiciones originales que se implementaron durante el periodo de entrenamiento. Las variables registradas son las mismas que se registraron durante el periodo de entrenamiento.

REVERSIÓN DE LA ZONA DE ALIMENTACIÓN (FORMACIÓN DE RUTINAS)

Finalizado el periodo de refuerzo los peces se evaluaron por su capacidad de formar rutinas. La prueba consistió en la reversión de la zona de alimentación. Durante esta prueba a los peces que se entrenaron para alimentarse en la zona derecha, se les colocó el alimento en la zona izquierda y

viceversa. La prueba evaluó el desempeño de los individuos durante 6 comidas consecutivas (tres días). Las variables registradas son las mismas del periodo de entrenamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables evaluadas durante toda la fase experimental se examinaron por la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas para verificar si mostraban una distribución normal. Aquellas variables no normales se normalizaron empleando el logaritmo 10 ($\log_{10}(var+1)$). Las variables con distribución normal se analizaron empleando la prueba de t de Student, aquellas variables que permanecieron con una distribución no normal después de la transformación logarítmica se evaluaron empleando las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney.

RESULTADOS

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

La **TABLA 4.1** con los resultados de la prueba t muestra que los animales P y R seleccionados para realizar el experimento no mostraron diferencias significativas en el peso, longitud total y en el factor de condición de Fulton.

P (N=10)		R (N=10)		
VARIABLE	MEDIA±DE	MEDIA±DE	t	p
Peso	0,798±0,11	0,825±0,12	-0,522	0,607
LT	42,03±0,97	42,47±1,12	-0,947	0,356
K	1,07±0,12	1,07±0,11	-0,007	0,993

TABLA 4.1. MEDIA (± DE) Y RESULTADOS DE LA PRUEBA T de peso (g), longitud total (LT) y factor de condición de Fulton (K), en peces cebra P y R, evaluados por la prueba de toma de riesgo en grupos (asterisco indica diferencias significativas entre P y R.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

LATENCIAS PARA REASUMIR LA ALIMENTACIÓN DESPUÉS DE UNA SITUACIÓN ESTRESANTE

Los resultados muestran que los peces P, reasumieron la alimentación mas rápido, ($t = -4,56$, $p = 0,0002$, $DF = 18$), pasaron menos tiempo en el refugio cuando son confrontados con una nueva situación ($t = -5,47$, $p = 0,00003$, $DF = 18$) y cometieron menos errores para encontrar la comida ($t = -2,56$, $p = 0,019$, $DF = 18$) que los peces R (ver **FIGURAS 4.3, 4.4 y 4.5** respectivamente).

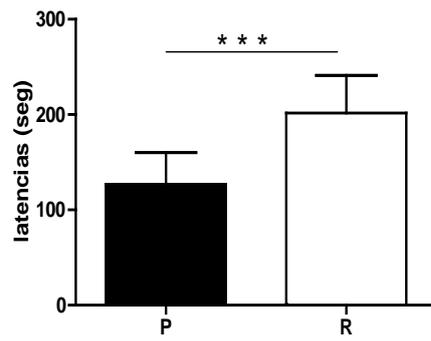


FIGURA 4.3. MEDIA (\pm DE) DE LA LATENCIA EN SEGUNDOS que los individuos P y R tomaron para realimentarse, cuando son confrontados con un ambiente nuevo. *** $p < 0,001$.

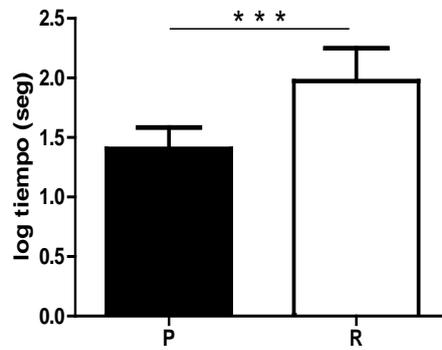


FIGURA 4.4. MEDIA (\pm DE) DEL LOGARITMO DE TIEMPO EN SEGUNDOS que los individuos P y R permanecieron en el refugio, cuando son confrontados con un ambiente nuevo. *** $p < 0,001$.

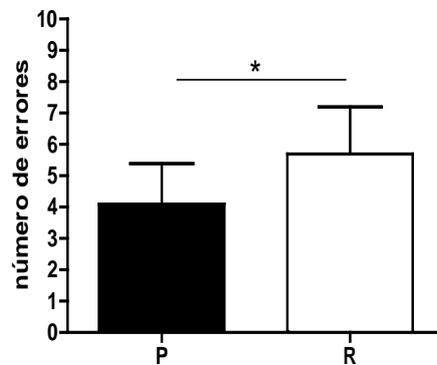


FIGURA 4.5. MEDIA (\pm DE) DEL NÚMERO DE ERRORES que los individuos P y R cometieron, cuando son confrontados con un ambiente nuevo. * $p < 0,05$.

PERIODO DE ENTRENAMIENTO

La FIGURA 4.6 muestra que los peces P tomaron menos tiempo que los peces R en desempeñar correctamente los criterios establecidos para realizar las tareas durante el periodo de aprendizaje ($t = -6,18$, $p < 0,0001$, $DF=18$). En la TABLA 4.2 se muestran los resultados de las latencias para realimentarse, tiempo en el refugio y errores cometidos, durante el periodo de entrenamiento.

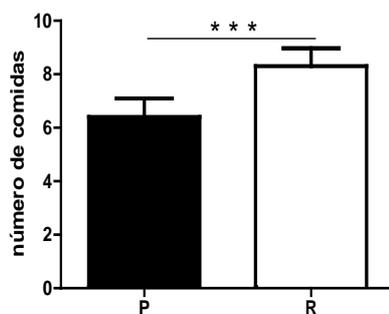


FIGURA 4.6. MEDIA (± DE) DEL NÚMERO DE COMIDAS que los individuos P y R necesitaron para el correcto desempeño de las tareas durante el periodo de entrenamiento, *** $p < 0,001$.

COMIDAS	CONDUCTA	LATENCIA PARA ALIMENTARSE		TIEMPO EN EL REFUGIO		ERRORES	
		Media (± DE)	p	Media (± DE)	p	Media (± DE)	p
1	P	126,9±33,1	p=0,0008	26,4±11,1	P=0,0006	4,1±1,3	p=0,02
	R	201,5±39,6		108,6±57,5		5,7±1,5	
2	P	119,0±23,4	p=0,0001	20,6±6,8	P=0,0001	3,8±1,1	p=0,005
	R	204,6±34,9		123,0±23,7		5,0±0,7	
3	P	79,8±8,9	p=0,0001	20,4±6,4	P=0,0001	1,6±0,5	p=0,000
	R	187,6±44,2		139,0±27,4		4,8±0,6	
4	P	85,1±21,1	p=0,037	27,7±12,9	P=0,0001	2,1±1,1	p=0,57
	R	105,8±19,0		83,2±24,0		2,0±0,7	
5	P	20,6±4,0	p=0,0001	9,4±3,1	P=0,0001	1,6±0,5	p=0,002
	R	120,5±31,2		90,8±37,3		3,3±1,2	
6	P	8,1±1,7	p=0,0001	0	P=0,0001	0,2±0,4	p=0,0007
	R	95,2±25,8		41,4±12,1		1,9±1,1	
7	P	8,3±2,5	p=0,0001	0	P<0,0000	0,1±0,3	p=0,01
	R	21,3±4,0		10,2±3,0		1,1±1	
8	P	7,0±1,3	p=0,876	0	-----	0	p=0,32
	R	7,6±2,6		0		0,1±0,3	

9	P	6,5±1,2	37,50	0	-----	0	45,00
	R	6,1±1,2	p=0,328	0		0,1±0,3	
10	P	5,8±1,0	49,50	0	-----	0	-----
	R	5,9±0,9	p=0,968	0		0	

TABLA 4.2. MEDIA (\pm DE) Y RESULTADOS DE MANN-WHITNEY DE LATENCIA para alimentarse, tiempo en el refugio y número de errores cometidos, por individuos P y R sometidos a un periodo de entrenamiento.

OBJETO NUEVO

La FIGURA 4.7 muestra que los peces R tomaron mas tiempo en alimentarse que los peces P cuando un objeto nuevo se adicionó en la trayectoria seguida por los individuos para alcanzar la zona de alimentación correcta ($t=-3,37$, $p= 0,003$, $DF=18$). Esta respuesta se debe principalmente a que los peces R permanecieron mucho más tiempo en el refugio que los peces P (Mann-Whitney $U= 0,000$ $p= 0,0001$, ver FIGURA 4.8). Sin embargo no existieron diferencias significativas en el número de errores cometidos entre los peces de ambas conductas ($t=-1,88$, $p= 0,075$, $DF=18$).

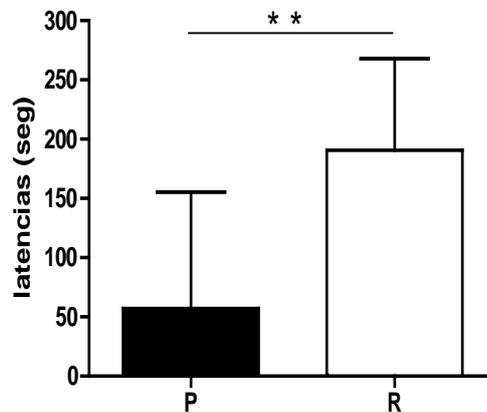


FIGURA 4.7. MEDIA (\pm DE) DE LA LATENCIAS EN SEGUNDOS para encontrar la comida en individuos P y R, confrontados con un objeto nuevo insertado en la trayectoria de alimentación. $**p<0,01$.

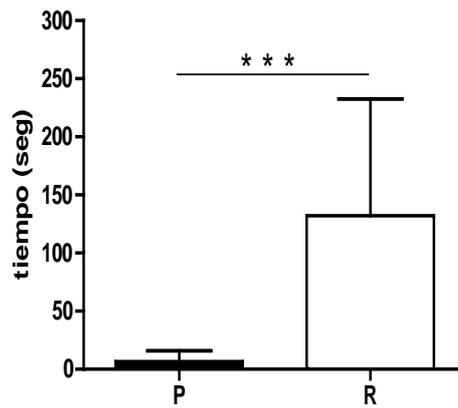


FIGURA 4.8. MEDIA (\pm DE) DEL TIEMPO EN SEGUNDOS que los individuos P y R permanecieron en el refugio cuando se confrontaron con un objeto nuevo insertado en la trayectoria de alimentación. *** $p < 0,001$.

REVERSIÓN DE LA ZONA DE ALIMENTACIÓN

El resultado de la prueba t muestra que no existe diferencia significativa entre P y R cuando la zona de alimentación se revirtió por primera vez ($t=1,55$, $p=0,13$, $DF=18$). La **FIGURA 4.9** muestra que los peces P cometen mas errores para encontrar la comida que los peces R cuando la zona de alimentación se revirtió por primera vez ($t=4,54$, $p=0,0002$, $DF=18$).

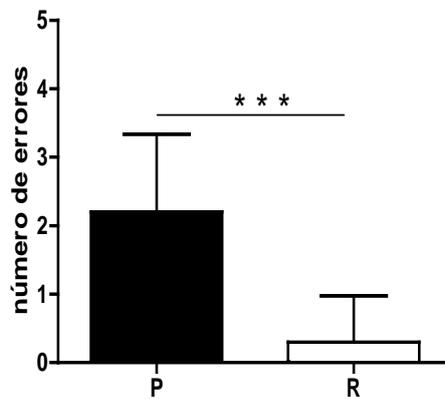


FIGURA 4.9. MEDIA (\pm DE) DEL NÚMERO DE ERRORES COMETIDOS para encontrar la comida en individuos P y R, cuando la zona de alimentación se revirtió por primera vez. *** $p < 0,001$.

Sin embargo los resultados muestran que los peces R permanecieron mucho más tiempo en el refugio que los peces P, cuando se revirtió la zona de alimentación ($t= -3,69$, $p= 0,001$, $DF= 18$, ver **FIGURA 4.10**).

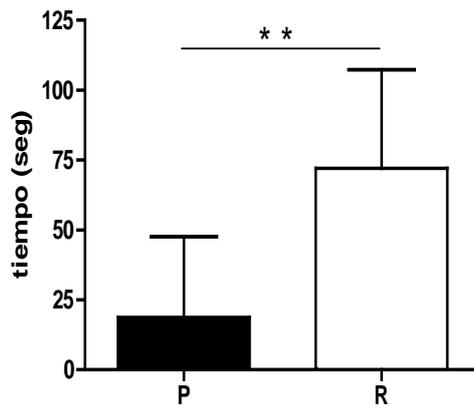


FIGURA 4.10. MEDIA (\pm DE) DEL TIEMPO EN SEGUNDOS que los individuos P y R, permanecen en el refugio cuando la zona de alimentación se revirtió por primera vez. ** $p < 0,01$.

La **FIGURA 4.11** muestra que los peces P demoraron más tiempo en alcanzar el correcto desempeño de las tareas de aprendizaje establecidas durante el periodo de entrenamiento que los peces R cuando la zona de alimentación se revirtió (Mann-Whitney $U = 2,500$ $p = 0,0003$).

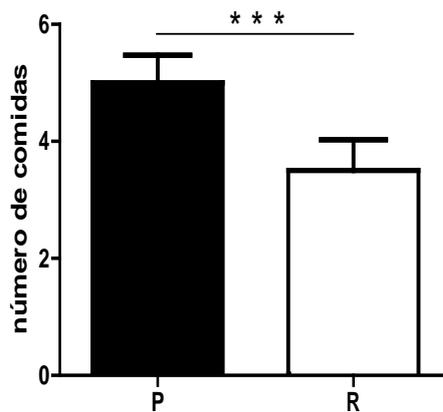


FIGURA 4.11. MEDIA (\pm DE) DEL NÚMERO DE COMIDAS NECESARIAS en individuos P y R, para alcanzar igual desempeño de las tareas que durante la fase de entrenamiento, después de revertir la zona de alimentación. *** $p < 0,001$.

CONSISTENCIA DE LAS LÍNEAS A TRAVÉS DE SITUACIONES

Los resultados del coeficiente de correlación de Spearman de todas las variables en las tres situaciones evaluadas en un mismo contexto muestran que existen diferencias entre P y R. Los peces P muestran correlaciones negativas entre el objeto nuevo y la latencia para alimentarse cuando la posición de la comida se revirtió (ver TABLA 4.3). Por el contrario los peces R no mostraron ninguna correlación entre las tres situaciones evaluadas (ver TABLA 4.4).

PRUEBA	ALIMENTACIÓN			OBJETO NUEVO			REVERSIÓN		
	LA	TR	E	LA	TR	E	LA	TR	E
ALIMENTACIÓN									
LA	1,00	-0,09	-0,60	-0,03	0,15	0,13	-0,04	-0,43	-0,43
TR	-0,09	1,00	-0,36	0,03	0,01	0,07	0,37	0,42	0,27
E	-0,60	-0,36	1,00	-0,27	-0,42	-0,39	-0,02	0,25	0,08
OBJETO NUEVO									
LA	-0,03	0,03	-0,27	1,00	0,89***	0,87**	-0,72*	0,44	-0,52
TR	0,15	0,01	-0,42	0,89***	1,00	0,98***	-0,71*	0,33	-0,58
E	0,13	0,07	-0,39	0,87**	0,98***	1,00	-0,69*	0,38	-0,53
REVERSIÓN									
LA	-0,04	0,37	-0,02	-0,72*	-0,71*	-0,69*	1,00	-0,19	0,52
TR	-0,43	0,42	0,25	0,44	0,33	0,38	-0,19	1,00	-0,23
E	-0,43	0,27	0,08	-0,52	-0,58	-0,53	0,52	-0,23	1,00

VARIABLES EVALUADAS EN CADA UNO DE LAS SITUACIONES: LA=latencia para alimentarse (seg); TR=tiempo en el refugio (seg); E=número de errores cometidos. Cuadros grises indican consistencias entre situaciones.

