

# Comportamiento reproductor en el blenio de río (*Salaria fluviatilis*): aspectos relacionados con la estrategia reproductiva del macho

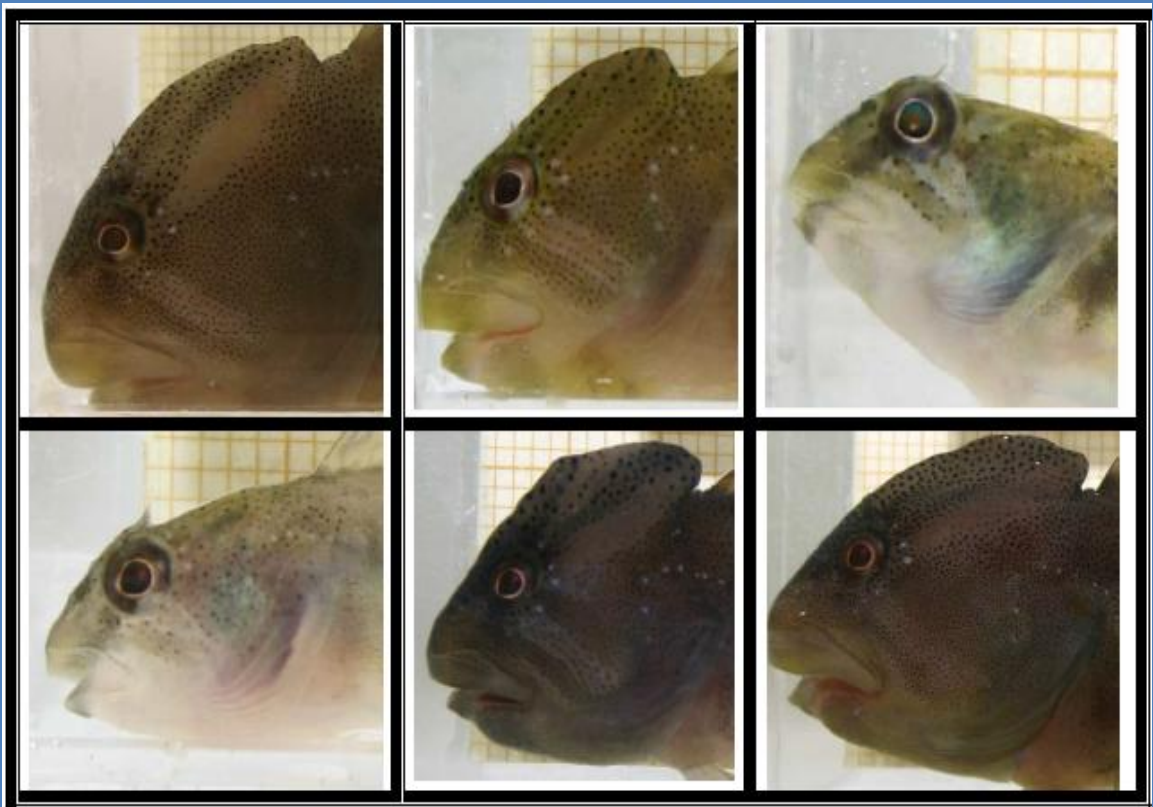
Noëlle Fabré Mitjans

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Comportamiento reproductor en el  
blenio de río (*Salaria fluviatilis*):  
aspectos relacionados con la  
estrategia reproductiva del macho



Noëlle Fabre Mitjans  
Tesis Doctoral, 2014



Facultad de Biología

Departamento de Biología Animal

Programa de Doctorado en Biodiversidad

# Comportamiento reproductor en el blenio de río (*Salaria fluviatilis*): aspectos relacionados con la estrategia reproductiva del macho

Memoria presentada por:

**Noëlle Fabre Mitjans**

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Barcelona, Julio 2014

**La Doctoranda:**

**La Directora de la Tesis:**

**Noëlle Fabre Mitjans**

**Dolors Vinyoles Cartanyà**

Dibujos: N. Fabre

Fotografías: N. Fabre, E. García-Galea, D. Vinyoles

Maquetación: N. Fabre

*A mis padres y a mamie Renée*



## AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, tras seis años de trabajo repletos de descubrimientos, esfuerzos, suspenses, momentos realmente cómicos, peleas con el ordenador, debates apasionantes, ocurrencias mil para perfeccionar los diseños, sesiones de medición de peces hasta las tantas de la noche y una gran dosis de entusiasmo, a una solo le entran ganas de lanzar un grandísimo gracias a todas las personas que han hecho posible esta increíble aventura.

Ante todo quisiera agradecer a mi directora de tesis, Dolors Vinyoles, pieza clave, por todo lo que ha hecho por mí durante este tiempo. Junto a ella he aprendido a investigar y también muchos valores como la curiosidad, el esfuerzo y la constancia. Ha sido un privilegio muy grande trabajar con ella y haber podido compartir tantos momentos entrañables. Siempre recordaré al Dr. Xavier Ruiz, el día que me dirigí a él preguntando si me podía recomendar a alguien con quién pudiese hacer el proyecto del máster de biodiversidad. Sin titubeos me recomendó a Dolors diciéndome: “Sí, esta profesora hace investigaciones muy interesantes sobre peces y tiene una sensibilidad especial a la hora de hacer ciencia”. Tenía razón, fue un flechazo. También quisiera darle las gracias a él por ser el causante de que todo pudiese empezar.

A continuación agradezco en lo más profundo a Eduardo García-Galea por haberme ayudado tanto, por su inagotable paciencia, pasión por el saber y firmeza en llegar hasta el final ¡Qué honor tenerle a mi lado en este viaje! ¡Temblad, *Xiphophorus*, temblad, que con alguien como él estudiándoos poca cosa podréis ocultar!

---

También las gracias a Domingo Rodríguez-Teijeiro, por las aportaciones y consejos reveladores que siempre llegaban como agua de mayo. A Albert Maceda, por ser el mejor “doctor pez” posible, viniendo al rescate con buena predisposición y una gran sonrisa. A Florenci Serra, María Marsal, Jacint Nadal y Mercè Durfort, por ayudarme con el tema de los embriones, un mundo totalmente nuevo para mí. Estoy muy agradecida a Francesc Oliva por haber aceptado de trabajar con nosotros, por su esfuerzo y su predisposición en encontrar soluciones. A Vítor Almada, por sus ideas y propuestas, a Pedro Cordero, por su sentido del humor y sus ánimos, a Anabel Perdices, por recibirme y mostrarme cómo se trabaja en el CSIC y a Gustavo Llorente, por prestarme materiales y espacios.

A mis compañeros de departamento: Marcel y Noelia, gracias por echarme una mano en el laboratorio ¡No sabéis cuanto se agradece! Carolina, gracias por tu simpatía y por compartir aventuras paralelas con nuestros amigos los blénidos. A Pablo, Anabel, Marc y Guillem, gracias por vuestra energía y optimismo. Y un guiño cómplice a Miquel Vila, “el noi de les planàries”, por acompañarnos a pescar y por hacernos reír tanto.

Mención especial a Olga Martín, Geoff Harwood y Víctor Bonet. Muchas gracias por ayudarme con la eterna batalla que es el inglés editorial. Gracias a Jordi Guinea y a todo el equipo del estabulario, por cuidar de los peces y de las instalaciones. A los Guassos, gracias por ayudar a hacer realidad algunos de los diseños que han sido esenciales para los experimentos.

A mis amigos. Mil gracias por vuestro apoyo y comprensión. No hace falta que haga un listado de vuestros nombres, porque todos y cada uno de vosotros sois



importantes para mí y sé que lo sabéis. Eso sí, necesito mencionar a Lolita, te has ido pero sé que has estado a mi lado durante todo este tiempo. Gracias.

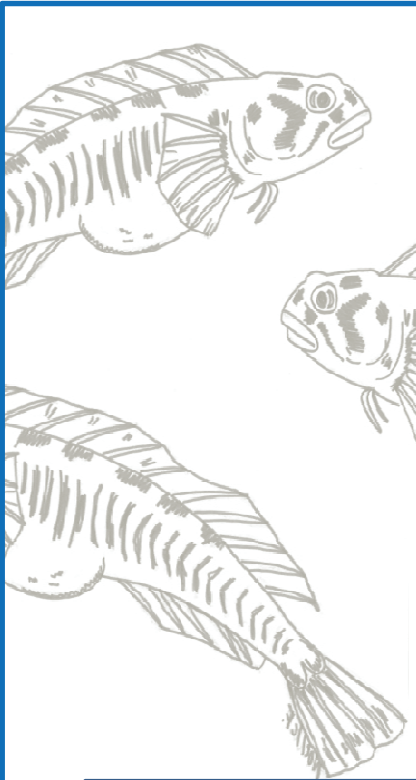
Por último quisiera acabar por agradecer a mis padres por tanto y tanto. Pero sobretodo por respetar mi pasión y fomentarla, por haber estado a mi lado compartiendo buenos y malos momentos y por haber creído en mí siempre. Gracias por haberme ayudado en la logística de los experimentos y por vuestra entrega y alegría. A vosotros os dedico la tesis con todo mi cariño juntamente a mi querida mamie Renée, de quién he heredado el gusto por el dibujo que me ha permitido ilustrar la tesis.



# CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>11</b>
- El blenio de río: <i>Salaria fluviatilis</i>	13
- Aplicación de los estudios de comportamiento a la conservación de las especies	17
- Comportamiento y desarrollo	19
- Personalidad y aprendizaje	22
<b>OBJETIVOS Y ESTRUCTURA</b>	<b>31</b>
- Objetivos	33
- Estructura de la tesis	35
<b>CAPÍTULO 1. COMPORTAMIENTO Y DESARROLLO</b>	<b>37</b>
SECCIÓN 1.1. Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río ( <i>Salaria fluviatilis</i> )	39
SECCIÓN 1.2. La presencia de los padres afecta al desarrollo de los embriones en <i>Salaria fluviatilis</i> (Asso 1801), un pez con cuidado parental	53
<b>CAPÍTULO 2. PERSONALIDAD Y APRENDIZAJE</b>	<b>81</b>
SECCIÓN 2.1. La osadía se relaciona con el desarrollo de la cresta cefálica en el macho del blenio de río <i>Salaria fluviatilis</i> (Asso, 1801)	83
SECCIÓN 2.2. Aprendizaje espacial basado en marcas visuales en el blenio de río <i>Salaria fluviatilis</i> (Asso, 1801)	93
<b>RESUMEN DE LOS ARTÍCULOS</b>	<b>123</b>
<b>INFORME DE LA DIRECTORA</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>137</b>
- Importancia de conservar los peces de agua dulce; acciones <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	139
- Papel de las tácticas reproductivas alternativas (ARTs) en la conservación de <i>S. fluviatilis</i>	142
- Personalidad animal y aprendizaje en conservación	147
- Cría en cautividad de <i>S. fluviatilis</i>	152
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</b>	<b>163</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>195</b>
Apéndice 1: Acuarios experimentales	197
Apéndice 2: Nidos naturales y artificiales	200
Apéndice 3: Identificación de los individuos	201





# Introducción general





# INTRODUCCIÓN GENERAL

## **El blenio de río: *Salaria fluviatilis***

El blenio de río, *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), es uno de los pocos miembros de la familia Blenniidae que vive en aguas dulces (Ficha 1: distribución). Se trata de un pez de pequeño tamaño (Ficha 1: descripción), que puede vivir entre 3 y 5 años. Es una especie bastante euriterma (tolera temperaturas que van de los 3°C a los 30°C) y eurihalina (Plaut, 1998), que se encuentra en los tramos bajos y medios de ríos, en lagos, estuarios y lagunas costeras. Su hábitat está constituido por substratos pedregosos en zonas de corriente y profundidad moderadas (Freeman et al., 1990). Esta exigencia ecológica hace que su localización en los ríos siga una distribución parcheada. En ríos mediterráneos se ha observado que presenta un crecimiento rápido entre primavera e inicios de verano y en otoño, mientras que en la época de estiaje (cuando decrece el caudal y escasean los recursos alimentarios), crece poco. Alcanza la madurez sexual en el primer año de vida y la reproducción se da entre mayo y julio, aunque los individuos de mayor edad pueden adelantarla al mes de abril (Vinyoles & Sostoa, 2007). En esta época del año, los machos excavan una cavidad bajo una piedra aplanada y cortejan a las hembras. El cortejo consiste en movimientos de la cabeza (*head nodding*), coloración oscura del cuerpo con bandas claras en la cresta, erección de la aleta dorsal, temblor corporal y movimientos de invitación al interior del nido. Por su parte, la hembra receptiva, adquiere una coloración de franjas oscuras muy conspicua (Neat et al., 2003; Lengkeek & Didderen, 2006). Durante el apareamiento, la hembra deposita una monocapa de huevos en la parte inferior de la piedra y el macho

---

los fecunda inmediatamente (Wickler, 1957a). Las hembras pueden poner hasta 3000 huevos (dependiendo de su tamaño y edad) en puestas fraccionadas de 300 a 600 huevos (Wickler, 1957b). A lo largo del periodo de reproducción los machos se aparean con varias hembras y presentan cuidado parental de los huevos hasta la eclosión, que consiste en defender y ventilar la puesta, así como realizar tareas de limpieza del nido. Durante el periodo de cuidado parental, el macho ve restringidas sus oportunidades de alimentarse, lo cual hace disminuir su condición física y favorece que pueda consumir huevos de sus propias puestas (canibalismo filial) (Vinyoles et al., 1999). Los huevos tardan unos 14 días en eclosionar a 20°C, las larvas se alimentan de zooplancton y son planctónicas hasta que alcanzan los 15 mm de longitud (Gil et al., 2010). Los adultos, por su parte, se alimentan de insectos, crustáceos y, en algunos casos, de alevines de otros peces (principalmente ciprínidos), aunque su presa principal son las larvas de quironómidos (Vinyoles, 1993).

Aunque en la lista roja de la IUCN se la cataloga como una especie de “Preocupación menor” (LC), *S. fluviatilis* ha sufrido una fuerte regresión y es una especie en peligro en varios países mediterráneos: Turquía (Balik, 1995), Italia (Bianco, 1995), Francia (Changeux & Pont, 1995) Grecia (Economidis, 1995), Croacia (Mrakovcic et al., 1995) y España (Elvira, 1995a). Se ha catalogado como especie de “especial interés” en el Anexo II del Real Decreto 439/90 por el cual se regula el Catálogo Nacional de especies amenazadas de España, y aparece como “especie en peligro de extinción” en el Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales Españoles (Doadrio, 2001). Se considera en peligro de extinción en Extremadura (Anexo I del Catálogo regional de especies amenazadas de Extremadura, ley 8/1998 de 26 de junio), Aragón (Anexo del Catálogo de especies amenazadas de Aragón, Decreto 49/1995 de 28 de



marzo), La Rioja (Catálogo regional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre de La Rioja, Decreto 44/1998 de 10 de julio) y el País Vasco (Catálogo vasco de especies amenazadas de la fauna y flora silvestre y marina, Decreto 167/1996, de 9 de julio). En Cataluña, se ha incluido dentro de la categoría D (especies que requieren la elaboración de un plan de conservación) del “Annex II de les espècies protegides de fauna salvatge autòctona de Catalunya (llei 3/88 de protecció dels animals)”. La principal amenaza para la especie es la pérdida de hábitat reproductivo (Ferrito & Tigano, 1996; Côté et al., 1999), aunque también la perjudica la excesiva extracción de agua (Changeux & Pont, 1995; Collares-Pereira et al., 2000), la contaminación (Hernández et al., 2000) y la introducción de especies invasoras (Elvira, 1995b).

Los peces de agua dulce suponen uno de los grupos de vertebrados más amenazados del planeta (Bruton, 1995). Esto se debe a que aproximadamente el 40% del total de especies de peces viven en aguas continentales (Lundberg et al., 2000) y que estos ecosistemas son especialmente vulnerables a la pérdida de biodiversidad (Sala et al., 2000) y a la actividad antropogénica (Strayer & Dudgeon, 2010). Entre las acciones para promover la conservación de las especies se encuentran la cría en cautividad y las reintroducciones (Seal et al., 1993; Tear et al., 1993) y ya se han aplicado en varias ocasiones a especies de peces de agua dulce (p.e., Shiri Harzevili et al., 2003; Shute et al., 2005; Williot et al., 2009). Aunque estas acciones no suponen soluciones idóneas, ya que el futuro de la biodiversidad está en conservar la naturaleza, a veces, se presentan como la única alternativa posible (Beissinger, 1997; Snyder et al., 1996). Dichas acciones de conservación necesitan tener en cuenta ciertos aspectos de las especies como la genética y ecología (p.e., Neves, 2004; Araki et al.,

---

2007), el comportamiento (Gibbons et al., 1995) y la biología reproductiva y del desarrollo (Sarkar et al., 2006).

Los estudios de conservación no necesariamente han de ir dirigidos a especies críticamente amenazadas. Las contribuciones al conocimiento que aporta el estudio de especies asociadas a otras especies que se hallan en peligro, de especies raras en áreas concretas o de soluciones generales que puedan tener aplicación en conservación pueden ser también muy beneficiosas (Sutherland, 1998). Así pues, investigaciones centradas en *S.fluviatilis* no sólo pueden aportar información relevante para su conservación sino que pueden beneficiar a otras especies con hábitos parecidos (i.e., bentónicas y con cuidado parental), y que también están en regresión, como por ejemplo el cavilat (*Cottus gobio*) en Europa (incluido en el Annex II of the Habitats Directive). Hay que tener en cuenta que los peces con cuidado parental suelen tener intervalos de puesta más largos y que según la IUCN esto se ha asociado a categorías de riesgo más elevadas (Jager et al., 2008). Además, se ha descrito que *S. fluviatilis* es el huésped del gloquidio de la almeja perlífera gigante *Margaritifera auricularia* (Araujo et al., 2001). Este bivalvo es una especie en peligro crítico de extinción (Categoría CE, IUCN), que necesita de un pez hospedador (que mantenga a los gloquidios en sus branquias durante la fase pelágica) para poder completar su ciclo biológico. Así pues, una mejora en el estado de las poblaciones naturales de *S.fluviatilis* podría beneficiarle.

## **Aplicación de los estudios de comportamiento a la conservación de las especies**

El conocimiento del comportamiento es esencial para entender las interacciones entre el individuo y su entorno, repercutiendo en el crecimiento y persistencia de las poblaciones naturales (Charmantier et al., 2008; Schmitz et al., 2008). Entender los procesos evolutivos subyacentes al comportamiento permiten predecir la capacidad adaptativa de las especies en un mundo que cambia rápidamente bajo la influencia humana (Both & Visser, 2001; Sih et al., 2011). En los últimos 20 años se ha observado un incremento de publicaciones que empiezan a subrayar la estrecha relación existente entre los estudios de comportamiento animal y los de conservación (p.e., Caro & Durant, 1995; Sutherland, 1998; Caro, 1999; Blumstein, 2006). Estas dos disciplinas hasta hace relativamente poco se centraban en intereses diferentes. Mientras que los estudiosos del comportamiento investigaban sobre mecanismos causales y la teoría evolutiva (ciencia básica), los conservacionistas trabajaban en aspectos aplicados, y no existía conciencia de la importancia de unir ambas ramas del conocimiento. Se conoce como “comportamiento y conservación” (*conservation behaviour*) a esta disciplina emergente que utiliza conocimientos en comportamiento para resolver problemas de conservación (Blumstein & Fernández-Juricic, 2004).

Los comportamientos que más pueden aportar a la ciencia de la conservación son aquellos relacionados con: la supresión reproductora, el infanticidio, los mecanismos de elección de pareja, los sistemas de apareamiento, la plasticidad social, la dispersión, la migración, la atracción conspecífica y los comportamientos reproductivos que precisan de ciertos recursos ambientales (i.e., lugares de cría

---

apropiados) sensibles a la actividad humana (Anthony & Blumstein, 2000). Su importancia radica en el efecto que tienen sobre la  $N_e$  (tamaño poblacional efectivo), ya que pueden reducir el tamaño y la tasa de crecimiento así como afectar el sesgo reproductivo de una población, lo cual los relaciona estrechamente al efecto Allee (Stephens et al., 1999). De los comportamientos mencionados, en la presente tesis, se estudiarán algunos aspectos relacionados con la supresión reproductora y la influencia de ciertos recursos ambientales sobre el comportamiento reproductivo. La supresión reproductora consiste en la presencia de machos dominantes que monopolizan los recursos reproductivos y que limitan las oportunidades de reproducirse a otros machos maduros sexualmente. Es importante conocer cómo funciona la supresión reproductora, ya que puede debilitar a una población cuando los individuos inhibidos no son capaces de reproducirse inmediatamente al desaparecer los dominantes (Greene et al., 1998). Por otra parte, es de interés estudiar cómo la disminución, a menudo provocada por la acción humana, de un recurso necesario para reproducirse (p.e., árboles con cavidades en aves) afecta al comportamiento y reproducción de las especies. Otros aspectos del comportamiento que se estudiarán, y cómo veremos en breve, también pueden tener repercusión en la conservación, son los que conciernen a la personalidad, el aprendizaje y el cuidado parental.

El estudio del comportamiento se presenta como una herramienta imprescindible para detectar de forma sensible las consecuencias de la pérdida/fragmentación del hábitat y los cambios en la tasa de mortalidad de las especies (Goss-Custard & Sutherland, 1997) y supone un buen indicador de “salud” de una población (Anthony & Blumstein 2000). A parte de estas aplicaciones, no hay que

despreciar el interés que esta temática despierta en la sociedad y, por tanto, su potencial papel educativo (Sutherland, 1998).

### **Comportamiento y desarrollo**

Los peces constituyen el grupo de vertebrados con mayor variabilidad en los sistemas de apareamiento (Barlow, 1991). En muchas especies los machos presentan tácticas reproductivas alternativas (*Alternative Reproductive Tactics*, ARTs, Ficha 2) que se corresponden a distintos morfotipos que difieren en morfología, fisiología y comportamiento (Taborsky, 2001). El diferente grado de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CSSs) es una de las diferencias más evidentes entre machos con distintas tácticas reproductivas (Kodric-Brown, 1998; Oliveira et al., 2005). Las hembras, valoran la calidad del macho basándose en estos caracteres (Kirkpatrick, 1987), pudiendo incluso renunciar a reproducirse si éstos están expresados por debajo de un cierto umbral (Blumstein, 1998). En muchas especies las ARTs son secuenciales (Taborsky, 1998; Gross, 1996); los machos grandes, y con CSSs desarrollados, suelen actuar como dominantes, mientras que los machos jóvenes, más pequeños, tienen los CSSs poco desarrollados y se comportan como parásitos. La táctica parásita (que también se puede llamar táctica *sneaker*) consiste en entrar en los nidos de los machos dominantes y conseguir fertilizaciones. El momento en el que el macho joven pasa de *sneaker* a dominante no suele estar fijado genéticamente (Immler et al., 2004) y su adopción depende de factores ambientales como: el contexto social, la competencia por recursos reproductivos y la disponibilidad de hembras (De Fraipont et al., 1993; Taborsky, 1994; Burmeister et al., 2005). Conocer cómo la adopción de las tácticas

---

reproductivas y el desarrollo de los CSSs se ajusta a los cambios ambientales y permite a las poblaciones sobrevivir en condiciones extremas tiene interés en la conservación y gestión de las especies.

La familia de los blénidos resulta muy interesante para estudiar la plasticidad fenotípica en la adopción de las ARTs (Ficha 3). En el caso de *S.fluviatilis* los CSSs de los machos consisten en una cresta cefálica y un par de glándulas anales que cubren los dos primeros radios de la aleta anal. El grado de desarrollo de los CSSs puede ayudar a distinguir la ART adoptada por cada macho (Neat et al., 2003) ya que los machos dominantes tienen CSSs desarrollados y los no-dominantes no. La plasticidad en la adquisición de las ARTs y el desarrollo en CSSs ya se ha descrito en una de las especies de blénido filogenéticamente más próxima a *S. fluviatilis*, el gallerbo *S. pavo* (Saraiva et al., 2010, 2012). Conocer cómo factores ambientales del tipo social y la disponibilidad de nidos pueden afectar en la adopción de las ARTs puede ayudar a comprender la adaptabilidad de la especie a los cambios en del entorno. De hecho, las poblaciones de *S. fluviatilis* que viven en ríos mediterráneos se encuentran en hábitats sometidos a fuertes fluctuaciones de caudal, temperatura y disponibilidad de recursos tróficos (Vinyoles & Sostoa, 2007). Se prevé que el cambio climático exagerará estas fluctuaciones, a lo que se sumarán mayores impactos antropogénicos (Vörösmarty et al., 2000). La presencia de ARTs podría ser la clave que permitiese sobrevivir a *S.fluviatilis* a estos cambios si la adopción de una u otra táctica se adaptase a las condiciones ambientales.

Otro punto de interés es estudiar si el comportamiento de cuidado parental puede afectar al desarrollo embrionario. La cría en cautividad de los peces se puede

ver beneficiada por investigaciones acerca de diversos aspectos relacionados con la obtención de larvas de buena calidad: genética de los padres (Nagahama, 1994), alimentación de la hembra (Harel et al., 1994), condiciones físico-químicas (Gillet, 1994; Brown et al., 1995), condiciones de confinamiento de los progenitores (Campbell et al., 1994), sistemas de prevención de infecciones para las puestas (Brock & Bullis, 2001) y alimentación en las primeras fases de larva (People Le Ruyet et al., 1993). Se sabe que el cuidado parental favorece a la supervivencia de la descendencia (Clutton-Brock, 1991) pero hay pocos estudios que hagan referencia a la posibilidad de que éste influya directamente sobre el desarrollo embrionario. Hasta el momento, al respecto, sólo se ha atribuido que el cuidado parental, al favorecer la oxigenación de los huevos, pueda acelerar su desarrollo (Zoran & Ward, 1983), pero todavía se desconoce si pueden existir otros mecanismos implicados (por ejemplo, intercambio de hormonas). En las primeras fases de desarrollo los individuos son muy vulnerables a la depredación (Bailey, 1984) y a la muerte por inanición (Miller et al., 1988). Pequeñas diferencias iniciales en variables morfológicas como por ejemplo la longitud (Hare & Cowen, 1997) pueden ser determinantes para la supervivencia de las larvas. En *S. fluviatilis*, el desarrollo embrionario y la descripción de la larva han sido aportados por Gil et al. (2010). Estos autores proponen un sistema efectivo para la cría en cautividad de la especie. Sin embargo, en dicha investigación, se obtuvo una alta mortalidad de larvas en los primeros estadios de desarrollo (85% de los individuos). Este problema podría mitigarse incrementando la obtención de embriones durante la cría. Una posibilidad para alcanzar este objetivo podría ser mantener las puestas separadas de sus padres, lo cual evitaría el canibalismo filial por parte del macho cuidador. Sin embargo, antes de implementar este tipo de propuesta se requiere realizar experimentos que estudien

---

el posible efecto de la presencia de los padres (y del cuidado parental) sobre el desarrollo de los embriones.

### **Personalidad y aprendizaje**

Se puede definir la personalidad animal como el conjunto de comportamientos (o síndrome de comportamiento) que difiere entre individuos de una misma especie y que suele mantenerse constante en el tiempo y en distintos contextos (Sih et al., 2004). Esta personalidad se puede describir usando cinco categorías genéricas: actividad, osadía, exploración, agresividad y sociabilidad (Réale et al., 2007), de las cuales una de las más estudiadas es la osadía. Se puede definir la osadía (o *boldness*) de un individuo como el comportamiento que éste presenta frente a objetos o situaciones nuevas que plantean cierto riesgo (Sloan Wilson et al., 1994). En muchos programas de reintroducción los animales liberados son seleccionados en función de la edad, sexo y grado de salud (Yalden, 1993; Sarrazin & Legendre, 2000), pero cada vez se ve más clara la importancia de tener también en cuenta el temperamento o personalidad animal (Ficha 4). Conocer mejor las diferencias de personalidad entre individuos puede ser esencial en programas de conservación (McDougall et al., 2006), siendo los comportamientos más relevantes aquellos asociados con la respuesta anti-predador, exploración y forrajeo (p.e., Godin & Davis, 1995; Fraser et al., 2001; Kurvers et al., 2010). Los niveles de osadía están sujetos a la selección natural (Huntingford & Giles, 1987), por lo que individuos con niveles inapropiados podrían tener menor supervivencia en la naturaleza. Esto dependerá de cada contexto y de cada especie. Conocer estos procesos puede ser relevante a la hora de recuperar poblaciones



salvajes. Se ha visto, por ejemplo, que en el zorro veloz (*Vulpes velox*), los individuos más *bold* morían con más frecuencia al ser liberados en la naturaleza (Bremner-Harrison et al., 2004). Por el contrario, en el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*), los individuos más *bold* fueron los que sobrevivieron más (Sinn et al., 2014).