TABLA 4.3. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN, para las diferentes situaciones en individuos P de ambos sexos (asterisco indica relaciones que son estadísticamente significantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

PRUEBA	ALIMENTACIÓN			OBJETO NUEVO			REVERSIÓN		
	LA	TR	E	LA	TR	E	LA	TR	E
ALIMENTACIÓN									
LA	1,00	0,67*	-0,11	0,28	0,34	-0,22	-0,16	0,26	-0,58
TR	0,67*	1,00	-0,33	0,01	-0,03	-0,11	0,12	-0,01	0,02
E	-0,11	-0,33	1,00	0,03	0,04	0,57	-0,04	0,42	-0,29

OBJETO NUEVO									
LA	0,28	0,01	0,03	1,00	0,97***	-0,49	-0,34	0,13	-0,54
TR	0,34	-0,03	0,04	0,97***	1,00	-0,52	-0,35	0,13	-0,62
E	-0,22	-0,11	0,57	-0,49	-0,52	1,00	0,39	0,25	0,20
REVERSIÓN									
LA	-0,16	0,12	-0,04	-0,34	-0,35	0,39	1,00	0,52	0,46
TR	0,26	-0,01	0,42	0,13	0,13	0,25	0,52	1,00	-0,37
E	-0,58	0,02	-0,29	-0,54	-0,62	0,20	0,46	-0,37	1,00

Variables evaluadas en cada uno de los contextos: **LA**=latencia para alimentarse (seg); **TR**=tiempo en el refugio (seg); **E**=número de errores cometidos. Cuadros grises indican consistencias entre situaciones.

TABLA 4.4. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN, para las diferentes situaciones en individuos R de ambos sexos (asterisco indica relaciones que son estadísticamente significantes usando. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Nuestro estudio muestra que los peces P y R reaccionan con patrones opuestos de respuesta y muestran diferencias en flexibilidad frente a estímulos ambientales similares a los reportados para roedores (Koolhaas *et al.*, 1999; Korte *et al.*, 2005), animales de granja (Bolhuis *et al.*, 2004) y otras especies de peces (Ruiz-Gómez *et al.*, 2011).

En nuestro estudio previo (ver **CAPÍTULO 3**) los peces P reasumieron la alimentación más rápido cuando fueron confrontados con una nueva situación. Resultados similares se reportaron en líneas de trucha arco iris, donde los peces LR reasumen más rápido la alimentación después de una situación estresante (Øverli *et al.*, 2005). Sin embargo en nuestro estudio anterior los peces no tenían acceso a un área de refugio que le brindara al individuo la oportunidad de poder reaccionar con patrones alternativos de respuestas (Treit, 1989; Veenema *et al.*, 2005). En nuestro diseño actual nosotros le otorgamos la oportunidad de elegir entre salir a alimentarse o permanecer en la seguridad que le brinda el refugio, el comportamiento mostrado por ambas líneas es similar al del estudio anterior, donde los peces P reasumieron la alimentación más rápido, permanecieron menos tiempo en el refugio y cometieron menos errores cuando se expusieron a una nueva situación. En ambos estudio las latencias para reasumir la alimentación no estuvo condicionada por diferencias en peso, longitud o factor de condición de Fulton que puedan sugerir diferencias en tasas metabólicas en reposo (Biro and Stamp, 2008, 2010; Martins *et al.*, 2011).

Posiblemente las diferencias mostradas entre ambas líneas en las latencias para realimentarse después de una situación estresante, estén asociadas a la percepción de la nueva situación (Tong, 2010). Los peces R mostraron síntomas de mayor estrés, con patrones de comportamientos como neofobia, reducida exploración y miedo, característicos de una alta activación del eje HPI (Budaev, 1997; Budaev and Zhuikov, 1998; Koolhaas *et al.*, 1999; Brown and Braithwaite, 2005; Thomas *et al.*, 2010; Meager *et al.*, 2012).

PERIODO DE ENTRENAMIENTO

De forma general los peces P alcanzaron el correcto desempeño de las tareas más rápido que los peces R durante el periodo de entrenamiento. Los peces P mostraron una reducción paulatina entre cada comida en la latencia para alimentarse, el tiempo en el refugio y el número de errores cometidos; por el contrario los peces R mostraron reducciones seguidas muchas veces de incrementos de las latencias para alimentarse, principalmente debido a una mayor permanencia en la zona de refugio. Esto pareciera indicar que existen diferencias cognitivas temporales en la forma de desempeñar el aprendizaje entre P y R; en la literatura se ha establecido asociaciones entre el nivel cognitivo, neuroendocrino y de comportamiento en líneas de trucha arco iris (Moreira *et al.*, 2004), también en *Poecilia reticulata* se encontró una relación positiva entre machos previamente seleccionados como atrevidos y el desempeño de una tarea asociativa de aprendizaje (Dugatkin and Alfieri, 2003). Sin embargo nosotros no podemos hablar de diferencias en el aprendizaje, ya que en nuestro estudio todos los peces fueron capaces de desempeñar correctamente las tareas durante el periodo de entrenamiento y después del primer desafío con el objeto nuevo no existió diferencia entre las líneas en las latencias para alimentarse.

OBJETO NUEVO

El correcto desempeño de las tareas aprendidas durante la fase de entrenamiento se alteró dramáticamente en los peces R cuando se confrontaron con un estímulo ambiental en este caso un objeto nuevo colocado en la ruta seguida por los individuos para alimentarse, en tanto los peces P, mostraron menos signos de ser afectados por el estímulo ambiental. En el estudio actual la mayor latencia para alimentarse en los peces R está influenciada por un mayor tiempo de permanencia en el área refugio lo que probablemente muestra que los individuos tenían la capacidad de evaluar la nueva situación como potencialmente peligrosa para ellos, sugiriéndonos que las respuestas de comportamiento de R estuvieron relacionadas a la exposición al estímulo ambiental. Además nosotros apoyamos nuestra sugerencia en el hecho de que no existieron diferencias en el número de errores cometidos entre P y R, señalando que los peces R tenían contacto visual con el objeto nuevo desde la seguridad que les brindaba el refugio antes de tomar el riesgo de ir a alimentarse, esto se reportó en la literatura en donde algunos autores sugieren que las respuestas en comportamiento puede ser expresada por la magnitud con que cada individuo percibe y reacciona al estímulo ambiental (Dadda *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008; Tong, 2010).

Resultados similares mostrada por nuestras líneas conductuales se han reportado en otras especies de peces, en trucha arco iris de dos líneas (HR y LR), después de tener desempeños similares en el periodo de entrenamiento, HR tomaron más tiempo en alimentarse que LR cuando se confrontaron con un objeto nuevo (Ruiz-Gómez *et al.*, 2011). En mamíferos de laboratorio también se han encontrado resultados similares, en ratones domésticos (*Mus musculus*) individuos seleccionados por una corta latencia de ataque (SAL), con patrones de comportamiento similares a P, no mostraron respuestas a estímulos ambientales colocado dentro del tanque de prueba. Contrariamente ratones de larga latencia de ataque (LAL), mostraron cambios en los patrones de comportamiento similares a los mostrados por los peces R en el estudio actual (Benus *et al.*, 1991).

REVERSIÓN DE LA ZONA DE ALIMENTACIÓN

A pesar de que los peces P y R no mostraron diferencias en las latencias para encontrar la comida cuando se revirtió la zona de alimentación por primera vez, hubo diferencias en el tiempo de permanencia en el refugio y el número de errores cometidos que sugieren diferencias en la disposición a formar rutinas entre las dos líneas. El mayor número de errores cometidos por los individuos P para encontrar la comida, sugiere que en individuos con este tipo de personalidad una vez aprendidas una tarea mantiene el mismo patrón de comportamiento, sugiriendo probablemente el desarrollo de rutinas. Nuestras afirmaciones se apoyan en dos observaciones del patrón de comportamiento adoptado por los peces P:

(1) *A pesar que la comida era visible en la nueva posición los peces P continuaron buscándola en el lugar donde se entrenaron mostrando un comportamiento rutinario y*

(2) *los peces P permanecieron menos tiempo en el refugio que los peces R, indicando que los individuos P no respondieron al estímulo ambiental (cambio de posición de la comida), a pesar de que era visible. Por el contrario los peces R fueron mas propensos a evaluar el estímulo, demoraron más tiempo en el refugio evaluando la nueva situación en este caso la nueva posición de la comida, una vez el nuevo estímulo se identificó como una presa y que no representaba una amenaza procedieron a alimentarse, situación que se refleja por el menor número de errores cometidos.*

Resultados similares se han reportado en ratones en donde individuos con un comportamiento P cometieron un mayor número de errores para encontrar la nueva posición de la comida que individuos R, cuando se produce una modificación ambiental (Benus *et al.*, 1990). En animales de granja como el caso de cerdos seleccionados como P en la prueba de resistencia (*resistance back test*), cometieron más errores para encontrar la comida cuando se revirtió de posición en el brazo opuesto del laberinto T que cerdos R (Bolhuis *et al.*, 2004). En peces, Ruiz-Gómez *et al.*, (2011), no encontraron diferencias entre HR y LR cuando la comida se revirtió al brazo opuesto de su aparato de prueba sin embargo cuando la comida se colocó en el área abierta en donde era visible los peces LR demoraron más tiempo para encontrarla, a pesar que nadaban sobre ella, mientras que los peces HR identificaron la nueva posición ajustaron su comportamiento aprendido encontrando la comida rápidamente.

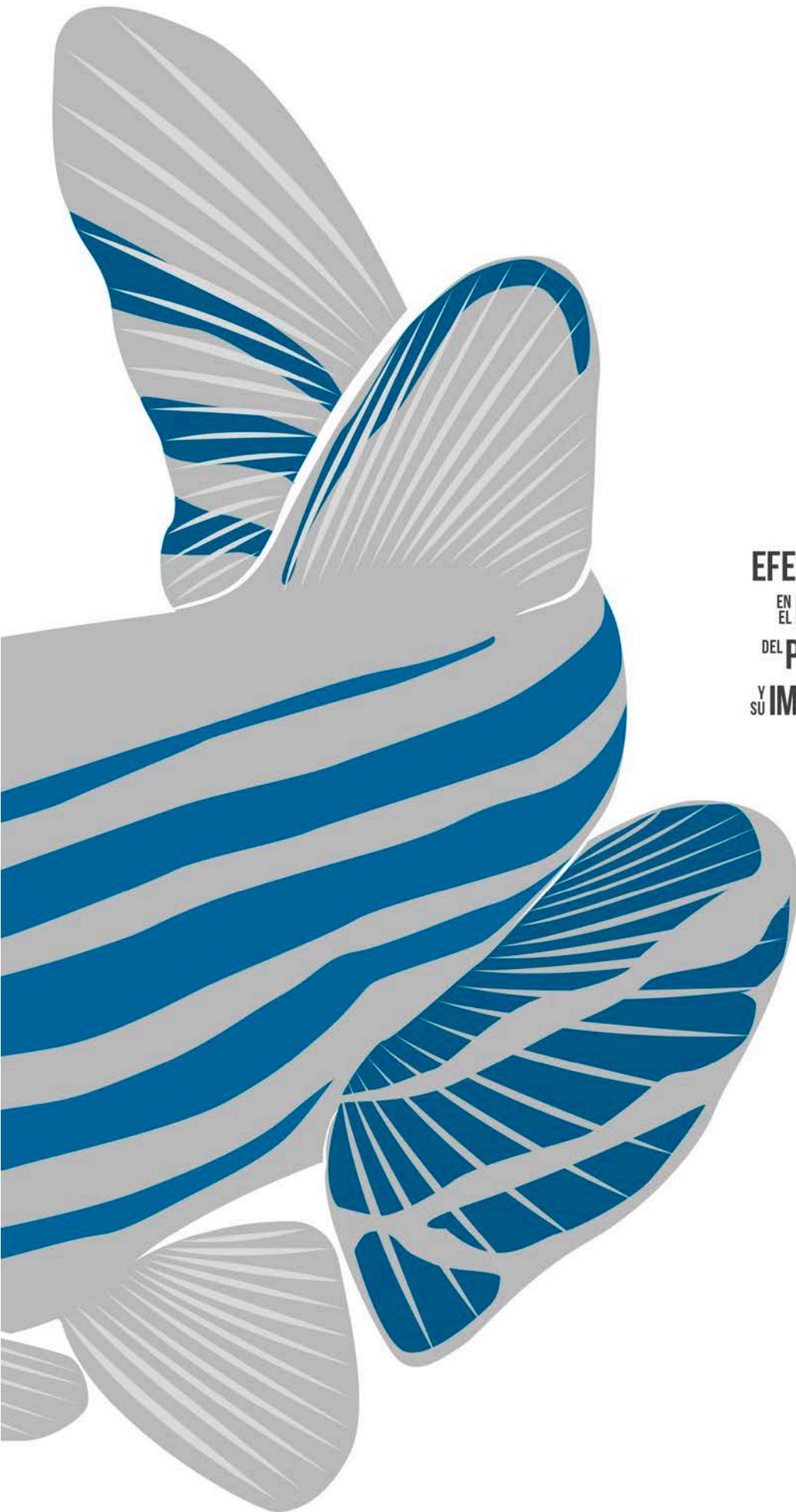
Otra diferencia mostrada por las líneas se observó cuando la posición de la comida es revertida a la zona contraria, en este caso los peces P demoraron mucho más tiempo en ajustar su comportamiento (número de comidas), insistentemente buscaban la comida en la zona donde habían sido entrenados, por el contrario los peces R se adaptaron más rápido a la nueva posición, este resultado es similar al reportado en ratones en donde el fotoperiodo se revirtió y los individuos P les tomo más tiempo ajustarse al nuevo horario, por el contrario los individuos R se ajustaron inmediatamente a la nueva situación (Benus *et al.*, 1988).

CONSISTENCIA DE LAS LÍNEAS

En el estudio actual nosotros mostramos consistencia de la personalidad de los peces P frente a diferentes situaciones en un mismo contexto, los resultados muestran *correlaciones negativas significantes entre las variables observadas cuando se introdujo un objeto nuevo y la latencia para*

alimentarse cuando la comida se revirtió de posición ($p < 0,05$). Estas correlaciones mostradas por los peces P son importantes pues ***demuestran la incapacidad de modificar un comportamiento una vez aprendido con mayor predisposición al desarrollo de rutinas***, por el contrario los peces R a pesar de haber aprendido el correcto desempeño de sus tareas, se mostraron mas propensos a reaccionar a los estímulos ambientales ajustando sus patrones de comportamiento, por lo tanto mostrando una mayor flexibilidad. Estos resultados están en línea con los reportados en *Parus major*, en donde los autores sugieren que los individuos de rápida exploración con patrones de comportamiento similares a los peces P mostraron mayor consistencia en sus comportamientos y por lo tanto desarrollaron comportamientos rutinarios que los individuos de lenta exploración, similares en nuestro estudio a los peces R (Verbeek *et al.*, 1994).

En conclusión nosotros mostramos diferencias en como individuos D rerio seleccionados por sus personalidad en nuestro programa de selección bidireccional responden a estímulos ambientales y su predisposición a desarrollar flexibilidad de comportamiento. Los peces P mostraron patrones de comportamientos mas repetitivos una vez aprendida una tarea, similares a los descritos en otras especies (Koolhaas, *et al.*, 1999; Sih *et al.*, 2004, Ruiz-Gómez *et al.*, 2011), sugiriendo que en esta línea las experiencias previas adquiridas determinan el estilo de afrontamiento adoptado posteriormente frente a un desafío, sugiriendo una mayor predisposición al desarrollo de rutinas (Koolhaas *et al.*, 2010). Por el contrario los peces R mostraron respuestas de comportamiento asociadas al estímulo ambiental presente, ajustando sus comportamientos de acuerdo a la situación sugiriendo una mayor predisposición a mostrar flexibilidad de comportamientos (Benus *et al.*, 1991; Koolhaas *et al.*, 1999, Koolhaas *et al.*, 2010).