Recientemente la variación individual en comportamientos como la osadía o la capacidad de aprendizaje se ha convertido en un tema de interés en acuicultura y en la cría de peces (Brännäs & Johnsson, 2008; Huntingford & Adams, 2005). Numerosos trabajos han encontrado una asociación entre la osadía y ciertas características de los peces que podrían tener aplicación tanto en la cría en cautividad como en las reintroducciones, entre las que cabe citar: la tasa de crecimiento (Biro & Stamps, 2008), los niveles de agresividad (Tulley & Huntingford, 1988), la dominancia (Sundström et al., 2004) y la capacidad de exploración (Dzieweczynski & Crovo, 2011). Por otra parte, la capacidad de aprendizaje también es una característica favorable para las especies de peces, ya que les permite aprender de la experiencia y adaptarse al medio en el que viven (Dodson, 1988). Se requieren estudios que investiguen aspectos cognitivos y evolutivos del aprendizaje para poder ser aplicados en los programas de conservación. Esta faceta ha sido muy útil a la hora de reeducar a los peces criados en cautividad antes de ser liberados, como por ejemplo, la recuperación del reconocimiento del predador (Chivers & Smith, 1994) o la adquisición de hábitos por imitación (Brown & Laland, 2003).

Dado a que en algunas especies de peces la osadía se ha asociado a dominancia (Sundström et al., 2004), es interesante comprobar si en *S.fluviatilis* los machos atrevidos son aquellos que adoptan la táctica dominante y desarrollan más los CSSs.

---

Esta relación podría ayudar a predecir con antelación qué machos monopolizarán los recursos o bien, cuál es el perfil de comportamiento de un macho dependiendo del grado de desarrollo de sus CSSs. También es de interés ver si la hembra escoge aparearse con machos *bold*, como ocurre en otras especies de peces (Godin & Dugatkin, 1996). En cuanto al aprendizaje, estudiaremos el que concierne a las habilidades espaciales basadas en marcas (*landmarks*) visuales. Los peces dependen de su capacidad de orientación y aprendizaje para llevar a cabo actividades vitales (p.e., Markel, 1994). Estos mecanismos cada vez se están conociendo mejor y se está revelando que el uso de información espacial, más que un aspecto filogenético, sería un aspecto adaptativo a las condiciones ecológicas (Sovrano et al., 2002). Conocer qué sistemas utiliza el individuo para orientarse es importante para saber cómo los cambios estructurales del ecosistema pueden afectarle. Los peces que utilizan estímulos visuales podrían ser más sensibles al aumento de turbidez (Girvan & Braithwaite, 1998). Los sexos podrían responder de forma diferente a estas perturbaciones ya que cada uno podría utilizar sistemas de orientación diferente. En el caso de los blénidos, se ha descrito que machos y hembras hacen un uso diferente del espacio. Mientras que los machos suelen ser territoriales y están muy vinculados al nido (Neat & Lengkeek, 2009), las hembras tienen mayores espacios vitales (*home-range*) y recorren largas distancias (Costa et al., 2011). En peces se ha visto que las hembras escogen a machos con mayor habilidad espacial (Shohet & Watt, 2009) pero no se sabe qué criterio utilizan para reconocer esta cualidad en el macho.

En la presente tesis nos centraremos en profundizar en aspectos de plasticidad fenotípica, cría en cautividad y comportamiento de *S. fluviatilis*. Con tal fin se llevaran a cabo una serie de experimentos en el laboratorio con ejemplares capturados en el río Segre (ver Ficha 5).

## Ficha 1: *Salaria fluviatilis*

**Nombres comunes:** Blenio de agua dulce (Castellano), Rabosa o Bavosa de riu (Català), Freshwater blenny (Inglés), Blennie fluviatile (Francés), Caboz-de-água-doce (Portugués).

**Taxonomía:** Clase: Actinopterygii, Orden: Perciformes, Familia: Blenniidae.

**Distribución:** Europa (Albania, Croacia, Francia, Grecia, Italia, Montenegro, España y Portugal). Asia (Turquía e Israel). África (Argelia y Marruecos). En la Península Ibérica se encuentra en las cuencas del Fluvià, Ebro, Júcar, Segura, Guadiana y Guadalquivir (Kottelat & Freyhof, 2007). Mediante el estudio de aloenzimas de varias poblaciones de lago y de río en Grecia y en la Península Ibérica se ha podido reconstruir el origen y divergencia de dichas poblaciones a partir de un ancestro marino (Perdices et al., 2000). Los resultados sugieren que hubo distintos episodios de colonización. Las poblaciones que quedaron aisladas primero fueron las de lago (lago Trichonis y lagunas de Ruidera), mientras que las poblaciones de río debieron de estar conectadas entre sí hasta tiempo más recientes, lo cual las hace más similares genéticamente. Hace relativamente poco se consideraba la única especie de blenio de agua dulce, pero recientemente se han descrito otras especies: *S. economidisi* (Kottelat, 2004) en el lago Trichonis (Grecia) y *S. atlantica* (Doadrio et al., 2011) en ríos africanos de vertiente Atlántica.

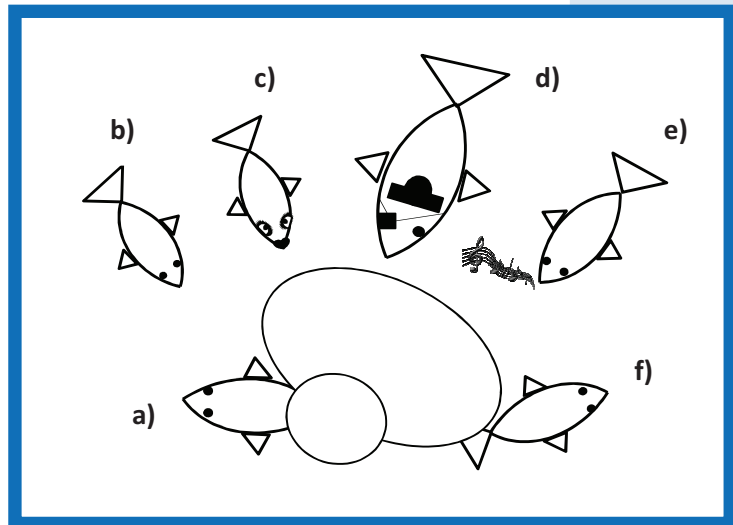
**Descripción:** Pez de pequeño tamaño (de 8 a 15 cm), con cuerpo comprimido, que disminuye en altura de la región cefálica a la caudal. Las aletas pélvicas son anteriores a las pectorales, tienen una sola espina y le permiten apoyarse en el fondo. La aleta dorsal y anal están formadas por radios espinosos y blandos (D: XII-XIII + 16-17; A: II + 16-19) y recorren la mayor parte del cuerpo. La aleta caudal tiene un perfil distal convexo. No tiene escamas y para compensarlo, secreta una abundante mucosidad a través de unos poros mucosos situados alrededor de los ojos y a lo largo de la línea lateral (muy marcada en esta especie). Al no tener vejiga natatoria, su capacidad natatoria es limitada y se desplaza mediante movimientos rápidos

y cortos. Posee dientes pectiniformes en ambas mandíbulas, con un par de caninos especialmente desarrollados. La coloración es muy variable, pero en general consiste en bandas transversales oscuras sobre un fondo verdoso-amarillento. Presenta dimorfismo sexual. Los machos son de mayor tamaño, más robustos, con la aleta dorsal más grande y durante la época reproductiva desarrollan CSSs (Ficha 3).



## Ficha 2: Tácticas reproductoras alternativas (ARTs)

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un organismo de expresar distintos fenotipos a partir de un sólo genotipo en respuesta a su entorno (West-Eberhard, 2003). En muchos peces encontramos ejemplos de dicha plasticidad (p.e., Garduño-Paz et al., 2010). En algunas especies esta plasticidad afecta a la táctica reproductiva que adopta el macho frente a un determinado contexto. Las tácticas

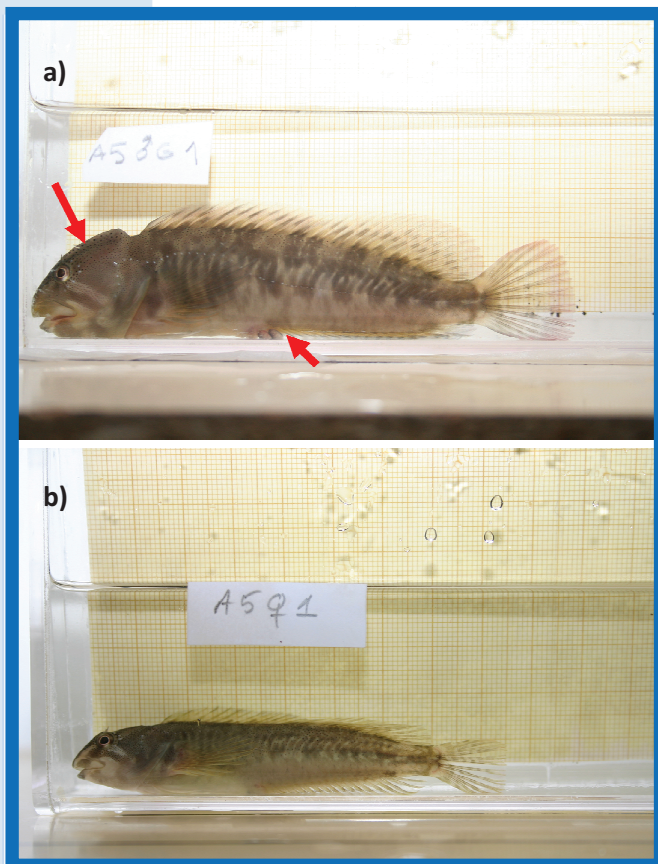


reproductivas alternativas (ARTs) evolucionan a partir de la competencia entre machos por recursos limitados (i.e., hembras o lugares de puesta). Unos pocos machos suelen monopolizar los recursos, **machos burgueses (a)** y esto promueve a que el resto desarrolle otros mecanismos para conseguir acceder al recurso. En peces se han descrito numerosas ARTs (Taborsky, 1994, Oliveira et al., 2008). La más frecuente de dichas tácticas alternativas es la táctica parásita o **sneaker (b)**, en la que el macho que la adopta entra furtivamente en el nido del macho burgués o bien intercepta una pareja que está apareándose y parasita fertilizaciones. Algunos *sneakers* se han especializado en la táctica **female mimicry (c)**, es decir, para acceder más fácilmente a los huevos, confunden al macho burgués haciéndose pasar por hembras, imitando su coloración y comportamiento. Otras ARTs menos frecuentes y conocidas son por ejemplo la táctica **pirata (d)** que suele ser adoptada por machos grandes que desplazan a un macho burgués de su nido. Esto les beneficia en cuanto a que no han invertido energías en acondicionar el nido ni en defenderlo. Por otra parte, hay machos que adoptan la táctica de **interceptor (e)** que consiste en interceptar y robar al macho burgués la hembra que había atraído éste en un principio. Por último, una táctica relacionada con la *sneaker* pero no tan bien conocida es la táctica **satélite (f)**. En este caso, el macho satélite es un macho “tolerado” por el macho burgués y que establece su territorio dentro del que defiende éste segundo. El macho satélite intenta conseguir sus propias puestas aunque a veces también actúa como *sneaker*. No se sabe con exactitud porqué el macho burgués acepta a los satélites pero algunas hipótesis sugieren que el coste de expulsión es demasiado elevado y que por otro lado la presencia de satélites podrían hacer más atractivo un territorio para las hembras y mejorar su defensa.

## Ficha 3: Los Caracteres sexuales secundarios (CSSs)

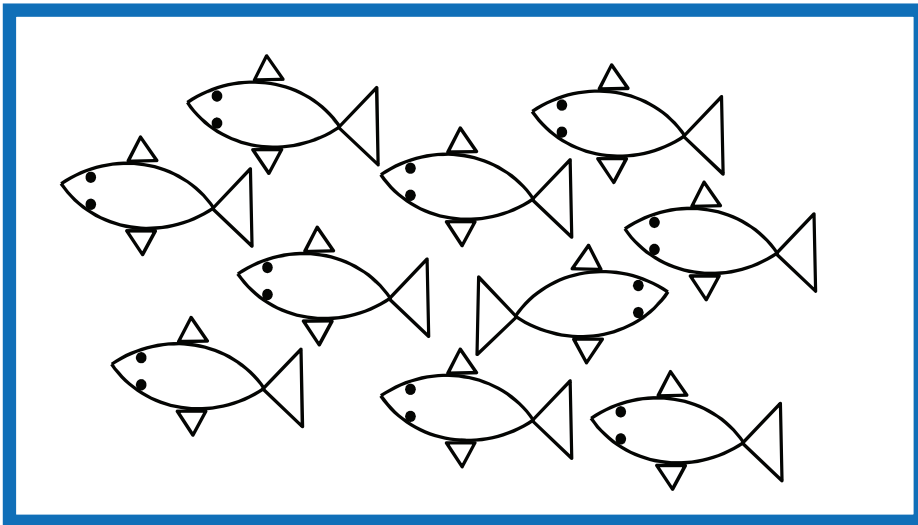
Los caracteres sexuales secundarios son características propias de un individuo sexualmente maduro que distingue a los sexos y que no están directamente implicados en la reproducción. Muchas especies utilizan los CSSs como señales informativas sobre la calidad genética del macho (Karino & Haijima, 2001; Hughes et al., 2005), su estado de salud (Wedekind, 1992), su condición física (Andersson, 1986) y su grado de agresividad (Viera et al., 2008). Por ello es habitual que intervengan en la elección de la hembra (Kirkpatrick, 1987), en la competencia intrasexual (Grether, 1996), o bien en ambos a la vez (Berglund et al., 1996). La familia de los blénidos resulta muy interesante para estudiar estos caracteres. Aunque no todos los miembros de dicha familia presente CSSs, los más frecuentes en muchas especies son: el desarrollo de una cresta cefálica, cirros sensoriales, tamaño de la aleta dorsal y glándulas anales (Zander, 1975; Oliveira et al., 1999b; Giacomello & Rasotto, 2005; Barata et al., 2008). Ya Darwin (1872) sugirió que los ornamentos sexuales que presentaban los blénidos estaban sujetos a la selección sexual. Los rasgos de reproducción y ecología que han podido

predisponer la acción de la selección natural y el desarrollo de CSSs tan conspicuos en los blénidos han sido resumidos por (Neat & Lengkeek, 2009) y son básicamente: (1) un sistema de apareamiento promiscuo, lo cual hace que la variabilidad en el éxito reproductivo sea elevada, (2) territorialidad, lo cual implica competencia entre los machos y la aparición de ARTs, (3) cuidado parental, lo cual predispone a las hembras a utilizar sistemas para identificar a los machos de mejor calidad, (4) viven en hábitats con mucha luz, lo cual favorece las señales visuales, y (5) tienen el hábito de adoptar oquedades u otras estructuras como nidos, lo cual permite que las desventajas de tener ornamentos llamativos sean menores. El dimorfismo sexual en *S.*



*fluviatilis* se puede ver en la ilustración de la izquierda (a. macho en el que se han señalado los CSSs: la cresta y las glándulas anales; b. hembra).

## Ficha 4: Personalidad animal, historia y perspectivas



El estudio de la personalidad animal es una disciplina reciente, multidisciplinaria y controvertida (Gosling, 2008). Reciente en cuanto a que, a pesar de que los primeros estudios se llevaron a cabo hace aproximadamente entre 50-100 años (Pavlov, 1906; Yerkes, 1939; Hebb, 1946), es en los últimos 20 años en los que ha resurgido y cobrado importancia. Multidisciplinaria porque es una temática abordada por múltiples disciplinas: etología, ecología del comportamiento, endocrinología, conservación animal, veterinaria, biología, genética y psicología comparada (entre otros). Controvertida porque en un principio la comunidad científica se mostró reticente en aceptar que el término “personalidad” pudiese aplicarse a animales no-humanos. Estas dudas quedaron resueltas cuando Gosling et al. (2003) demostraron objetivamente que la personalidad existía en animales ya que cumplía con los tres grandes criterios que definen los estudios de personalidad en humanos: 1) coincidencia en las valoraciones recogidas por observadores independientes, 2) capacidad de estas valoraciones en predecir resultados y 3) capacidad de reflejar atributos reales de los individuos valorados. Los estudios en personalidad animal tienen la ventaja de que permiten un grado de manipulación superior al que se da en estudios con humanos (control sobre los individuos y su entorno), facilitan el estudio de los parámetros fisiológicos asociados al comportamiento (p.e., disección del cerebro), permiten periodos de observación más largos y facilitan los estudios longitudinales (ciclos de vida más cortos y posibilidad de seguir varias generaciones), y son menos costosos económicamente. Los resultados obtenidos pueden tener repercusión a la hora de seleccionar individuos animales para determinadas funciones (escoger los perros más aptos para ser entrenados para detectar explosivos, cría en cautividad y repoblación en la naturaleza).

## Ficha 5: El río Segre (Camarasa)



Todos los peces utilizados en la presente tesis fueron capturados (en distintos momentos) en el río Segre, cerca de Camarasa. Este río de 265 km de longitud nace en la vertiente norte del Pico del Segre, en el circ de la Culassa (Cerdaña francesa) y desemboca en el río Ebro (a la altura de Mequinenza). Su

cuenca fluvial (21.922 km<sup>2</sup>) es la más grande e importante de las cuencas internas de Catalunya. La precipitación media es de 814 mm/año y la temperatura anual media va de los -5°C a los 14.7°C. Estos dos parámetros oscilan mucho de los tramos altos (Pirineo) a los tramos bajos cerca de la desembocadura. En Camarasa (situada aproximadamente a unos 89 km de la desembocadura), concretamente, la precipitación media es de 600-800 mm/año y la temperatura anual media de 10-15°C. Las precipitaciones se concentran en los meses de primavera y otoño, mientras que son escasas en invierno y verano. En Camarasa el cabal medio es de 70 m<sup>3</sup>/s (con un máximo de 120 m<sup>3</sup>/s en junio y un mínimo de 50.8 m<sup>3</sup>/s en agosto). El régimen hidrológico natural de la cuenca es de tipo nivopluvial, sin embargo, los embalses lo han afectado en gran medida. El río Segre tiene ocho embalses, la mayoría construidos a finales del siglo pasado. Justo antes de Camarasa hay el embalse de Camarasa (construido en 1920 y con una capacidad de 113 hm<sup>3</sup>) en el tramo final de la Noguera Pallaresa, uno de sus principales afluentes. La Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) ha notificado que el río Segre se encuentra contaminado en más del 70% de su recorrido, lo que lo convierte en el más contaminado de Catalunya, sólo por detrás del Besòs y el Llobregat. Sin embargo, el tramo comprendido entre Artesa de Segre y Camarasa, se considera uno de los últimos tramos que sobrevive relativamente intacto después de la construcción del embalse de Rialb. En esta zona, aparte de *S. fluviatilis*, se pueden encontrar otros peces como el barbo de Graells (*Luciobarbus graellsii*), la trucha común (*Salmo trutta*) y el gobio ibérico (*Gobio lozanoi*) (Plarromaní, 2009). *Salaria fluviatilis* se considera abundante en el lugar de captura (Sostoa et al., 2010). Al finalizar los experimentos todos los peces fueron devueltos al río.





# Objetivos y estructura





## OBJETIVOS

En la presente tesis se estudian distintos aspectos del desarrollo y del comportamiento del blenio de río (*Salaria fluviatilis*) con el fin de aportar conocimientos útiles para la conservación de la especie. Con éste propósito general, se decidió establecer los siguientes objetivos:

1. Evaluar cómo el factor social (entendido como las interacciones entre machos de distintas tallas) y la abundancia de nidos (cuando estos suponen un recurso limitante o no limitante) afectan la plasticidad fenotípica en la adopción de la táctica burgués de los machos.
2. Determinar si la ausencia de los padres (macho y hembra progenitores) tiene efecto en el desarrollo de los embriones. Concretamente, se estudiará si esta ausencia afecta a la secuencia ontogénica embrionaria y al desarrollo de ciertas estructuras morfológicas.
3. Estudiar si existe relación entre el comportamiento atrevido en situaciones de riesgo (osadía) y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CSSs) del macho, y de si éstos últimos se relacionan con la adquisición del estatus parental.
4. Definir si la especie es capaz de usar marcas visuales para orientarse y si existen diferencias entre sexos. En caso de que los machos usen marcas visuales se estudiará si existe relación entre la habilidad espacial y el desarrollo en caracteres sexuales secundarios.



## ESTRUCTURA DE LA TESIS

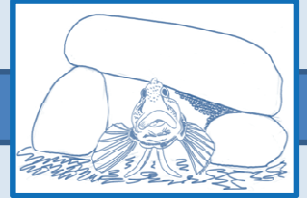
La tesis se estructura en dos capítulos conteniendo dos artículos cada uno.

El capítulo 1, titulado “Comportamiento y desarrollo” ha querido englobar las dos investigaciones que relacionan el desarrollo morfológico de los peces (en un caso adultos y en el otro embriones) con distintos tipos de interacciones intraespecíficas. En el punto 1.1. se estudiará la plasticidad fenotípica de los machos en respuesta a las condiciones sociales y a la densidad de nidos. En el punto 1.2. se tratará el desarrollo embrionario dependiendo de la presencia o ausencia de la pareja progenitora (y en consecuencia, de cuidado parental).

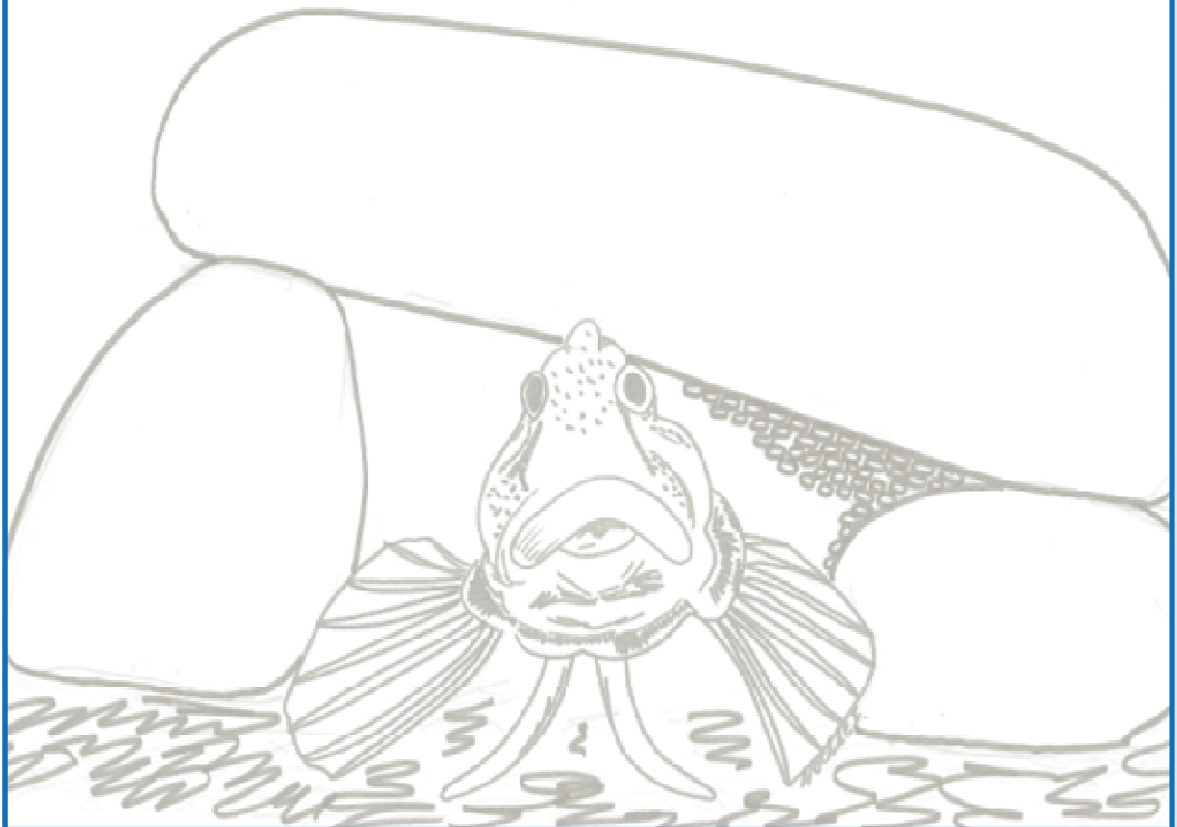
A continuación, en el capítulo 2, titulado “Personalidad y aprendizaje” se incluyen dos investigaciones que pretenden estudiar cómo la personalidad y la cognición animal pueden afectar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la dominancia de los machos. Concretamente, en el punto 2.1. se estudiará la relación entre los caracteres sexuales secundarios (CSSs) y la osadía (*Boldness*). En el punto 2.2. se estudiará la relación entre sexo y habilidad espacial y entre el desarrollo en CSSs y habilidad espacial.

Al final de la tesis, la bibliografía general recogerá todas aquellas citas que aparecen fuera de los capítulos. Por último, también se han añadido unos apéndices con el fin de ilustrar mejor los diseños experimentales y hacerlos más comprensibles al lector.



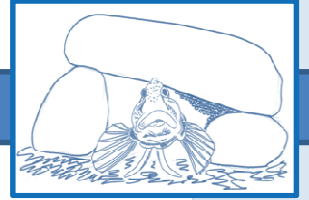


# Capítulo 1. Comportamiento y desarrollo









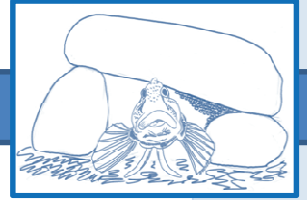
## Sección 1.1.

Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*)



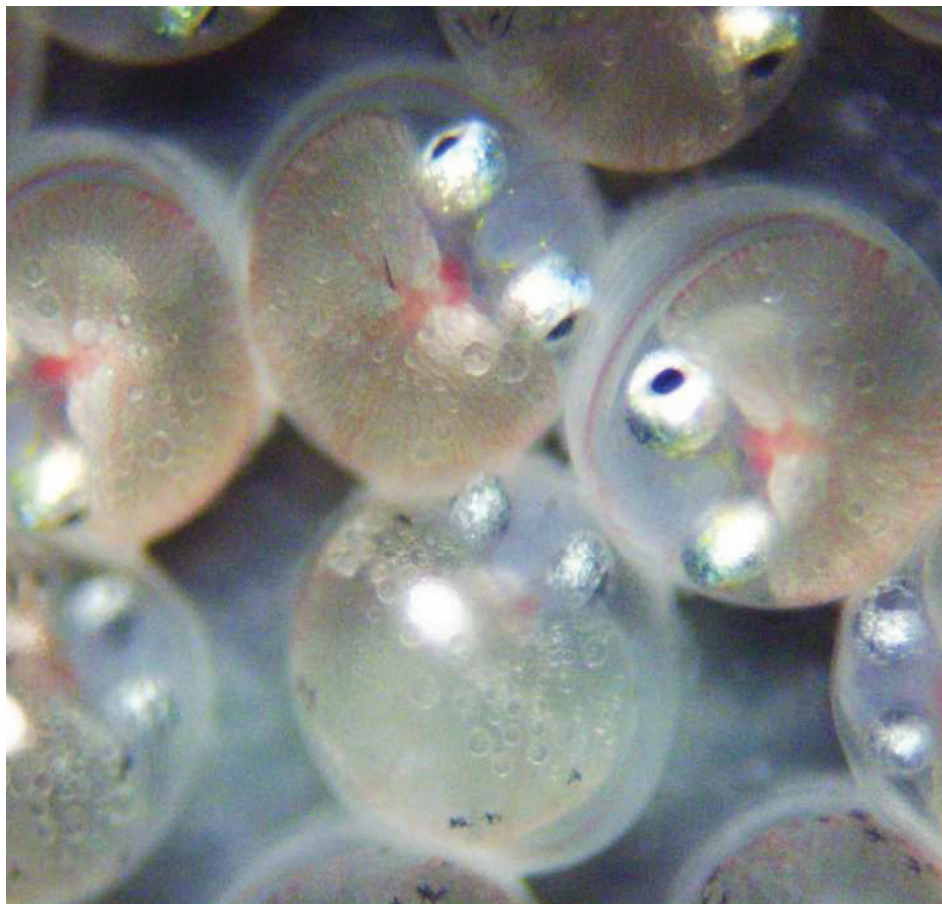
Texto del artículo disponible en / Text de l'article disponible a / Available online at:

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/cjz-2013-0233>



## Sección 1.2.

La presencia de los padres afecta al desarrollo de los embriones en *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), un pez con cuidado parental





**Parents' presence affects embryos' development in  
*Salaria fluviatilis* (Asso 1801), a fish with parental care**

**Noëlle Fabre<sup>\*</sup>, Eduardo García-Galea<sup>\*</sup> & Dolors Vinyoles<sup>\*,1</sup>**

<sup>\*</sup>Department of Animal Biology (Vertebrates), Faculty of Biology,

University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Tel.: +34 (0) 934039808; fax: +34 (0) 934035740; email: d.vinyoles@ub.edu

## **Abstract**

In fishes, the parents' presence improves embryos' survival through parental care but it is also associated with some disadvantages such as clutch cannibalism and male physical condition loss. Captive breeding of the river blenny *Salaria fluviatilis* might improve if these disadvantages were avoided by artificially replacing parental care benefits in the lab. Before accepting this procedure, it should be studied whether embryo development is dependent or not on any other unknown effect related to the parents' presence. In this study, the ontogenetic sequence and some morphological structures (standard length, head height, jaw length and yolk-sac volume) from embryos reared both in the presence and in the absence of the parents were compared. In the parents' absence treatment, well-developed embryos were obtained, but a smaller size of the yolk-sac, a greater head height and a greater jaw length than in the parents' presence treatment were found at day 11 after oviposition.

## **Keywords**

Captive breeding; embryonic growth; freshwater blenny; ontogeny

## Introduction

Although fish parental care is associated with an increase in the embryos' survival (Clutton-Brock, 1991) it entails some disadvantages. For example, some behaviours such as filial cannibalism often produce significant losses in the number of embryos both in nature (Manica, 2002) and under captivity conditions (Schwanck, 1986). Furthermore, the energetic expenditure associated with parental care produces a decrease in the physical condition of the progenitors involved that might compromise their future reproduction (Sabat, 1994; Smith & Wootton, 1995). These circumstances introduce an interesting question. Does the presence of the parents still benefit embryo development under controlled conditions (absence of both predators and pathogens and suitable oxygen supply)? If the answer is no, parents could be removed from the aquaria containing clutches, thus avoiding egg cannibalism, preventing male condition loss and increasing the possibility of further matings. There are no studies addressing these topics so far. Information related to the care of the eggs has a practical application for the captive breeding of endangered species.

Fish eggs show certain permeability to external substances (Potts & Rudy, 1969). Consequently, embryo development could potentially be affected by pheromones released by conspecifics. Testosterone and other hormones secreted by the parental male (Katsel et al., 1992; Stacey & Cardwell, 1997) might penetrate the eggs. It has been shown that, in some vertebrates, androgen levels before birth have an effect on development (Staub & De Beer, 1997). In fishes, testosterone has been described to have an effect on yolk utilization rates (McCormick, 1999). Several substances released through the skin or through specialized structures like the anal glands in blennies

(Serrano et al., 2008) might contain compounds with an effect on embryo development. Even the sperm, that some parental males release repeatedly on clutches (e.g., Marconato et al., 1996), might have some kind of effect (Kekäläinen et al., 2010). Similarly, female presence could affect embryo development directly through the multiple hormones they release (Sorensen & Stacey, 2004) or indirectly through the effects on the male behaviour which increases parental care in the presence of females (Pampoulie et al., 2004). All these aspects suggest that the mere presence of parents in the nest could play a role in the growth of the embryo.

The river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso 1801) is a freshwater fish from the Blenniidae family that lives in rivers and lakes in the Mediterranean basin and in Portugal. This species is classified as vulnerable or endangered in many of the countries where it occurs (see Vinyoles & Sostoa, 2007). During the breeding season, males excavate a nest cavity under a stone, and females lay monolayer clutches of eggs under the stone. Females are multiple spawners and they lay from 600 to more than 3000 eggs (depending on their body size) in clutches of 300-600 eggs (Vinyoles & Sostoa, 2007). After fertilization, only males provide care to the eggs by fanning and defending them until they hatch. Several females might spawn with one male, which guards the eggs at different stages of development (Neat et al., 2003). Eggs are demersal and adhesive; embryos are sensitive to low oxygen concentration and they hatch in about 14 days at 20 °C (Wickler, 1957).

For *S. fluviatilis*, embryo development and larvae description have been reported by Gil et al. (2010). These authors proposed an efficient method to breed this species. However, they found a high mortality of larvae in the first stages of development (85% of the individuals). Fry recruitment in captivity might be improved by increasing



embryo production. One possibility to attain this goal would be to maintain the clutches separated from the parents in fish species presenting egg care, thus avoiding egg cannibalism. Filial cannibalism and heterocannibalism occur in *S. fluviatilis* (Vinyoles et al., 1999). However, before accepting this possibility, parental presence effects on embryo development need to be better understood.

This study examines, for the first time in fishes, the potential effects of the absence of parents on the development of embryos under controlled conditions in the laboratory. The main objective was to analyze if there were morphological differences between embryos reared in the presence and in the absence of the parents. Two experiments were conducted in order to determine the effects of parental presence on the ontogenetic sequence of embryos and on the embryos' morphological development, respectively. Results will be discussed focusing on captive breeding improvement and future conservation programmes.

## **Material and methods**

Methodological procedure was based on the experimental design proposed by Gil et al. (2010) who studied the embryo and larvae development of *S. fluviatilis* from eggs maintained in the parents' presence. Two experiments were conducted from April to July 2011 (Experiment 1: Parental presence effect on the embryonic ontogenetic sequence) and from April to July 2012 (Experiment 2: Parental presence effect on the embryonic morphological development). Wild fish were used in both experiments. Fish were caught in the River Segre (a tributary of the Ebro Basin), close to the locality of

Camarasa (Spain) both in November 2010 (Experiment 1) and November 2011 (Experiment 2). Experiment 1 permitted the comparison of the ontogenetic sequence of embryos reared "with parents" (treatment W) with that of embryos reared "without parents" (treatment W/O) and allowed to determine: (1) the physicochemical and antiseptic conditions needed to guarantee embryos survival, (2) a detailed experimental procedure (including, for example, the clutch division for the experimental treatments: W and W/O), (3) the time of the day when females lay eggs more frequently, and (4) the most suitable day for the induction of egg hatching. After the experience gained in Experiment 1, Experiment 2 permitted the comparison between treatments of some specific morphological characteristics at the end of embryonic development. After the experiments, fish were returned to the same place where they had been caught. The protocol of this study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Barcelona (Registration nº 220111) and was in accordance with decree 214/97 from the Government of the Generalitat de Catalunya.

*Experiment 1: Parental presence effect on the embryonic ontogenetic sequence*

Five males (with total lengths between 100 and 135 mm) and 15 females (with total lengths from 75 to 100 mm) were maintained in a 260 l aquarium (hereafter referred to as general aquarium) supplied with a biological filter and PVC refuges. Eight 30 l aquaria were settled (hereafter referred to as experimental aquaria), four of them with the purpose of maintaining clutches under the treatment W and the other four intended for maintaining clutches under the treatment W/O. All these aquaria were located in a climatized room (20 °C) and under a light regime of 12 h L: 12 h D (hours

Light: hours Darkness). Each experimental aquarium had a biological filter, sand substratum (composed of a mixture of sand, gravel and coral), one artificial nest (already accepted by fish in previous essays) and an air-diffuser. Every nest consisted of a transparent plastic box (13.5 cm large x 7 cm height x 12 cm deep) opened at one side (this opening acting as the entrance) and with the ceiling substituted by a squared glass (to prevent the structure from floating). The nest inner walls (including the ceiling) were covered with black acetate sheets that were fixed with plastic clips. This configuration permitted the removal of the sheets from the nests in order to manipulate the clutches easily.

Physicochemical water conditions were controlled daily in all the experimental aquaria. Oxygen concentration at the nest entrance over the study (mean  $\pm$  SD =  $8.3 \pm 0.2$  mg l<sup>-1</sup>) was similar to the one found throughout the reproductive period of *S. fluviatilis* in natural conditions (Vinyoles et al., 1999). Other physicochemical parameters were also controlled: pH (mean  $\pm$  SD =  $7.5 \pm 0.5$ ), water temperature (mean  $\pm$  SD =  $23.1 \pm 0.2$  °C), NO<sub>2</sub> (mean  $\pm$  SD =  $0.04 \pm 0.05$  mg l<sup>-1</sup>), NO<sub>3</sub> (mean  $\pm$  SD =  $10.0 \pm 0.0$  mg l<sup>-1</sup>) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mean  $\pm$  SD =  $0.06 \pm 0.02$  mg l<sup>-1</sup>). The mean value for all these parameters was not significantly different between treatments W and W/O (all Mann-Whitney *U*-test, *P*>0.05) in this experiment. Throughout the study (both in the general and experimental aquaria) fish were fed once a day with frozen quironomidae larvae and, once a week, with fresh mussels.

When, in the general aquarium, a fish couple presented sexual activity (i.e., the male showed courtship behaviour and the female was gravid and had stripped colouration) it was moved to one of the four 30 l experimental aquaria assigned to the treatment W. In these aquaria, egg laying was controlled twice a day (at 8:00 a.m. and

at 8:00 p.m.). When a clutch was found it was split into two similar halves (one to be kept by the parents and the other to be kept alone) following the next steps: (1) careful removal of the acetate sheet containing the clutch from the nest and its placing inside one of the aquaria of the W/O treatment (this move was done inside a small container full of water to prevent air contact and consequential infections), (2) once inside this aquarium W/O, we split the acetate sheet into two similar halves using surgical scissors (making sure not to break the eggs and following a random cut direction) and we took a picture (through the aquarium wall) which made it possible to define the clutch borders and to distinguish eggs added afterwards, (3) one of the two halves was randomly chosen and was left in the nest of the aquarium W/O in an equivalent position to the one found in the aquarium W, (4) the other half clutch was returned to the aquarium W in its original position (the hole generated in the sheet by the clutch division was substituted by a new piece of sheet to maintain continuity), and (5) the addition of a methylene blue solution in both aquaria (one dose of 4 ml from a dilution of methylene blue with concentration  $6.8 \text{ g l}^{-1}$ ). Methylene blue is a common treatment to prevent fungal infection in fishes' eggs and fingerlings (Bolívar et al., 2001) and in low doses it is not harmful to embryos (Hayes, 1930). Clutch division was done in the aquaria W/O to reduce fish stress during manipulation. Although in natural conditions many females lay eggs in one male nest (Neat et al., 2003), only one female per aquarium was provided to control for the possible maternal effect on embryos' development. This female was left in the W treatment for the 11 days clutch development period in order to simulate a realistic environment. During reproduction, female presence in the proximity of nests is the prevalent condition (Neat et al., 2003) and we expected that this is required to both stimulate male parental care and prevent

male total clutch cannibalism behaviour (Kvarnemo et al., 1998). In this experiment, all the females laid eggs between 8:00 a.m. and 8:00 p.m. (this timeframe coincided with the 12h L period of the light cycle). A sample of five eggs was collected daily from each half clutch (treatments W and W/O) since the day the eggs were detected for the first time until they hatched. Eggs were removed by suctioning with a pipette. Embryo manipulation and ontogenetic description were done following Gil et al. (2010). Fish couples who finished successfully a clutch were removed from the experiment (and maintained in a different aquarium, similar to the general one, until the end of the study). Experimental aquaria were reused for new couples, after being cleaned. Fish couples that cannibalized their clutches were returned to the general aquarium to start again the selective process.

Eggs were removed until day 12 after oviposition and it was found that hatching occurred between day 12 and day 13 (at water temperature = 23 °C) as described by Gil et al. (2010). As environmental stress accelerates hatching in fishes (e.g., Czerkies et al., 2001) we induced hatching artificially through immersion in water at 13 °C during 5 minutes on day 11 (after oviposition). At that date embryos' development was almost complete and the morphological structures were well defined and easy to compare.

#### *Experiment 2: Parental presence effect on the embryonic morphological development*

11 males (ranging from 75 to 90 mm in total length) and 11 females (from 60 to 100 mm total length) were used in this experiment. The protocol was the same as in Experiment 1 but, in this case, a single sample of eggs per couple was collected. Hatching was induced day 11 after oviposition (thus guaranteeing that the hatch time

was the same for all the embryos). Physicochemical parameters (see Experiment 1 for more details) were not significantly different between treatments W and W/O (all Mann-Whitney *U*-test,  $P > 0.05$ ).

About 20-25 just-hatched embryos from each experimental treatment (W and W/O) were submitted to a lethal dose ( $150 \text{ mg l}^{-1}$ ) of tricaine methanesulfonate (MS-222) in a Petri plate. Pictures were taken in the lab (using a digital camera - optika microscopes Italy, 7M- fixed to a stereo microscope) and structures were measured afterwards using the software Sigma Scan Pro 5. Morphological variables measured in newborn embryos were: standard length (distance comprised between the tip of the snout and the posterior edge of the hypural plate), head height (vertical line measured at the level of the operculum), jaw length (distance from the extreme caudal end to the tip of the Meckel's cartilage), and yolk-sac volume. The latter variable was measured following Heming & Buddington (1988) formula:  $YSV = 0.1667 \pi LH^2$ , where  $H$  is the yolk-sac minimum diameter and  $L$  the yolk-sac maximum diameter. After measuring just-hatched embryos, males and females were anesthetized (with MS-222) and measured (total length) before being removed from the experiment (and maintained in an aquarium similar to the general one until the end of the study).

### *Statistical analysis*

Before the statistical analyses a  $\text{Log}(x + 1)$  transformation of the morphological variables was done in order to adjust to normality. All analyses were performed using the free software R version 2.15.2 (R Core Team, 2012).

In order to study the effect of the experimental condition on embryo development, and taking into account the fact that clutch number is a random factor, it is adequate to analyze these data with a linear mixed model. The following model was considered for each one of the embryos' morphological variables (see a similar example in Pinheiro & Bates, 2000):  $y_{ijk} = \beta_j + b_i + b_{ij} + \epsilon_{ijk}$ , where  $y_{ijk}$  is the morphological variable measured for the  $k$ th egg from the  $i$ th clutch under the  $j$ th treatment. Thus,  $\beta_j$  is the fixed effect for treatment (W or W/O). This model has random effects at two levels: the effects  $b_i$  for clutch and the effects  $b_{ij}$  for the type of treatment within each clutch (this allows to assess the presence of interactions between clutch and treatment).

Models were carried out with the `lme` function from the R package `nlme` (Pinheiro et al., 2012). Residual distribution fit to normality was verified by visual inspection of normal probability plots. The conditional coefficient of determination (Cond.  $r^2$ , which describes the proportion of variance explained by both the fixed and random factors) and the marginal coefficient of determination (Mar.  $r^2$ , which describes the proportion of variance explained by the fixed factor alone) were calculated following Nakagawa & Schielzeth (2013). When multiple tests were performed, significance levels were corrected using the sequential Bonferroni method (Rice, 1989). Real probability values are reported throughout.

Within each experiment, clutches that provided the embryos came from independent parental pairings (once the protocol completed for one clutch, the progenitors involved were separated in a different aquarium and could not be selected again). However, data concerning cannibalism were obtained from pairings in which

the male, the female, or both, could have intervened in a previous unfinished clutch. This repetition was necessary to obtain enough clutches.

## **Results**

Fish in both experiments were sexually active from April onwards. All males exhibited paternal care: anal gland rubbing on the clutches, nest guarding and egg fanning. In both experiments all the eggs presented a normal development and succeeded to hatch. No deteriorated or infected eggs (by fungus or bacteria) were found.

### *Experiment 1: Parental presence effect on the embryonic ontogenetic sequence*

Only five of the 19 clutches laid in the artificial nests were available to obtain a complete ontogenetic sequence under the two experimental treatments. This was because 74% of clutches were cannibalized in the aquaria under the experimental treatment W. Physicochemical and antiseptic conditions established in the experimental design proved to be adequate. The sequence of ontogenetic events observed by visual inspection in embryos under the treatment W was not different than that maintained under the treatment W/O (fig. 1). The ontogenetic sequence found was identical to that described by Gil et al. (2010).



	Day 2	Day 3	Day 5	Day 6	Day 7	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13
Treatment W	-Embryo -Cephalic and caudal dilatation	-Brain -Notochord -Myomeres -Pigmented eyes	-Median finfold -Otoliths -Anus	-Pectoral fins	-Mouth	-Anus opened	-Opercula -Mouth opened	-Hatching glands -Opercula opened	-Hatching
Treatment W/O	-Embryo -Cephalic and caudal dilatation	-Tail free -Auditory vesicles - Gut							

**Figure 1.** Morphological structures in the embryos of *Salaria fluviatilis* are listed in the boxes corresponding to the day of first apparition in Experiment 1. In both treatments (W and W/O the parents) the sequence was the same. This description followed Gil et al. (2010) and obtained equivalent results.

*Experiment 2: Parental presence effect on the embryonic morphological development*

13 clutches were obtained but only five could be used for the analyses (the other eight were rejected because they were cannibalized). A similar number of embryos from each half clutch (one half for each experimental treatment) were photographed (table 1).

Clutch	Male length (mm)	Female length (mm)	Treatment W (n)	Treatment W/O (n)
1	90.0	91.2	25	27
2	75.5	68.3	20	21
3	80.6	62.2	20	26
4	78.8	84.9	25	25
5	89.1	63.6	27	26

**Table 1.** Fish total length and sample sizes (n) of measured embryos in Experiment 2. Embryos 11 days old are provided for each clutch and experimental treatment. Abbreviations and symbols: Treatment W, Treatment with parents; Treatment W/O, Treatment without parents.

All morphological variables were correlated to each other except jaw length and yolk-sac volume (Pearson correlations; standard length and head height:  $r_p = 0.79$ ,  $P <$

0.05; standard length and jaw length:  $r_p = 0.57$ ,  $P < 0.05$ ; standard length and yolk-sac volume:  $r_p = -0.21$ ,  $P < 0.05$ ; head height and jaw length:  $r_p = 0.64$ ,  $P < 0.05$ ; head height and yolk-sac volume:  $r_p = -0.35$ ,  $P < 0.05$ ; jaw length and yolk-sac volume:  $r_p = -0.02$ ,  $P > 0.05$ ).

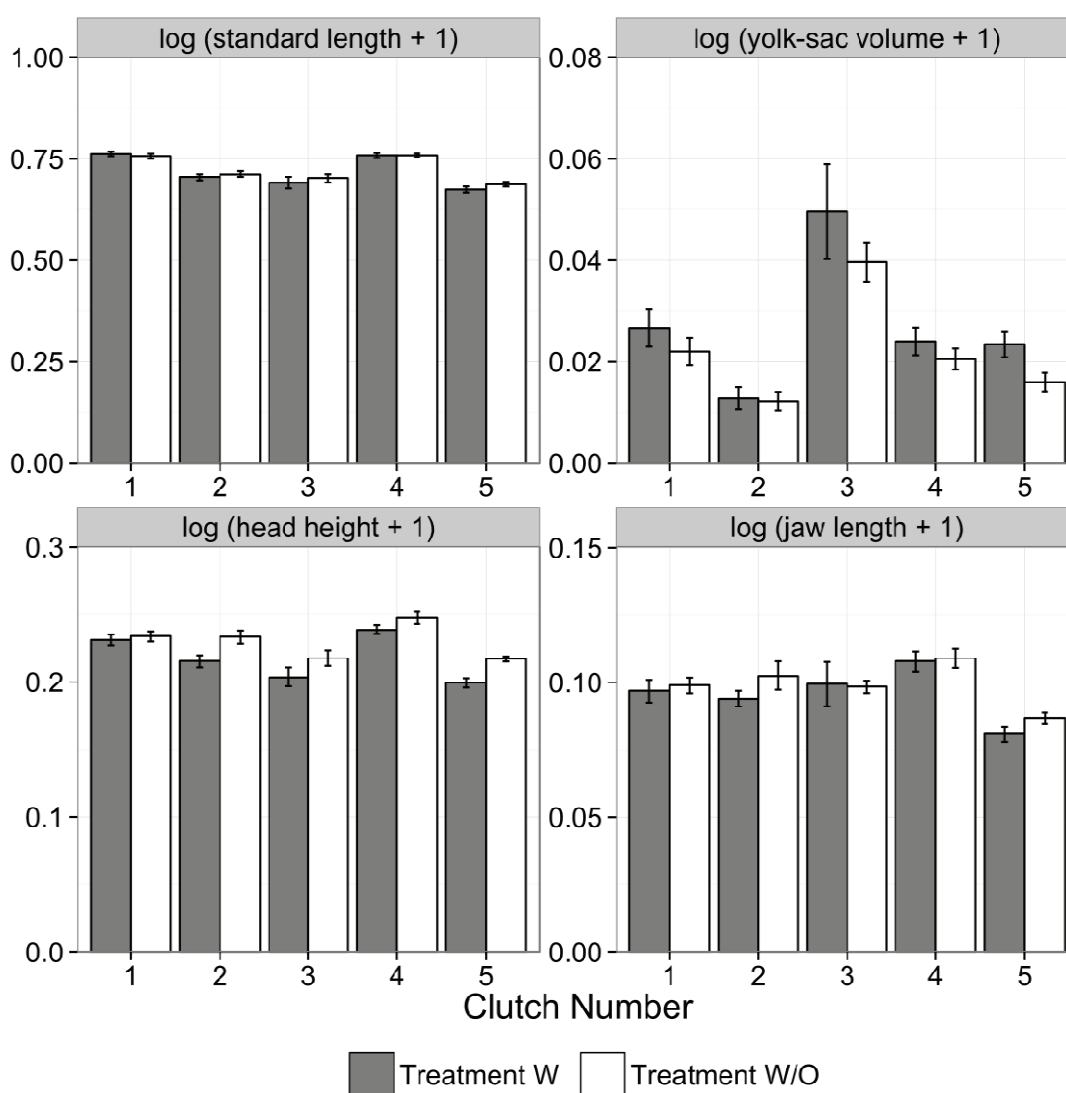
Apart from standard length, the remaining morphological variables (head height, jaw length and yolk-sac volume) showed differences related to the presence or absence of parents (table 2).

Variable	Estimates $\pm$ SE		ANOVA			$r^2$	
	Treatment W	Treatment W/O	F	d.f	P	Con	Mar
Standard length	0.72 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.00	2.18	1	0.140	0.76	0.00
Head height	0.22 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.00	20.89	1	4.9e <sup>-06*</sup>	0.66	0.12
Jaw length	0.09 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	5.77	1	0.016*	0.47	0.02
Yolk-sac volume	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	15.02	1	1.0e <sup>-04*</sup>	0.69	0.04

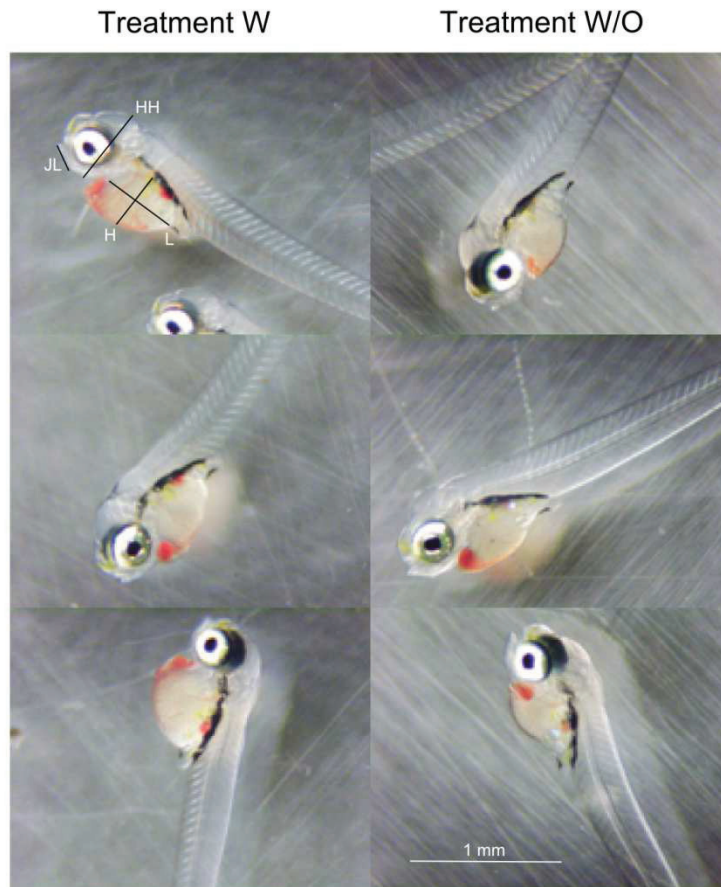
**Table 2. Linear mixed effects models predicting embryos' development depending on the experimental treatment in Experiment 2. All variables were previously log (x+1) transformed.** Abbreviations and symbols: Treatment W, Treatment with parents; Treatment W/O, Treatment without parents; Con and Mar, Conditional and Marginal coefficients of determination values ( $r^2$ ); \*,  $P < 0.0125$  (after Bonferroni correction).

Both head height and jaw length presented higher values in the treatment W/O, while the yolk-sac volume showed higher values under the treatment W (figs. 2, 3). The yolk-sac volume was the morphological variable in this study which presented the higher variability between clutches (fig. 2).

Although the models indicated development differences between the two experimental treatments (W and W/O), the general low values of the marginal  $r^2$  (table 2) express the small contribution of parents presence to the variability as compared to the one explained by clutch (conditional  $r^2$ ). Among all the variables, jaw length showed the lowest variability between clutches.



**Figure 2.** Standard length, yolk-sac volume, head height and jaw length (mean  $\pm$  95% CI) measured in 11 days old *Salaria fluviatilis* embryos reared with (Treatment W) and without (Treatment W/O) the parents for each clutch, are shown for Experiment 2.



**Figure 3.** Comparison of *Salaria fluviatilis* embryos on day 11 of development between the two experimental treatments (W and W/O the parents) in Experiment 2. It can be appreciated from the images that greater head heights and jaw lengths are found in the Treatment W/O, whereas a greater yolk-sac volume is found for Treatment W. In the first image, the lines indicate how some of the variables were obtained: HH (head height), JL (jaw length) and H, L (diameters required to calculate yolk-sac volume).

## Discussion

Parents' absence did not prevent the obtainment of well-developed embryos without malformations. However, embryos 11 days old showed differences in their morphological traits (yolk-sac volume, head height and jaw length) depending on whether they had been kept with or without the parents. This result represents a novelty because, so far, eggs were supposed to receive the hormones related to embryo development solely in the female's ovary (Sampath-Kumar et al., 1997).

Although this study did not prove external hormone transmission from parents to eggs, results suggest that this might be possible. Embryos kept in the “with parents” treatment had a more developed yolk-sac at day 11 than embryos kept under the “without parents” treatment. Yolk-sac absorption rate is closely related to environmental factors and it accelerates under stress conditions, such as, for example, when temperature increases (Fukuhara, 1990) or oxygen concentration drops (Hamor & Garside, 1977). However, in this study, temperature and oxygen concentrations were similar in all aquaria (as were the other physicochemical conditions unrelated to progenitor fish), which means that the differences found must be attributed to the experimental treatments. In the peacock blenny (*S. pavo*) males release a species-specific odor that attracts reproductively competent females (Serrano et al., 2008). This odor consists of hydrophilic odorants from the anal gland that the male releases in a slowly and sustained pattern (peptides and peptide-derivates) and less hydrophilic odorants that possibly originate from the testes or blind pouches (glycoproteins and steroids such as 11-ketotestosterone and glucuronides). An effect of such hormones released by the male (androgens) seems plausible. In a previous work, McCormick (1999) found that eggs injected with testosterone had a slower yolk absorption rate than eggs without manipulation. In accordance with this author’s findings, in this study, embryos reared in the presence of the parents (treatment that might have been influenced by 11-testosterone and other steroids since the male is in close contact with the eggs) presented more developed yolk-sac than embryos without parents. In another study, Kekäläinen et al. (2010) found that many males releasing sperm simultaneously increased environmental steroid concentration (compared to the treatment with just a single male) with a similar effect on yolk-sac absorption. It is not

known, however, how hormones released by the female could have influenced yolk-sac development. The father (sole carer of the eggs in this species) is probably the parent that contributes to help embryos to make a more efficient use of their yolk-sac and to have greater energetic resources at birth (thus increasing survival opportunities). However, other studies are needed to confirm this, as well as to differentiate between male and female presence effects. These approaches should ideally keep the male alone with the clutches but their design should solve first the problem of maintaining such situation without affecting male's behaviour (i.e., parental care, cannibalism and desertion).

There are many hypotheses that could explain the greater head height and jaw length development in embryos reared without the parents. A first explanation considers that male's androgens might affect the embryos' growth rate. Supporting this, Srivastava & Brown (1993) found that embryos treated with testosterone grow slower before hatching. Afterwards, during the fry phase, they grow faster than individuals in the control group. It seems that the yolk-sac accumulates extrinsic hormones and, as suggested by Piferrer & Donaldson (1994), the effect of these hormones is not immediate and appears later during the development. A second possibility could be that parents' presence affects embryos' sexual determination. *Salaria fluviatilis* is a species with sexual dimorphism and, among other morphological characteristics, head size and jaw length are bigger in males than in females (Vinyoles, 1986). In blennies, no sexual chromosomes have been found for the moment (e.g., Devlin & Nagahama, 2002). In fishes, sexual determination is often dependent on environmental factors, especially temperature (Baroiller et al., 2009) and pH (Römer & Beisenherz, 1996), and frequently appears early in the developing embryo (Seki et al.,

2005). Additionally, the timing and duration of exposition to certain hormones is essential for sex determination (Piferrer, 2001). In some experiments performed with teleostean fishes' eggs it was found that egg immersion into hormonal solutions affected gonad development and sexual determination (e.g., Koger et al., 2000). Usually, contact with androgens is associated to masculinisation and contact with estrogens to feminisation (Yamamoto, 1969).

Results revealed a greater variability between clutches than between the treatments within a clutch in the second experiment. This could be attributed to maternal (e.g., Marteinsdottir & Steinarsson, 1998) and paternal (e.g., Butts & Litvak, 2007) effects related to the particular traits of the parents used in this experiment. Although the present study was not designed to relate the parents' characteristics to the embryos' development, the results encourage future investigations to delve deeper into this aspect.