EFEECTO ^{DE LA} PERSONALIDAD
EN EL ÉXITO REPRODUCTIVO
DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)
Y SU IMPORTANCIA ^{EN LA} FITNESS
DE LA ESPECIE

5

INTRODUCCIÓN

La variación en comportamientos entre individuos de una población frente a cambios ambientales esta ampliamente documentada (Wilson, 1998, Frost *et al.*, 2007, Korte *et al.*, 2005). Estas variaciones individuales se ha descrito en varias especies de peces (Sneddon, 2003; Bell, 2005; Martins *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010). También se ha reportado que las variaciones individuales en comportamiento son estables (Dall *et al.*, 2012), y se describen en la literatura con diversos nombres como personalidad animal (Gosling and John, 1999), síndromes de comportamiento (Sih *et al.*, 2004a), temperamento (Réale *et al.*, 2007), y estilos de afrontamiento (*coping styles*) (Koolhaas *et al.*, 1999).

Varios términos son empleados para categorizar los extremos de la variación en personalidad, nosotros en el presente estudio utilizaremos los términos proactivo-reactivo (P-R), *coping style*. **Los individuos P se caracterizan por mostrar comportamientos consistentemente más agresivos**, tomar más riesgos, ser más insensibles a cambios ambientales, formar rutinas, prosperar en ambientes estables ricos en recursos con altas densidades, reproducción temprana y **sus niveles de cortisol basal son bajos**. En cambio **los individuos R muestran patrones de comportamiento opuestos a los descritos para los individuos P y sus niveles basales de cortisol son altos** (Korte *et al.*, 2005; Stamps, 2007; Jones and Godin, 2010; Koolhaas *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011).

Los rasgos de personalidad utilizados por el individuo para afrontar con las diferentes variaciones ambientales tienen implicaciones directas en su eficacia biológica o *fitness* (Drent *et al.*, 2003; Koolhaas *et al.*, 2010). En algunas especies se ha mostrado la relación de la conducta con la *fitness*, como el caso de ovejas de cuerno largo (*Ovis canadensis*) en donde el comportamiento de individuo atrevido *bold* correlaciona positivamente con una mayor supervivencia en tiempos de alta presión de predación (Réale and Festa-Bianchet, 2003). Igualmente en estudios realizados con líneas conductuales de aves (*Parus major*), se encontró que una rápida exploración esta relacionada positivamente con la agresividad y la competencia, y sus consecuencias a nivel de la *fitness* se refleja en una mayor supervivencia anual de los adultos (Verbeek *et al.*, 1999; Dingemanse *et al.*, 2004). En peces existe poca literatura que examine la relación de la personalidad con la *fitness* de la especie (Dugatkin, 1992; Godin and Davis, 1995; Ariyomo and Watt, 2012). Además existen evidencias de que la personalidad esta relacionada a éxitos reproductivos, y otros rasgos relacionados como la supervivencia de las crías. La idea general es que individuos P muestran un mayor éxito reproductivo y mejores tasas de crecimiento que individuos R (Both *et al.*, 2005; Réale *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Niemelä *et al.*, 2013).

El pez cebra es un pequeño ciprínido originario del Sur de Asia, y se encuentran ampliamente distribuidos en India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistan (Lawrence, 2007). Su reproducción en la naturaleza esta asociada al monzón, sin embargo bajo condiciones de laboratorio se reproduce durante todo el año (Spence and Smith, 2006). Los artículos relacionados con ciertos parámetros reproductivos en esta especie son variados (Spence *et al.*, 2008). Sin embargo variables como el tamaño de puestas en hembras se ha relacionado con intervalo entre puestas, edad y tamaño de la hembra (Eaton and Farley, 1974; Spence and Smith, 2006; Uusi-Hiekkilä *et al.*, 2012). En la literatura existe solo un artículo (trabajo) que relaciona aspectos de la personalidad con éxitos reproductivos en peces cebras machos (Ariyomo and Watt, 2012). A pesar de la importancia del pez cebra en diferentes campos de la investigación poco se conoce del efecto que tiene la personalidad en los éxitos reproductivos y el crecimiento larvario.

Por la tanto nosotros nos planteamos como objetivo principal de este estudio evaluar el efecto que la personalidad de hembras y machos tiene en el éxito reproductivo. Un segundo objetivo es investigar si la personalidad de los padres tiene un papel en la supervivencia y el crecimiento larvario de las crías. Para resolver los objetivos nosotros nos planteamos las siguientes hipótesis.

Individuos con personalidad P y R tienen estrategias reproductivas diferentes.

Los individuos P tienen un mayor éxito reproductivo que los individuos R.

La personalidad parental tiene un efecto en el desempeño de las crías.

Las crías de padres P muestran una mejor fitness que las crías de padres R.

Existen diferencias entre los fenotipos de color (WT-UAB/WT-I) en individuos de una misma personalidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

REPRODUCTORES, ESTABULACIÓN Y MANEJO

Los reproductores (*D. rerio*), empleados para desarrollar este experimento fueron adultos entre 10 y 12 meses de edad, provenientes de nuestro programa genético de selección de líneas por personalidad, crecidos en nuestro laboratorio. Se utilizó la generación G1, de ambos fenotipos. Un total de 6 familias P y 5 familias R, del fenotipo WT-UAB, generados de una puesta en masas de sus progenitores G0 y 4 familias P y R generadas de una reproducción en parejas siguiendo un esquema de reproducción en familias del fenotipo WT-I, se emplearon para desarrollar este experimento. Las parejas de cada línea conductual del fenotipo WT-UAB se asignaron al azar después de la selección por personalidad realizada en la generación G1, mientras que las parejas de cada línea conductual del fenotipo WT-I son hermanos completos provenientes del programa de selección de familias por personalidad realizado desde la G0 (ver **CAPÍTULO 2**). Dos semanas antes del inicio de la reproducción cada individuo de cada pareja se estabuló en tanques de metacrilato de 1,3 litros (14,0 alto; 26,5 superior; 21,5 fondo, 5,4 ancho cm) ordenados en estanterías en una sala con ambiente controlado ubicada dentro del acuario de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España. El sistema de alimentación se modificó, a partir del día 15, previo al inicio de la reproducción y se mantuvo durante el desarrollo del experimento, adicionando un tercer suministro de alimento al mediodía, de acuerdo a la siguiente programación: mañana alimento húmedo, mediodía y tarde con alimento seco, siguiendo las recomendaciones de la casa proveedora (ZfBio-labs®, ver www.zfbio-labs.com). Adicionalmente con la finalidad de mejorar la calidad de las puestas, dos veces por semana durante todo el desarrollo del experimento los reproductores recibieron raciones extras de artemia (*Artemia sp.*, Ocean Nutrition®, Esse, Belgium).

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA Y FOTOPERIODO

El suministro de agua se realizó con agua de grifo previamente (filter cartidge CTO®, Water Quality Association, Lisle, IL, USA). El estante en donde se alojaron los reproductores esta equipado con un sistema cerrado de recirculación con un sistema de filtración física y biológica. Semanalmente se recambió el 30% del volumen de agua de cada estante. La temperatura del agua se mantuvo en $28,00 \pm 1,00^\circ\text{C}$, las concentraciones de oxígeno se mantuvieron en $5,47 \pm 0,26$ mg/L, ambas mediciones se realizaron diariamente con un oxímetro (OxyGuard®, Handy Polaris, OxyGuard International, Denmark). Adicionalmente se realizaron controles semanales de Amoniaco, Nitrito, Nitrato y

pH (Sera Test Kit®, New Tech, Watlington, Kent, UK). El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 14:10 (0600-2000 horas).

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Este experimento se diseñó para evaluar el efecto de la personalidad en el éxito reproductivo y la supervivencia larvaria en *D. rerio*, como medida de fitness. Se emplearon reproductores G1 de los dos fenotipos (WT-UAB, WT-I). El experimento contó con 10 parejas de P y 9 parejas de R, de las cuales 6 parejas de P y 5 de R correspondieron al fenotipo de color WT-UAB, el resto correspondió al fenotipo WT-I. Dos semanas antes de iniciar el experimento se pesaron, se registró la longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton de cada uno de los individuos experimentales. Cada pareja realizó tres puestas exitosas durante el ensayo. Cada puesta exitosa se incubó en medio E3 en placas de Petri. Al finalizar la fase embrionaria se evaluó la supervivencia de cada una de las familias. La fase larvaria de la progenie G2 también se evaluó para ver el efecto de la personalidad de los padres en el desempeño de las crías. Nosotros registramos la supervivencia y el crecimiento (longitud total), en las larvas de cada una de las familias en la G2. Mayores detalles serán proporcionados en cada uno de los apartados correspondientes.

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

Quince días antes de iniciar el estudio a cada uno de los reproductores se les registró el peso, la longitud total y se determinó el factor de condición de Fulton (Carlander, 1950; Goetz *et al.*, 2010). Se estabularon individualmente en tanque trapezoidales de metacrilato de 1,3 litros y se modificó el sistema de alimentación.

PUESTAS

Las puestas se iniciaron en el mes de abril de 2011, empleando 2 tanques de vidrio de 6 litros con dimensiones de (25,5x14x17cm). Se utilizó un tanque para la alimentación y el otro para la puesta. Ambos tanques se etiquetaron debidamente con la clave del fenotipo, personalidad y familia respectivamente. Cada tanque de puesta contenía una paridera flotante (15x10x10 cm), equipada con canicas simulando un sustrato para estimular la puesta. La temperatura se fijó en 28°C, y el ciclo de luz-oscuridad se estableció en 14:10 horas. En la tarde a las 1500 horas cada tanque de puesta se llenó con 5 litros de agua, se colocó dentro de cada tanque una paridera previamente equipada con canicas. Entre las 1700-1800 horas, cada familia compuesta de 1 macho y 1 hembras se colocó dentro del tanque de puesta, colocando una tapa en el tanque para evitar que los individuos saltasen fuera. En la mañana cada grupo de reproductores de cada familia se transfirió al tanque de alimentación y se le suministró la primera comida, las parejas que no realizaron puestas exitosas permanecieron en el tanque de alimentación hasta el siguiente cruce, aquellas parejas que realizaron puestas exitosas se transfirieron individualmente, a su tanque stock y se dejaron descansar por 7 días. El horario de alimentación durante el periodo de puestas es el mismo empleado durante las dos semanas previas a el inicio de los apareamientos, en donde la última comida se suministró a las 1500 horas con la finalidad que los individuos excretaran la mayor cantidad posible antes de ser transferidos al tanque de puesta. En la tarde a las 1700 horas cada pareja se transfirió al tanque de puesta, dejados durante la noche.

RECOLECCIÓN, LIMPIEZA Y MANEJO DE LAS PUESTAS

Después de transferir las parejas de reproductores de cada familia del tanque de puesta al tanque de alimentación, las parideras se retiraron y examinaron para ver la presencia de huevos. Los huevos se

extrajeran vertiendo medio E3 (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002), con la ayuda de una botella a presión y se recolectaron en una malla fina para acuario, realizando tres lavados consecutivos empleando el medio E3. Posteriormente los huevos se transfirieron dentro de una placa de Petri de 140 mm. Con la ayuda de una pipeta Pasteur de 3 ml, cualquier residuo de comida o heces se retiró. Se registró el conteo del número total de huevos puestos. Aquellos huevos con malformaciones o alguna coloración opaca fueron eliminados, después de realizar el conteo total. Los huevos limpios se transfirieron a una placa de Petri de 95 mm, conteniendo medio E3, etiquetada con los mismos datos del tanque de puesta y dejados por 24 horas para verificar la viabilidad de las puestas. En la mañana del día siguiente se eliminaron los huevos infértiles y se registró este dato correspondiente a la viabilidad de las puestas 1 día post-fertilización (1dpf). Los huevos fértiles de cada familia se colocaron en grupo de 30 en una placa de Petri de 55 mm, conteniendo medio E3, etiquetada con los datos de la familia. La temperatura se mantuvo en 28°C. y el ciclo de luz oscuridad en 14:10 horas.

VARIABLES ANALIZADAS

Una puesta se consideró exitosa si más de 30 embriones fertilizados se observaron 2-4 horas posteriores al amanecer. La tasa de puestas se definió como el número de puestas exitosas dividido por el número total de pares cruzados dentro de cada categoría conductual multiplicado por 100 (Monson and Sadler, 2010; Castranova *et al.*, 2011). Promedio de tamaño de puestas exitosas se definió como el número promedio de embriones viables producidos en cada una de las puestas exitosas. Porcentaje de viabilidad se calculó como el número de embriones viables 24 horas post-fertilización, dividido por el número total de huevos puestos, multiplicado por 100. Total de huevos puestos incluye: huevos viables, huevos no fertilizados con coloración opaca, huevos con malformaciones y embriones que mueren durante las primeras 24 horas.

FASE EMBRIONARIA

Las puestas exitosas de cada pareja se incubaron separadamente, en placas de Petri de 55mm. Las placas de Petri contenían 11 ml de medio E3 y se pusieron 30 embriones por cada placa de Petri (densidad: 2,72 embriones/ml). Se realizó un control diario de la temperatura de la habitación (28±1°C). El ciclo de luz oscuridad se mantuvo en 14:10 horas. Los embriones eclosionaron entre los 2-3 dpf. El corion se retiró con la ayuda de una pipeta Pasteur de 3ml. Finalizadas las 72 hpf., se registró la viabilidad embrionaria. Las larvas vivas se transfirieron a placas de Petri de 55 ml, conteniendo 11 ml de medio E3.

FASE LARVARIA

Finalizada la fase embrionaria e inicio de la fase larvaria 3 dpf, tres larvas de cada pareja se seleccionaron al azar registrándoseles la longitud total, posteriormente se devolvieron a su respectiva placa de Petri. Estos registros de longitud total se realizaron adicionalmente en 7, 14, 21 y 30 dpf. El 5dpf las larvas de cada familia se transfirieron a un tanque de metacrilato de 2,5 litros (14,0; 26,5; 21,5; 10,0 cm), ajustando la densidad, e iniciando el proceso de alimentación siguiendo las recomendaciones establecidas por la casa proveedora (ver [www. Zfbiolabs.com](http://www.Zfbiolabs.com)). La temperatura y concentración de oxígeno se mantuvieron similares en los tanques crías de cada una de las parejas (28,5°C; 5,46±0,12mg/L respectivamente) durante toda la fase larvaria. Diariamente se realizó un control de la mortalidad hasta el final del experimento 30dpf. Al final de la fase larvaria se registró la viabilidad larvaria y el crecimiento larvario de las crías de cada una de las parejas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de tasa de puesta, tamaño de puestas exitosas, viabilidad de las puestas, viabilidad embrionaria y viabilidad larvaria son el promedio de tres puestas realizadas por cada una de las parejas experimentales de ambos fenotipos. El crecimiento larvario es el promedio del registro de la longitud total de nueve larvas correspondientes a las tres puestas exitosas realizadas por cada una de las parejas experimentales de ambos fenotipos. Todos los datos se probaron por normalidad utilizando la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Aquellas variables no normales se normalizaron empleando el logaritmo 10 (\log_{10}). Las variables con distribución normal se analizaron empleando la prueba de t de Student, aquellas variables que permanecieron con una distribución no normal después de la transformación logarítmica se evaluaron empleando las pruebas no paramétrica de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa STATISTICA versión 7.

RESULTADOS

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS

No se encontraron diferencias significativas en el peso (g), longitud total (mm) y factor de condición de Fulton (K), entre los reproductores de familias P y R ($t=0,28$, $p=0,77$, $DF=36$; $t=0,24$, $p=0,80$, $DF=36$; $t=-0,01$, $p=0,98$, $DF=36$ respectivamente). En ambos fenotipos de color no se encontraron diferencias significativas entre individuos P y R en peso, longitud total y factor de condición de Fulton (WT-UAB $t=-0,21$, $p=0,83$, $DF=20$; $t=-1,37$, $p=0,18$, $DF=20$; $t=0,54$, $p=0,59$, $DF=20$; WT-I $t=0,54$, $p=0,59$, $DF=14$; $t=1,38$, $p=0,18$, $DF=14$; $t=-0,43$, $p=0,67$, $DF=14$, respectivamente).

REGISTRO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS (DIFERENCIAS ENTRE FENOTIPOS DE COLOR)

Línea P

No se encontraron diferencias significativas en el peso (g), longitud total (mm) y factor de condición de Fulton (K), entre los reproductores de familias P de ambos fenotipos de color ($t=-0,48$, $p=0,63$, $DF=18$; $t=-0,29$, $p=0,77$, $DF=18$; $t=-0,41$, $p=0,68$, $DF=18$ respectivamente).