There are many factors that have been described to affect parental care investment such as temperature (Shuter et al., 1980), oxygen (Lissåker et al., 2003) and the presence of predators (Steinhart et al., 2005). An increase in cannibalism has been associated to both clutch reduction (Lindström & Sargent, 1997; Lissåker et al., 2003) and female scarcity (Kvarnemo et al., 1998). Our design required the division of each clutch into two experimental conditions (with and without the parents) and this reduced clutches' size. The presence of only one female was considered also necessary to homogenize embryo variability all across the clutch. Such conditions did not suppress parental care or promote male desertion throughout the experiments. Although male behaviour has probably been altered to a certain extent by this experimental design, the fact that parental care still persisted allows us to assume that

the effect on embryo development is similar to that in natural conditions, although it may be less pronounced. Apart from the presence or absence of the parental fish, all the clutches were under similar experimental conditions and the differences found are not attributable to differences in manipulation.

It should be noted that in both experiments a high occurrence of total clutch cannibalism was observed (more than a half of the clutches obtained were discarded for this reason). This result must be interpreted with prudence since there was not an individual identification of the fish in the general aquarium and some of them could have intervened in more than one attempt to obtain useful clutches. This situation might have inflated the proportion of the cannibalism observed. Proportion of egg cannibalism attributable to the male or to the female was not possible to discern. However, its high occurrence probably was due to the limited size of the clutches after being divided into two parts. Cannibalized clutches did not participate in the analysis avoiding the possible effect of male removing specific eggs on the observed differences. Furthermore, it must be said that, in this species, cannibalism is probably not selective. In a previous study based on the analysis of gastrointestinal contents (see Vinyoles et al., 1999) authors found that eggs consumed by the males were healthy and well-developed.

In summary, results from this study suggest that parents' presence has an effect on the embryonic development and possibly also on the sexual determination of progeny. This circumstance makes it advisable to maintain parents with their clutches. Future investigations are needed to describe paternal and maternal effects on the size and the phenotype of embryos, the survival rate of larvae reared with and without parents, and the male hormonal effect on clutches.



## Acknowledgements

The authors are grateful to M. Durfort, J. Nadal, F. Serra and M. Marsal for the supply of materials and techniques, to A. Goldhoorn and X. Fabre for the help in aquaria maintenance, to J. D. Rodríguez-Teijeiro for the manuscript improvement, and G. Harwood and Víctor Bonet for English revision.

## References

- Baroiller, J.F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S. & Hoerstgen-Schwark, G. (2009) Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Phys. A*, 153, 30-38.
- Bolívar, B.R., Aragonés, D.M.A. & García, G. (2001) Effect of methylene blue and sodium chloride on the bacterial load in the transport water with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. In: *Health Management in Aquaculture*, pp. 188-198. Philippines, Southeast Asian Fish Development Center.
- Butts, I.A.E. & Litvak, M.K. (2007) Stock and parental effects on embryonic and early larval development of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *J. Fish Biol.*, 70, 1070-1087.
- Clutton-Brock, T. H. (1991). *The evolution of parental care*. Princeton University Press.
- Czerkies, P., Brzuzan, P., Kordalski, K. & Lucynski, M. (2001) Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos. *Aquaculture*, 196, 151-158.

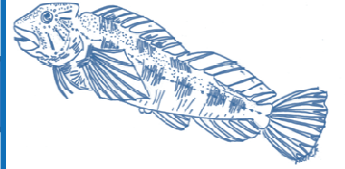
- Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191-364.
- Fukuhara, O. (1990) Effects of temperature on yolk utilization, initial growth, and behaviour of unfed marine fish larvae. *Mar. Biol.*, 106, 169-174.
- Gil, F., Faria, C. & Almada, V.C. (2010) An Efficient Technique for the Captive Breeding of an Endangered Freshwater Fish *Salaria fluviatilis* (Pisces: Blenniidae), with a Description of Its Ontogeny. *J. World Aquacult. Soc.*, 41, 49-56.
- Hamor, T. & Garside, E.T. (1977) Size relations and yolk utilization in embryonated ova and alevins of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in various combinations of temperature and dissolved oxygen. *Can. J. Zool.*, 55, 1892-1898.
- Hayes, F.R. (1930) The metabolism of developing salmon eggs: The significance of hatching and the role of water in development. *Biochem. J.*, 24, 723-734.
- Heming, T. & Buddington, R. (1988) Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: W.S Hoar & D.J. Randall (Eds) *Fish Physiology*, Vol. 11, Part A, pp. 407-446. New York, Academic Press.
- Katsel, P.L., Dimitrieva, T.M., Valeyev, R.B. & Kozlov, Y.P. (1992) Sex pheromones of male yellowfin Baikal sculpin (*Cottocomephorus grewinkii*): isolation and chemical studies. *J. Chem. Ecol.*, 18, 2003-2010.
- Kekäläinen, J., Rudolfson, G., Janhunen, M., Figencshou, L., Peuhkuri, N., Tamper, N. & Kortet, R. (2010) Genetic and potential non-genetic benefits increase offspring fitness of polyandrous females in non-resource based mating system. *BMC Evol. Biol.*, 10, 20.

- Koger, C.S., Teh, S.J. & Hinton, D.E. (2000) Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol or testosterone. *Mar. Environ. Res.*, 50, 201-206.
- Kvarnemo, C., Svensson, O. & Forsgren, E. (1998) Parental behaviour in relation to food availability in the common goby. *Anim. Behav.*, 56, 1285-1290.
- Lindström, K. & Sargent, R.C. (1997) Food access, brood size and filial cannibalism in the fantail darter, *Etheostoma flabellare*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 40, 107-110.
- Lissåker, M., Kvarnemo, C. & Svensson, O. (2003). Effects of a low oxygen environment on parental effort and filial cannibalism in the male sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Behav. Ecol.*, 14, 374-381.
- Manica, A. (2002) Filial cannibalism in teleost fish. *Biol. Rev.*, 77, 261-277.
- Marconato, A., Rasotto, M. & Mazzoldi, C. (1996) On the mechanism of sperm release in three gobiid fishes (Teleostei: Gobiidae). *Environ. Biol. Fish.*, 46, 321-327.
- Marteinsdottir, G. & Steinarsson, A. (1998) Maternal influence on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *J. Fish Biol.*, 52, 1241-1258.
- McCormick, M.I. (1999) Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. *Oecologia*, 118, 412-422.
- Nakagawa, S. & Schielzeth, H. (2013) A general and simple method for obtaining  $R^2$  from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol. Evol.*, 4, 133-142.
- Neat, F.C., Lengkeek, W., Westerbeek, E.P., Laarhoven, B. & Videler, J.J. (2003) Behavioural and morphological differences between lake and river populations of *Salaria fluviatilis*. *J. Fish Biol.*, 63, 374-387.

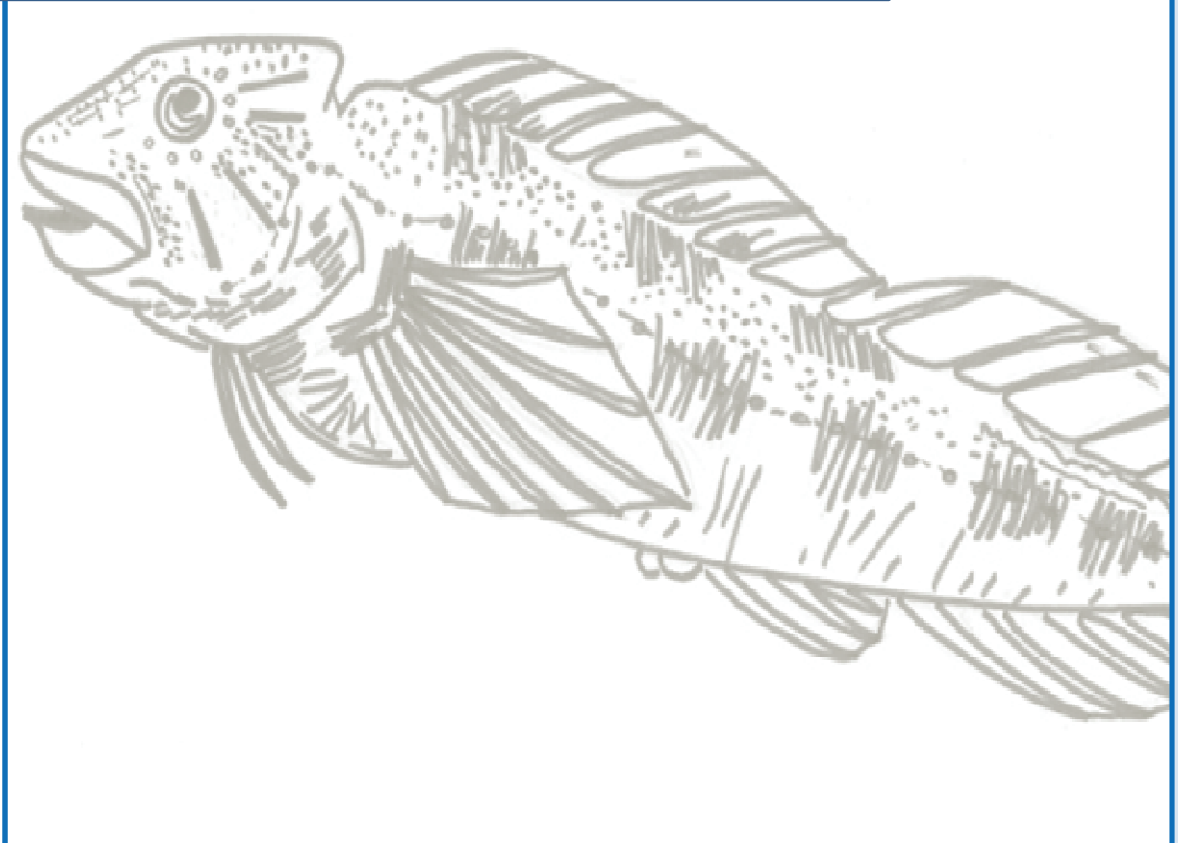
- Pampoulie, C., Lindström, K. & Mary, C.M.S. (2004) Have your cake and eat it too: male sand gobies show more parental care in the presence of female partners. *Behav. Ecol.*, 15, 199-204.
- Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229-281.
- Piferrer, F. & Donaldson, E. (1994) Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 $\beta$  and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol. Biochem.*, 13, 219-232.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. (2000) *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer. Section 1.3.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.B., DebRoy, S., Sarkar, D. & the R Development Core Team (2012) *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-104*. Available at <http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html/>
- Potts, W.T.W. & Rudy, P.P.J. (1969) Water balance in the eggs of the Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Exp. Biol.*, 50, 223-237.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223-225.
- Römer, U. & Beisenherz, W. (1996) Environmental determination of sex in *Apistogrammai* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *J. Fish Biol.*, 48, 714-725.
- Sabat, A.M. (1994) Costs and benefits of parental effort in a brood-guarding fish (*Ambloplites rupestris*, Centrarchidae). *Behav. Ecol.*, 5, 195-201.

- Sampath-Kumar, R., Lee, S.T., Tan, C.H., Munro, A.D. & Lam, T.J. (1997) Biosynthesis in vivo and excretion of cortisol by fish larvae. *J. Exp. Zool.*, 277, 337-344.
- Schwanck, E. (1986) Filial cannibalism in *Tilapia mariae*. *J. Appl. Ichthyol.*, 2, 65-74.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M. & Kobayashi, K. (2005) Fish full life-cycle testing for 17 $\beta$ -estradiol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 1259-1266.
- Serrano, R.M., Barata, E.N., Birkett, M.A., Hubbard, P.C., Guerreiro, P.S. & Canário, A.V. (2008) Behavioral and olfactory responses of female *Salaria pavo* (Pisces: Blenniidae) to a putative multi-component male pheromone. *J. Chem. Ecol.*, 34, 647-658.
- Shuter, B.J., MacLean, J.A., Fry, F.E.J. & Reiger, H.A. (1980). Stochastic simulation of temperature effects on first-year survival of smallmouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109, 1-34.
- Smith, C. & Wootton, R.J. (1995). The costs of parental care in teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 5, 7-22.
- Sorensen, P.W. & Stacey, N.E. (2004) Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zeal. J. Mar. Fresh.*, 38, 399-417.
- Srivastava, R.K. & Brown, J.A. (1993) Assessment of egg quality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, treated with testosterone: biochemical composition. *Can. J. Zool.*, 71, 109-115.
- Stacey, N.E. & Cardwell, J.R. (1997) Hormonally-derived pheromones in fish: new approaches to controlled reproduction. In: M. Fingerman, R. Nagabhushanam & M.F. Thompson (Eds) *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1, pp. 407-454. New Delhi, Oxford-IBH.

- Staub, N.L. & De Beer, M. (1997) The Role of Androgens in Female Vertebrates. *Gen. Comp. Endocr.*, 108, 1-24.
- Steinhart, G.B., Sandrene, M.E., Weaver, S., Stein, R.A. & Marschall, E.A. (2005). Increased parental care cost for nest-guarding fish in a lake with hyperabundant nest predators. *Behav. Ecol.*, 16, 427-434.
- Vinyoles, D. (1986) Biología i ecología de *Blennius fluviatilis* (Asso, 1801) en el riu Matarranya. Thesis. Department of Zoology, University of Barcelona.
- Vinyoles, D. & De Sostoa, A. (2007) Life-history traits of the endangered river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso) and their implications for conservation. *J. Fish Biol.*, 70, 1088-1108.
- Vinyoles, D., Côté, I.M. & De Sostoa, A. (1999) Egg cannibalism in river blennies: the role of natural prey availability. *J. Fish Biol.*, 55, 1223-1232.
- Wickler, W. (1957) Das ei von *Blennius fluviatilis* Asso (= *Bl. vulgaris* Poll.). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 45, 641-648.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (Eds) *Fish Physiology*, Vol. 3, pp 117-175. New York, Academic Press.

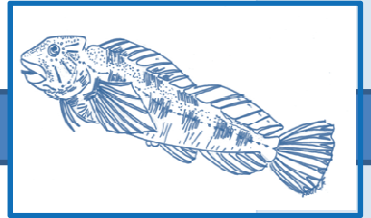


# Capítulo 2. Personalidad y aprendizaje









## Sección 2.1.

La osadía se relaciona con el desarrollo de la cresta cefálica en el macho del blenio de río *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)





## Boldness is related to the development of the cephalic crest in the male of the river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)

Noëlle FABRE, Eduardo GARCÍA-GALEA, Dolors VINYOLES\*

Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

**Abstract** Boldness is defined as the tendency of an individual to take risks when exposed to novel objects or situations. The main aim of this work was to elucidate if boldness was related to the development of the secondary sexual traits (SSTs) in the male of the river blenny *Salaria fluviatilis*, a freshwater fish which takes care of eggs. As a second objective SSTs effect on parental status adoption was also explored. Wild young fish were caught in the Segre River (Ebro basin) in November 2010. Fish were kept in five aquaria in groups of eight males and eight females with artificial nests. Boldness (boldness score and hesitancy) of males (initially with little SSTs development) was tested as the time required to exit a refuge when exposed to a new environment. Fish were maintained in the same aquaria for several months, and males' SSTs development and reproductive behaviour were monitored. Boldness score was negatively associated to cephalic crest development. Hesitancy was negatively related to male length and was also influenced by the interaction between male length and cephalic crest. Parental status acquisition was positively related to the male's length, marginally related to anal gland development, and non-related to cephalic crest. These results suggest an intrasexual role of the crest as an informative trait of boldness (honest signal) which might not necessarily be chosen by the females. It is also discussed that correlational selection could be responsible for linking boldness and growth rate in this species. Sexual selection, in addition to having directed the evolution of secondary sexual traits, might have favored certain personality traits (e.g. boldness) associated with the achievement of a larger body length [Current Zoology 60 (3): 373–380, 2014].

**Keywords** Animal personality, Behavioural syndromes, Freshwater blenny, Male reproductive success, Shyness

Animal personality is defined as a set of behavioural responses (behavioural syndrome) that differs between individuals of the same species and exhibits consistency through time and in different contexts (Sih et al., 2004; Réale et al., 2007). Animal personality is generally described in five general categories: activity, shyness-boldness, exploration-avoidance, aggressiveness and sociability (Réale et al., 2007). One of the most thoroughly studied is the shyness-boldness continuum, which is described as the propensity (boldness) or aversion (shyness) to take risks in front of novel objects or situations (Sloan Wilson et al., 1994). Boldness can be evaluated through different behavioural responses such as the willingness to approach predators (Godin and Dugatkin, 1996), the tendency to exploit new sources of food or to interact with unfamiliar objects (Wilson, 1998), exploration of a new environment (Dzieweczynski and Crovo, 2011) or foraging activity under risk (Bell, 2005). In fish, positive relations regularly exist between boldness and other behaviours: learning capacity (Dugatkin and

Alfieri, 2003), dispersal (Rehage and Sih, 2004), innovation (Harcourt et al., 2009), feeding rate and growth (Biro and Stamps, 2008), survival (Smith and Blumstein, 2008), physical condition (Pellegrini et al., 2010), aggressiveness (Tulley and Huntingford, 1988) and dominance (Sundström et al., 2004).

Coloration also has been related to boldness. The eumelanin-based coloration from the males has been associated to boldness and aggressivity in many vertebrates (Ducrest et al., 2008; Mafli et al., 2011; Mateos-González and Senar, 2012). In the guppy fish *Poecilia reticulata*, the boldest males were found to have a brighter coloration than shy males (Godin and Dugatkin, 1996). Among fish (and other vertebrates) it is not known, however, if boldness is related to the development of secondary sexual traits (SSTs) of the male based on the development of special morphological structures (e.g. cephalic crests, breeding tubercles or anal glands). Are bold males more likely to develop their SSTs than shy males? Taking into account that

---

Received Jan. 19, 2014; accepted Mar. 9, 2014.

\* Corresponding author. E-mail: d.vinyoles@ub.edu

© 2014 Current Zoology

hormones (androgens) implicated in dominance and aggressiveness are associated both to SSTs development (Oliveira et al., 2001) and to boldness (Daisley et al., 2005), it is quite probable that a relation between SSTs and boldness could exist.

In some species, females choose males' boldness directly (Godin and Dugatkin, 1996) while in others they select indirect characteristics related to it, for instance the courtship intensity (Reaney and Backwell, 2007). Choosing bold males might be advantageous to females because these males would be more likely to have fitness advantages related to this personality trait and transmit them to their offspring (Drent et al., 2003; Brown et al., 2007). Female choice often is based on the SSTs in order to assess male's quality (Candolin, 2000; Ottova et al., 2005). It remains to be answered whether the degree of development of the SSTs could also be influenced by a personality trait such as boldness.

The river blenny *Salaria fluviatilis* is a freshwater fish of the Blenniidae family with parental care of eggs. During the breeding season, which in nature extends from May to the end of July (Vinyoles and Sostoa, 2007), males excavate a nest cavity under a stone, and several females lay clutches in a monolayer on the underside of the stone. This species adapts easily to captivity conditions and is thus suitable to study the relation between boldness and SSTs development. Among blennies the presence of at least two alternative reproductive tactics (Oliveira et al., 2001) is common: dominant males (territorial, with developed SSTs) and sneaker males (often with female appearance and with non-developed SSTs). In *S. fluviatilis* these two reproductive tactics (dominant and sneaker) were described by Neat et al. (2003). The male SSTs consist of the development of a cephalic crest and two anal glands covering the first spines of the anal fin. Generally the degree of development of these SSTs has been described as a male characteristic preferred by the females (Gonçalves and Oliveira, 2003; Serrano et al., 2008).

The main objective of our study was to investigate (in wild fish maintained under experimental conditions) if boldness in the males of *S. fluviatilis* was related to the degree of their SSTs development. We will consider whether or not acquisition of parental status among males (defined here as the obtention of clutches inside the nest) was related to their SSTs development. *S. fluviatilis* is a species classified as vulnerable or threatened in many countries where it occurs (see Vinyoles and Sostoa, 2007). Therefore the results from our work could bring information for the future management and

conservation of this species.

## 1 Materials and Methods

### 1.1 Field collection and fish maintenance

We caught the fish by electrofishing on November 2010 in the River Segre (a tributary of the River Ebro), near Camarasa (Catalonia). Males chosen during fishing ( $n=48$ ) were one year old ranging from 60 to 70 mm in total length (TL). These characteristics ensured that, at the time of reproduction, the fish were sexually mature according to Vinyoles and Sostoa (2007) and, subsequently, could develop SSTs during the experiment. Females ( $n=53$ ) had a larger range of lengths (from 60 to 90 mm TL) and took part in the study as a sexual stimulus for the males. At their arrival to the animal facility for aquatic animals (in the University of Barcelona) we measured the fish (TL) and distributed them into five experimental aquaria as follows: eight males, five small females (from 60 to 70 mm TL) and three large females (from 80 to 90 mm TL). An extra aquarium served to maintain the remaining fish which were used to replace experimental individuals that died during the experiment. None of these replacement fish were included in the analyses.

We tagged experimental males with Visible Implant Elastomer (VIE) following the guidelines of Northwest Marine Technology Inc. (Shaw Island, Washington). Just one colour was used (fluorescent red), only visible under ultraviolet light. We made a small mark on each male in the base of one of the impair fins (first dorsal, second dorsal, anal or caudal) and in one of the two sides (right or left). This permitted us to differentiate the eight males from each aquarium. Marks apparently did not affect fish behaviour nor health.

All experimental aquaria (260L) were in a climatized room and had the same equipment: one biological filter, air diffusor and substrata (consisting of a mix of sand, gravel and coral in proportion 2:2:1). They were maintained under constant Mean ( $\pm$  SD) temperature ( $22.96 \pm 1.15$  °C) and water physicochemical conditions (pH =  $7.4 \pm 0.21$ ,  $\text{NO}_2^- = 0.05 \pm 0.00$  mg/L,  $\text{NO}_3^- = 3.4 \pm 0.84$  mg/L,  $\text{NH}_4^+ = 0.00 \pm 0.00$  mg/L; hardness: 19). Light regime was 12:12 (light: dark). Each aquarium was isolated by opaque curtains to prevent any interaction with external features. We placed 10 nests in each aquarium (distributed in two parallel rows of five nests each). Nests were artificial structures that had been already accepted as nesting sites by males of the same species in previous experiments (unpublished data). They consisted of transparent plastic boxes (13.5 cm

width  $\times$  7 cm high  $\times$  12 cm depth) open in the front (nest entry) and with the ceiling substituted by a glass surface. Their inner walls were covered by black acetate sheets fixed to the structure with plastic clips. Nest entries faced the aquaria walls in order to facilitate clutch detection and observations. We fed fish “ad-libitum” with frozen red chironomid every morning (10:00 a.m). Once a week fresh mussels were added to the diet.

### 1.2 Experimental protocol

The aquarium where fish boldness was tested (boldness aquarium) measured  $45 \times 45 \times 45$  cm and had similar conditions to the ones of the experimental aquaria (temperature, water characteristics and substrata). This aquarium was also isolated with opaque curtains to prevent possible interferences produced by our presence on fish behaviour during the tests. We designed the boldness aquarium (Fig. 1) following Brown et al. (2007). We installed a video camera (Sony Handycam HDR-SR1E) 120 cm above the aquarium to record the tests and posteriorly visualize them with the computer.

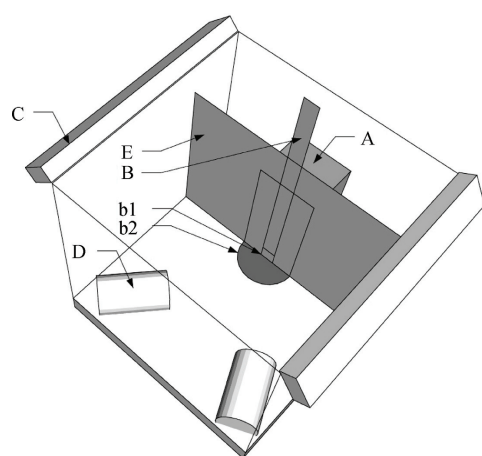
Boldness tests were performed from 19 to 27 December (from 8:00 a.m to 3:00 p.m), approximately one month after fish capture. At this time males’ SSTs were little developed. During this experimental phase we fed the fish daily at 7:00 p.m. (to prevent possible interactions between feeding and behaviour) and we temporarily divided the aquaria in two compartments (one with the fish to test and the other one with the ones that had it already done). We tested each fish only once, follow-

ing Brown and Braithwaite (2004), and its turn to perform the test was randomly established. We caught each male with a hand net and placed it inside the “boldness box” (Fig. 1) which top was immediately closed with a plastic cover. After a 5 minutes settling time, we opened the boldness box window by raising the transparent trapdoor (Fig. 1) and fish were free to emerge. Test duration was 55 minutes and all of them were video-recorded. After the test (and before being returned to their aquarium), we anesthetized (with MS-222, tricaine methanesulfonate), measured (TL), and photographed (lateral and ventral view) the male inside a small methacrylate recipient with a graph paper at the back. These pictures permitted us to measure the SSTs development (cephalic crest and anal glands) by using the Sigma Scan Pro 5 programme. When we returned the male to the aquarium, we placed it in the compartment for fish which had already been tested. Before we introduced a new individual into the boldness aquarium, we renewed the water (always maintaining the same level of 27 cm depth). Once all the fish had performed the test, we removed the divisions from the experimental aquaria. Throughout the experiment we measured fish TL (both sexes) and SSTs development (only males) every 45 days from November 2010 to July 2011. Measures were done following the same steps as those indicated for the males after the boldness test, but females were just measured in TL and not photographed.

We monitored clutch laying every morning (9:00 a.m) from January to the end of the experiment in July. When we found a clutch we classified the correspondent male as “parental”. We considered the males that did not obtain clutches during the experiment to be “non-parental”.

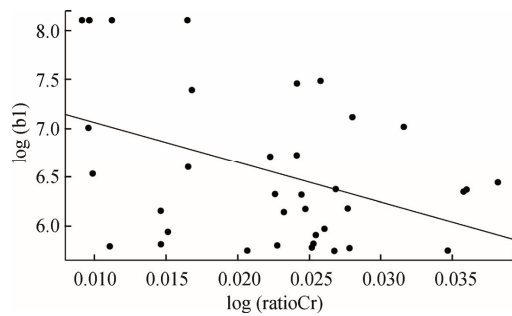
### 1.3 Measured variables

In this study we considered the same behavioural variables as the ones used in Brown et al. (2005): 1) Boldness score (b1) defined as the time taken for the fish’s snout to emerge from the box, and 2) Hesitancy (b2) defined as the time the fish took to cross the black arc minus the time it took for the fish to emerge from the box (Fig. 1). We assigned the maximum time for the test (3300 seconds) to the fish where no time for b1 was registered (because they did not emerge from the boldness box during the test). We did not assign a hesitancy score to the fish that did not cross the black arc following Brown et al. (2005) recommendations. We obtained variables b1 and b2 through the posterior visualization of the video recordings and log-transformed them for the analyses.



**Fig. 1** Diagrammatic representation of the boldness aquarium

A: Boldness box (30 $\times$ 11 $\times$ 11 cm) with a top opening to introduce fish and an inferior small window (3 cm) for to exit. B: transparent trapdoor (39 $\times$ 4.5 cm). b1: line that defined boldness score (emergence time). b2: arc that define hesitancy time. C: neon lamp. D: PVC tube (4 cm diameter  $\times$  13 cm length). E: methacrylate wall.



**Fig. 2** Relation between the development of the cephalic crest,  $\log(\text{ratioCr})$ , and boldness score,  $\log(\text{b1})$

The line was adjusted with the estimations obtained in the linear mixed model.

The SSTs measures we took for the males were: the cephalic crest height (Cr, mm, measured as the distance from the middle of the cranium to the top of the crest) and the gland mean diameter (Gl, calculated as the average of the first and second anal gland diameters). We expressed the SSTs variables as the log-transformation of  $\text{ratioCr}$  ( $\text{Cr}/\text{TL}$ ) and  $\text{ratioGl}$  ( $\text{Gl}/\text{TL}$ ) in the analyses.

The study protocol of this work was approved by the Research Ethics Committee of the University of Barcelona (Registration n° 221/11). In October 2011 we returned the fish to the stretch of river where they had been caught.

#### 1.4 Statistical analyses

We analyzed whether boldness (b1) and hesitancy (b2) were related to SSTs development by means of two linear mixed models (LMMs, one for b1 and one for b2) with aquarium ID as a random variable to control for data dependency. Each model included initially as covariates:  $\log(\text{TL})$ ,  $\log(\text{ratioCr})$  and  $\log(\text{ratioGl})$ , with all the paired interactions between them. The best model was found by extracting parameters using the AIC criterion corrected for small samples sizes (AICc) (Burnham and Anderson, 2002).

To analyze whether or not the development of SSTs was related to obtaining a clutch we used a general linear mixed model (GLMM) with a binomial distribution of errors and the link function logit. In this model “Pa-

rental status” was the dependent binary variable (0 = non-parental, 1 = parental) and aquarium the random component.