Línea R

La **FIGURA 5.1** muestra que los individuos R del fenotipo de color WT-UAB tienen una mayor longitud total que los individuos R del fenotipo de color WT-I ($t=2,55$, $p=0,02$, $DF=16$). No se encontraron diferencias significativas en el peso (g) y factor de condición de Fulton (K), entre los reproductores de familias P de ambos fenotipos de color ($t=0,39$, $p=0,70$, $DF=16$; $t=-1,46$, $p=0,16$, $DF=18$ respectivamente).

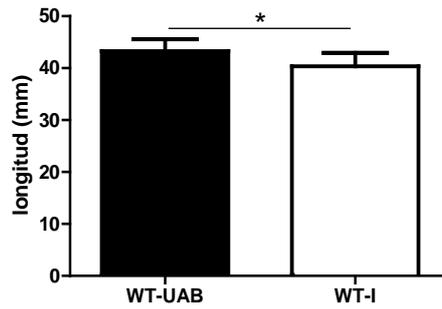


FIGURA 5.1. MEDIA (\pm DE) DE LA LONGITUD TOTAL entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I. * $p < 0,05$.

FASE REPRODUCTIVA

Se realizaron un total de 128 cruces, en donde se alcanzaron 57 puestas exitosas, produciendo 13.664 huevos de los cuales 10.362 eran embriones viables, utilizados para el desarrollo de las siguientes fases del estudio (ver **TABLA 5.1**).

FENOTIPO	PERSONALIDAD	NÚMERO DE CRUCES	NÚMERO DE PUESTA EXITOSAS	NÚMERO DE HUEVOS TOTALES	NÚMERO DE EMBRIONES VIABLES 1DPF
WT-UAB	P	39	18	4.528	3.704
	R	30	15	3.828	2.921
WT-I	P	31	12	3.054	2.234
	R	28	12	2.254	1.503
Total		128	57	13.664	10.362

TABLA 5.1. COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE PECES CEBRA de las líneas P y R de la primera generación G1, de ambos fenotipos de color.

TASA DE PUESTAS

Los resultados de la prueba t (ver **FIGURA 5.2**), muestran que no existen diferencias significativas en la tasa de puestas entre individuos P y R ($t = -1,47$, $p = 0,16$, $DF = 17$). En ambos fenotipos de color no se encontraron diferencias significativas entre individuos P y R en la tasa de puestas (WT-UAB $t = -1,36$, $p = 0,20$, $DF = 9$; WT-I $t = -1,54$, $p = 0,17$, $DF = 6$ respectivamente).

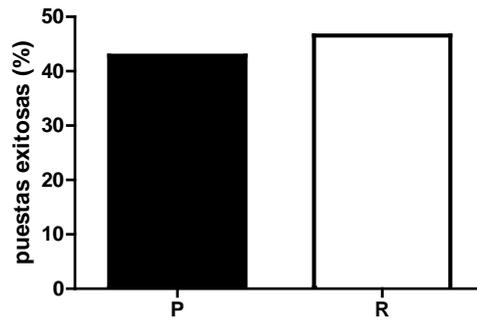


FIGURA 5.2. TASA DE PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS P Y R de la primera generación G1 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades.

Tasa de puestas (diferencias entre fenotipos de color)

Línea P

La **FIGURA 5.3** muestra que los individuos P del fenotipo de color WT-UAB tienen mayor tasa de puesta que los individuos P del fenotipo de color WT-I ($t=3,50$, $p=0,008$, $DF=8$).

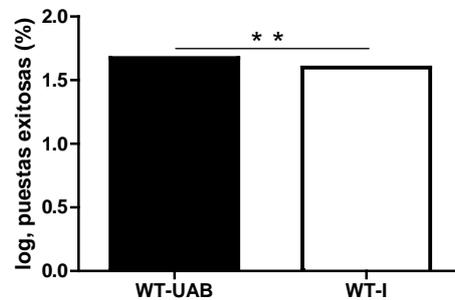


FIGURA 5.3. TASA DE PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS DE LOS FENOTIPOS DE COLOR WT-UAB Y WT-I de la primera generación G1 de la personalidad P. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de los dos fenotipos. $**p<0,01$.

Línea R

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de puestas entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I ($t=1,89$, $p=0,09$, $DF=7$).

PROMEDIO DE TAMAÑO DE PUESTAS EXITOSAS

La FIGURA 5.4 muestra que no existen diferencias significativas entre individuos P y R en el número de embriones de puestas exitosas ($t=1,97$, $p=0,06$, $DF=17$). No se encontraron diferencias significativas entre individuos P y R en el fenotipo WT-UAB ($t=0,85$, $p=0,41$, $DF=9$). Sin embargo en el fenotipo WT-I, se encontraron valores cerca de la significancia entre individuos P y R ($t=2,32$, $p=0,059$, $DF=6$).

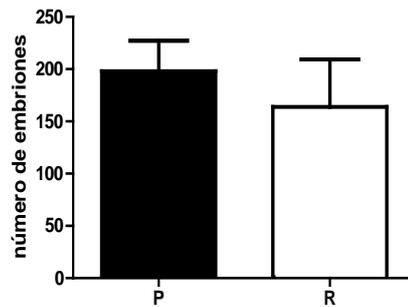


FIGURA 5.4. MEDIA (\pm DE) DE TAMAÑO DE PUESTAS EXITOSAS DE INDIVIDUOS P Y R de la primera generación G1 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades.

Promedio de tamaño de puestas exitosas (diferencias entre fenotipos de color)

Línea P

No se encontraron diferencias significativas en el promedio de tamaño de puestas exitosas entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I (Mann-Whitney U= 10,000 $p=0,66$).

Línea R

La FIGURA 5.5 muestra que los individuos R del fenotipo de color WT-UAB tienen mayor promedio de tamaño de puestas exitosas que los individuos R del fenotipo de color WT-I ($t=3,64$, $p=0,008$, $DF=7$).

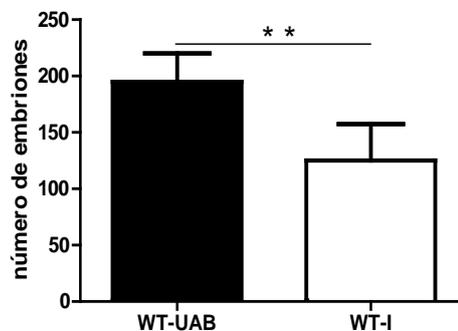


FIGURA 5.5. MEDIA (\pm DE) DE PROMEDIO DE TAMAÑO DE PUESTAS EXITOSAS DE INDIVIDUOS DE LOS FENOTIPOS DE COLOR WT-UAB Y WT-I de la primera generación G1 de la personalidad R. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de los dos fenotipos. ** $p<0,01$.

PORCENTAJE DE VIABILIDAD

Los peces con personalidad P tienen un mayor porcentaje de viabilidad reproductiva que los peces R ($t=3,66$, $p=0,0019$, $DF= 17$; ver **FIGURA 5.6**). A nivel de fenotipo los peces P presentan una mayor viabilidad reproductiva que los peces R, tanto en WT-UAB como en WT-I. ($t=4,68$, $p=0,0011$, $DF=9$; $t= 2,61$, $p=0,0399$, $DF= 6$, ver **FIGURAS 5.7 y 5.8** respectivamente).

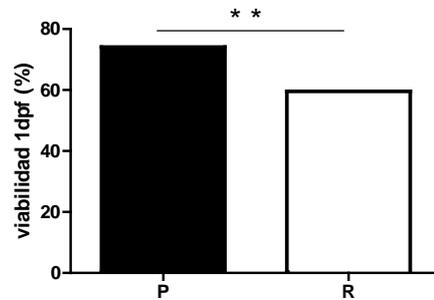


FIGURA 5.6. VIABILIDAD DE LAS PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS P Y R de la primera generación G1 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos conductas. ** $p<0,01$.

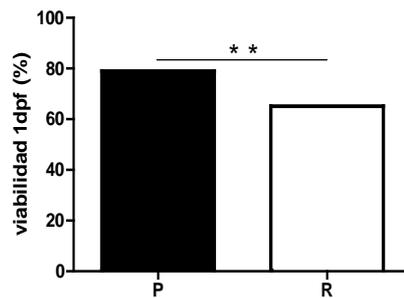


FIGURA 5.7. VIABILIDAD DE LAS PUESTAS EN PORCENTAJE, DE P Y R de la primera generación G1 del fenotipo WT-UAB. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades. ** $p<0,01$.

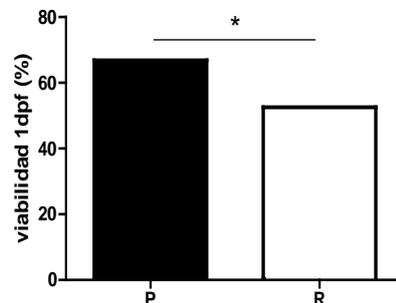


FIGURA 5.8. VIABILIDAD DE LAS PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS P Y R de la primera generación G1 del fenotipo WT-I. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades. * $p<0,05$.

Porcentaje de viabilidad (diferencias entre fenotipos de color)

Línea P

La **FIGURA 5.9** muestra que los individuos P del fenotipo de color WT-UAB tienen mayor porcentaje de viabilidad que los individuos R del fenotipo de color WT-I ($t=2,61$, $p=0,03$, $DF=8$).

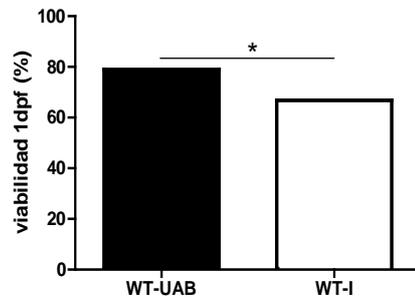


FIGURA 5.9. VIABILIDAD DE LAS PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS DE LOS FENOTIPOS DE COLOR WT-UAB Y WT-I de la primera generación G1 de la personalidad p. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de los dos fenotipos. * $p<0,05$.

Línea R

La **FIGURA 5.10** muestra que los individuos P del fenotipo de color WT-UAB tienen mayor porcentaje de viabilidad que los individuos R del fenotipo de color WT-I ($t=3,94$, $p=0,005$, $DF=7$).

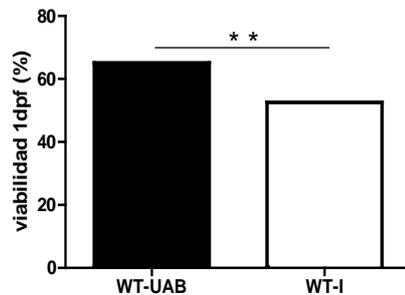


FIGURA 5.10. VIABILIDAD DE LAS PUESTAS EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS DE LOS FENOTIPOS DE COLOR WT-UAB Y WT-I de la primera generación G1 de la personalidad p. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de los dos fenotipos. ** $p<0,01$.

FASE EMBRIONARIA

Los embriones deformes o muertos se removieron cada día hasta el final de la fase embrionaria 3 dpf. El total de embriones que eclosionaron se compararon con el número inicial de embriones a 1dpf. La viabilidad embrionaria fue superior al 90% en ambos tipos de personalidades a nivel general y en los dos fenotipos de color.

VIABILIDAD EMBRIONARIA

No se encontraron diferencias significativas entre peces P y R en la viabilidad embrionaria a 3dpf ($t=-0,20$, $p=0,84$, $DF=17$) (ver **FIGURA 5.11**). El fenotipo WT-UAB no mostró diferencias significativas entre peces P y R en la viabilidad embrionaria ($t= -0,26$, $p= 0,80$, $DF= 9$). Tampoco fueron encontradas diferencias significativas en la viabilidad embrionaria entre peces P y R en el fenotipo WT-I ($t=0,07$, $p=0,94$, $DF= 6$).

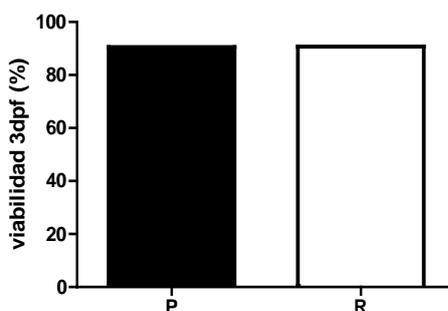


FIGURA 5.11. VIABILIDAD EMBRIONARIA EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS P Y R de la primera generación G1 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades.

Viabilidad embrionaria (diferencias entre fenotipos de color)

No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad embrionaria a 3dpf entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I ($t=-0,86$, $p=0,41$, $DF=8$). En los individuos R de los dos fenotipos de color no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad embrionaria ($t=-0,55$, $p=0,59$, $DF=7$).

FASE LARVARIA

VIABILIDAD LARVARIA

La **FIGURA 5.12** muestra que los individuos de la personalidad P tienen una mayor viabilidad larvaria 30dpf que los individuos con personalidad R (Mann-Whitney $U= 18,500$ $p= 0,03$). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre individuos P y R en la viabilidad larvaria en el fenotipo WT-UAB (Mann-Whitney $U= 3,000$ $p= 0,14$). No se encontraron diferencias significativas entre individuos P y R en la viabilidad larvaria en el fenotipo WT-I ($t= 2,12$, $p= 0,06$, $DF=9$).

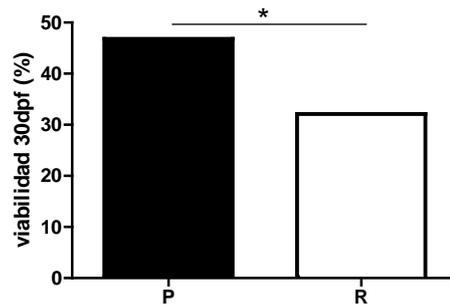


FIGURA 5.12. VIABILIDAD LARVARIA EN PORCENTAJE DE INDIVIDUOS P Y R de la segunda generación G1 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de tres puestas de cada una de las parejas de las dos personalidades. * $p < 0,05$.

Viabilidad larvaria (diferencias entre fenotipos de color)

No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad larvaria a 30dpf entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I ($t = -0,74$, $p = 0,47$, $DF = 8$). En los individuos R de los dos fenotipos de color no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad larvaria ($t = -1,04$, $p = 0,32$, $DF = 7$).

CRECIMIENTO LARVARIO

La **FIGURA 5.13** muestra que existen diferencias significativas entre P y R en la longitud total al final del periodo larvario ($t = 3,11$, $p = 0,006$, $DF = 17$). Los individuos P tuvieron una mayor longitud total que los individuos R en ambos fenotipos de color (WT-UAB $t = 2,31$, $p = 0,04$, $DF = 9$; WT-I $t = 7,19$, $p = 0,0003$, $DF = 6$; ver **FIGURAS 5.14** y **5.15** respectivamente).

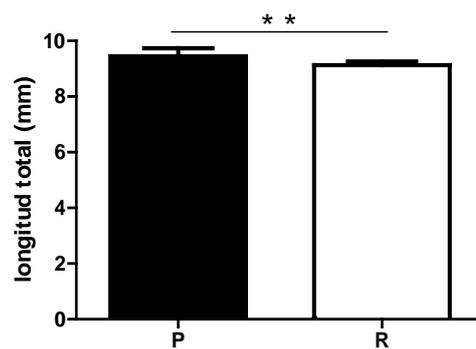


FIGURA 5.13. MEDIA (\pm DE) DE LONGITUD TOTAL (MM), 30 DPF DE INDIVIDUOS P Y R de la segunda generación G2 de ambos fenotipos de color. Datos representan el promedio de longitud total de nueve larvas de los tres grupos de crías de cada una de las parejas de las dos personalidades. ** $p < 0,01$.

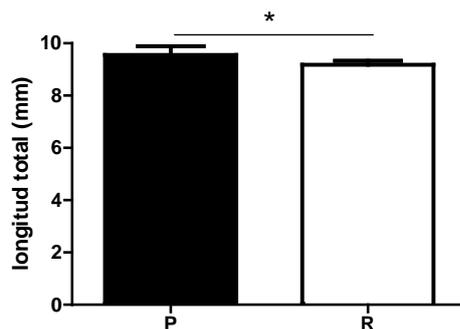


FIGURA 5.14. MEDIA (\pm DE) DE LONGITUD TOTAL (MM), 30 DPF DE INDIVIDUOS P Y R de la segunda generación G2 del fenotipo WT-UAB. Datos representan el promedio de longitud total de nueve larvas de los tres grupos de crías de cada una de las parejas de las dos conductas. * $p < 0,05$.

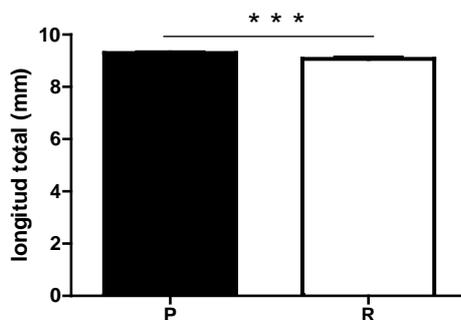


FIGURA 5.15. MEDIA (\pm DE) DE LONGITUD TOTAL (MM), 30 DPF DE INDIVIDUOS P Y R de la segunda generación G2 del fenotipo WT-I. Datos representan el promedio de longitud total de nueve larvas de los tres grupos de crías de cada una de las parejas de las dos personalidades. * $p < 0,001$.**

Crecimiento larvario (diferencias entre fenotipos de color)

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento larvario a 30dpf entre individuos P de los fenotipos de color WT-UAB y WT-I ($t=1,52$, $p=0,16$, $DF=8$). En los individuos R de los dos fenotipos de color no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento larvario ($t=1,33$, $p=0,22$, $DF=7$).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que muestra los éxitos reproductivos de hembras y machos proveniente de un programa genético de reproducción de líneas de pez cebra (*Danio rerio*), seleccionados por su personalidad. **Nuestros resultados muestran que peces cebras de la línea P tienen un mayor éxito reproductivo que los peces R.** Las comparaciones de ambos fenotipos de color muestran que el fe-

notipo WT-UAB presenta mejores índices reproductivos que el fenotipo WT-I. También se encontró que las crías (fase larvaria) de peces P tienen mayor porcentaje de supervivencia y mayor tasa de crecimiento que crías de la línea R. El desempeño de ambos fenotipos de color es similar en la fase embrionaria y larvaria.

ÉXITO REPRODUCTIVO

El principal resultado de nuestro estudio es que existen diferencias en los éxitos reproductivos entre individuos P y R previamente separados por su personalidad en la prueba de toma de riesgo en grupos (Mackenzie *et al.*, 2009). Los peces P mostraron una mayor viabilidad de las puestas que los peces R, el cual fue independiente de las condiciones ambientales, debido a que los peces se evaluaron bajo las mismas condiciones de laboratorio. Este resultado tiene importantes consecuencias en la supervivencias de las crías ya que el pez cebra no muestra cuidado parental, y un mayor número de puestas viables representa la probabilidad de un mayor número de crías que tendrán una mayor posibilidad de supervivencia y por lo tanto una mayor fitness para la especie (Spence *et al.*, 2007).

Una tendencia general es que individuos atrevidos *bold*, un comportamiento característico de individuos de la personalidad P, muestran un mayor éxito reproductivo que individuos tímidos *shy* característico de individuos de la personalidad R (Smith and Blumstein, 2008). Nuestros resultados muestran que los individuos con personalidad P en la prueba de toma de riesgo en grupos mostraron un éxito reproductivo superior a los individuos R, resultados similares han sido reportados en otras especies como: ovejas de cuerno largo (Réale *et al.*, 2000) y pez arco iris (Colléter and Brown, 2011). En el caso de pez cebra, Ariyomo and Watt (2012), reportaron que individuos atrevidos y agresivos machos tienen mayor viabilidad de las puestas que individuos tímidos, estos resultados son similares a los reportados por nosotros en donde los individuos P mostraron una mayor viabilidad de las puestas que los individuos R.

Los resultados revelan que no existe diferencia en el peso, longitud total y factor de condición entre P y R a diferencia de lo reportado para en poblaciones naturales de *Brachyrhaphis episcopi* (Brown and Braithwaite, 2004; Brown *et al.*, 2007). El hecho de que los peces P fueron más exitosos reproduciéndose que los peces R en nuestro estudio no está correlacionado con tamaño o con diferencias relacionada a las tasas metabólicas, como se ha reportado en la literatura (Stamps, 2007; Biro and Stamps, 2008; Uusi-Heikkilä *et al.*, 2012). Estos resultados nos hacen pensar que la personalidad juega un papel importante en los éxitos reproductivos mostrados por pez cebras. Resultados similares también se han reportado en mamíferos tales como ovejas de cuerno largo (Réale *et al.*, 2000) y rinoceronte negro (Carlstead *et al.*, 1999).

Una mayor viabilidad de las puestas puede estar relacionada a una mejor sincronización entre machos y hembras, durante la liberación de los gametos la cual puede ser el resultado del comportamiento adoptado por los individuos P, en donde el macho muestra un comportamiento más agresivo en la dinámica del apareamiento, con nados alrededor del sitio de puestas, y con el cuerpo cercano a las hembras a menudo tocando los lados de la misma con su boca asegurándose que estas pueda captar las señales olfatorias que inician la ovulación (van den Huk and Lambert, 1983), y garantizando la fecundación del mayor número de embriones al momento de la puesta (Spence and Smith, 2005). En cambio, individuos R muestran un comportamiento diferente al momento del apareamiento persiguiendo las hembras alrededor de todo el acuario habilitado para las puestas (Spence *et al.*, 2006)

Otra posible razón en la viabilidad de las puestas puede estar determinada por la calidad espermática del macho, sin embargo los resultados hasta el momento son contradictorios y no se ha podido determinar que exista una relación entre la personalidad y la calidad espermática (Paull *et al.*, 2008; Ariyomo and Watt, 2012).

Los resultados de las otras variables reproductivas estudiadas muestran que no existen diferencias en la tasa de puesta y el número de embriones sanos de cada puesta exitosa. Estos resultados son similares a los encontrados por Castranova *et al.*, (2011), que no encontró diferencias significativas entre el promedio de tamaños de puestas y la tasa de puestas en ocho laboratorios diferentes, sin embargo el mismo autor muestra que en algunos laboratorios la densidad tiene un efecto en el porcentaje de viabilidad, siendo las viabilidades menores en los tanques con menor densidad. Basado en estos antecedentes una posible explicación de la falta de diferencia en la tasa de puestas puede ser el hecho de que no existe una competencia por el sitio de puestas entre hembras en donde la hembra dominante suprime la puesta de la hembra subordinada a través de mecanismos hormonales (Gerlach, 2006; Spence *et al.*, 2007). En el caso de los machos una posible explicación para valores similares de tasa de puestas y el número de embriones es el tipo de apareamiento realizado en parejas en donde el macho no tiene que entrar en comportamientos agresivos con otros machos que interfieran con el proceso de apareamiento (Reichard *et al.*, 2004; Paull *et al.*, 2010).

El fenotipo de color WT-UAB mostró un mayor éxito reproductivo independiente de la personalidad. Los individuos P y R del fenotipo de color WT-UAB, mostraron un éxito reproductivo superior que el mostrado por individuos P y R del fenotipo de color WT-I. Una posible explicación para la diferencia registrada es la mayor uniformidad reflejada por los individuos del fenotipo WT-UAB como resultado de la selección fenotípica realizada sobre este fenotipo. Otra posible explicación para la diferencia encontrada puede ser el esquema de reproducción empleado, en el sentido que los reproductores del fenotipo WT-UAB en este estudio provienen de un sistema de apareamiento en masas de sus progenitores, mientras que los reproductores empleados del fenotipo de color WT-I son hermanos completos provenientes de una reproducción en familias con posibles efectos de endogamia (Monson and Kirsten, 2010).

SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE LAS LARVAS

Nuestros resultados muestran que las larvas P tienen una mayor supervivencia y un mayor crecimiento que las larvas R al final de la fase larvaria. Esto parece tener una relación directa con el éxito reproductivo de los padres, lo que nos hace pensar que la personalidad puede tener un componente heredable (Bell and Stamps, 2004; Brown *et al.*, 2007; Dingemans *et al.*, 2009). Asumiendo que existe un componente heredable de la personalidad podemos pensar que la mayor supervivencia y el mayor crecimiento de las crías de padres P puede estar relacionada a una mayor disposición a tomar riesgo y explorar el nuevo ambiente y por lo tanto alcanzar acceso a mayores fuentes de alimento (Wilson *et al.*, 1994; Sundström *et al.*, 2004; Meager *et al.*, 2012).

Una posible implicación de crecer más rápido puede ser la posibilidad de alcanzar condiciones apropiadas para la reproducción a mas temprana edad como se ha reportado en otras especies como las ovejas de cuernos largos (Réale *et al.*, 2000). En el caso de pez cebra el crecimiento mas rápido puede involucrar alcanzar una mejor condición corporal en la época de abundancia de recursos, tomando en cuenta que la reproducción de esta especie en su entorno natural esta asociada a la época del monzón en donde la disponibilidad de alimento es mayor y en donde las crías deben alcanzar la mejor condición corporal que garantice la supervivencia en la época de escasez de alimen-

to, y las condiciones apropiadas para la reproducción en la siguiente estación (Selman *et al.*, 1993; Spence *et al.*, 2008).

En conclusión este estudio sugiere que los individuos de la línea P tienen un mayor éxito reproductivo que los individuos de la línea R, mostrando una mayor viabilidad de las puestas. Igualmente las crías de P tienen un mejor desempeño que las crías de R. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones para la fitness de la especie creadas en cautiverio característico de las prácticas de acuicultura donde la selección por un rasgo conductual conlleva la selección por otros rasgos correlacionados (Bell and Stamps, 2004; Johnson and Sih, 2005), muchos de los cuales pueden tener importantes implicaciones económicas tales como mejores tasas de crecimiento (Ward *et al.*, 2004; Biro and Stamps, 2008). Sin embargo a nivel de poblaciones naturales, las estrategias reproductivas mostradas por ambas conductas pueden ser más difíciles de interpretar, y pueden estar influenciadas por diferentes factores exógenos como la depredación (Bell, 2005; Dingemanse *et al.*, 2007), disponibilidad de recursos (Grand and Kramer, 1992; Hamilton and Dill, 2002), que pueden tener un impacto en la dinámica reproductiva mostrada por un individuo y en el caso de nuestros resultados puede ser que un individuo P con una conducta de asumir más riesgo, tenga un mayor porcentaje de depredación por lo que su éxito reproductivo tiene que ser más alto que un individuo R con niveles menores de éxitos reproductivos pero con una vida reproductiva más larga por menores niveles de depredación, al asumir un menor riesgo (Stamps, 2007; Smith and Blumstein, 2008).



**DISCUSIÓN
GENERAL**

6

Los resultados de esta tesis muestran las diferencias en rasgos de personalidad de dos líneas de pez cebra (*Danio rerio*) seleccionadas por sus divergencias en los patrones de respuesta frente a la toma de riesgo en grupos y como su relación con otros rasgos puede determinar la fitness de la especie. Los resultados de cada uno de los experimentos utilizados para identificar las diferencias en rasgos de personalidad en las líneas, se discutió en su capítulo correspondiente. De esta manera aquí solo se resumen los principales descubrimientos.

En el **CAPÍTULO 2** reportamos tres resultados principales:

- (1) *Exitosamente establecimos un programa bidireccional de selección de familias por rasgos de personalidad,*
- (2) *Los resultados de este capítulo confirman que la prueba de toma de riesgo en grupos es apropiada y confiable para separar las poblaciones de pez cebra en divergentes personalidades y*
- (3) *La selección por rasgos de personalidad selecciona a su vez por rasgos morfológicos.*

En la primera parte de la investigación establecimos un **programa de selección bidireccional** de líneas de pez cebra por sus rasgos de personalidad. En peces solo conocemos un estudio de selección bidireccional por rasgos de personalidad (Gerlai and Csányi, 1994). Esta parte del estudio era clave para entender aspectos de la divergencia en personalidades de las líneas frente a diferentes desafíos ambientales, además el programa de selección era necesario para investigar una posible relación entre la personalidad y algún rasgo morfológico y poder explorar su aplicabilidad en el sector acuícola. Podemos afirmar que nuestro programa de selección fue exitoso apoyándonos en los resultados obtenidos a través de dos generaciones de selección en donde el 50% de las familias empleadas en cada una de las líneas conductuales fue consistente en la expresión de su personalidad.

Otro aspecto a resaltar de la selección fue el incremento en porcentajes de los individuos en cada una de las líneas y la diferencia de respuestas entre ellas, por ejemplo la línea R mostró un incremento en porcentaje de individuos y en latencia de salida en la primera generación comparada con los progenitores, sin embargo en la segunda generación no registró incrementos significativos comparados con la primera generación. Por el contrario la línea P mostró un decrecimiento en el porcentaje de individuos en la primera generación comparada con los progenitores pero registró un incremento significativo en el porcentaje de individuos en la segunda generación comparada con la primera.

Para desarrollar el programa de selección por personalidad empleamos la **prueba de toma de riesgo en grupos por tratarse de una especie altamente gregaria** (Huntingford *et al.*, 2010). La variación individual en la disposición de tomar riesgo se ha utilizado con éxito para separar poblaciones de especies gregarias en divergentes personalidades (Mackenzie *et al.*, 2009). La prueba de toma de riesgo en grupos evalúa la disposición para explorar un ambiente nuevo y por consiguiente tiene importantes implicaciones ecológicas y evolutivas para la especie (Wolf and Weissing, 2012). La disposición a explorar un ambiente nuevo puede favorecer situaciones ventajosas dependiendo de las condiciones ambientales presentes; por ejemplo en un ambiente con alta depredación un individuo con mayor disposición a explorar puede tener un riesgo más alto de depredación, por el con-

trario si hay baja depredación el individuo se puede beneficiar de nuevos sitios de alimentación y incrementar su biomasa (Fraser, 2001; Stamps, 2007).

Establecimos en este capítulo que **la selección por divergencias en personalidad selecciona a su vez por divergencia en morfología**. La relación entre personalidad y deferencias a nivel morfológico se ha reportado en algunas especies de peces (Brown and Braithwaite, 2004; Brown and Braithwaite 2007), sin embargo las diferencias observadas en estos estudios estuvieron relacionadas a variables que relacionan comportamiento con el estado físico del animal (Ward *et al.*, 2004), o comportamiento con diferencias en tasas metabólicas (Careau *et al.*, 2008). Encontramos que las líneas difieren en el diámetro de las orbitas oculares. Además nuestros resultados reflejan que la divergencia observada en el diámetro de orbitas oculares entre las dos líneas está relacionada al sexo.

La importancia de la visión en el comportamiento exploratorio realizado por los peces se ha reportado, tanto en animales en fase larvaria (Bishop and Brown, 1992) como en edad adulta (Chivers *et al.*, 2001). De la misma forma Shand (1997) reportó que un mayor diámetro ocular esta relacionado con mejor calidad de la visión en peces. Tomando estos resultados en conjunto reportamos una relación directa entre la personalidad y la calidad de la visión en peces. En este estudio los peces de la línea P mostraron diámetros de orbitas oculares mayores que los peces de la línea R., sin embargo esta diferencia solo fue observada en individuos machos. Este resultado es interesante si lo vemos a nivel holístico de cada una de las líneas y a nivel de los diferentes papeles que desempeña el sexo dentro de las líneas, por ejemplo la mejor calidad de la visión mostrada por la línea P puede estar relacionada con el tipo de comportamiento adoptado por esta línea que se caracteriza por una alta disposición a explorar ambientes nuevos y en donde una mejor calidad en la visión puede mejorar los niveles de supervivencia mediante la evaluación de un depredador o la adquisición de nuevos recursos alimenticios. Por el contrario la línea R muestra baja disposición para explorar ambientes nuevos, extrayendo la información ambiental del comportamiento de P por lo que un mayor diámetro ocular posiblemente sería una adaptación costosa en animales con este tipo de personalidad.