Error adjustment was verified by visual inspection of the normal probability plots. Statistical analyses were performed with the free software R (R Core Team, 2012). For the linear mixed models estimations lmer and glmer functions from the package lme4 (Bates et al., 2012) were used. The best model was found by using sequentially the drop1 function.

## 2 Results

At the beginning of the experiment (in November) we found no significant differences between aquaria for the TL neither for females ( $F_{4,36} = 0.06$ ;  $P > 0.05$ ; Mean  $\pm$  SD =  $73.00 \pm 9.57$  mm) nor for males ( $F_{4,36} = 0.31$ ;  $P > 0.05$ ). In November males had little SSTs development (Table 1) and this development was similar in all the aquaria (all  $P > 0.05$ ). In December, when boldness tests were performed, for fish that emerged, we observed a high variability for b1, Mean ( $\pm$  SD) =  $659.72 \pm 423.60$  seconds (min = 313, max = 1781 seconds) and for b2, Mean ( $\pm$  SD) =  $145.00 \pm 278.31$  seconds (min = 3, max = 1218 seconds). Five males did not emerge from the boldness box and from the ones who emerged only two did not cross the black arc.

We observed that the month of maximum SSTs development for all the males ( $n = 37$ ) was in February (Table 1). At that time males' TL, Cr and Gl were similar between aquaria (all  $P > 0.05$ ). Similar results were obtained for females' TL ( $F_{4,34} = 0.13$ ;  $P > 0.05$ ; Mean  $\pm$  SD =  $74.95 \pm 10.04$  mm). February also coincided with the beginning of the reproductive period that lasted until April. 40.5% of males ( $n = 15$ ) acted as parents (i.e. they had clutches in their nests). Distribution of parental males in the five aquaria was: three in three aquariums, two in one aquarium and four in another aquarium (at most half of males acted as parentals in each aquarium). No parental male was displaced from his nest by other males or defended more than one nest during the experiment. There was one parental male (7% of parentals)

**Table 1** Total length (TL), cephalic crest height (Cr) and mean glandular diameter (Gl) for the males of *S. fluviatilis* in November (with underdeveloped SSTs) and February (parental and non-parental males)

Month	Male status	<i>n</i>	TL (mm)	Cr (mm)	Gl (mm)
November	Underdeveloped	40	$65.98 \pm 3.39$ (60–70)	$0.71 \pm 0.21$ (0.29–1.38)	$1.14 \pm 0.23$ (0.54–1.60)
February	Parental	15	$78.33 \pm 2.89$ (72–82)	$2 \pm 0.75$ (0.75–3.19)	$2.09 \pm 0.26$ (1.58–2.53)
	Non-parental	22	$71.95 \pm 5.37$ (61–81)	$1.46 \pm 0.57$ (0.61–2.68)	$1.74 \pm 0.27$ (1.24–2.21)

Means ( $\pm$  SD, and minimum-maximum values in parentheses) are shown.

and four non-parental males (18% of non-parentals) that did not emerge from the boldness box. Throughout the experiment three males and one female died (in different aquaria) and we substituted them with fish of similar characteristics (not considered in the analyses).

The best LMM for log(b1) only included the covariate log(ratioCr) which has a significant negative effect on log(b1) (Table 2). The interpretation of this result is that a higher crest development is associated to less time required to emerge from the boldness box (boldness score, Fig. 2). The best LMM for log(b2) included log(TL) (significant negative effect) and log(TL):log(ratioCr) interaction with a positive effect (Table 2).

The best GLMM model for parental status included log(TL) and log(ratioGl), log(TL) had a significant positive effect and log(ratioGl) a marginal positive effect (Table 2). Parental males were longer and had a tendency to have more glandular development than non-parentals males. Crest height did not have an effect on the condition of parental status.

### 3 Discussion

In this work we found that bolder males of *S. fluviatilis* showed a higher degree of cephalic crest development. Who would benefit from this? The males or the females? The cephalic crest function remains still unclear among blennies. In *S. pavo* the degree of development of this trait has been related to the male reproductive success (Gonçalves and Oliveira, 2003). Conversely, in the latter species, this relationship was not found by Oliveira et al. (1999). These authors suggested that the cephalic crest in blennies could play an important role in male-male competition rather than merely attracting females. Though, this suggestion would be

supported by our results obtained with *S. fluviatilis* (the cephalic crest size was not related to parental status of males). Boldness has been related to growth (Biro and Stamps, 2010), aggressiveness (Huntingford, 1976), dominance (Sundström et al., 2004; Colléter and Brown, 2011), resistance to infections (Locatello et al., 2012) and to a major ability to win fights (Fuxjager et al., 2010). Larger size (body length) and aggressiveness are known to offer advantages in the intrasexual competition (Fujii et al., 2005; Larson et al., 2006). Thus, if the size of the cephalic crest is associated to boldness, males could use this information to assess aggressiveness and dominance of competitors before a potential confrontation. In this case the cephalic crest could function as an honest signal (see Maynard-Smith and Harper, 1995). Using this kind of signal allows animals to avoid potentially costly fights that they are unlikely to win. It is probable that *S. fluviatilis* males use these signals since in blennies fights lead to higher energy expenditure and increase the risk of injury (in the fins and body) that might compromise their survival and reproduction (Santos and Nash, 1996).

Females, otherwise, could prefer characteristics that make a male a good father rather than a dominant individual (Forsgren, 1997; Wong, 2004). We observed here that males which succeeded in obtaining clutches in their nests were those with bigger sizes. Male size has been often related to female choice in fish (Kolm, 2001). In fish species with a resource-based mating system, male size has been associated with benefits in nest defence and greater ability in taking care of clutches (Fujii et al., 2005). In our study, males with higher hesitancy times were larger at the time of reproduction, and this suggests they could have grown faster. In this sense,

**Table 2 Results for the best Linear Mixed Models (for b1 and b2) and for the best General Linear Mixed Model (Parental)**

Dep	Fixed effects	Estimates $\pm$ SE	F	df	P
log(b1)	Intercept	7.47 $\pm$ 0.35	–	–	–
	Log (ratioCr)	-40.8 $\pm$ 14.72	8.21	1	0.00*
log(b2)	Intercept	-108.14 $\pm$ 67.55	–	–	–
	Log (TL)	-24.00 $\pm$ 15.55	5.39	1	0.02*
	Log (ratioCr)	-5699.61 $\pm$ 2683.17	0.04	1	0.83
	Log(TL):log(ratioCr)	1310.71 $\pm$ 616.08	4.53	1	0.03*
Parental	Intercept	-40.78 $\pm$ 14.01	–	–	–
	Log (ratioGl)	345.57 $\pm$ 185.71	3.46	1	0.06
	Log (TL)	0.42 $\pm$ 0.15	7.77	1	0.01*

“Dep” indicates the dependent variables for each model: log(b1), boldness score; log(b2), hesitancy; and Parental, males’ parental status. Considered covariates were: log(ratioCr), cephalic crest height; log(ratioGl), mean glandular diameter; and log(TL), total length. Significant fixed effects are indicated (\*).

personality seemed to have played an important role on length which positively influenced the adoption of parental status. According to Biro and Stamps (2010), individuals with a more active metabolism and faster growth have a higher energy expenditure and therefore should take more risks when they are foraging. The interaction found between male length and cephalic crest size explaining hesitancy is more difficult to interpret. This interaction would indicate that the effect of male length on the hesitancy would be mitigated by the cephalic crest size. We also found a marginally significant effect of anal glands size on parental status acquisition. It has been described that these glands are responsible for pheromones that are released to attract females (Barata et al., 2008) and for antimicrobial secretions to prevent egg infections (Pizzolon et al., 2010). Our study, however, was not addressed to investigate female choice. Further studies are required to better understand female choice on male morphological traits (SSTs) and male boldness behaviour.

The variability of personality traits between individuals suggests that the optimal behaviour for a species is not unique (Dall et al., 2004; Stamps, 2007; Wolf and Weissing, 2010). The individual position in the shyness-boldness axis affects its fitness differently depending on the environmental context (Dingemanse et al., 2004; Dingemanse and Réale, 2005; Sinn et al., 2006). In the male of *S. fluviatilis*, where Neat et al. (2003) have described the presence of two reproductive tactics (parental and sneakers), boldness could favour dominant behaviours against other males in the nest selection process. Animal personality traits might influence the adoption of a specific tactic, because tactics are related to the presence or absence of developed SSTs. Alternative reproductive tactics in fish are, in fact, influenced by environmental factors such as the social context, competition for a suitable reproductive site, and female availability (Burmeister et al., 2005).

The pace-of-life syndrome (POLS) states that individual behavioural differences should be linked to life-history differences (Réale et al., 2010). Our results indicate that in this species correlational selection might be favoring the linkage between boldness and life-history traits such as fast growth and probably early reproduction (due to the advantage of larger males to become parental). Our results also suggest that intrasexual and intersexual selection might not only drive the evolution of morphological traits, but thereby also favor behavioral types that allow males to reach larger body sizes. Increasingly, knowledge of animal persona-

lity is taken into account to improve the success of reintroductions and conservation programs in the field (McDougall et al., 2006). Our study allows us to understand better how boldness is related to the development of SSTs and the latter with the acquisition of parental status. In other fish species latency to exit the refuge was found to be repeatable (e.g. Wilson and Godin, 2009; Harris et al., 2010). However, future studies need to test whether boldness is repeatable in *S. fluviatilis* and to determine whether these processes also occur in nature.

**Acknowledgments** We thank J.D. Rodríguez-Teijeiro for reviewing and improving the manuscript. Excellent lab assistance was provided by R. Mitjans and A. Goldhoorn. We also thank G. Harwood for English revision, the two anonymous reviewers for their recommendations, and the University of Barcelona for providing materials and animal facilities. Research was funded by the research team “Biologia de Vertebrats” (2009 SGR 43) included in the Universities and Research programme (PIGC) from Generalitat de Catalunya.

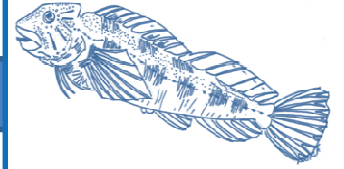
## References

- Barata EN, Serrano RM, Miranda A, Nogueira R, Hubbard PC et al., 2008. Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour* 75: 379–389.
- Bates DM, Maechler M, Bolker B, 2012. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999999-0. [http://r-forge.r-project.org/R/?group\\_id=60](http://r-forge.r-project.org/R/?group_id=60)
- Bell AM, 2005. Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 464–473.
- Biro PA, Stamps JA, 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 361–368.
- Biro PA, Stamps JA, 2010. Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? *Trends in Ecology & Evolution* 25: 653–659.
- 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, Burgess F, Braithwaite V, 2007. Heritable and experiential effects on boldness in a tropical poeciliid. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 237–243.
- Brown C, Jones F, Braithwaite V, 2005. *In situ* examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid *Brachyrhaphis episcopi*. *Animal Behaviour* 70: 1003–1009.
- Burmeister SS, Jarvis ED, Fernald RD, 2005. Rapid behavioral and genomic responses to social opportunity. *Plos Biology* 3: 1996–2004.
- Burnham KP, Anderson DR, 2002. Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach. Springer.
- Candolin U, 2000. Changes in expression and honesty of sexual signalling over the reproductive lifetime of sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biolo-*

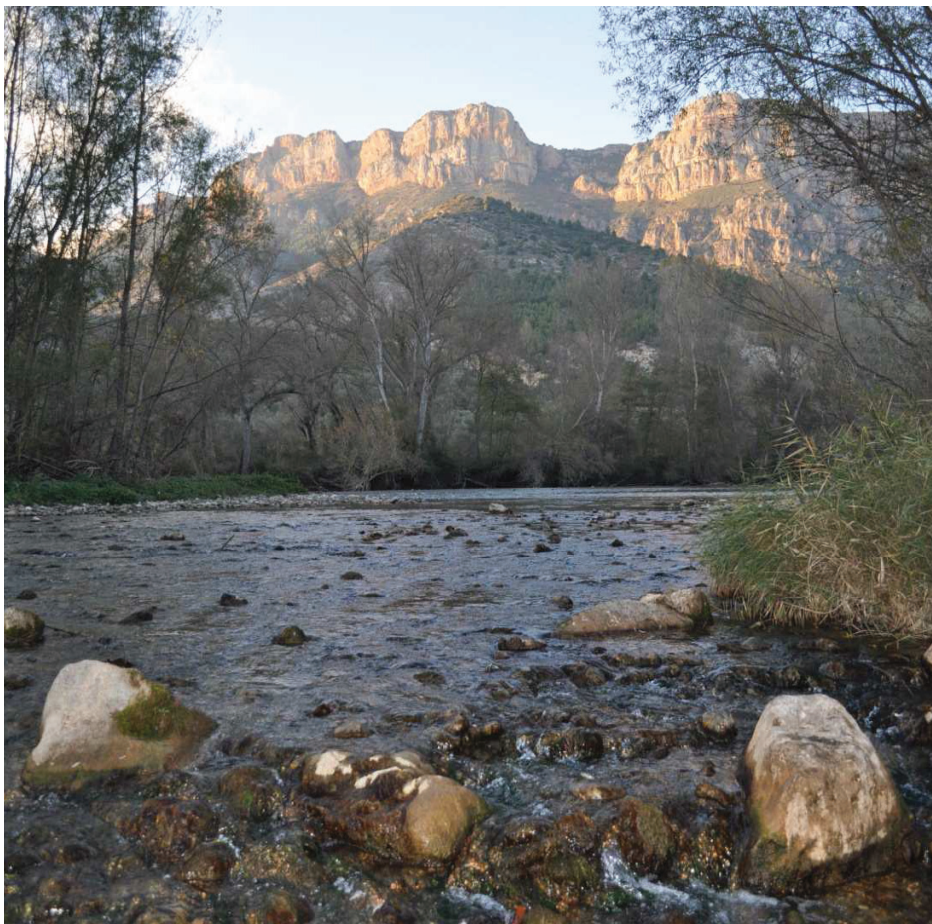


- gical Sciences 267: 2425–2430.
- Colléter M, Brown C, 2011. Personality traits predict hierarchy rank in male rainbowfish social groups. *Animal Behaviour* 81: 1231–1237.
- Daisley NJ, Bromundt V, Möstl E, Kotschal K, 2005. Enhanced yolk testosterone influences behavioral phenotype independent of sex in Japanese quail chicks *Coturnix japonica*. *Hormones and Behavior* 47: 185–194.
- Dall SRX, Houston AI, McNamara JM, 2004. The behavioural ecology of personality: Consistent individual differences from an adaptive perspective. *Ecology Letters* 7: 734–739.
- Dingemanse NJ, Both C, Drent P, Tinbergen J, 2004. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: 847–852.
- Dingemanse NJ, Réale D, 2005. Natural selection and animal personality. *Behaviour* 142: 1165–1190.
- Drent PJ, Oers KV, Noordwijk AJV, 2003. Realized heritability of personalities in the great tit *Parus major*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 45–51.
- Ducrest A, Keller L, Roulin A, 2008. Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends in Ecology & Evolution* 23:502–510.
- Dugatkin LA, Alfieri MS, 2003. Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethology Ecology & Evolution* 15: 43–49.
- Dziewieczynski TL, Crovo JA, 2011. Shyness and boldness differences across contexts in juvenile three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* from an anadromous population. *Journal of Fish Biology* 79: 776–788.
- Forsgren E, 1997. Female sand gobies prefer good fathers over dominant males. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 264: 1283–1286.
- Fujii S, Hironaka M, Nomakuchi S, 2005. Male body size and brooding success under natural conditions in the freshwater Japanese goby *Rhinogobius* sp. OR (orange type). *Journal of Ethology* 23: 127–132.
- Fuxjager MJ, Montgomery JL, Becker EA, Marler CA, 2010. Deciding to win: Interactive effects of residency, resources and ‘boldness’ on contest outcome in white-footed mice. *Animal Behaviour* 80: 921–927.
- Godin JG, Dugatkin LA, 1996. Female mating preference for bold males in the guppy *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 10262–10267.
- Gonçalves DM, Oliveira RF, 2003. Time spent close to a sexual partner as a measure of female mate preference in a sex-role-reversed population of the blenny *Salaria pavo* (Risso) (Pisces: Blenniidae). *Acta Ethologica*: 6: 1–5.
- Harcourt JL, Ang TZ, Sweetman G, Johnstone RA, Manica A, 2009. Social feedback and the emergence of leaders and followers. *Current Biology* 19: 248–252.
- Harris S, Ramnarine IW, Smith HG, Pettersson LB, 2010. Picking personalities apart: Estimating the influence of predation, sex and body size on boldness in the guppy *Poecilia reticulata*. *Oikos* 119: 1711–1718.
- Huntingford FA, 1976. The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour* 24: 245–260.
- Kolm N, 2001. Females produce larger eggs for large males in a paternal mouthbrooding fish. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268: 2229–2234.
- Larson ET, O’Malley DM, Melloni RH Jr, 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research* 167: 94–102.
- Locatello L, Pizzolon M, Rasotto M, 2012. One trait, many signals: Different information on male quality is enclosed within the same trait in a blenny fish. *Naturwissenschaften* 99: 863–867.
- Maynard-Smith J, Harper DGC, 1995. Animal signals: Models and terminology. *Journal of Theoretical Biology* 177: 305–311.
- Maffi A, Wakamatsu K, Roulin A, 2011. Melanin-based coloration predicts aggressiveness and boldness in captive eastern Hermann’s tortoises. *Animal Behaviour* 81: 859–863.
- Mateos-Gonzalez F, Senar JC, 2012. Melanin-based trait predicts individual exploratory behaviour in siskins *Carduelis spinus*. *Animal Behaviour* 83: 229–232.
- McDougall PT, Réale D, Sol D, Reader SM, 2006. Wildlife conservation and animal temperament: Causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation*, 9: 39–48.
- Neat FC, Lengkeek W, Westerbeek EP, Laarhoven B, Videler JJ, 2003. Behavioural and morphological differences between lake and river populations of *Salaria fluviatilis*. *Journal of Fish Biology* 63: 374–387.
- Oliveira RF, Almada VC, Forsgren E, Gonçalves EJ, 1999. Temporal variation in male traits, nesting aggregations and mating success in the peacock blenny. *Journal of Fish Biology* 54: 499–512.
- Oliveira RF, Carneiro LA, Gonçalves DM, Canario AVM, Grober MS, 2001. 11-Ketotestosterone inhibits the alternative mating tactic in sneaker males of the peacock blenny *Salaria pavo*. *Brain, Behavior and Evolution* 58: 28–37.
- Ottová E, Simkova A, Jurajda P, Dávidová M, Ondracková M et al., 2005. Sexual ornamentation and parasite infection in males of common bream *Abramis brama*: A reflection of immunocompetence status or simple cost of reproduction? *Evolutionary Ecology Research* 7: 581.
- Pellegrini AA, Wisenden B, Sorensen P, 2010. Bold minnows consistently approach danger in the field and lab in response to either chemical or visual indicators of predation risk. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 381–387.
- Pizzolon M, Giacomello E, Marri L, Marchini D, Pascoli F et al., 2010. When fathers make the difference: Efficacy of male sexually selected antimicrobial glands in enhancing fish hatching success. *Functional Ecology* 24: 141–148.
- R Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Réale D, Garant D, Humphries MM, Bergeron P, Careau V et al., 2010. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 4051–4063.
- Réale D, Reader SM, Sol D, McDougall PT, Dingemanse NJ, 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews* 82: 291–318.
- Reaney LT, Backwell PRY, 2007. Risk-taking behavior predicts aggression and mating success in a fiddler crab. *Behavioral*

- Ecology 18: 521–525.
- Rehage JS, Sih A, 2004. Dispersal behavior, boldness, and the link to invasiveness: A comparison of four *Gambusia* species. *Biological Invasions* 6: 379–391.
- Santos RS, Nash RD, 1996. Seasonal variations of injuries suffered by individuals of the Azorean rock-pool blenny *Parablennius sanguinolentus parvicornis*. *Copeia* 1: 216–219.
- Serrano RM, Lopes O, Hubbard PC, Araújo J, Canário AVM et al., 2008. Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny *Salaria Pavo*. *Journal of Fish Biology* 73: 1790–1798.
- Sih A, Bell A, Johnson JC, 2004. Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 372–378.
- Sinn DL, Apiolaza LA, Moltschanivskyj NA, 2006. Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1437–1447.
- Smith BR, Blumstein DT, 2008. Fitness consequences of personality: A meta-analysis. *Behavioral Ecology* 19:448–455.
- Stamps JA, 2007. Growth-mortality tradeoffs and personality traits in animals. *Ecology Letters* 10:355–363.
- Sundström LF, Petersson E, Höjesjö J, Johnsson JI, Järvi T, 2004. Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout *Salmo trutta*: Implications for dominance. *Behavioral Ecology* 15: 192–198.
- Tulley JJ, Huntingford FA, 1988. Additional information on the relationship between intra-specific aggression and anti-predator behaviour in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Ethology* 78: 219–222.
- Vinyoles D, De Sostoa A, 2007. Life-history traits of the endangered river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso) and their implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 70: 1088–1108.
- 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 populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353: 199–205.
- Wilson AD, Godin JGJ, 2009. Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology* 20: 231–237.
- Wolf M, Weissing FJ, 2010. An explanatory framework for adaptive personality differences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 3959–3968.
- Wong B, 2004. Superior fighters make mediocre fathers in the Pacific blue-eye fish. *Animal Behaviour* 67: 583–590.



Sección 2.2.  
Aprendizaje espacial  
basado en marcas visuales  
en el blenio de río *Salaria fluviatilis*  
(Asso, 1801)





# **Spatial learning based on visual landmarks in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801).**

**Noëlle Fabre<sup>\*</sup>, Eduardo García-Galea<sup>\*</sup> & Dolors Vinyoles<sup>\*,1</sup>**

<sup>\*</sup>Department of Animal Biology (Vertebrates), Faculty of Biology,

University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Tel.: +34 (0) 934039808; fax: +34 (0) 934035740; email: d.vinyoles@ub.edu

## **Abstract**

The use and learning of visual landmarks seems to be strongly influenced by ecological demand and could depend on the species habitat, sex and presumably dominance status. In blennies, sexes differ in their home-range extension and this could predispose them to use different mechanisms to orientate. The main aim of this study was to investigate if *Salaria fluviatilis* (a benthonic and polygynic freshwater blenny) was able to solve a learning maze using direct visual landmarks. Performances between sexes were compared and the possible relation between the males' secondary sexual characteristics (SSCs) development and spatial ability considered. In this species the SSCs consist of a cephalic crest and a pair of anal glands. Fish were submitted to 10 exams (each one consisting of 11 consecutive tests) in a specially designed apparatus where they had to find the correct exit using direct visual landmarks. The proportion of males that learned the task (80%) was higher than those of females (30%). The cephalic crest development of the male was associated with a major rapidity in solving the spatial task. These results support previous works that state the importance of ecological demand on shaping the species spatial abilities. They also provide a comprehensive perspective that would link dominance (through the cephalic crest development), learning and sexual selection.

*Keywords:* dominance, fish orientation, river blenny, secondary sexual characteristics, spatial ability

## 1. Introduction

Fish depend on their capacity of orientation to perform a series of vital activities such as: foraging (Hughes & Blight, 1999), locating spawning sites (Mazeroll & Montgomery, 1998), performing homing behaviour (Thyssen, 2010; Jorge, Almada, Gonçalves, Duarte-Coelho, & Almada, 2012) or eluding predators (Aronson, 1971; Markel, 1994). Their orientation can be based on different external stimulus such as: water flow direction (Braithwaite & Girvan, 2003), electromagnetism (Walker et al., 1997), polarized light (Hawryshyn, Arnold, Bowering, & Cole, 1990), odors (Stabell, 1984), social information (Brown & Laland, 2003) and visual landmarks (Burt & Macias García, 2003). There are different categories of orientation: positional, object-directed, stratal, zonal, topographic and geographic (Jander, 1975). While the majority of these categories have a strong innate and instinctive component, topographic orientation depends mostly on spatial learning and memory. The capacity to include previous experiences within spatial behaviour is essential for certain fish to survive and to adapt to environmental changes (Dodson, 1988).

An extended bibliography exists on spatial learning based on visual landmarks in fish. It has been described that they can use these kind of landmarks: 1) as direct and indirect points of reference (Warburton, 1990; López, Broglio, Rodríguez, Thinus-Blanc, & Salas, 1999), 2) as sequences (Mazeroll & Montgomery, 1998), 3) from different directions (Rodríguez, Duran, Vargas, Torres, & Salas, 1994) and 4) they can establish complex geometric relationships between them (Braithwaite & De Perera, 2006). These mechanisms are becoming better understood and some studies are revealing that certain spatial abilities in fish are comparable to those of adult humans and superior to

the ones found in children and rats (Sovrano, Bisazza, & Vallortigara, 2002). This suggests that spatial information use could be more influenced by the species ecological demands than by its phylogeny.

The habitat where a fish population occurs determines the importance acquired by visual landmarks in their orientation. In experiments with sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* it was observed that visual landmarks were more used by individuals from: the lake population compared with the river population (Odling-Smee & Braithwaite, 2003), the clear and static water population compared with the eutrophic and poor visibility water population (Girvan & Braithwaite, 1998) and the high-predation condition population compared with low-predation condition population (Huntingford & Wright, 1989). Moreover, it has been suggested that the benthonic species of *Gasterosteus* would be more likely to use visual landmarks than the limnetic ones (Odling-Smee, Boughman, & Braithwaite, 2008).

In certain species, males and females differ in home-range (Wittenberger, 1981) and this entails differences in ecological demand and spatial ability (Gaulin & FitzGerald, 1986, 1989). In promiscuous or polygynous mating systems, males are frequently the mobile sex (Brown, 1966; Lockie, 1966; Ewer, 1968; Trivers, 1972) and they present more complex spatial abilities than females (Gray & Buffery, 1971). However, in blennies, this circumstance is reversed; while the females have a broad home-range (Costa et al., 2011), males are restricted to their nest (Neat & Lengkeek, 2009) and they make short excursions outside to feed and to defend their territory (Almada, Gonçalves, De Oliveira, & Barata, 1992; Gonçalves & Almada, 1998). These differences could predispose sexes to use distinct landmarks to orientate. Males might use local



(visual) landmarks whereas females might prefer to use other spatial references more significant in a larger scale (e.g. water flow direction or electromagnetism).

Animal personality could have also an influence on spatial learning. Boldness (defined as the propension to take risks) has been associated to a major facility to learn (Dugatkin & Alfieri, 2003) and also to the dominant status acquisition (Dahlbom, Lagman, Lundstedt-Enkel, Sundström, & Winberg, 2011). These associations could have a physiological basis; fish that grow fast and have a better response to stress are more prone to explore their surroundings (Biro & Stamps, 2010; Archard, Earley, Hanninen, & Braithwaite, 2012) and to become dominant (Hofmann, Benson, & Fernald, 1999; Pottinger & Garrick, 2001). All this make it reasonable to suppose that dominance and spatial learning could be related, adding to the fact that dominant males (in territorial species) might be more motivated to use visual landmarks than non-dominant males (without territory). Among fish, visual landmarks are frequently used to define territorial limits (Heap, Byrne, & Stuart-Fox, 2012). In species with alternative reproductive tactics (ARTs) the dominant status is associated to a higher development in secondary sexual characteristics (SSCs) (Fleming & Gross, 1994; Oliveira & Almada, 1998; Oliveira, Carneiro, Gonçalves, Canario, & Grober, 2001).

*Salaria fluviatilis* is one of the few blenny species that inhabits freshwater and occurs in rivers and lakes from the Mediterranean basin. During the reproductive period which extends from May to the end of July (Vinyoles & Sostoa, 2007), males excavate a cavity under a stone and several females lay clutches in a monolayer on the underside of the stone. A good topographic knowledge of the familiar area, a good memory and a particular curiosity to explore has been attributed to this species by Wickler (1957),

but it was not studied which was the role of visual landmarks. Probably, repeated incursions to the nest enable visual recognition of neighboring objects by the males. In a species with similar habits, the shanny (*Liphophyrus pholis*), the use of visual landmarks has been already found (Burt de Perera & Guilford, 2008). *S.fluviatilis* supposes also an appropriate model to study the relationship between spatial ability and SSCs development. During the reproduction period, males develop a cephalic crest and a pair of anal glands. Recently, boldness has been associated with cephalic crest in this species (Fabre, García-Galea, & Vinyoles, 2014) but it is still unknown if SSCs are related to spatial ability.

The main objective of this study was to define if *S. fluviatilis* is able to use solely direct visual landmarks to orient and if there are differences between sexes. In the case that visual landmarks use is found for the males, relation between SSCs development and spatial ability would be explored.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Field collection and fish maintenance*

Fish were caught in the river Segre, a tributary of the Ebro River, close to the Camarasa region (Spain) in November 2010. A total of 80 specimens were collected, there were 40 males and 25 females of similar sizes (ranging from 60 to 70 mm in total length, TL), and 15 large females (ranging from 80 to 90 mm in TL).