El hecho de que las diferencias visuales solo estén presentes en machos puede estar relacionada con una mayor capacidad exploratoria en los machos en esta especie (Moretz *et al.*, 2007a; Dahlbom *et al.*, 2012), posiblemente relacionada con la dinámica reproductiva de esta especie en donde la hembra selecciona el sitio de puesta, dentro del territorio dominado por un macho (Spence and Smith, 2005). La oportunidad de reproducirse de un macho puede estar determinada por su capacidad exploratoria para descubrir un lugar que reúna las características exigidas por las hembras, situación que se ve favorecida por una mejor capacidad visual para explorar y por su agresividad para defender su territorio de la intromisión de otros machos. A nivel de la *fitness* de las líneas esta ventaja morfológica en la visión en P le permite administrar mejor sus recursos en una línea conductual caracterizada por patrones de comportamiento que demandan altos gastos energéticos como es el caso de la exploración. En el caso de la línea R sus patrones de comportamiento demandan menos gastos energéticos por lo que esta adaptación morfológica no le representa ninguna ventaja, quizás por esta razón ambas líneas en este estudio no mostraron diferencias en el factor de condición y en otras variables fisiológicas como es el caso de la glucosa realizadas en nuestro laboratorio (Observación personal, S. Rey). Estos resultados en conjunto confirman el efecto que tiene la personalidad en otros rasgos del individuo y como estas relaciones pueden incrementar la *fitness*.

En el **CAPÍTULO 3** evaluamos una de las premisas de la personalidad que es la **consistencia de las diferencias en personalidad en tiempo y entre contextos** (Gosling, 2001, Dall *et al.*, 2004). De este capítulo podemos extraer dos resultados principales:

- (1) *Ambas líneas mostraron consistencia en el tiempo y entre contexto y*
- (2) *Existe diferencia en la fortaleza de la consistencia entre líneas.*

Resultados similares se han reportado en líneas de *Parus majors* seleccionadas por su rápida o lenta exploración, en donde las líneas fueron diferentes en la fortaleza de la consistencia entre contextos (Carere *et al.*, 2005). A pesar de que no pudimos evaluar directamente consistencia en el tiempo, la definición de consistencia describe la previsibilidad en el comportamiento, de esta forma realizamos una medida indirecta a través de los resultados obtenidos de consistencia entre contextos de ambas líneas que se realizó 10 meses después de la primera prueba de toma de riesgo en grupos. Siguiendo este razonamiento para evaluar consistencia en el tiempo vemos que ambas líneas mostraron consistencia pero mostraron diferencia en la fortaleza de la consistencia. En el caso de la línea P solamente el 50% de los individuos mostró la misma personalidad en la re prueba comparado con más de 75% mostrado por la línea R, de esta forma pareciera que R fue más consistente en el tiempo que P. Sin embargo este puede ser un efecto de la prueba, que al aplicarse en grupos de nueve individuos solo se seleccionan como P los primeros tres en salir del refugio o los primeros que salgan en 10 minutos, de esta manera es de esperar que solo $\frac{1}{3}$ de los individuos evaluados en la re prueba sean P, sin embargo la mitad de los individuos según la prueba son P. Pero si evaluamos las latencias de salida nos damos cuenta que en la re prueba más del 75% de los individuos P mostraron consistencia en su personalidad. Además en la línea P si tomamos en cuenta solo las latencias de salida no existe ningún individuo R, en cambio en la línea R a pesar de que más del 75% de los individuos fueron R en la re prueba existe alrededor de 5% de individuos P de esta forma podemos interpretar que ambas líneas fueron consistentes en más del 75% de las veces, pero que estos resultados sugieren una mayor consistencia de P.

En el caso de la evaluación de la consistencia entre contextos el comportamiento de ambas líneas mostró consistencia entre contextos, de acuerdo a los dos conceptos principales de consistencia que es alta previsibilidad o correlación. **Ambas líneas mostraron una alta previsibilidad en la conducta adoptada en cada uno de los contextos** la cual fue visible por las diferencias mostradas entre ambas. A nivel de correlación se encontraron correlaciones entre dos de los contextos evaluados en ambas líneas. A pesar que las líneas mostraron correlaciones altas de consistencia, mostraron diferencia en la significancia de dichas correlaciones. En general la línea P mostró una mayor significancia entre sus niveles de agresividad y el tiempo en reasumir la alimentación después de una situación estresante lo que nos hace pensar que esta línea presenta una mayor fortaleza en la correlación que la línea R.

Para una mayor comprensión en las diferencias en consistencia mostrada por ambas líneas en el estudio llevado a cabo en el **CAPÍTULO 3**, decidimos **evaluar la flexibilidad de comportamiento de las líneas frente a modificaciones ambientales introducidas después del correcto desempeño de las tareas aprendidas durante un periodo de entrenamiento**. En la primera parte del estudio del capítulo 4, evaluamos la latencia para reasumir la alimentación después de una situación estresante, previamente evaluada en el **CAPÍTULO 3**, pero con la diferencia que en esta oportunidad le adaptamos una zona de refugio al tanque experimental para permitirle al individuo tener dos opciones claras de respuesta (Treit, 1989; Veenema *et al.*, 2005). La línea P registró una menor latencia para reasu-

mir la alimentación similar al resultado reportado en el **CAPÍTULO 3** de esta tesis, y en línea con el resultado obtenido en trucha arco iris (Øverli *et al.*, 2005). A pesar de que no evaluamos la capacidad cognitiva de las líneas si pudimos observar diferencias temporales en el desarrollo del aprendizaje durante el periodo de entrenamiento. La línea P mostró mayor consistencia en el desarrollo de las tareas reduciendo el tiempo entre cada una de las pruebas en el periodo de entrenamiento hasta alcanzar el correcto desempeño de las mismas. Sin embargo la línea R mostró ser mas variable para alcanzar el correcto desarrollo de las tareas, mostrando reducciones seguidas de incrementos en tiempo en los primeros días de entrenamiento, este comportamiento ya se ha reportado en ratones, donde la línea LAL, caracterizada como R muestra comportamientos variables en las fases de entrenamiento (Benus *et al.*, 1986).

La diferencia entre ambas líneas al ser confrontadas con un objeto nuevo refleja una de las características principales de la flexibilidad o plasticidad de comportamiento que es la diferencia en respuestas a estímulos ambientales (Coppens *et al.*, 2010). **La línea R mostró de forma general una mayor respuesta al estímulo ambiental (objeto nuevo)**, reflejado en el incremento de las latencias para alimentarse principalmente atribuido a un mayor tiempo de permanencia en el refugio, pero sin incrementos en el número de errores respecto a la línea P. Este incremento en el tiempo de latencia en refugio sin incrementos en los errores sugiere que en la línea R, muchas de sus respuestas están condicionadas por los estímulos ambientales, en donde el individuo evalúa previamente una situación desde un área segura (mayor tiempo en el refugio) y si la situación no representa peligro la realiza con precisión que se puede observar en este estudio por no registrar incrementos en el número de errores cometidos.

En el segundo desafío cuando la zona de alimentación se revirtió, las líneas no mostraron diferencias en sus latencias de alimentación. La línea R permaneció más tiempo en el refugio que la línea P igual que cuando se confrontaron con un objeto nuevo pero sin embargo la línea P cometió más errores para encontrar la nueva zona de alimentación que la línea R. **El mayor número de errores cometidos por P en conjunto a su menor tiempo de permanencia en el refugio nos sugiere que las respuestas en esta línea no están determinadas por estímulos ambientales y que son mas bien la expresión del aprendizaje alcanzado de una tarea específica, por lo tanto la línea P tiende a ser mas rutinaria y menos flexible frente a modificaciones ambientales.** Las líneas fueron diferentes en su nivel de consistencia, a pesar que ambas líneas mostraron patrones diferentes de comportamiento, solo se observó consistencia en la línea P sugiriendo que esta línea le es mas difícil ajustar su comportamiento una vez aprendido frente a un estímulos ambientales, este resultado esta en línea con el reporte realizado en ratones machos (Benus *et al.*, 1988).

En el **CAPÍTULO 5** evaluamos el **efecto de la personalidad en dos de los componentes más importantes de la fitness de una especie: reproducción y supervivencia.** La línea P mostró mejores índices de reproducción que la línea R. Estos resultados están en línea con los reportados por Ariyomo *et al.*, (2012). Las crías de P mostraron mayor supervivencia y mayores tasas de crecimiento en la fase larvaria, este resultado en esta especie es importante si tomamos en cuenta que el pez cebrá no muestra cuidado parental.

En conjunto que la línea P muestre mejores índices reproductivos y mayores tasas crecimiento y supervivencia de sus crías pueden estar asociados a la historia de vida de este tipo de personalidad caracterizada por tasas de crecimiento mas altas, maduración temprana, alta disposición a explorar ambientes nuevos, características que reducen su esperanza de vida principalmente

por ser sujetos de una mayor tasa de depredación, o que pueden comprometer su capacidad reproductiva por lesiones infringidas por conespecíficos, con lo cual los individuos de este tipo de conducta deben mostrar una alta eficiencia reproductiva para incrementar su fitness. Esto se refuerza por el resultado de una mayor supervivencia de las crías y mayores tasas de crecimiento registrado en la línea P.

CONCLUSIONES

La toma de riesgo en grupos es una prueba conductual apropiada para separar poblaciones en divergentes personalidades.

La selección por personalidad selecciona por rasgos morfológicos.

Las diferencias en rasgos morfológicos entre ambas líneas conductuales están relacionadas al sexo.

El pez cebra muestra consistencia en el comportamiento en el tiempo y a través de diferentes contextos.

La personalidad individual tiene un efecto en la fortaleza de la consistencia mostrada entre contextos.

Las líneas responden con patrones alternativos de respuestas frente a estímulos ambientales.

La personalidad tiene un efecto en la flexibilidad de comportamiento mostrada por el individuo.

La personalidad afecta la dinámica reproductiva del individuo.

La fitness individual es determinada por la personalidad del individuo.

Es importante incluir evaluaciones de la personalidad en los programas de selección desarrollados en acuicultura



ANEXO



PRUEBAS PRELIMINARES DE ANESTESIA

Para el registro de las variables morfométricas se realizó una prueba piloto en la que se evaluaron dos anestésicos: MS-222 (tricaina) anestésico de síntesis química (n=10) y el aceite de clavo de síntesis natural (n=10). El efecto que el anestésico produce sobre el animal genera un curvamiento del cuerpo (animal adopta la forma de la letra c con la cabeza y la región caudal curvada hacia uno de los flancos) impidiendo realizar con precisión medidas como la longitud total, adicionalmente los peces retraen la aleta anal pegándola al cuerpo lo que dificulta el registro de esa variable.

En vista de estas dificultades se realizó una segunda prueba piloto con los mismos anestésicos y el uso del agua fría como una tercera alternativa realizando una adaptación de la metodología empleada por Pritchard (2001a), en pez cebra (*Danio rerio*). Para cada uno de los tratamientos se emplearon 10 animales (n=10 por tratamiento). Se empleó un procedimiento de habituación para reducir la temperatura corporal con agua fría. La temperatura se redujo paulatinamente a 5°C, de la siguiente manera: 1) Los peces se transfirieron del tanque stock con temperatura de 28°C a un tanque previamente acondicionado con una temperatura de 23°C, en donde permanecieron 6 horas. 2) Finalizado el primer periodo los peces fueron transferidos a un segundo tanque con temperatura de 18°C, dejados durante la noche. 3) En la mañana los peces se transfirieron a un tanque acondicionado a 13°C, en donde permanecieron por un periodo de 1 hora. 4) Los peces se transfirieron individualmente a un vaso de precipitado conteniendo 300 ml de agua, colocado dentro de una bandeja con hielo con una temperatura promedio de 8°C, en donde mostraron signos evidentes de inmovilidad, procediendo al registro de las variables morfométricas. Los resultados del tratamiento del agua fría mostraron que los peces estaban totalmente relajados permitiendo el registro de las variables de forma confiable, reduciendo el tiempo de registro de todas las variables de 2.07 ± 0.01 minutos en los anestésicos convencionales a 1.55 ± 0.02 min. Adicionalmente el tiempo de recuperación utilizando el agua fría es inmediato en cambio con ambos anestésicos era superior a los 5 minutos. La mortalidad al emplear agua fría se mantuvo por debajo del 1%, comparado con 3% utilizando los anestésicos convencionales. Tomando esos resultados justificamos el uso del agua fría como mecanismo para inmovilizar los peces para las siguientes pruebas.



BIBLIOGRAFÍA



- Adams C, Huntingford F. 2004. Incipient speciation driven by phenotypic plasticity? Evidence from sympatric populations of Arctic charr. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81: 611-618.
- Adriaenssens B, Johnsson J. 2013. Natural selection, plasticity and the emergence of a behavioural syndrome in the wild. *Ecology Letters*, 16: 47-55.
- Amanuma K, Takeda H, Amanuma H, Aoki Y. 2000. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnology*, 18: 62-65.
- Archad G, Braithwaite V. 2011. Variation in aggressive behaviour in the poeciliid fish *Brachyrhaphis episcopi*. Population and sex differences. *Behavioural Processes*, 86:52-57.
- Ariyomo T, Carter M, Watt P. 2013. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. *Behavior Genetics*, 43: 161-167.
- Ariyomo T, Watt P. 2012. The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish. *Animal Behaviour*, 83: 41-46.
- Bakker T. 1986. Aggressiveness in sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*): a behavior-genetic study. *Behaviour*, 98: 1-144.
- Barcellos L, Ritter F, Kreutz L, Quevedo R, Bolognesi da Silva L, Bedin A, Calliari A, Finco J, Cericato L. 2007. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, 272: 774-778.
- Barros T, Alderton W, Reynolds H, Roach A, Berghmans S. 2008. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 154:1400-1413.
- Basic D, Winberg S, Schjolden J, Krogdahl Å, Höglund E. 2012. Context-dependent responses to novelty in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), selected for high and low post-stress cortisol responsiveness. *Physiology and Behavior*, 105: 1175-1181.
- Bell A, Sih A. 2007. Exposure to predation generates personality in threespined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecology Letters*, 10: 828-834.
- Bell A, Stamps J. 2004. Development of behavioral differences between individuals and population of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, 68: 1339-1348.
- Bell A. 2005. Behavioral differences between individuals and two populations of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 464-473.
- Bell A. M. 2007. Future directions in behavioural syndromes research. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 274: 755-761.
- Benus R, Bohus B, Koolhaas J, Vanoortmerssen G. 1991. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*, 47:1008-1019.
- Benus R, Koolhaas J, van Oortmerssen G. 1987. Individual-differences in behavioral reaction to a changing environment in mice and rats. *Behaviour*, 100:105-122.
- Benus R, Koolhaas J, van Oortmerssen G. 1988. Aggression and adaptation to the light-dark cycle – role of intrinsic and extrinsic control. *Physiology Behavior*, 43:131-137.
- Benus R, Koolhaas J, van Oortmerssen G. 1990. Routine formation and flexibility in social and nonsocial behavior of aggressive and nonaggressive male-mice. *Behaviour*, 112:176-193.
- Bilotta J, Risner M, Davis E, Haggbloom S. 2005. Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish*, 2: 259-268.
- Biro P, Post J. 2008. Rapid depletion of genotypes with fast growth and bold personality traits from harvested fish populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 105: 2919-2922.
- Biro P, Stamps J. 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology Evolution*, 23: 361-368.
- Biro P, Stamps J. 2010. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior?. *Trends in Ecology and Evolution*, 25:653-659.
- Bishop T, Brown J. 1992. Threat sensitive foraging by larval threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behav Ecol Sociobiol*, 31: 133-138.

- Blackwell B, Brown M, Willis D. 2000. Relative weight (WR) status and current use in fisheries assessment and management. *Reviews in Fisheries Science*, 8:1-44.
- Blaser R, Gerlai R. 2006. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav. Res. Methods* 38: 456–469.
- Bolhuis J, Schouten W, de Leeuw J, Schrama J, Wiegant V. 2004. Individual coping characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs. *Behav. Brain Res*, 152:351-360.
- Both C, Dingemans NJ, Drent P, Tinbergen J. 2005. Pairs of extreme avian personalities have highest reproductive success. *Journal of Animal Ecology*, 74: 667-674.
- Brelvi D, Peterson E, Winberg S. 2005. Divergent stress coping style in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1040: 239-245.
- Briffa M, Greenaway J. 2011. High in situ repeatability of behaviour indicates animal personality in the beadlet Anemone *Actinia equina* (Cnidaria). *Plos One*, 6: 7.
- Briffa M, Rundle S, Fryer A. 2008. Comparing the strength of behavioural plasticity and consistency across situations: animal personalities in the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 1305-1311.
- Brown C, Braithwaite VA. 2004. Size matters: a test of boldness in eight populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi*. *Animal Behaviour*, 68: 1325-1329.
- Brown C, Braithwaite VA. 2005. In situ examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyrhaphis episcopi*. *Anim Behav*, 70: 1003-1009.
- Brown C, Jones F, Braithwaite V. 2007. Correlation between boldness and body mass in natural populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi*. *Anim Behav.*, 68:1325-1329.
- Brown G, Macnaughton C, Elvidge C, Ramnarine I, and Godin J. 2009. Provenance and threat-sensitive predator avoidance patterns in wild-caught Trinidadian guppies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63:699-706.
- Brydges N, Colegrave N, Heathcote R, Braithwaite V. 2008. Habitat stability and predation pressure affect temperament behaviours in populations of three-spined sticklebacks. *Journal of Animal Ecology*, 77: 229-235.
- Budaev S, Zhukov A. 1998. Avoidance learning and personality in the guppy *Poecilia reticulata*. *J Comp Psychol*, 112: 92-94.
- Budaev S, Zworykin D, Mochev A. 1999. Consistency of individual differences in behavior of the lion-headed cichlid, *Steatocranus casuaris*. *Behavioural Processes*, 48:49-55.
- Budaev S, Zworykin D. 2002. Individuality in fish behavior. *Ecology and comparative psychology. Journal of Ichthyology*, 42:189-195.
- Budaev S. 1997. Personality in the guppy (*Poecilia reticulata*): a correlational study of exploratory behavior and social tendency. *J. Comp. Psychol*, 111:399-411.
- Burns, J. (2008). The validity of three test of temperament in guppies. *Journal of Comparative Psychology*, 122:344-356.
- Cañestro C, Yokoi H, Postlethwait J. 2007. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nature Reviews Genetics*, 8: 932–942.
- Careau V, Thomas D, Humphries M, Réale D. 2008. Energy metabolism and animal personality. *Oikos*, 117: 641-653.
- Carere C, Drent P, Privitera L, Koolhaas J, Groothuis T. 2005. Personalities in great tits, *Parus major*: stability and consistency. *Animal Behaviour*, 70: 795-805.
- Carere C, Groothuis T.G.G, Moestl E, Daan S, Koolhaas J.M. 2003. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Horm. Behav.*, 43:540-548.
- Carlander K. 1950. *Handbook of freshwater Fishery Biology*, W.M. C Brown Company, Dubuque, Iowa.
- Carlstead K, Mellen J, Kleiman D. 1999. Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in US zoos: I. Individual behaviour profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biol*, 18: 17-34.

- Carsia R, Weber H, Satterlee D. 1988. Steroidogenic properties of isolated adrenocortical cells from Japanese quail selected for high serum corticosterone response to immobilization. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 5: 231-240.
- Carter A, Goldizen A, Heinsohn R. 2012. Personality and plasticity: temporal behavioural reaction norms in a lizard, the Namibian rock agama. *Animal Behaviour*, 84: 471-477.
- Castranova D, Lawton A, Lawrence C, Baumann D, Best J, Cascolla J, Doherty A, Ramos J, Hakkesteeg J, Chongmin W, Wilson C, Malley J, Weinstein B. 2011. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 8: 141-146.
- Chapman B, Morrell I, Tosh C, Krause J. 2010. Behavioural consequences of sensory plasticity in guppies. *Proceedings of the Royal Society B*, 277:1395-1401.
- Chivers D, Mirza R, Bryer P, Kiesecker J. 2001. Threat-sensitive predator avoidance by slimy sculpins: understanding the importance of visual versus chemical information. *Can J Zool*, 79: 867-873.
- Coleman K, Wilson DS. 1998. Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context-specific. *Anim Behav*, 56:927-936.
- Colléter M, Brown C. 2011. Personality traits predict hierarchy rank in male rainbowfish social groups. *Animal Behaviour*, 81: 1231-1237.
- Conrad J, Weinersmith K, Brodin T, Saltz J, Sih A. 2011. Behavioural syndromes in fishes: a review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology*, 78:395-435.
- Coppens C, Boer S, Koolhaas J. 2010. Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. *Proceedings of the Royal Society B*, 365:4021-4028.
- Dadda M, Zandonà E, Bisazza A. 2007. Emotional responsiveness in fish from lines artificially selected for a high and low degree of laterality. *Physiol Behav*, 92: 764-772.
- Dahlbom J, Lagman D, Lundstedt-Enkel, Sundström F, Winberg S. 2011. Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*). *Plos One*, 6:8.
- Dahlbom SJ, Backström T, Lundstedt-Enkel K, Winberg S. 2012. Aggression and monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.*, 228: 333-338.
- Dall S, Bell A, Bolnick D, Ratnieks F. 2012. An evolutionary ecology of individual differences. *Ecology Letters*, 15: 1189-1198.
- Dall S, Houston A, McNamara J. 2004. The Behavioral ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. *Ecol Lett*. 7:734-739.
- Dingemans N J, Bouwman K M., van de Pol M, van Overveld T, Patrick S C, Matthysen E, Quinn J L. 2012. Variation in personality and behavioural plasticity across four populations of the great tit *Parus major*. *Journal of Animal Ecology*, 81: 116-126.
- Dingemans N, Van der Plas F, Wright J, Réale D, Schrama M, Roff D, Van der Zee E, Barber I. 2009. Individual experience and evolutionary history of predation affect expression of heritable variation in fish personality and morphology. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 1285-1293.
- Dingemans N, Wolf M. 2013. Between-individual differences in behavioural plasticity within populations: causes and consequences. *Animal Behaviour*, In Press, 1-9.
- Dingemans N, Wright J, Kazem A, Thomas D, Hickling R, Dawnay N. 2007. Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *Journal of Animal Ecology*, 76: 1128-1138.
- Dingemans N, Both C, Drent P, Tinbergen J. 2004. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol Sci.*, 271: 847-852.
- Doyle R, Talbot A. 1986. Effective population size and selection in variable aquaculture stocks. *Aquaculture*, 57: 27-35.
- Drent P, van Oers K, van Noordwijk A. 2003. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceeding of the Royal Society B*, 270: 45-51.
- Dugatkin L, Alfieri M. 2003. Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethol. Ecol. Evol.*, 15:43-49.

- Dugatkin L, McCall M, Gregg R, Cavanaugh A, Christensen C, Unsel M. 2005. Zebrafish (*Danio rerio*) exhibit individual differences in risk-taking behavior during predator inspection. *Ethology Ecology & Evolution*, 17: 77-81.
- Dugatkin LA. 1992. Tendency to inspect predators predicts mortality risk in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioural Ecology*, 3: 124-127.
- Eaton R, Farley R. 1974. Spawning cycle and eggs production in zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in the laboratory. *Copeia*, 1: 195-204
- Edens F, Siegel H. 1975. Adrenal responses in high and low ACTH response lines of chickens during acute heat stress. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 25: 64-73.
- Egan R, Bergner C, Hart P, Cachat J, Canavello P, Elegante M, Elkhayat S, Bartels B, Tien A, Tien D, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukouska Z, Kalueff A. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*, 205: 38-44.
- Engeszer R, Albericida Barbiano L, Ryan M, Parichy D. 2007. Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, 74: 1269-1275.
- Falconer D, Mackay T. 2006. *Introducción a la genética cuantitativa*. Editorial Acribia, S.A. Edición N° 4 en lengua española. 469pp.
- Fang, F. 2000. Barred *Danio* species from the Irrawaddy River drainage (Teleostei, Cyprinidae). *Ichthyological Research*, 47: 13-26.
- Feldker D.E.M, Datson N.A, Veenema A.H, Meulmeester E, De Kloet E.R, Vreugdenhil E. 2003. Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice. *Eur. J. Neurosci.*, 17:379-387.
- Filby A, Paull G, Hickmore T, Tyler C. 2010. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *Bmc Genomics*, 11: 498.
- Fraser D, Gilliam J, Daley M, Le A, Skalski G. 2001. Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration. *The American naturalist*, 58:124-135.
- Frost J, Winrow-Giffen A, Ashley P, Sneddon L. 2007. Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness?. *Proceedings of The Royal Society B*, 274: 333-339.
- Gerlach G. 2006. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Animal Behaviour*, 72: 1119-1124.
- Gerlai R, Csányi V. 1994. Artificial bidirectional selection for a species-specific behavioural element, staccato movement, in paradise fish, *Macropodus opercularis*. *Anim. Behav.*, 48: 1293-1300.
- Gjedrem T. 2005. *Selection and breeding programs in aquaculture*. AKVAFORSK, Institute of Aquaculture Research AS, Norway. 378 pp.
- Goatley C, Bellwood D, Bellwood O. 2010. Fishes on coral reefs: changing roles over the past 240 million years. *Paleobiology*, 36: 415-427.
- Goatley C, Bellwood D. 2009. Morphological structure in a reef fish assemblage. *Coral Reefs*, 28: 449-457.
- Godin J, Davis S. 1995. Who dares, benefits- predator approach behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*) deters predators pursuit. *Proceeding of the Royal Society B*, 259: 193-200.
- Goetz F, Rosauer D, Sitar S, Goetz G, Simchick C, Roberts S, Johnson R, Murphy C, Bronte CR, MacKenzie S. 2010. A genetic for the phenotypic differentiation between siscowet and lean lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Molecular Ecology*, 19: 176-196.
- Gosling SD, John OP. 1999. Personality dimensions in nonhuman animals: a cross-species review. *Current Directions in Psychological science*, 8: 69-75
- Gosling SD. 2001. From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychol Bull.* 127:45-86.
- Grant J, Kramer D. 1992. Temporal coupling of food arrival reduces its monopolization and defence by zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Animal Behaviour*, 44: 101-110.
- Grunwald D, Eisen J. 2002. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 3: 717-724.
- Hamilton I, Dill L. 2002. Monopolization of food by zebrafish (*Danio rerio*) increases in risky habitats. *Can J Zool*, 80: 2164-2169.

- Harcourt J, Sweetman G, Johnstone R, Manica A. 2009. Personality counts: the effect of boldness on shoal choice in three-spined sticklebacks. *Animal Behaviour*, 77: 1501-1505.
- Heatwole S, Fulton C. 2013. Behavioural flexibility in reef fishes responding to a rapidly changing wave environment. *Marine Biology*, 1-13 (Article in press).
- Hedrick A. 2000. Crickets with extravagant mating songs compensate for predation risk with extra caution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 267: 671-675.
- Helmut S. 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149: 187-195.
- Hill A, Teraoka H, Heideman W, Peterson R. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.*, 86: 6-19.
- Huntingford F, Adams C. 2005. Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 142:1207-1221.
- Huntingford F, Andrew G, Mackenzie S, Morera D, Coyle S, Pilarczyk M, Kadri S. 2010. Coping strategies in a strongly schooling fish, the common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 76: 1576-1591
- Huntingford F, Coyle S. 2007. Anti-predator defences in sticklebacks: trade offs, risk sensitivity and behavioural syndromes. In *Biology of the Three-Spined Stickleback* (Ostlund-Nilsson, S., Mayer, I & Huntingford, F. A., eds), 127-156 pp.
- Huntingford F. 1976. The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, 24:245-260.
- Huntingford F. 2004. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology*, 65:122-142.
- Imre I, McLaughlin R, Noakes D. 2002. Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow. *Journal of Fish Biology*, 61: 1171-1181.
- Janczak A, Pedersen L, Rydhmer L, Bakken M. 2003. Relation between early fear- and anxiety-related behaviour and maternal ability in sows. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 82: 121-135.
- Johansen I, Sørensen C, Sandvik G, Nilsson G, Höglund E, Bakken M, Øverli Ø. 2012. Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 7: 161-171.
- Johnson J, Sih A. 2005. Precopulatory sexual cannibalism in fishing spiders (*Dolomedes triton*): a role for behavioural syndromes. *Animal Behaviour*, 58: 390-396.
- Jones K, Godin J. 2010. Are fast explorers slow reactors? Linking personality type and anti-predator behaviour. *Proceedings of the royal society B*, 277: 625-632.
- Kittilsen S, Ellis T, Schjolden J, Braasrad B, Øverli Ø. 2009. Determining stress-responsiveness in family groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using non-invasive measures. *Aquaculture*, 298: 146-152.
- Koolhaas J, de Boer S, Buwalda B, van Reenen K. 2007. Individual variation in coping with stress: A multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain Behavior and Evolution*, 70: 218-226.
- Koolhaas J. 2008. Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain Behavior and Immunity*, 22: 662-667.
- Koolhaas JM, de Boer SF, Coppens CM, Buwalda B. 2010. Neuroendocrinology of coping style: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontier in Neuroendocrinology*, 31: 307-321.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ. 1999. Coping style in animals: current status in behavior and stressphysiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 925-935.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. 2005. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and cost of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29: 3-38.
- Kralj-Fišer S, Schneider J. 2012. Individual behavioural consistency and plasticity in an urban spider. *Animal Behaviour*, 84: 197-204.

- Kristiansen T, Fernö A. 2007. Individual behaviour and growth of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L) fed sinking and floating feed: evidence of different coping styles. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 104:236-250.
- Lahti K, Huuskonen H, Laurila A, Piironen J. 2002. Metabolic rate and aggressiveness between brown trout populations. *Funct. Ecol.*, 16: 167-174.
- Larson E, O'Malley D, Melloni R. 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 167: 94-102.
- Lawrence C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269: 1-20.
- Leussis M, Bolivar V. 2006. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30:1045-64.
- Lima S, Dill L. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 619-640.
- Liu F, Wang J, Theodorakis C. 2006. Thyrotoxicity of sodium arsenate, sodium perchlorate, and their mixture in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*, 40: 3429-3436.
- Mackenzie S, Ribas L, Pilarczyk M, Capdevila DM, Kadri S, Huntingford FA. 2009. Screening for coping style increases the power of gene expression studies. *Plos One*, 4: 1-5.
- Maderspacher F. 2012. Colour patterns: channelling turing. *Current Biology*, 22: 266-268.
- Magnhagen C, Staffan F. 2005 Is boldness affected by group composition in young-of-the-year perch (*Perca fluviatilis*)?. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 57: 295-303.
- Magurran A. 1993. Individual differences and alternative behaviours. In: Pitcher, T.J. (Ed.), *The Behaviours of Teleost Fishes*. Chapman and Hall, London, pp. 441-447.
- Martin J, Réale D. 2008. Temperament, risk assessment and habituation to novelty in eastern chipmunks, *Tamias striatus*. *Animal Behaviour*, 75: 309-318.
- Martins C, Silva P, Conceição L, Costas B, Höglund E, Øverli Ø, Schrama J. 2011. Linking fearfulness and coping styles in fish. *Plos One*, 6:1-8.
- Martins CI, Schrama JW, Verret JA. 2005. The consistency of individual differences in growth, feed efficiency and feeding behaviour in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) housed individually. *Aquacult. Res*, 36: 1509-1516.
- McClure M. 1999. Development and Evolution of Melanophore Patterns in Fishes of the Genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Morphology*, 241: 83-105.
- McClure MM, McIntyre PB, McCune AR. 2006. Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69: 553-570.
- McDougall P, Réale D, Sol D, Reader S. 2005. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Anim. Conserv.*, 9: 39-48.
- McDougall P, Réale D, Sol D, Reader S. 2006. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation*, 9:39-48.
- McGowan, R. 2001. A low stress, high yield breeding trap for use with zebrafish *Danio rerio*. <http://www.neuro.uoregon.edu/k12/small%20operations.html>.
- Meager J, Fernö A, Skæraasen J, Järvi T, Rodewald P, Sverdrup G, Winberg S, Mayer I. 2012. Multidimensionality of behavioural phenotypes in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Physiology and Behavior*, 106: 462-470.
- Mitteroecker P, Gunz, P. 2009. Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36: 235-247.
- Monson C, Sadler K. 2010. Inbreeding depression and outbreeding depression are evident in wild-type zebrafish lines. *Zebrafish*, 7: 189-197.