Animals were placed in five 260 L aquaria provided with a biological filter, air diffuser and substrata (consisting of a mix of sand, gravel and coral in proportion 2:2:1). Each aquarium holds 10 artificial nests (distributed in two parallel rows of five nests each)

that function both as refuges and nests for the fish. Nests consisted of transparent plastic boxes (13.5 cm width x 7 cm high x 12 cm depth) whose inner ways were covered by black acetate sheets to make them opaque, with an opening in the front (nest entry) and with the ceiling substituted by a glass surface. Previous experiments with these artificial nests confirmed that the species readily accepted them as nesting sites (unpublished data). The water in the aquaria consisted of 95% deputed freshwater and 5% seawater (with a final salinity of 2 ppm) and was partially renewed with a two weeks periodicity to maintain adequate pH, NO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub> levels. Temperature (mean  $\pm$  SD = 22.96  $\pm$  1.15 °C) and light regime 12L:12D were maintained constant throughout the experiment.

In each aquarium there was the following proportion of fish: eight males, five median females and three large females. In the experiment only median-sized fish were used (all the males and the five females). Large females just served as sexual stimulus in the aquaria (in order to simulate female variability in sizes found in nature, Vinyoles and Sostoa (2007)). Animals were feed "ad libitum" with red quironomidae larvae (the principal pray of the species following Vinyoles (1993)) once a day. Once a week fresh mussels were added to the diet.

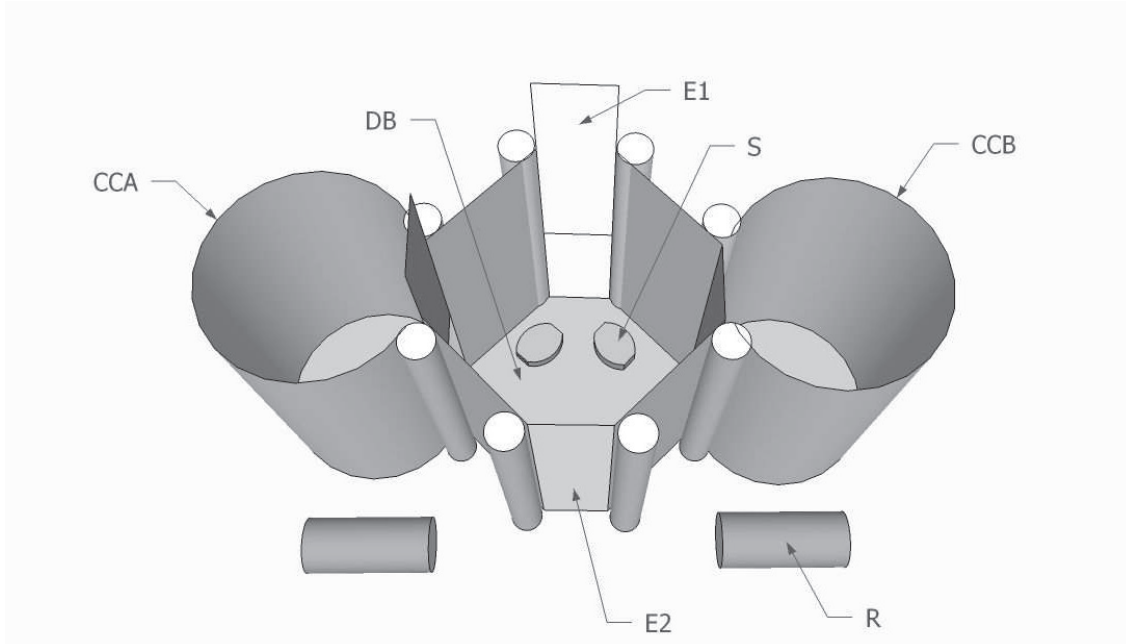
The experiment was performed from August to September 2011 (coinciding with the end of the reproductive period). The long time that fish were maintained in the aquaria before the experiment served to habituate them to captivity and manipulation (manipulation consisted in capturing them once a month with small hand-nets). Fish individual recognition was possible through the identification of certain traits such as:

the cephalic crest shape, mucous pore location and body pigmentation pattern. After the experiments fish were returned to the river.

## *2.2. Apparatus*

The experimental apparatus used to perform the learning task was inspired in the design described by Ingle and Saharian (1973) and used later by other authors (Salas et al., 1996; López, Broglio, Rodríguez, Thinus-Blanc, & Salas, 1999, 2000). This structure consisted of a rhomboidal box (hereafter referred to as decision-box) of 196 cm<sup>2</sup> area and 20 cm height, constructed with PVC pieces (0.5 cm thick) and whose vertices were opened with 5 cm openings (Fig. 1). Two of these openings (opposite each other) give access to a cylindrical compartment that consisted of a vertical PVC tube (11 cm diameter x 20 cm height) opened at the top. Between each cylindrical compartment and the decision-box a grey plastic sliding door (that could open and close the compartment) was placed. During the tests one of the cylindrical compartments remained closed (the one non-used) while the other one received the individual that has to start the test. The other two openings from the decision-box acted as exits of the apparatus and the fish has to decide throughout the test which one to use. These exits also have sliding doors but in this occasion they were made with transparent plastic (to avoid fish visual detection). During the tests one of the exits was open (correct exit) while the other was blocked by the transparent sliding door (wrong exit). The visual landmarks used to indicate the correct exit were two similar flattered stones (6.6 x 4.5 cm and 5.4 x 4.5 cm respectively). Stones were placed on the floor of the decision-box, one at each side of the correct exit (at a distance of 4.5 cm from the exit and at 2.5 cm from the closest apparatus wall). When the fish that was performing the

test succeed to exit the apparatus, outside, it found two small PVC tubes, one at each side (4 cm diameter x 13 cm length) that acted as refuges. Although these tubes were invisible to the fish until they exit the apparatus, they supposed a positive stimulus.



**Fig 1.** Diagrammatic representation of the experimental apparatus. The structure has two cylindrical compartments (CCA and CCB) and two transparent exit doors (E1, E2). In the central zone, called decision-box (DB), two stones (S) were placed at each side of the correct exit (in this case E1). Outside de apparatus and at each side of the exits there were two refuges (R).

The experimental apparatus plus the refuges were placed in a rectangular opaque plastic tank (47 x 56 cm base x 40.5 cm height, hereafter referred to as experiment-tank) covered with the same substrata than the one of the 260 L aquaria. Illumination was provided by two neon lights (98 x 12 cm, 60 W) placed 25 cm height above each cylindrical compartment. Direct illumination of the cylindrical compartments avoided the fish adopting the compartment as a refuge and stimulated them to seek safer places. The experiment-tank was surrounded by curtains (to avoid interactions with

the researcher). In order to record fish movements, a video camera (Sony Handycam HDR-SR1E) was placed above the apparatus (at a height of 140 cm). During the tests the experiment-tank was filled with water (same composition and temperature as the one in the aquaria) to a level of 15 cm and the lab lights switched off.

### *2.3. Learning task*

Fish were selected randomly in groups of two males and two females per aquarium. The two pairs selected were separated from the rest of the fish (in a separate zone of 30 x 40 cm surface) by placing a divider in the aquarium. After two days of habituation to the separate zone the learning task started. Each fish performed a maximum of 10 exams (each one constituted by 11 consecutive tests) in three days. Every test consisted of placing the fish into one of the cylindrical compartments (see the assignation sequence below) and waiting until the fish chose one of the two exits. When the first decision of the fish was to exit through the “correct exit” the choice was considered “correct” while in the contrary circumstance (when it hit the closed transparent door) the choice was considered “wrong”. Following López, Broglio, Rodríguez, Thinus-Blanc, and Salas (2000) recommendations, if a fish did not emerge from the cylindrical compartment within 5 minutes it was lightly prodded with a glass rod to motivate an exit. Fish that did not emerge their heads out of the cylindrical compartment and were immobile during the first 15 minutes of the first exam were discarded from the experiment. This decision was based on previous observations that indicate that fish who presented these behaviors did not exit the cylindrical compartment in the following hour. Fish that were not discarded have no time limitation to perform the tests. Each test finished when the fish exit the apparatus

through the correct exit and hid in one of the PVC refuges. After 30 seconds, the fish was captured and a new test started until the exam (11 tests) was completed.

The apparatus configuration changed between tests; the cylindrical compartments (A or B) and the correct exits (1 or 2) were used in a pseudorandom sequence so that correct choices required alternation of turns, following Salas et al. (1996). The two stones were moved to always indicate the correct exit and supposed the only reliable landmark to learn the task. During the 30 seconds between tests, the correspondent configuration was settled and also the substrata in front of the apparatus exits stirred to avoid the use of any of its elements to orientate. At the end of the exam, the fish was left in a 10 L bucket provided with an air-diffuser and a PVC refuge to rest. Each fish was submitted to 4 exams the first and second day and to two exams the third day, with a time span of 2-3 hours between tests in the same day. After the exams of the day the fish were returned to their respective aquaria and fed.

#### *2.4. Measured variables*

Fish were considered to have learnt (i.e. they reached the acquisition criterion) when they attained 9 correct choices in an exam. In previous essays it was seen that fish that get this punctuation maintained or increased it in successive exams, therefore, when a fish attained the acquisition criterion it was not submitted to more exams. Each fish was assigned a learning category (yes, no) depending if they had or not reached the acquisition criterion in the 10 exams. For the fish in learning category “yes” learning rapidity was evaluated through the number of exams performed to attain the acquisition criterion. The time each fish needed to complete an exam was recorded in

order to calculate the average time per exam (s) for each sex and for each learning category.

At the end of the experiment individuals were measured in a small transparent container with a graph paper at the back. The variables considered were: TL for both sexes and SSC development for the males (cephalic crest height and gland mean diameter). Cephalic crest height (Cr) was obtained as the distance from the middle of the cranium to the top of the crest (mm) and the gland mean diameter (GI) was obtained as the average of the first and second anal gland diameter. Both SSCs development variables were divided by TL, ratioCr (Cr/TL) and ratioGI (GI/TL). All variables were  $\log(x+1)$  transformed before the statistical analyses.

### *2.5. Statistical analyses*

To analyze whether or not the development of SSTs was related to the number of exams required to attain the acquisition criterion a generalized linear model (GLM) with a Poisson distribution of errors (with the link function log) was used. In this model “number of exams to acquisition” was the dependent variable (ranging from 1 to 10, where the fish that did not learn were assigned a 10). Each model included initially as covariates:  $\log(\text{TL})$ ,  $\log(\text{ratioCr})$  and  $\log(\text{ratioGI})$ , with all the paired interactions between them. The best model was found by extracting parameters using the AIC criterion corrected for small samples sizes (AICc) (Burnham & Anderson, 2002). Error adjustment was verified by visual inspection of the normal probability plots. Statistical analyses were performed with the glm function in the package stats from the free software R (R Core Team, 2012). The best model was found by using sequentially the drop1 function.



### 3. Results

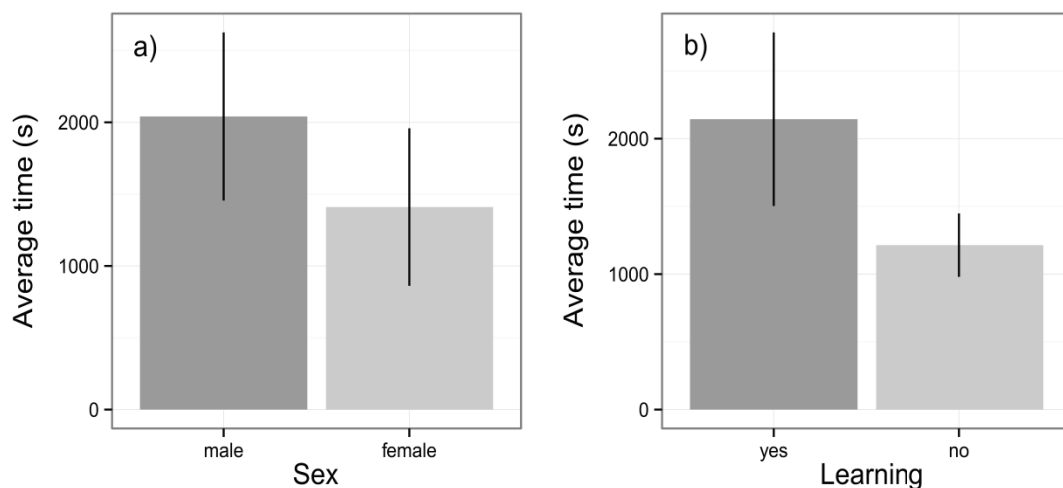
There were no significant differences in TL (*mean*  $\pm$  *SD*, mm) between males ( $91.6 \pm 7.9$ ) and females ( $90.5 \pm 3.2$ ) at the moment of the experiment ( $t=0.41$ ,  $df=18$ ,  $P=0.69$ ). From the 40 males and 25 females submitted to the learning task, only 10 individuals of each sex were able to perform it. The rest of fish were discarded because they did not emerge from the cylindrical compartment (Fig. 1) in the first exam. There were no significant differences in the proportion of discarded males compared to females ( $G\text{-test}=2.34$ ,  $df=1$ ,  $P=0.13$ ).

The number of correct choices in the first exam for all the individuals followed a random pattern (binomial distribution  $P>0.20$ ) proving that the fish did not detect the transparent door and that they were not initially attracted or repulsed by the stones. Proximately, more than the half of the fish that were able to perform the experiment attained the acquisition criterion (55%). Among the fish that solved the task within the 10 exams there were 8 males (80% of the males) and 3 females (30% of females). This result implied that males showed a major capacity to find the exit of the apparatus learning the position of the visual landmarks than females ( $G\text{-test}= 5.3$ ,  $df=1$ ,  $P=0.021$ ). The three females that reached the acquisition criterion required 7, 7 and 9 exams respectively. The number of exams each one of the eight males needed to learn the task can be found in Table 1. There were no significant differences in the average time per exam (s) between sexes (Fig. 2a; *Mann–Whitney U-test*,  $n = 10$ ,  $P >0.05$ ) and between fish depending on their category of learning (yes, no) (Fig. 2b; *Mann–Whitney U-test*,  $n = 10$ ,  $P =0.07$ ), although in this case the result is marginally significant. There

were no differences in length between fish that learn and fish that did not ( $t=-0.49$ ,  $df=18$ ,  $P=0.63$ ).

TL (mm)	Cr (mm)	Gl (mm)	Exam
100	1.91	2.31	2
92	1.52	1.82	2
96	1.85	2.31	4
78	1.71	1.17	5
95	0.76	1.51	5
82	0.96	1.36	6
98	0.48	1.35	8
83	1.11	1.57	9
100	1.05	1.77	10
92	0.87	1.50	10

**Table 1.** Characteristics of *Salaria fluviatilis* males that performed the experiment: total length (TL), cephalic crest height (Cr) and mean glandular diameter (Gl). In the last column (Exam) the number of the exam when each fish attained the acquisition criterion is indicated. The two males that did not learn were assigned a 10.



**Fig. 2.** Average time needed by *Salaria fluviatilis* to complete each exam expressed in seconds (mean  $\pm$  95% CI). In graph a) fish are separated by sex and in graph b) fish are separated depending if they have learned (yes) or not (no) the task throughout the 10 exams.

The best GLM model for the number of exams depending on TL and SSC development only included the variable  $\log(\text{ratioCr})$ , which has a negative effect on the number of exams (Table 2). The males that had a major cephalic crest development during the exam were the ones who learned faster (i.e. they needed less exams to attain the acquisition criterion). Note, however, that the three males that learned faster (in the 4 first exams) tended to have, apart from the cephalic crest, more developed glands than the rest (Table 1).

Dep	Fixed effects	Estimates $\pm$ SE	F	d.f	P
Nº of exams	Intercept	2.54 $\pm$ 0.33	-	-	-
	Log(ratioCr)	-58.17 $\pm$ 25.43	5.41	1	0.02*

**Table 2.** Results for the best Linear Model. Dep indicates the dependent variable: number of exams to acquisition (Nº of exams). This model only considered as covariate: Log (ratioCr), which has a significant negative effect (\*).

#### 4. Discussion

The present study supposes the first experimental approximation to the use and learning of direct visual landmarks in the freshwater blenny. The first finding was that the species used visual landmarks to orientate and also that males and females differed in the learning task resolution. These differences might be attributed to distinct spatial abilities in the sexes adjusted to their specific ecological demands (Odling Smee & Braithwaite, 2003). This result is coherent with the initial hypothesis stating that *S.fluviatilis* males could be more prone than females to use visual landmarks, because males need to return to their nests after the short incursions they

do outside in search for food or to defend their territories. However it is not clear what other mechanisms could be intervening, which is their relative importance or the interaction between them. In rivers, the male of this species orient the nest entrance depending on the flow velocity found in the microhabitat (Vinyoles, Côté, & De Sostoa, 2002), but it is still unknown how he finds this entrance. Perhaps a chemical recognition could exist, since male blennies rub the clutches with their anal glands impregnating them with protective substances (Pizzolon et al., 2010). Populations living in rivers probably, as occurs in other fish species, use to a certain extent the direction of turns to orientate (Odling-Smee & Braithwaite, 2003). Females seemed to use less than males visual landmarks. In some blennies females were found to have a bigger telencephalon than males (Carneiro, Andrade, Oliveira, & Kotrschal, 2001; Costa et al., 2011). Telencephalon is related to memory and spatial learning in fish (Overmier & Hollis, 1990; Broglio, Rodríguez, & Salas, 2003; Rodríguez et al., 2002) and is important in the construction of the spatial map (Salas et al. 1996; López, Broglio, Rodríguez, Thinus-Blanc, & Salas, 1999, 2000). Spatial maps could be constituted of a series of submaps obtained through different sensory systems and orientation is performed with the submap that is available in a certain moment (Sovrano, Bisazza, & Vallortigara, 2003; Quinn, 2005) or integrating all the submaps at the same time if they are coherent (Vargas, López, Salas, & Thinus-Blanc, 2004). The task presented in this experiment demanded the fish to use a unique direct visual landmark (based on the position of two stones indicating the correct exit of the maze). One possibility is that females were less successful in learning the task because they could be relying on other kind of landmarks and had a more global perception of the surroundings. The complexity of spatial maps depends on the importance they have for the survival of

the individual (Aronson, 1971; Markel, 1994). Female blennies have a major home-range than males (Costa et al., 2011) and they need to travel long distances to visit and to reproduce with several males (Kraak, 1996; Fagundes, Gonçalves, & Oliveira, 2007). In this context it is probable that they prefer to use other kind of signals to orientate themselves in large spaces. When moving in a small territory, it is likely that a female rather than relying on static landmarks (as seem to do the males) could use other efficient systems to find a mate such as pheromones (Barata et al., 2008; Serrano et al., 2008) or the conspicuous coloration of courting males (Gonçalves, Barata, Oliveira, & Canário, 2002). Future studies are needed to ascertain if these suppositions are correct by adapting a learning task more adjusted to females' ecological demands.

It is known that an association between learning and dominance (Zhuikov, 1993) and between learning and boldness (Dugatkin & Alfieri, 2003) do exist. Cephalic crest in blennies has been related both to dominance (Oliveira, Carneiro, Gonçalves, Canario, & Grober, 2001) and boldness (Fabre, García-Galea, & Vinyoles, 2014). Based on this premise, the second result obtained in this experiment (positive relation between cephalic crest development and learning ability) seems coherent. In rats it has been described that spatial ability is an inheritable trait (Tolman, 1924; Harrington, 1968), and due to the advantages it supposes to survival (Dodson, 1988) it is probable that it is affected by selective pressures. It is unclear how inter- and intra- sexual selection could play a role in the selection of learning ability. In a study performed with guppies (*Poecilia reticulata*) it was found that females preferred to reproduce with males that had more facilities to solve a spatial task (Shohet & Watt, 2009). However, the authors could not define which element informs females of this skill, if it was a physical characteristic or a behavior of the male. Female guppies prefer to mate with more

colorful and bold males (Godin & Dugatkin, 1996) and it is probable that these males are also more prone to learn. Some studies with blennies found that the cephalic crest is a sexual characteristic preferred by the females (Gonçalves & Oliveira 2003; Fagundes, Gonçalves, & Oliveira, 2007) and this could give support to the crest as a trait used by females to select bold and fast-learning males. However, in other studies cephalic crest was not related to female choice and seemed to indicate that this trait could be more important in an intra-sexual context (Oliveira, Almada, Forsgren, & Gonçalves, 1999; Fabre, García-Galea, & Vinyoles, 2014).

Previous works studying visual landmark learning in fish through resolution of mazes show that some species such as the goldfish (*Carassius auratus*) accept well similar methodologies to the one used in the present study (Salas et al., 1996; López, Broglio, Rodríguez, Thinus-Blanc, & Salas 1999, 2000). Contrarily, *S. fluviatilis* presented difficulties adapting to the learning task and numerous individuals had to be discarded because they were unable to perform the exams. Despite the fish were specifically habituated to captivity and manipulation and that the apparatus design was adapted to the species preferences in order to guarantee a high number of fish performing the task (using stones in spite of flat panels and offering refuges outside as positive stimulus) this was not achieved. This produced a small sample size, and even though these kind of experiments usually rely on a few individuals due to their complexity (e.g. Salas et al., 1996), the obtained results must be interpreted with prudence. Future studies are needed to define other mechanisms involved in *S. fluviatilis* orientation and to compare telencephalon sizes between sexes and its consequences in female abilities in other sort of learning exercises.

## Acknowledgments

We thank J.D. Rodríguez-Teijeiro for reviewing the manuscript, X. Fabre and A. Goldhoorn for lab assistance, G. Harwood for English revision, the two anonymous reviewers for their recommendations, and the University of Barcelona for providing animal facilities. Research was funded by the research team “Biologia de Vertebrats” (2009 SGR 43) included in the Universities and Research programme (PIGC) from Generalitat de Catalunya.

## References

- Almada, V. C., Gonçalves, E. J., De Oliveira, R. F., & Barata, E. N. (1992). Some features of the territories in the breeding males of the intertidal blenny *Lipophrys pholis* (Pisces: Blenniidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *72*, 187.
- Archard, G. A., Earley, R. L., Hanninen, A. F., & Braithwaite, V. A. (2012). Correlated behaviour and stress physiology in fish exposed to different levels of predation pressure. *Functional Ecology*, *26*, 637-645.
- Aronson, L. R. (1971). Further studies on orientation and jumping behavior in the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *188*, 378-392.
- Barata, E. N., Serrano, R. M., Miranda, A., Nogueira, R., Hubbard, P. C., & Canário, A. V. (2008). Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour*, *75*, 379-389.

- Biro, P. A., & Stamps, J. A. (2010). Do consistent individual differences in metabolic rate promote consistent individual differences in behavior? *Trends in Ecology & Evolution*, *25*, 653-659.
- Braithwaite, V. A., & De Perera, T. B. (2006). Short-range orientation in fish: how fish map space. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *39*, 37-47.
- Braithwaite, V. A., & Girvan, J. R. (2003). Use of waterflow to provide spatial information in a small-scale orientation task. *Journal of Fish Biology*, *63*, 74-83.
- Broglio, C., Rodríguez, F., & Salas, C. (2003). Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. *Fish and Fisheries*, *4*, 247-255.
- Brown, L. E. (1966). Home range and movement in small mammals. *Symposium of the Zoological Society of London*, *18*, 111-142.
- Brown, C., & Laland, K. N. (2003). Social learning in fishes: a review. *Fish and Fisheries*, *4*, 280-288.
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. New York: Springer.
- Burt, T., & Macias Garcia, C. (2003). Amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*) use visual landmarks to orient in space. *Ethology*, *109*, 341-350.
- Burt de Perera, T., & Guilford, T. C. (2008). Rapid learning of shelter position in an intertidal fish, the shanny *Lipophrys pholis* L. *Journal of Fish Biology*, *72*, 1386-1392.
- Carneiro, L. A., Andrade, R. P., Oliveira, R. F., & Kotrschal, K. (2001). Sex differences in home range and dorso-lateral telencephalon in the Azorian rock-pool blenny. *Society of Neuroscience Abstracts*, *27*.



- Costa, S. S., Andrade, R., Carneiro, L. A., Gonçalves, E. J., Kotrschal, K., & Oliveira, R. F. (2011). Sex Differences in the Dorsolateral Telencephalon Correlate with Home Range Size in Blenniid Fish. *Brain, Behaviour and Evolution*, *77*, 55-64.
- Dahlbom, S. J., Lagman, D., Lundstedt-Enkel, K., Sundström, L. F., & Winberg, S. (2011). Boldness predicts social status in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, *6*, e23565.
- Dodson, J. J. (1988). The nature and role of learning in the orientation and migratory behavior of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, *23*, 161-182.
- Dugatkin, L. A., & Alfieri, M. S. (2003). Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethology Ecology & Evolution*, *15*, 43-49.
- Ewer, R.F. (1968). *Ethology of mammals*. London: Logos.
- Fabre, N., García-Galea, E., & Vinyoles, D. (2014). Boldness is related to the development of the cephalic crest in the male of the river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801). *Current Zoology*, *60*, 373-380.
- Fagundes, T., Gonçalves, D. M., & Oliveira, R. F. (2007). Female mate choice and mate search tactics in a sex role reversed population of the peacock blenny *Salaria pavo* (Risso, 1810). *Journal of Fish Biology*, *71*, 77-89.
- Fleming, I. A., & Gross, M. R. (1994). Breeding competition in a Pacific salmon (coho: *Oncorhynchus kisutch*): measures of natural and sexual selection. *Evolution*, *48*, 637-657.
- Gaulin, S. J. C., & FitzGerald, R. W. (1986). Sex Differences in Spatial Ability: An Evolutionary Hypothesis and Test. *The American Naturalist*, *127*, 74-88.
- Gaulin, S. J. C., & Fitzgerald, R. W. (1989). Sexual selection for spatial-learning ability. *Animal Behaviour*, *37*, 322-331.

- Girvan, J. R., & Braithwaite, V. A. (1998). Population differences in spatial learning in three-spined sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *265*, 913-918.
- Godin, J. G., & Dugatkin, L. A. (1996). Female mating preference for bold males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 10262-10267.
- Gonçalves, E., & Almada, V. (1998). *A comparative study of territoriality in intertidal and subtidal blennioids (Teleostei, Blennioidei)*. Netherlands: Springer.
- Gonçalves, D. M., Barata, E. N., Oliveira, R. F., & Canário, A. V. M. (2002). The role of male visual and chemical cues on the activation of female courtship behaviour in the sex-role reversed peacock blenny. *Journal of Fish Biology*, *61*, 96-105.
- Gonçalves, D., & Oliveira, R. (2003). *Time spent close to a sexual partner as a measure of female mate preference in a sex-role-reversed population of the blenny *Salarias pavo* (Risso) (Pisces: Blenniidae)*. Berlin / Heidelberg: Springer.
- Gray, J. A., & Buffery, A. W. H. (1971). Sex differences in emotional and cognitive behavior in mammals including man: adaptive and neural bases. *Acta Psychologica*, *35*, 89-111.
- Harrington, G. M. (1968). Genetic-environmental interaction in "intelligence": I. Biometric genetic analysis of maze performance of *Rattus norvegicus*. *Developmental psychobiology*, *1*, 211-218.
- Hawryshyn, C. W., Arnold, M. G., Bowering, E., & Cole, R. L. (1990). Spatial orientation of rainbow trout to plane polarized light: the ontogeny of e-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics. *Journal of Comparative Physiology*, *166*, 565-574.

- Heap, S., Byrne, P., & Stuart-Fox, D. (2012). The adoption of landmarks for territorial boundaries. *Animal Behaviour*, *83*, 871-878.
- Hofmann, H. A., Benson, M. E., & Fernald, R. D. (1999). Social status regulates growth rate: consequences for life-history strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 14171-14176.
- Hughes, R. N., & Blight, C. M. (1999). Algorithmic behaviour and spatial memory are used by two intertidal fish species to solve the radial maze. *Animal Behaviour*, *58*, 601-613.
- Huntingford, F. A., & Wright, P. J. (1989). How sticklebacks learn to avoid dangerous feeding patches. *Behavioural processes*, *19*, 181-189.
- Ingle, D. J., & Sahagian, D. (1973). Solution of a spatial constancy problem by goldfish. *Physiological Psychology*, *1*, 83-84.
- Jander, R. (1975). Ecological aspects of spatial orientation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *6*, 171-188.
- Jorge, P. E., Almada, F., Gonçalves, A. R., Duarte-Coelho, P., & Almada, V. C. (2012). Homing in rocky intertidal fish. Are *Lipophrys pholis* L. able to perform true navigation? *Animal Cognition*, *15*, 1173-1181.
- Kraak, S. B. M. (1996). A quantitative description of the reproductive biology of the Mediterranean blenny *Aidablennius sphinx* (Teleostei, Blenniidae) in its natural habitat. *Environmental Biology of Fishes*, *46*, 329-342.
- Lockie, J. D. (1966). Territory in small carnivores. *Symposium of the Zoological Society of London*, *18*, 143-165.