- Morand-Ferron J, Varennes E, Giraldeau L. 2011. Individual differences in plasticity and sampling when playing behavioural games. *Proc. R. Soc. B.*, 278: 1223-1230
- Moreira P, Pulman K, Pottinger T. 2004. Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Horm Behav*, 46:450-457.
- Moretz J, Martins E, Robinson B. 2007a. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, 18: 556-562.
- Moretz J, Martins E, Robinson B. 2007b. The effects of early and adult social environment on zebrafish (*Danio rerio*) behavior. *Environ Biol Fish*, 80: 80-91.
- Mueller P, Diamond J. 2001. Metabolic rate and environmental productivity: well-provisioned animals evolved to run and idle fast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 12550-12554.
- Muller R, Schrader L. 2005. Behavioural consistency during social separation and personality in dairy cows. *Behaviour*, 142: 1289-1306.
- Neff B, Sherman P. 2004. Behavioral syndromes versus darwinian algorithms. *Trends Ecol.*, 19: 621-622.
- Nicieza, A. 1995. Morphological variation between geographically distinct populations of Atlantic salmon -The effects of ontogeny and habitat shift. *Funct. Ecol.*, 9: 448-456.
- Niemelä P, Dingemanse N, Alioravainen N, Vainikka A, Kortet R. 2013. Personality pace-of-life hypothesis: testing genetic associations among personality and life history. *Behavioral Ecology*, (Article in press).
- Nüsslein-Volhard C, Dahm R. 2002. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, 303 pp.
- Oliveira R, Silva J, Simões J. 2011. Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish*, 8: 73-81
- Oortmerssen G, Bakker T. 1981. Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav Genet*, 11:115-26.
- Øverli Ø, Korzan W, Höglund E, Winberg S, Bollig H, Watt M, Foster G, Barton B, Øverli E, Renner K, Summers C. 2004. Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. *Horm. Behav.* 45:235-241.
- Øverli Ø, Kotzian S, Winberg S. 2002. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. *Horm Bdehav* 42: 53-61.
- Øverli Ø, Sørensen C, Nilsson G. 2006. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty? *Physiol. Behav.* 87:506-512.
- Øverli Ø, Sørensen C, Pulman K, Pottinger T, Korzan W, Summers C, Nilsson G. 2007. Evolutionary background for stress-coping style: relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31:396-412.
- Øverli Ø, Winberg S, Pottinger T. 2005. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout- a review. *Integrative and Comparative Biology*, 45:463-474.
- Parichy DM, Johnson SL. 2001. Zebrafish hybrids suggest genetic mechanisms for pigment pattern diversification in *Danio*. *Development Genes and Evolution*, 211: 319-328.
- Parichy DM. 2006. Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*, 97: 200-210.
- Paull G, Filby A, Giddins H, Coe T, Hamilton P, Tyler C. 2010. Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish* 7: 109-117.
- Paull G, Van Look K, Santos E, Filby A, Gray M, Nash J, Tyler C. 2008. Variability in measures of reproductive success in laboratory-kept colonies of zebrafish and implications for studies addressing population-level effects of environmental chemicals. *Aquatic toxicology* 87: 115-126.
- Pineda H, Restrepo LF, Olivera Ángel M. 2004. Comparación morfométrica entre machos y hembras de cachama negra (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) mantenidos en estanque. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17: 24-29.

- Pottinger T, Pickering A, Hurley M. 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103: 275-289.
- Pressley M, Phelan III P, Witten E, Mellon M, Kim C. 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 29: 501-513.
- Pritchard VL, Lawrence J, Butlin RK, Krause J. 2001. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*, 62: 1085-1088.
- Pritchard VL. 2001. Behaviour and Morphology of the zebrafish, *Danio rerio*. Doctoral Thesis, School of Biology, University of Leeds, Leeds, West Yorkshire, 145 pp.
- Pyron M. 2003. Female preferences and male-male interactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Can. J. Zool.*, 81: 122-125.
- Réale D, Dingenmanse N, Kazem A, Wright J. 2010. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. *Proc. R. Soc. B.*, 365: 3937-3946.
- Réale D, Festa- Bianchet M. 2003. Predator-induced natural selection on temperament in bighorn ewe. *Anim Behav*, 65: 463-470.
- Réale D, Gallant B, Leblanc M, Festa-Bianchet M. 2000. Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behavior and life history. *Animal Behaviour*, 60: 589-597.
- Réale D, Martin J, Coltman W, Poissant J, Festa-Bianchet M. 2009. Male personality, life-history strategies and reproductive success in a promiscuous mammal. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 1599-1607.
- Réale D, Reader SM, Sol D, McDougall PT, Dingemans NJ. 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82: 291-318.
- Reichard M, Jurajda P, Smith C. 2004. Male-male interference competition decreases spawning rate in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51: 34-41.
- Richter H, Lückstädt C, Focken U, Becker K. 2000. An improved procedure to assess fish condition on the basis of length-weight relationships. *Archive of Fishery and Marine Research*, 48: 226-235.
- Riebli T, Avgan B, Bottini A-M, Duc C, Taborsky M, Heg D. 2011. Behavioural type affects dominance and growth in staged encounters of cooperatively breeding cichlids. *Animal Behaviour*, 81: 313-323.
- Robinson B, Wilson D. 1994. Character release and displacement in fishes: a neglected literature. *American Naturalist*, 144: 596-627.
- Rocha A, Ruiz S, Coll J. 2002. Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.*, 17: 93-102.
- Rodenburg T, Komen H, Ellen E, Uitdehaag K, van Arendonk J. 2008. Selection method and early-life history affect behavioural development, feather pecking and cannibalism in laying hens: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 110:217-228.
- Rodríguez A, Granado C. 1988. Características morfo-funcionales de *Chiostoma consocium*, *Ch. chapaley* *Ch. ocellane* del lago de Chapala, México (Pisces: Atherinidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México* 15: 265-272.
- Rubinstein AL. 2003. Zebrafish from disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery Development*, 6: 218-223.
- Rubinstein AL. 2006. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2: 231-240.
- Ruiz-Gómez M, Huntingford F, Øverli Ø, Thörnqvist P, Höglund E. 2011. Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles. *Physiol. Behav.*, 102:317-322.
- Salonen A. 2005. Behavioural and morphological variation in European grayling, *Thymallus thymallus*, populations. Doctoral Thesis, Integrative Ecology Unit Department of Biological and Environmental Sciences Faculty of Biosciences University of Helsinki Finland, 26 pp.
- Satterlee D, Johnson W. 1988. Selection of Japanese quail for contrasting blood corticosterone response to immobilization. *Poult. Sci.*, 67: 25-32.
- Schmittz L, Wainwright P. 2011. Ecomorphology of the eyes and skull in zooplanktivorous labrid fishes. *Coral Reefs*, 30: 415-428.

- Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218: 203-224.
- Shand J. 1997. Ontogenetic changes in retinal structure and visual acuity: a comparative study of coral-reef teleosts with differing post-settlement lifestyles. *Env. Biol. Fish*, 49: 307-322.
- Sih A, Bell A, Chadwick J. 2004a. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*, 19:372-378.
- Sih A, Bell AM, Johnson JC, Ziemba RE. 2004b. Behavioral syndromes: An integrative overview. *Quarterly Review of Biology*, 79: 241-277.
- Silva P, Martins C, Engrola S, Marino G, Øverli Ø, Conceição. 2010. Individual differences in cortisol levels and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles: Evidence for coping styles. *Applied Animal Behaviour Science*, 124: 75-81.
- Sinn D, Gosling S, Moltchanivskyj N. 2008. Development of shy/bold behavior in squid: context-specific phenotypes associated with developmental plasticity. *Animal Behaviour*, 75:433-442.
- Sison M, Gerlai R. 2010. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, 207: 99-104.
- Sluyter F, Arseneault L, Moffitt T.E, Veenema A.H, de Boer S, Koolhaas J.M. 2003. Toward an animal model for antisocial behavior: parallels between mice and humans. *Behav. Genet.*, 33:563-574.
- Smith B, Blumstein D. 2008. Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 19: 448-455.
- Sneddon LU. 2003. The bold and the shy: individual differences in rainbow trout, *J. Fish Biol*, 62: 971-975.
- Sørensen C, Johansen I, Øverli Ø. 2013. Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 181: 25-34.
- Spence R, Ashton R, Smith C. 2007. Ovoposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish *Danio rerio*. *Behaviour* 144: 953-966.
- Spence R, Fatema M, Reichard M, Huq K, Wahab M, Ahmed Z, Smith C. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *J. Fish Biol.*, 69: 1435-1448.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83:13-34.
- Spence R, Jordan W, Smith C. 2006. Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Frontiers in Zoology*, 3: 5.
- Spence R, Smith C. 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, 69: 1317-1323.
- Spence R, Smith C. 2006. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology*, 17: 779-783.
- Stamps J, Groothuis T. 2010. The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews*, 85: 301-325.
- Stamps J. 2007. Growth-mortality tradeoffs and 'personality traits' in animals. *Ecology Letters*, 10: 355-363.
- Stevenson R, Woods W. 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 1169-1190.
- Stewart A, Cachat J, Green J, Gaikwad S, Kyzar E, Roth A, Davis A, Collins C, El-Ounsi M, Pham M, Kalueff A. 2013. Constructing the habitume for phenotype-driven zebrafish research. *Behavioural Brain Research*, 236:110-117.
- Strand A, Magnhagen C, Alanara A. 2007. Effects of repeated disturbances on feed intake, growth rates and energy expenditures of juvenile perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, 265: 163-168.
- Sullivan C, Kim C. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 341-350.
- Sundström F, Petersson J, Höjesjö J, Johnsson J, Järvi T. 2004. Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (*Salmo trutta*): implications for dominance. *Behavioral Ecology*, 15: 192-198.

- Svanbäck R, Eklöv P. 2004. Morphology in perch affects habitat specific feeding efficiency. *Funct. Ecol.*, 18: 503-510.
- Templeton C, Shriner W. 2004. Multiple selection pressures influence Trinidadian guppy (*Poecilia reticulata*) antidepredator behavior. *Behavioral Ecology*, 15: 673-678.
- Thomas R, King T; Forshaw H; Marples N, Speed M, Cable J. 2010. The response of fish to novel prey: evidence that dietary conservatism is not restricted to bird. *Behav Ecol*, 21: 669-675.
- Toms C, Echevarria D, Jouandot D. 2010. A methodological review of personality-related studies in fish: focus on the shy-bold axis of behavior. *International Journal of Comparative Psychology*, 23:1-25.
- Tong E. 2010. Personality influences in appraisal-emotion relationships: the role of neuroticism. *J Personality*, 78: 393-417.
- Torres, K. 2010. Técnicas morfométricas aplicadas al estudio taxonómico de rayas espinosas Americanas del Género *Urotrygon* (Batoidea: Urotrygonidae) del Pacífico centro-sur Colombiano. Tesis de Grado, Universidad del Valle. Cali, Colombia, 90 pp
- Treit D. 1989. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review, *neurosci. Biobehav. Rev.*, 9:203-222.
- Ulloa P, Iturra P, Niera R, Araneda C. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21: 649-666.
- Uusi-Heikkilä, S, Kuparinen A, Wolter C, Meinelt T, Arlinghaus R. 2012. Paternal body size affects reproductive success in laboratory-held zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Biol Fish*, 93: 461-474.
- van de Nieuwegiessen P, Schrama J, Verreth J. 2008. A note on alarm cues in juvenile African catfish. *Clarias gaepinus* Burchell: indications for opposing behavioural strategies. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 113: 270-275.
- van den Hurk R, Lambert JGD. 1983. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Canadian Journal of Zoology*, 61: 2381-2387.
- van Oers K, De Jong G, van Noordwijk A, Kempenaers B, Drent P. 2005. Contribution of genetics to the study of animal personalities: a review of case studies. *Behaviour* 142:1185-1206.
- van Oers K, Mueller J. 2010. Evolutionary genomics of animal personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365: 3991-4000.
- van Riel E, Meijer O.C, Veenema A.H, Joels M. 2004. Hippocampal serotonin responses in short and long attack latency mice. *J. Neuroendocrinol.* 14:234-239.
- Veenema A, Cremers T, Jongsma M, Steenbergen P, De Boer S, Koolhaas J. 2005. Differences in the effects of 5-HT (1A) receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. *Psychopharmacology*, 178: 151-160.
- Veenema A.H, Meijer O.C, de Kloet E.R, Koolhaas J.M. 2003. Genetic selection for coping style predicts stressor susceptibility. *J. Neuroendocrinol*, 15:256-267.
- Verbeek M, Drent M, Wiepkema P. 1994. Consistent individual differences in early exploratory behavior of male great tits. *Anim Behav*, 48: 1113-21.
- Verbeek M, Goede P, Drent P, Wiepkema P. 1999. Individual behavioural characteristics and dominance in aviary groups of great tits. *Behaviour*, 136: 23-48.
- von Krogh K, Sørensen C, Nilsson G, Øverli Ø. 2010. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiology & Behavior*, 101: 32-39.
- Ward A, Thomas P, Hart P, Krause J. 2004. Correlates of boldness in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55: 561-568.
- Weber M, Rounds K, Brown M. 2012. Phenotypic variation and associated predation risk of juvenile common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 80:49-60.
- Wilson A, Godin J. 2009. Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology*, 21:57-62.

Wilson A, McLaughlin R. 2007. Behavioural syndromes in brook charr, *Salvelinus fontinalis*: prey-search in the field corresponds with space use in novel laboratory situations. *Animal Behaviour*, 74:689-698.

Wilson C, Arnott G, Elwood R. 2012. Freshwater pearl mussels show plasticity of responses to different predation risks but also show consistent individual differences in responsiveness. *Behavioural Processes*, 89: 209-303.

Wilson DS, Clark AB, Coleman K, Dearstyne T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 442-446.

Wilson DS. 1998. Adaptive individual differences within single population. *Philosophical Transactions of the Royal Society of the Royal Society of London, Series B*, 353: 199-205.

Wolf M, van Doorn G, Weissing F. 2008. Evolutionary emergence of responsive and unresponsive personalities. *Proc Nat Acad Sci USA*, 105:15825-30.

Wolf M, Weissing F. 2012. Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 452-461.

Wright D, Nakamichi R, Krause J, Butlin R. 2006. QTL Analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Behavior Genetics*, 36: 271-284.

Wright D, Rimmer L, Pritchard V, Krause J, Butlin R. 2003. Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Naturwissenschaften*, 90: 374-37

www.zfbiolabs.com.

Yoshida M, Nagamine M, Uematsu K. 2005. Comparison of behavioural responses to a novel environment between three teleosts, bluegill *Lepomis macrochirus*, crucian carp *Carassius landsdorffii*, and goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science*, 71: 314-319.



AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido al desarrollo de esta tesis. Muy especialmente quiero agradecer a mis directores Simon Mackenzie y Sònia Rey, que más que directores son y serán unos amigos para mí y mi familia, a los dos los aprecio mucho. Simon por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en tu grupo y Sònia gracias por tu guía, tiempo, paciencia y conocimientos para el desarrollo de este trabajo, nuevamente gracias a ambos por su don de persona.

También quiero agradecer a Nerea Roher por sus consejos y su apoyo durante el transcurso del doctorado.

De igual manera quiero agradecer a Lluís Tort, por su apoyo en todo momento y por su amistad, gracias Lluís.

A mis compañeros de Inmunología evolutiva que en el transcurso de estos años han mostrado un tremendo sentido del compañerismo los quiero mucho y gracias por su tremenda ayuda.

A mi mujer Ivonne y mi hijo Reynaldo que se sacrificaron tantas veces por mis cosas y me dieron ánimo en el transcurso del doctorado, a los dos gracias. A mi familia en mi país que me brinda su apoyo desde casa, los quiero mucho.

Finalmente quiero dar gracias a todos mis amigos del laboratorio de peces y a todas las amistades de Fisio Animal por sus consejos, ayuda y su buen trato conmigo. A todos gracias.