- López, J. C., Broglio, C., Rodríguez, F., Thinus-Blanc, C., & Salas, C. (1999). *Multiple spatial learning strategies in goldfish (Carassius auratus)*. Berlin / Heidelberg: Springer.
- López, J. C., Broglio, C., Rodríguez, F., Thinus-Blanc, C., & Salas, C. (2000). Reversal learning deficit in a spatial task but not in a cued one after telencephalic ablation in goldfish. *Behavioural Brain Research*, *109*, 91-98.
- Markel, R. W. (1994). An adaptive value of spatial learning and memory in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsi*. *Animal Behaviour*, *47*, 1462-1464.
- Mazeroll, A. I., & Montgomery, L. (1998). Daily Migrations of a Coral Reef Fish in the Red Sea (Gulf of Aqaba, Israel): Initiation and Orientation. *Copeia*, *4*, 893-905.
- Neat, F., & Lengkeek, W. (2009). Sexual selection in blennies. In R.A. Patzner, E.J. Gonçalves, P.A. Hastings, & B.G. Kapoor (Eds.) *The Biology of Blennies* (pp. 249-278). Enfield: Science Publishers.
- Odling-Smee, L., Boughman, J., & Braithwaite, V. (2008). *Sympatric species of threespine stickleback differ in their performance in a spatial learning task*. Berlin / Heidelberg: Springer.
- Odling-Smee, L., & Braithwaite, V. A. (2003). The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. *Animal Behaviour*, *65*, 4, 701-707.
- Oliveira, R. F., & Almada, V. C. (1998). Androgenization of dominant males in a cichlid fish: androgens mediate the social modulation of sexually dimorphic traits. *Ethology*, *104*, 841-858.

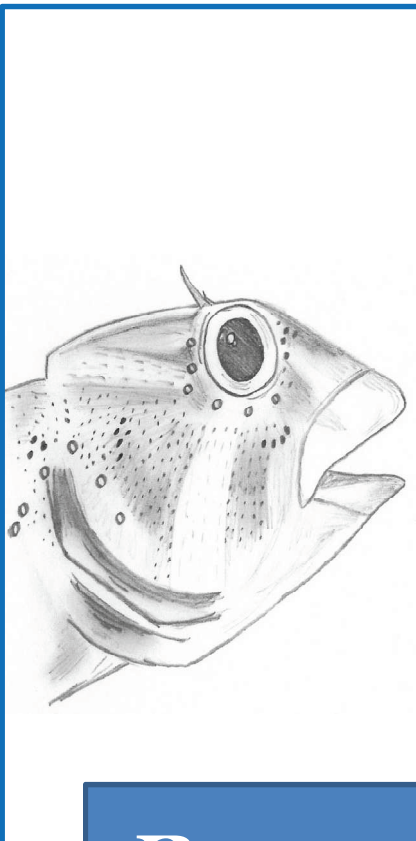
- Oliveira, R. F., Almada, V. C., Forsgren, E., & Gonçalves, E. J. (1999). Temporal variation in male traits, nesting aggregations and mating success in the peacock blenny. *Journal of Fish Biology*, *54*, 499-512.
- Oliveira, R. F., Carneiro, L. A., Gonçalves, D. M., Canário, A. V. M., & Grober, M. S. (2001). 11-Ketotestosterone Inhibits the Alternative Mating Tactic in Sneaker Males of the Peacock Blenny, *Salaria pavo*. *Brain, Behavior and Evolution*, *58*, 28-37.
- Overmier, J. B., & Hollis, K. L. (1990). Fish in the think tank: learning, memory, and integrated behavior. *Neurobiology of Comparative Cognition*, 205-236.
- Pizzolon, M., Giacomello, E., Marri, L., Marchini, D., Pascoli, F., Mazzoldi, C., & Rasotto, M. B. (2010). When fathers make the difference: efficacy of male sexually selected antimicrobial glands in enhancing fish hatching success. *Functional Ecology*, *24*, 141-148.
- Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (2001). Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, *40*, 419-427.
- Quinn, T. P. (2005). *The Behaviour and Ecology of Pacific Salmon and Trout*. Seattle: University of Washington Press.
- R Core Team (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rodríguez, F., Duran, E., Vargas, J. P., Torres, B., & Salas, C. (1994). Performance of goldfish trained in allocentric and egocentric maze procedures suggests the presence of a cognitive mapping system in fishes. *Animal Learning & Behavior*, *22*, 409-420.

- Rodríguez, F., López, J. C., Vargas, J. P., Gómez, Y., Broglio, C., & Salas, C. (2002). Conservation of Spatial Memory Function in the Pallial Forebrain of Reptiles and Ray-Finned Fishes. *The Journal of Neuroscience*, *22*, 2894-2903.
- Salas, C., Broglio, C., Rodríguez, F., López, J. C., Portavella, M., & Torres, B. (1996). Telencephalic ablation in goldfish impairs performance in a 'spatial constancy' problem but not in a cued one. *Behavioural Brain Research*, *79*, 193-200.
- Serrano, R. M., Lopes, O., Hubbard, P. C., Araújo, J., Canário, A. V. M., & Barata, E. N. (2008). Seasonal cell differentiation and olfactory potency of secretions by the anal glands of male peacock blenny *Salaria Pavo*. *Journal of Fish Biology*, *73*, 1790-1798.
- Shohet, A. J., & Watt, P. J. (2009). Female guppies *Poecilia reticulata* prefer males that can learn fast. *Journal of Fish Biology*, *75*, 1323-1330.
- Sovrano, V. A., Bisazza, A., & Vallortigara, G. (2002). Modularity and spatial reorientation in a simple mind: encoding of geometric and nongeometric properties of a spatial environment by fish. *Cognition*, *85*, 51-59.
- Sovrano, V. A., Bisazza, A., & Vallortigara, G. (2003). Modularity as a fish (*Xenotoca eiseni*) views it: Conjoining geometric and nongeometric information for spatial reorientation. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *29*, 199-210.
- Stabell, O. B. (1984). Homing and olfaction in salmonids: a critical review with special reference to the Atlantic salmon. *Biological Reviews*, *59*, 333-388.
- Thyssen, L. (2010). Homing behaviour of *Parablennius parvicornis* (Pisces: Blenniidae). *Anales Universitarios de Etología*, *4*, 25-30.

- Tolman, E. C. (1924). The Inheritance of Maze-Learning Ability in Rats. *Journal of Comparative Psychology*, *4*, 1-18.
- Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In B. G. Campbell (Eds.), *Sexual selection and the descent of man* (pp. 136-179). Aldine, Chicago.
- Vargas, J. P., López, J. C., Salas, C., & Thinus-Blanc, C. (2004). Encoding of Geometric and Featural Spatial Information by Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Psychology*, *118*, 206-216.
- Vinyoles, D. (1993). *Biologia i ecologia de Blennius fluviatilis (Pisces: Blenniidae) al Riu Matarranya*. PhD. Dissertation, Universitat de Barcelona.
- Vinyoles, D., Cote, I. M., & De Sostoa, A. (2002). Nest orientation patterns in *Salaria fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, *61*, 405-416.
- Vinyoles, D., & De Sostoa, A. (2007). Life-history traits of the endangered river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso) and their implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, *70*, 4, 1088-1108.
- Walker, M. M., Diebel, C. E., Haugh, C. V., Pankhurst, P. M., Montgomery, J. C., & Green, C. R. (1997). Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*, *390*, 371-376.
- Warburton, K. (1990). The use of local landmarks by foraging goldfish. *Animal Behaviour*, *40*, 500-505.
- Wickler, W. (1957). Vergleichende Verhaltensstudien an Grundfischen. I. Beiträge zur Biologie, besonders zur Ethologie von *Blennius fluviatilis* Asso im Vergleich zu einigen anderen Bodenfischen. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, *14*, 393-428.
- Wittenberger, J. F. (1981). *Animal social behavior*. Boston: Duxbury Press.

Zhuikov, A. Y. (1993). Avoidance learning and aggression in guppies. *Animal behaviour*, 45, 825-826.





# Resumen de los artículos



## RESUMEN DE LOS ARTÍCULOS

**PLASTICIDAD EN LOS CARACTERES SEXUALES SECUNDARIOS EN EL MACHO DEL BLENIO DE RÍO (*Salaria fluviatilis*). N. Fabre, F. Oliva, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). *Canadian Journal of Zoology* 92: 537-543.**

Las tácticas reproductivas alternativas (ARTs) dependientes de factores ambientales son comunes en los peces. Sin embargo, la flexibilidad de los peces de adoptar distintas tácticas en respuesta a las características de su entorno ha recibido poca atención. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la plasticidad fenotípica en la adopción del comportamiento dominante (“táctica burguesa”) en machos del blenio de río (*Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)). Con tal fin, se realizaron dos experimentos simultáneos en acuario para examinar el efecto de los factores sociales y de la abundancia de nidos en la adquisición de los caracteres sexuales secundarios (CSSs). Los experimentos se llevaron a cabo con machos pequeños (individuos sin CSSs), medianos (individuos de un año de edad) y grandes dominantes (de más de dos años de edad), todos ellos capturados en la naturaleza. En el experimento 1, los tres tamaños de macho fueron combinados para comparar el desarrollo en CSSs dependiendo del contexto intrasexual. En el experimento 2, el efecto de la abundancia de nidos (dos nidos vs. seis nidos) fue testado para cada tamaño de macho. Los machos medianos mostraron plasticidad fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales simuladas en los dos experimentos. La ausencia de machos grandes dominantes fue el factor principal que promovió el desarrollo de CSSs y la aparición del comportamiento parental. La limitación de nidos también influyó en el desarrollo de la

---

cresta cefálica en los machos medianos. Este conocimiento permite entender cómo la población del blenio de río consigue persistir cuando se ve reducida a individuos jóvenes durante las sequías estivales de los ríos mediterráneos.

**LA PRESENCIA DE LOS PADRES AFECTA AL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES EN *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), UN PEZ CON CUIDADO PARENTAL. N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). *Animal Biology* (Submitted).**

En los peces, la presencia de los padres mejora la supervivencia de los embriones a través del cuidado parental pero también está asociado a algunas desventajas como por ejemplo el canibalismo filial y la pérdida de condición física del macho. La cría en cautividad del blenio de río *Salaria fluviatilis* podría mejorarse si estas desventajas se evitaran sustituyendo los beneficios del cuidado parental artificialmente en el laboratorio. Antes de aceptar este procedimiento, debería estudiarse si el desarrollo de los embriones no es dependiente de algún otro efecto desconocido relacionado con la presencia de los padres. En el presente estudio se compararon la secuencia ontogénica y algunas estructuras morfológicas (longitud estándar, altura de la cabeza, longitud de la mandíbula y volumen del saco vitelino) de embriones mantenidos en presencia y en ausencia de los padres. En el tratamiento ausencia de los padres se obtuvieron embriones bien desarrollados, pero se encontró un tamaño menor de saco vitelino y un tamaño mayor de altura de la cabeza y de longitud de la mandíbula respecto al tratamiento presencia de los padres en el día 11 después de la ovoposición.

**LA OSADÍA SE RELACIONA CON EL DESARROLLO DE LA CRESTA CEFÁLICA EN EL MACHO DEL BLENIO DE RÍO *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801). N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). *Current Zoology* 60(3): 373-380.**

Se define la osadía como la tendencia de un individuo a correr riesgos cuando está expuesto a objetos o situaciones nuevas. El objetivo principal de este trabajo fue dilucidar si la osadía estaba relacionada con el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CSSs) en el macho del blenio de río *Salaria fluviatilis*, un pez de agua dulce que cuida de los huevos. Como segundo objetivo el efecto de los CSSs en la adopción del estatus parental también fue examinado. En noviembre del 2010 se capturaron peces silvestres jóvenes en el río Segre (Cuenca del Ebro). Los peces se mantuvieron en cinco acuarios en grupos de ocho machos y ocho hembras con nidos artificiales. El grado de osadía (score de *boldness* y *hesitancy*) de los machos (inicialmente con poco desarrollo en CSSs) se testó como el tiempo requerido para salir de un refugio cuando se les exponía a un nuevo ambiente. Los peces se mantuvieron en los mismos acuarios durante varios meses y el desarrollo en CSSs de los machos y su comportamiento reproductor fue monitorizado. El score de *boldness* se asoció negativamente al desarrollo en cresta cefálica. La *hesitancy* se relacionó negativamente con la longitud del macho y también estuvo influenciada por la interacción entre la longitud del macho y la cresta cefálica. La adquisición del estatus parental estuvo positivamente relacionada con la longitud del macho, marginalmente relacionada con el desarrollo de las glándulas anales y no relacionada con la cresta cefálica. Estos resultados sugieren que la cresta podría tener un papel intrasexual como característica informativa de la osadía (señal honesta) que no necesariamente sería escogida por las hembras. También se discute que la selección correlacional

---

podría ser responsable de la relación entre osadía y tasa de crecimiento en esta especie. La selección sexual, además de haber dirigido la evolución de los caracteres sexuales secundarios, podría haber favorecido algunos trazos de personalidad (por ejemplo la osadía) asociados con la adquisición de mayores longitudes corporales.

**APRENDIZAJE ESPACIAL BASADO EN MARCAS VISUALES EN EL BLENIO DE RÍO *Salaria fluviatilis* (ASSO, 1801). N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). Learning and Motivation (Submitted).**

El uso y aprendizaje de marcas visuales parece muy influenciado por la demanda ecológica y puede depender del hábitat, sexo y presumiblemente del estatus de dominancia en una especie. En blénidos, los sexos difieren en la extensión del home-range y esto podría predisponerlos a utilizar mecanismos distintos para orientarse. El principal objetivo de este estudio fue investigar si *Salaria fluviatilis* (un blenio de agua dulce bentónico y poligínico) es capaz de resolver un ejercicio de aprendizaje utilizando marcas visuales directas. Se comparó la realización entre sexos y se consideró la posible relación entre el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CSSs) del macho y la habilidad espacial. En esta especie los CSSs consisten en una cresta cefálica y un par de glándulas anales. Los peces se sometieron a 10 exámenes (cada uno constituido por 11 tests consecutivos) en un aparato experimental, diseñado expresamente, dónde tenían que encontrar la salida correcta usando marcas visuales directas. La proporción de machos que aprendieron el ejercicio (80%) fue más grande que el de hembras (30%). El desarrollo de la cresta cefálica del macho se asoció a una mayor rapidez en resolver el ejercicio espacial. Estos resultados dan soporte a trabajos

previos que afirman la importancia de la demanda ecológica a la hora de determinar las habilidades espaciales de las especies. También aportan una perspectiva comprensible que relaciona dominancia (a través del desarrollo de la cresta), aprendizaje y selección sexual.







# Informe de la directora





## INFORME DE LA DIRECTORA

Como directora de la tesis doctoral '**Comportamiento reproductor en el blenio de río (*Salaria fluviatilis*): aspectos relacionados con la estrategia reproductiva del macho**' realizada por **Noëlle Fabre Mitjans**, presento el siguiente informe sobre la contribución de la doctoranda en las publicaciones en coautoría que componen la tesis:

**SECCIÓN 1.1. N. Fabre, F. Oliva, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). Plasticity in secondary sexual characteristics in male freshwater blennies (*Salaria fluviatilis*). *Canadian Journal of Zoology* 92: 537-543.**

**Contribución de la doctoranda:** Participación en el diseño de los experimentos, captura de ejemplares en el río, mantenimiento de los acuarios, toma de datos, realización de los análisis, búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.

**Acerca de la revista:** *Canadian Journal of Zoology* tiene en la última edición disponible del *Journal Citation Reports* (JCR) correspondiente a 2013, un índice de impacto de 1.346. Esta revista se encuentra en el número 51 de 152 revistas (2º cuartil) en el área de la zoología.

**SECCIÓN 1.2. N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). Parents' presence affects embryos' development in *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), a fish with parental care. *Animal Biology* (Submitted).**

**Contribución de la doctoranda:** Concepción del trabajo, participación en el diseño de los experimentos, captura de ejemplares en el río, mantenimiento de los acuarios, toma de datos, realización de los análisis, búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.

---

**Acerca de la revista:** *Animal Biology* tiene en la última edición disponible del *Journal Citation Reports* (JCR) correspondiente a 2013, un índice de impacto de 0.614. Esta revista se encuentra en el número 121 de 152 revistas (4º cuartil) en el área de la zoología.

**SECCIÓN 2.1. N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). Boldness is related to the development of the cephalic crest in the male of the river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801). *Current Zoology* 60(3): 373-380.**

**Contribución de la doctoranda:** Concepción del trabajo, participación en el diseño de los experimentos, captura de ejemplares en el río, mantenimiento de los acuarios, construcción de estructuras experimentales, toma de datos, realización de los análisis, búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.

**Acerca de la revista:** *Current Zoology* tiene en la última edición disponible del *Journal Citation Reports* (JCR) correspondiente a 2013, un índice de impacto de 1.814. Esta revista se encuentra en el número 34 de 152 revistas (1º cuartil) en el área de la zoología. El artículo se publicó en un número especial dedicado a personalidad animal (*Animal Personality: Ecology, Behaviour, and Evolution*).

**SECCIÓN 2.2. N. Fabre, E. García-Galea y D. Vinyoles (2014). Spatial learning based in visual landmarks in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801). *Learning and Motivation* (Submitted)**

**Contribución de la doctoranda:** Concepción del trabajo, participación en el diseño de los experimentos, captura de ejemplares en el río, mantenimiento de los acuarios, construcción

de estructuras experimentales, toma de datos, realización de los análisis, búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.

**Acerca de la revista:** *Learning and Motivation* tiene en la última edición disponible del *Journal Citation Reports (JCR)* correspondiente a 2014, un índice de impacto de 1.145.

De la misma manera se informa que ninguno de los coautores participantes en los artículos que componen esta tesis ha utilizado, implícitamente o explícitamente, estos trabajos para la elaboración de su propia tesis doctoral.

Barcelona, a 7 de Julio de 2014

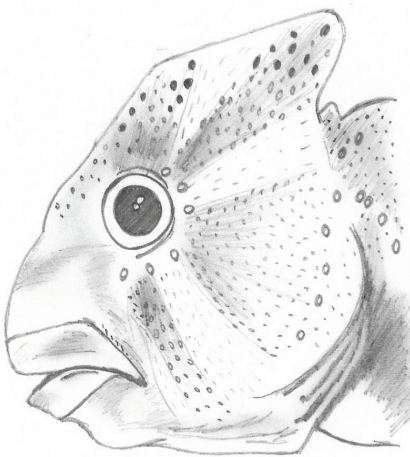
Dra. Dolors Vinyoles Cartanyà

Departamento de Biología Animal

Facultad de Biología (UB)



# Discusión general







## DISCUSIÓN GENERAL

### **Importancia de conservar los peces de agua dulce; acciones *in situ* y *ex situ***

La biodiversidad tiene un inestimable valor: consuntivo, productivo, ecológico, científico-educativo, cultural, estético y ético-moral (Lindenmayer & Burgman, 2005). A parte de esto, cada vez está cobrando más fuerza la importancia de su valor evolutivo, el cual, confiere potencial adaptativo a las especies y permite que sobrevivan a los cambios ambientales (Carroll & Fox, 2008). La biodiversidad de los ecosistemas de agua dulce, concretamente, destaca por su valor productivo (fuente de alimento), genético (resultado de un largo proceso de evolución) y ecológico (asimilación de residuos) (Pearce, 1998; Heal, 2000; Covich et al., 2004). Los peces que habitan en ríos y lagos juegan un papel importante como especies clave en la cadena trófica (Willson & Halupka, 1995), como indicadores de la calidad ecológica (IBI, índices de integridad biótica; Karr, 1981, 1987), y como agentes capaces de controlar la proliferación de insectos (Hanski et al., 1994). Sin embargo, la sociedad todavía está poco sensibilizada en la importancia que tiene conservar estos animales y sus ecosistemas (Abell, 2002; Dudgeon, 2003), amenazados por la creciente sobreexplotación, contaminación, degradación del hábitat, modificaciones del régimen fluvial e introducción de especies invasoras (Dudgeon et al., 2006; Geist 2011).

En el año 1992, en la Cumbre de la Tierra de Río de Janeiro, numerosos países firmaron el Convenio sobre la Diversidad Biológica, dónde se reconocía el valor presente y futuro de la biodiversidad, su reducción a nivel mundial y la necesidad de preservarla. Dichos países se comprometían a desarrollar estrategias nacionales y

---

planes de acción para conservar la biodiversidad, entre los que se distinguen acciones de conservación del tipo *in situ* y *ex situ*.

La conservación *in situ* engloba acciones como: la selección, establecimiento y gestión de áreas naturales protegidas, la protección y rehabilitación de ecosistemas, la promoción del desarrollo sostenible, la prevención de factores de riesgo (p.e., introducción de especies invasoras) y el desarrollo de leyes que contemplen la protección de especies y poblaciones amenazadas. Otras acciones que también se consideran conservación *in situ* son las translocaciones de individuos silvestres de una zona a otra. Son importantes a la hora de evitar la extinción de las poblaciones expuestas a un peligro en su área original, de vigorizar una población residente con nuevos individuos (sobre todo si es pequeña y tiene riesgo de endogamia) o de repartir ejemplares que sólo se encuentran en un área concreta a varios lugares para disminuir sus probabilidades de extinguirse. En peces de agua dulce existen numerosos ejemplos de programas *in situ* relacionados con la restauración de los hábitats que han obtenido buenos resultados. En Inglaterra, por ejemplo, la restauración del río Clyde ha permitido la recuperación de las comunidades de peces y el retorno del salmón (*Salmo salar*) tras 100 años de ausencia (Maitland, 1987). De forma similar, en Suecia, el aspirado del exceso de sedimento en el lago Trummen permitió recuperar la calidad del agua y restablecer la comunidad de peces (Andersson et al., 1975). Algunos ejemplos de translocación de peces de una localidad a otra y consejos para llevar a cabo dichas acciones se pueden encontrar en Poly (2003) y en George et al. (2009). Aunque los programas de conservación *in situ* ofrecen muchas ventajas, a veces también tienen sus limitaciones (Lindenmayer & Franklin, 2002) y necesitan complementarse con programas de conservación *ex situ*.

Los programas *ex situ*, implican la cría en cautividad y la criopreservación de embriones (Rall, 1993; Carolsfeld et al., 2003) que tienen como fin mantener poblaciones viables para poder reintroducirlas bajo condiciones apropiadas. Su aplicación se recomienda sólo cuando la viabilidad de la especie a gestionar no es posible en la naturaleza y se tienen elevados conocimientos de su biología, ya que estas técnicas tienen asociados numerosos problemas (Snyder et al., 1996). La principal preocupación se basa en que el entorno artificial (muy distinto al natural) puede tener efectos nocivos sobre los animales; promoviendo la selección de determinadas características indeseables (Price, 1999; Frankham, 2008) o favoreciendo que los ejemplares pierdan comportamientos importantes para la supervivencia en libertad (Markowitz, 1982). En truchas, por ejemplo, se ha visto que el efecto de la domesticación reduce la capacidad reproductiva en un 40% por cada generación mantenida en cautividad cuando los peces son liberados en la naturaleza (Araki et al., 2007). Muchos programas de reintroducción sólo mantienen una generación en cautividad antes de reintroducir los animales para minimizar estos efectos nocivos (Perrin, 1988). Sin embargo, en *S. salar*, incluso una generación mantenida en estas condiciones puede perjudicar la diversidad genotípica y reducir la resistencia a enfermedades y la capacidad de nadar en aguas abiertas (Blanchet et al., 2008). Pese a todo, en algunas circunstancias, la cría en cautividad y la reintroducción han sido positivas para algunas especies de peces (Rakes et al., 1999; Shute et al., 2005) y no debe descartarse su potencialidad.

Los planes de recuperación son instrumentos técnico-administrativos que sirven de guía para definir aquellas acciones necesarias para restaurar una especie hasta que pueda ser viable por sí misma en el ecosistema e incluyen toda una serie de

---

propuestas de acciones de conservación *in situ* y *ex situ* (Carrillo, 1989). En España los primeros planes de recuperación aparecen en la década de los ochenta y en la actualidad sólo dos están dedicados a especies de peces de agua dulce: el fartet (*Aphanius iberus*) y el samaruc (*Valencia hispanica*). Uno de los factores esenciales para el diseño de los programas tanto *in situ* como *ex situ* dirigidos a proteger especies animales es tener en cuenta el sistema de reproducción (Greene et al., 1998) y el sistema de apareamiento (Garnier et al., 2001). En la conservación de los peces es de especial interés estudiar la competencia intrasexual, el sistema de elección de pareja, los sistemas de apareamiento (Rowe & Hutchings, 2003) y el comportamiento reproductivo (Helfman, 1999; Sousa-Santos et al., 2014). Los resultados obtenidos en la presente tesis pueden ayudar a comprender mejor ciertos aspectos del comportamiento de *S. fluviatilis* que pueden tener aplicación en su conservación.

### **Papel de las tácticas reproductivas alternativas (ARTs) en la conservación de *S. fluviatilis***

La primera investigación de este trabajo sugiere, junto a otras observaciones de campo realizadas para *S. fluviatilis* (Quirós & Vinyoles, unpublished data), que los machos jóvenes son capaces de suplir la función de los machos parentales cuando estos desaparecen de la población (lo que en la naturaleza ocurre en periodos de reproducción marcados por sequías severas). Esto explicaría la supervivencia de las poblaciones de *S. fluviatilis* en tramos de ríos mediterráneos sometidos a condiciones ambientales extremas, ya que la desaparición de las cohortes de machos adultos en este tipo de ríos es un fenómeno frecuente (Vinyoles & Sostoa, 2007). Estos machos grandes podrían tener una tasa de mortalidad más elevada que los individuos

pequeños debido a una reducción de su resistencia inmunológica por desgaste reproductivo (Zuk & Stoehr, 2001; Hanssen et al., 2005), a una mayor sensibilidad al estrés ambiental (Harvey & Stewart, 1991) o a una mayor sensibilidad a la escasez de recursos tróficos (Gonçalves & Almada, 1997).

Apenas se conoce cómo los impactos antropogénicos pueden afectar a las ARTs. Para algunas especies de peces como *S. salar*, el blanquillo camello (*Lopholatilus chamaeleonticeps*) y el pez sol (*Lepomis sp.*), se ha visto que desequilibrar las frecuencias de dichas tácticas puede alterar negativamente a la dinámica de las poblaciones (Vincent & Sadovy, 1998). En *S. fluviatilis* la presencia de machos jóvenes en la población podría ser decisiva en términos reproductivos ya que, como hemos visto, son capaces de substituir a los machos parentales cuando estos desaparecen y dado que también tendrían su importancia cuando actúan como machos parásitos (*sneakers*). La presencia de éstos reduce tanto la probabilidad de incompatibilidades genéticas, que se pueden producir cuando sólo interviene un macho en la fecundación (Smith & Reichard, 2005), como la infertilidad debida a limitación de esperma (ya que aumentan la cantidad de esperma total en el ambiente) (Parker, 1998). Nótese el éxito de la táctica parásita a la hora de conseguir fecundaciones, en blénidos marinos se ha observado que la contribución genética de los machos dominantes (burgueses) a la descendencia del nido custodiado se acerca sólo al 60% y que en casi un 83% de los casos dichos nidos presentan fertilizaciones llevadas a cabo por otros machos (Mackiewicz et al., 2005). Las ventajas de la participación de los machos parásitos en la fecundación afectarían al comportamiento de las hembras, ya que en varias especies de peces (entre ellos también algunos blénidos), se ha descrito que éstas prefieren aparearse con machos parentales que tienen asociados machos parásitos (Fu et al.,

---

2001; Oliveira et al., 2002; Watters, 2005). Por otra parte, la presencia de machos parásitos también afecta al comportamiento de los propios machos parentales que pueden reducir la intensidad de cortejo (Le Comber et al., 2003), el esfuerzo de defensa (Rios-Cardenas & Webster, 2005) y las tareas de mantenimiento del nido (Willmott & Foster, 1995) y, por el contrario aumentar la tasa de canibalismo filial (Manica, 2004). En especies de peces (lábridos) como el tordo (*Symphodus ocellatus*) la extrema incursión de machos parásitos puede provocar que los machos parentales incluso rechacen el apareamiento con las hembras (Alonzo & Warner, 1999). Todos estos ejemplos (que podemos encontrar en Reichard et al., 2007) ilustran las complejas interacciones entre las ARTs y sus efectos en la dinámica de la reproducción.

El cambio climático también podría afectar a las ARTs. Algunos autores han descrito que puede provocar cambios evolutivos en los comportamientos de cortejo (Møller, 2010), en la duración del periodo de reproducción (Møller et al., 2010), en la intensidad de la selección sexual (Møller & Szép, 2005) y en el comportamiento infanticida (Møller, 2011). En zonas del planeta sometidas a estrés hidrológico y aumento de temperatura (como es el caso de los ríos en las zonas de climatología mediterránea), el cambio climático podría afectar en profundidad la reproducción de los peces. El aumento de la temperatura podría conllevar un desequilibrio en la proporción de sexos (ya que en muchos peces la asignación del sexo depende de la temperatura) (Ospina-Alvarez & Piferrer, 2008), afectar el crecimiento y desarrollo, e inhibir los comportamientos normales (McCullough, 1999; Materna, 2001). El aumento de las sequías, entre otros, es probable que produzca cambios en la estructura de edades (como ya se ha comentado anteriormente), afecte la competencia entre conspecíficos, incremente la fragmentación de las poblaciones y conduzca a cuellos de

botella (Matthews & Marsh-Matthews, 2003). Cabe citar que en la Península Ibérica ya se ha detectado una reducción en los regímenes fluviales (Lorenzo-Lacruz et al., 2012), exagerando las ya difíciles condiciones producidas por las sequías estivales naturales de las zonas mediterráneas (Vicente-Serrano & Cuadrat-Prats, 2007).

Por otra parte, en peces, la adopción de las ARTs podría verse alterada por la presencia de moléculas complejas en el agua capaces de actuar como disruptores endocrinos. En ríos sometidos al efecto de la contaminación (urbana e industrial) se han identificado numerosos compuestos químicos capaces de afectar el estado de salud de los peces. A pesar de la depuración de las aguas residuales llevada a cabo por las EDARs (Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales) muchos de estos compuestos (p.e., los detergentes alquilfenoles -APEs- y el etinilestradiol o píldora anticonceptiva-EE2-) son retornados a los ríos en una forma aún más activa que los compuestos de entrada (Solé et al., 2000, 2003). Estos compuestos pueden actuar como disruptores endocrinos. Los disruptores endocrinos son moléculas sintéticas análogas a las hormonas sexuales de fabricación endógena (p.e., los estrógenos, como el estradiol). Existe una amplia bibliografía sobre su efecto en peces de agua dulce. En el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*), por ejemplo, se ha visto que la exposición a estas sustancias reduce su respuesta agresiva hacia otros machos, lo cual puede tener consecuencias negativas en el establecimiento de territorio y en el éxito reproductivo (Bell, 2001). En el guppy (*Poecilia reticulata*) afecta la intensidad y velocidad de la exhibición sexual (Bayley et al., 1999). En la gambusia (*Gambusia affinis*) produce la masculinización de las hembras y, en los machos, una precocidad en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CSSs) (Howell et al., 1980; Bortone et al., 1989). A menudo, las alteraciones producidas por los disruptores endocrinos se asocian a la interferencia en

---

la producción de la 11-Ketotestosterona (11-KT), una hormona que en peces determina la aparición de ciertos comportamientos reproductivos del macho (como la territorialidad, la construcción del nido o el cortejo) y el desarrollo de los CSS (Oliveira et al., 1999a). Es lo que parece ocurrir en el pez cebra (*Danio rerio*), dónde la alteración de esta hormona disminuye el éxito reproductor de los machos dominantes (Coe et al., 2008). En blénidos, las distintas ARTs se diferencian por tener distintos niveles de 11-ketotestosterona (Oliveira et al., 2001) y esto las haría potencialmente sensibles a la contaminación por disruptores. A parte, debería dilucidarse, en futuros estudios, el efecto de la contaminación química sobre la selección sexual y cómo ésta puede modificar el papel de la señalización (tanto a nivel de la competencia intrasexual masculina como a nivel de la selección intersexual). Se ha visto, por ejemplo, que los machos de *G. aculeatus* de mala condición física pueden beneficiarse de una disminución de la visibilidad en aguas contaminadas, dado que en estas circunstancias, se reduce la competencia intrasexual y pueden incrementar la intensidad de cortejo, el cual deja de ser un buen indicador de calidad para las hembras (Wong et al., 2007).

El conocimiento sobre el funcionamiento de las ARTs en *S. fluviatilis* también podría ser aplicado a programas de conservación *ex situ*. En especies de peces con ARTs, cuando las distintas tácticas están presentes en la población, aumenta la variabilidad genética de la descendencia (Watson, 1991; Rowe & Hutchings, 2003). Esto es así porque la poliandria (en la que múltiples padres fecundan las puestas) se asocia a una menor tasa de consanguinidad y a una mayor diversidad de genes (Barbosa & Magurran, 2006). Así, pues, dado que una de las principales preocupaciones de la cría en cautividad es el mantenimiento de la diversidad genética se recomendaría mantener la variedad de edades y de tamaños en los acuarios de cría



para permitir la presencia de las ARTs. Sin embargo, se necesitarían realizar estudios previos para conocer el sistema de apareamiento de *S. fluviatilis*. Se ha descrito que los blénidos, en general, son poligínicos y promiscuos (Mackiewicz et al., 2005). Sin embargo, en especies en las que el macho tiene cuidado parental de las puestas, suele combinarse la monopolización de recursos de la poliginia (desde el punto de vista del macho) y la poliandria secuencial (es decir, la hembra se aparea con varios machos en diferentes momentos del período de reproducción). En los nidos de *S. fluviatilis* es habitual encontrar puestas formadas por grupos de huevos en distintos estadios de desarrollo, lo cual indica que la misma -o distintas hembras- han estado involucradas en la ovoposición con un macho dominante (Côté et al., 1999). Aunque publicaciones previas sugieren que la especie presenta un sistema de apareamiento poligínico (Lengkeek & Didderen, 2006), en el que un macho atrae a varias hembras para que realicen una o más puestas en su nido, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio genético de paternidad de las puestas que avale si realmente esto es así. Futuros trabajos deberían profundizar en este aspecto.

### **Personalidad animal y aprendizaje en conservación**

Otro punto que hemos querido abordar en la presente tesis es la relación entre personalidad, desarrollo (en CSSs) y crecimiento en *S. fluviatilis*. La variabilidad de la personalidad está estrechamente ligada a la variabilidad genética (Frankham et al., 2002; King et al., 2012) y ésta, a su vez, como se viene comentando, es esencial para permitir adaptarse a los cambios ambientales y reduce la probabilidad de extinción (Frankham, 1995). El comportamiento óptimo depende del contexto (Dingemanse et al., 2004; Dingemanse & Réale, 2005; Sinn et al., 2006). Puede ser distinto en función

---

de la frecuencia de otras estrategias en la población (como por ejemplo, la táctica parásita depende de la presencia de machos parentales) o bien de variables de estado de los individuos, como la tasa de crecimiento, tamaño, habilidades y experiencia (Bell, 2007; Stamps, 2007; Biro & Stamps, 2008; Wolf & Weissing, 2010). Así pues, cuanto más variabilidad en personalidades exista en una población más probabilidades de que algunos individuos tengan el comportamiento óptimo ante unas circunstancias determinadas y puedan sobrevivir.

Todo ello nos lleva a pensar que los programas de conservación *in situ* deberían centrarse en estudiar cómo los diferentes temperamentos de osadía-timidez benefician a los peces en distintos escenarios y qué factores mantienen la variabilidad de la personalidad. Estos factores todavía son bastante desconocidos pero se empiezan a distinguir algunos como la depredación (Dingemanse et al., 2007), la competencia por los recursos (Dingemanse et al., 2004), el factor social (Cote et al., 2008) y el grado de parasitación (Barber & Dingemanse, 2010). Los impactos antropogénicos en la naturaleza amenazan con cambiar las presiones selectivas que se producen sobre las distintas personalidades y esto conllevaría a una reducción en la variabilidad de comportamientos (revisión en Carere & Maestripieri, 2013). Por ejemplo, ante la fragmentación del hábitat los individuos con personalidades asociadas a menor dispersión podrían tener menos probabilidades de sobrevivir (Fraser et al., 2001), la contaminación podría afectar más a los animales con personalidades tímidas ya que en general son más sensibles al estrés y esto afecta a su sistema inmunológico (Sapolsky, 1990) y los animales más atrevidos podrían ser capturados con más facilidad (Biro & Post, 2008). Perder un rasgo de personalidad implicaría la pérdida de genes (y características) que en otro contexto podrían ser favorables.

Por otra parte, los programas de conservación *ex situ* son los que más podrían beneficiarse de los estudios sobre personalidad animal. En cautividad se pueden generar nuevas presiones selectivas o bien se puede relajar la selección natural, lo cual puede favorecer la rápida evolución de características físicas y de comportamiento diferentes a las de las poblaciones silvestres (Carlstead, 1996; Woodworth et al., 2002). Por ejemplo, en *S. salar* criados en cautividad se ha observado la aparición de una agresividad exagerada frente a conspecíficos y frente a otros peces (Blanchet et al., 2008). En el godeido *Skiffia multipunctata* se ha descrito que los ejemplares criados en cautividad presentan mayor tiempo de cortejo, agresividad y curiosidad frente a un depredador que los que se mantienen en condiciones seminaturales (Kelley et al., 2005). Las reintroducciones pueden beneficiarse mucho del estudio de la personalidad animal; algunos estudios han mostrado que conocer la personalidad de los animales antes de reintroducirlos ayuda a prever su éxito de supervivencia (Heezik et al., 1999; Munkwitz et al., 2005), otros sugieren que cada fase de la reintroducción podría tener en cuenta el temperamento (liberar primero a los individuos osados y luego a los tímidos) (McDougall et al., 2006) y por último, los hay que muestran que reintroducir individuos con variabilidad de personalidades puede ayudar a la especie a adaptarse a un hábitat heterogéneo (Höjesjö et al., 2002). Pese a estos hallazgos, todavía queda mucho por hacer en este campo y es preciso disponer de mucha más información para tomar decisiones correctas.

Los resultados vistos en esta tesis sugieren que los machos más atrevidos desarrollan más la cresta y crecen más que los cobardes, lo cual favorecería que se volvieran dominantes. Este conocimiento podría tener aplicaciones en el mantenimiento de los peces en cautividad; si la osadía nos da pistas de qué peces

---

pueden ser más dominantes y agresivos (p.e., Tulley & Huntingford, 1988), esto puede ser útil a la hora de confinar ciertos individuos en espacios pequeños o de evitar acumular muchos peces agresivos juntos. El estrés y las heridas físicas ocasionados por las agresiones propias de las condiciones de confinamiento son negativos para los peces (Ashley, 2007). También permitiría hacer una previsión sobre el número de machos dominantes que se podrían presentar dadas unas condiciones de estabulación determinadas (p.e., con nidos y hembras disponibles).

Estudiar la habilidad espacial también nos puede ayudar a entender cómo sobreviven los peces en los ambientes naturales (Dodson, 1988). Uno de los ejemplos más sorprendentes de este hecho lo tenemos en el góbido *Bathygobius soporator* que, para escapar de los depredadores durante la marea baja, es capaz de saltar exactamente en el charco contiguo si previamente ha tenido la oportunidad de explorar la zona durante la marea alta (Aronson, 1971). La presente tesis supone una primera aproximación al uso de marcas visuales por parte de *S. fluviatilis*, una especie bentónica clasificada por Balon (1975) como un pez espeleófilo (que nidifica en cavidades u oquedades naturales). El uso, como nido, de una piedra de determinadas características y tamaño (ver Freeman et al., 1990), posiblemente vaya ligado a la capacidad de adquirir un buen conocimiento topográfico del territorio, como ya fue sugerido por Wickler (1957a). Por otra parte, las hembras de *S. fluviatilis*, como ha sido descrito para otras especies de blénidos (Kraak, 1996; Fagundes et al., 2007), es muy probable que visiten varios nidos antes de aparearse con un macho (lo que también conllevaría una cierta habilidad de orientación en el espacio). Partiendo de los resultados obtenidos, los machos de *S. fluviatilis* tienden a utilizar más las marcas visuales que las hembras. La relación positiva entre el desarrollo de la cresta cefálica

del macho y la rapidez de aprendizaje espacial conecta, además, con los resultados obtenidos en el trabajo sobre personalidad del macho. Al parecer un mayor grado de osadía, una mayor capacidad de aprendizaje y una mayor dominancia (ésta expresada como el grado de desarrollo de la cresta) serían características que podrían ir unidas en esta especie. Esto supone una síntesis interesante, ya que hasta el momento sólo se habían hecho relaciones dos a dos de estos rasgos de comportamiento: aprendizaje con dominancia (Zhuikov, 1993), osadía con dominancia (Sundström et al., 2004) y aprendizaje con osadía (Dugatkin & Alfieri, 2003). Así pues, en *S. fluviatilis*, el grado de desarrollo de la cresta cefálica se presentaría como una señal idónea (característica física informativa) del perfil de comportamiento del macho y que, posiblemente, tendría gran importancia en la selección intrasexual. Este resultado también se relaciona con la primera investigación (efecto del factor social y de la densidad de nidos sobre el desarrollo CSSs). En los acuarios dónde sólo había machos medianos y dónde tuvieron mayor competencia intrasexual (factor nido limitante) se observó un gran desarrollo de la cresta cefálica. Es probable que los machos que consiguieron monopolizar el recurso fuesen los más valientes, los más dominantes (con mayor cresta) y los más hábiles en reconocer marcas visuales. Todas estas aptitudes les serían adecuadas para escoger, defender y mantener el nido.

En los programas *ex situ* se debería tener en cuenta que la capacidad de aprender puede ser utilizada para facilitar las reintroducciones. Si *S. fluviatilis* es capaz de aprender, podrían serle aplicadas ciertas condiciones y dinámicas de confinamiento para mantener el comportamiento lo más parecido al de los peces silvestres. Aplicar técnicas de enriquecimiento puede incrementar las probabilidades de sobrevivir en los peces reintroducidos (Sheenaja, 2011). En mamíferos y en pájaros se ha visto que los

---

ambientes complejos estimulan el desarrollo cognitivo y la flexibilidad de comportamiento (p.e., Rabin, 2003). Ello explica porqué los zoológicos cada vez estén apostando más por ofrecer diferentes tipos de enriquecimiento a sus animales (Shepherdson, 2001). Recientemente, también se está viendo que el enriquecimiento espacial del lugar de cría favorece la adaptabilidad del comportamiento de los peces (Salvanes et al., 2007), estimula la exploración de zonas nuevas, la interacción con presa viva, la sofisticación de las interacciones sociales y la recuperación más rápida tras el ataque simulado de un depredador (Braithwaite & Salvanes, 2005). A parte, la inclusión de ciertas dinámicas también puede ayudar a los peces a estar más preparados a la vida en la naturaleza (Brown & Laland, 2001).

### **Cría en cautividad de *S. fluviatilis***

Un último aspecto abarcado por la tesis ha sido la cría en cautividad. Este tipo de actividad necesita un profundo conocimiento del comportamiento asociado a las interacciones entre machos y hembras para que puedan darse apareamientos exitosos. Sin embargo, en especies con cuidado parental, esta necesidad se extiende a entender también las interacciones entre el progenitor cuidador y los huevos. Originalmente, el cuidado parental de los huevos aparece en especies territoriales que forman parejas durante la reproducción (Ah-king et al., 2005) y evolucionó por la necesidad de hacer sobrevivir la descendencia en condiciones difíciles (Clutton-Brock, 1991). Aproximadamente 90 de las 420 familias de teleósteos que existen incluyen especies que defienden o manipulan sus huevos o juveniles a modo de cuidado parental (Helfman et al., 1997), siendo la mayoría de agua dulce y con más prevalencia de machos cuidadores que de hembras (Blumer, 1982). Inicialmente los beneficios del

cuidado parental a la descendencia debían ser mínimos y seguramente se limitaban a proteger los huevos frente a la depredación (Klug et al., 2005). Este tipo de cuidado parental está ampliamente extendido en peces y lo podemos ver en especies como el cavilat (*Cottus gobio*) (Marconato & Bisazza, 1988) y en *Etheostoma crossopterum* (Knouft & Page, 2004). En otras especies el cuidado parental ha evolucionado en complejidad y ha ido incluyendo otros comportamientos que incrementaban la supervivencia de los huevos, como por ejemplo, la ventilación y construcción de nidos bien oxigenados (Zoran & Ward, 1983; Östlund & Ahnesjo, 1998; Hale et al., 2003), o bien, los que se podrían considerar los más especializados consistentes en controlar la aparición de enfermedades, ya por extracción directa de los huevos infectados (Payne et al., 2004) o mediante la secreción de sustancias protectoras (Little et al., 2008; Pizzolon et al., 2010). Se ha visto que, mientras que en condiciones desfavorables incrementa el cuidado parental (Jones & Reynolds, 1999) en condiciones favorables éste decrece considerablemente (St Mary et al., 2001). Esta circunstancia motivó a nuestro equipo a plantearse si en condiciones controladas de laboratorio era posible sustituir los beneficios del cuidado parental, o por el contrario, no era posible dada la existencia de algún mecanismo todavía desconocido que supusiera un efecto beneficioso de la presencia de los padres.

La cría en cautividad de *S. fluviatilis* en la Península Ibérica se ha realizado en condiciones semiintensivas (en balsas), obteniéndose buenos resultados en La Alfranca, Caspe y Matarraña (Proyecto LIFE04 NAT/ES/000033; Conservación de *Margaritifera auricularia* en Aragón). La cría en laboratorio (cría intensiva) ha resultado más difícil y fue llevada a cabo por el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología gracias a un convenio entre de la Universidad de Barcelona y el

---

Gobierno de Aragón dentro del mismo proyecto. No es hasta la publicación de Gil et al. (2010) que se establece una metodología sólida para su obtención en laboratorio (a pesar de que la mortalidad de larvas seguía siendo muy elevada). Nuestros hallazgos no aportan directamente un mayor número de embriones pero desvelan que la presencia del macho podría ser esencial para su correcto desarrollo y que tal vez, podría intervenir en la asignación del sexo de la descendencia. En algunos peces los factores ambientales juegan un papel importante en la determinación sexual de los embriones (Devlin & Nagahama, 2002), pero en blénidos, poco se sabe acerca de estos mecanismos y más estudios deberían profundizar esta cuestión. De momento, sería aconsejable mantener ambos progenitores con sus puestas en los programas *ex situ*, por lo menos hasta que no se pueda demostrar que el papel primordial sobre las puestas lo ejerce el macho. Otras recomendaciones que se podrían extraer de la experiencia adquirida son: 1) la necesidad de mantener al macho con varias hembras simulando las condiciones naturales (Neat et al., 2003), ya que su ausencia incrementa el canibalismo (Kvanermo et al., 1998) y es lo que parece haberse producido en nuestro caso, 2) Se podrían separar a los embriones en los últimos días de desarrollo y a partir de entonces tenerlos en un acuario aparte para evitar pérdidas por canibalismo filial o de larvas recién nacidas, 3) Sería interesante averiguar si la presencia de los padres puede realmente influir en la determinación del sexo. Esto podría incluso ser planteado como alternativa para obtener más individuos del sexo que interese en una situación determinada, 4) Estudiar la viabilidad de las larvas mantenidas sin los progenitores y 5) Dado a que la mayor parte de la variabilidad obtenida entre embriones se debió a la pareja progenitora, es preciso estudiar mejor



los efectos maternos y paternos para obtener larvas de buena calidad y más aptas para la supervivencia en los ambientes naturales.

Como hemos intentado justificar a lo largo de toda la tesis, el estudio del comportamiento puede ser una pieza clave para entender y gestionar mejor las poblaciones de *S.fluviatilis* (tanto en las acciones *in situ* como *ex situ*). Entender mejor la flexibilidad de las ARTs, las diferencias en personalidad entre individuos, la capacidad de aprendizaje en un entorno complejo y los efectos del cuidado parental permiten predecir la capacidad de adaptación al medio y la posible respuesta frente a los cambios extremos que están sufriendo los ecosistemas naturales en las últimas décadas. Los hallazgos aquí descritos permiten trazar algunas directrices útiles, pero se requieren estudios de campo que completen las observaciones y una visión integrada que considere otros aspectos como la genética, fisiología y ecología para una gestión coherente y responsable.





# Conclusiones





## CONCLUSIONES

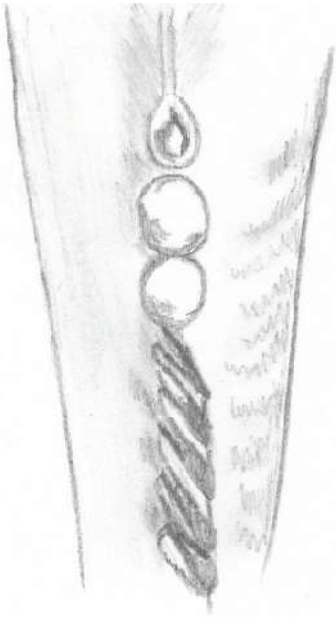
- 1) El macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*) muestra ser fenotípicamente plástico en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (CCSs) y en la consiguiente adopción del estatus dominante (de macho parental) dependiendo de factores ambientales como:
  - a) El contexto social intrasexual: la ausencia de machos dominantes (de mayor longitud) promueve tanto desarrollo de los CCSs como el inicio del comportamiento parental. Por lo contrario, la presencia de dichos machos dominantes inhibe la expresión de los CCSs y del comportamiento parental en machos más pequeños.
  - b) La abundancia de nidos: la escasez de nidos propicia el desarrollo de la cresta cefálica en machos que adoptan por primera vez la táctica parental.
- 2) La plasticidad del macho del blenio de río en el desarrollo de los CCSs y en la adopción del estatus parental se ve más favorecida por factores ambientales de tipo social, antes que por la abundancia de nidos.
- 3) Los machos más grandes (que provenían del campo con CSSs más o menos desarrollados) desarrollan de forma similar los CSSs y conservan el comportamiento dominante independientemente de los factores ambientales a los que se encuentran sometidos en los experimentos (es decir, del contexto social y de la abundancia de nidos).

- 
- 4) Los embriones de blenio de río elevados en presencia de los padres tienen una secuencia de desarrollo embrionario idéntica a la de embriones mantenidos en ausencia de los padres. Dicha secuencia coincide con la descrita por Gil et al. (2010).
  - 5) El volumen del saco vitelino en embriones elevados en presencia de los padres es mayor que el de embriones mantenidos en ausencia de ellos. Por lo contrario, los embriones mantenidos en ausencia de padres presentan una mayor altura de la cabeza y mayor longitud de la mandíbula.
  - 6) La mayor parte de la variabilidad en el desarrollo de los embriones viene explicada por el hecho de pertenecer a puestas distintas (parejas distintas) y muy poca se atribuye a la mera presencia o ausencia de los padres.
  - 7) Un menor tiempo en emerger el hocico fuera de la caja de *boldness* se relaciona con un mayor desarrollo de la cresta cefálica. Por su parte, la *hesitancy* de los peces (tiempo que tardan en salir completamente de la caja de *boldness*) se relaciona negativamente con la longitud total y positivamente con la interacción entre la longitud total y la cresta. Ello significa que los peces con menor tiempo de *hesitancy* crecen más y que el efecto de la longitud corporal sobre la *hesitancy* viene mitigada por el tamaño de la cresta.
  - 8) Los machos que consiguen puestas (parentales) son más grandes en longitud y presentan cierta tendencia a tener un mayor desarrollo glandular que los machos que no consiguen puestas. El tamaño de la cresta no influye sobre la adquisición o no del estatus parental.
  - 9) La mitad de los peces que realizaron el experimento de aprendizaje espacial basado en marcas visuales llegaron al nivel de adquisición. Una proporción significativamente mayor de machos aprende antes el ejercicio que las hembras.

- 10)** No se encuentran diferencias significativas en el tiempo medio de realización de los exámenes entre sexos ni entre peces que aprenden y no aprenden.
- 11)** Un mayor desarrollo de la cresta cefálica del macho se asocia a menor número de exámenes para llegar al criterio de adquisición.







# Bibliografía general





## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abell, R. (2002). Conservation biology for the biodiversity crisis: a freshwater follow-up. *Conservation Biology*, 16: 1435-1437.
- Ah-King, M., Kvarnemo, C. & Tullberg, B.S. (2005). The influence of territoriality and mating system on the evolution of male care: a phylogenetic study on fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 371-382.
- Alonzo, S.H. & Warner, R.R. (1999). A trade-off generated by sexual conflict: Mediterranean wrasse males refuse present mates to increase future success. *Behavioral Ecology*, 10: 105-111.
- Andersson, M. (1986). Evolution of condition-dependent sex ornaments and mating preferences: sexual selection based on viability differences. *Evolution*, 40: 804-816.
- Andersson, C., Berggren, H. & Hamrin, S. (1975). Lake Trummen restoration project. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 19: 1097-1106.
- Anthony, L.L. & Blumstein, D.T. (2000). Integrating behaviour into wildlife conservation: the multiple ways that behaviour can reduce Ne. *Biological Conservation*, 95: 303-315.
- Araki, H., Cooper, B. & Blouin, M.S. (2007). Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science*, 318: 100-103.
- Araujo, R., Bragado, D. & Ramos, M.A. (2001). Identification of the river blenny, *Salaria fluviatilis*, as a host to the glochidia of *Margaritifera auricularia*. *Journal of Molluscan Studies*, 67: 128-129.

- 
- Aronson, L.R. (1971). Further studies on orientation and jumping behavior in the gobiid fish, *Bathygobius soporator*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 188: 378-392.
- Ashley, P.J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104: 199-235.
- Bailey, K.M. (1984). Comparison of laboratory rates of predation of five species of marine fish larvae by three planktonic invertebrates: effects of larval size on vulnerability. *Marine Biology*, 79: 303-309.
- Balik, S. (1995). Freshwater fish in Anatolia, Turkey. *Biological Conservation*, 72: 213-223.
- Balon, E.K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32: 1663-1670.
- Barata, E.N., Serrano, R.M., Miranda, A., Nogueira, R., Hubbard, P.C. & Canário, A.V. (2008). Putative pheromones from the anal glands of male blennies attract females and enhance male reproductive success. *Animal Behaviour*, 75: 379-389.
- Barber, I. & Dingemanse, N.J. (2010). Parasitism and the evolutionary ecology of animal personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365: 4077-4088.
- Barbosa, M. & Magurran, A.E. (2006). Female mating decisions: maximizing fitness? *Journal of Fish Biology*, 68: 1636-1661.
- Barlow, G.W. (1991). Mating systems among cichlid fishes. En: Keenleyside, M.H.A. (ed.) *Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution*, pp. 173-190. Chapman and Hall, London, UK.

- Bayley, M., Nielsen, J.R. & Baatrup, E. (1999). Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 68-73.
- Beissinger, S.R. (1997). Integrating behavior into conservation biology: potentials and limitations. En: Clemmons, J.R. & Buchholz, R. (eds.) *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild*, pp. 23-47. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bell, A.M. (2001). Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, 62: 775-780.
- Bell, A.M. (2007). Evolutionary biology: animal personalities. *Nature*, 447: 539-540.
- Berglund, A., Bisazza, A. & Pilastro, A. (1996). Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 385-399.
- Bianco, P.G. (1995). Mediterranean endemic fresh-water fishes of Italy. *Biological Conservation*, 72: 159-170.
- Biro, P.A. & Post, J.R. (2008). Rapid depletion of genotypes with fast growth and bold personality traits from harvested fish populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 2919-2922.
- Biro, P.A. & Stamps, J.A. (2008). Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 361-368.
- Blanchet, S., Paez, D.J., Bernatchez, L. & Dodson, J.J. (2008). An integrated comparison of captive-bred and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*): Implications for supportive breeding programs. *Biological Conservation*, 141: 1989-1999.

- 
- Blumer, L.S. (1982). A bibliography and categorization of bony fishes exhibiting parental care. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 75: 1-22.
- Blumstein, D.T. (1998). Female preferences and effective population size. *Animal Conservation*, 1: 173-177.
- Blumstein, D.T. (2006). Ten things a behavioral biologist can do to help conservation. *Conservation Behaviorist*, 4: 2-3.
- Blumstein, D.T. & Fernández-Juricic, E. (2004). The emergence of conservation behavior. *Conservation Biology*, 18: 1175-1177.
- Bortone, S.A., Davis, W.P. & Bundrick, C.M. (1989). Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43: 370-377.
- Both, C. & Visser, M.E. (2001). Adjustment to climate change is constrained by arrival date in a long-distance migrant bird. *Nature*, 411: 296-298.
- Braithwaite, V.A. & Salvanes, A.G. (2005). Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272: 1107-1113.
- Brännäs, E. & Johnsson, J.I. (2008). Behaviour and welfare in farmed fish. En: Magnhagen, C., Braithwaite, V.A., Forsgren, E. & Kapoor, B.G. (eds.) *Fish Behaviour*, pp. 593–627. Science Publishers, Enfield, USA.
- Bremner-Harrison, S., Prodohl, P.A. & Elwood, R.W. (2004). Behavioural trait assessment as a release criterion: boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). *Animal Conservation*, 7: 313-320.

- Brock, J.A. & Bullis, R. (2001). Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture*, 197: 137-159.
- Brown, C. & Laland, K.N. (2001). Social learning and life skills training for hatchery reared fish. *Journal of Fish Biology*, 59: 471-493.
- Brown, C. & Laland, K.N. (2003). Social learning in fishes: a review. *Fish and Fisheries*, 4: 280-288.
- Brown, N.P., Bromage, N.R. & Shields, R.J. (1995). The effect of spawning temperature on egg viability in the Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). En: Goetz, F.W. & Thomas, P. (eds.) *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, p. 181. Austin, Texas, USA.
- Bruton, M.N. (1995). Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 43: 1-27.
- Burmeister, S.S., Jarvis, E.D. & Fernald, R.D. (2005). Rapid Behavioral and Genomic Responses to Social Opportunity. *Plos Biology*, 3: 1996-2004.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. & Sumpter, J.P. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.
- Carere, C. & Maestriperi, D. (2013). *Animal personalities: behavior, physiology, and evolution*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Carlstead, K. (1996). Effects of captivity on the behavior of wild mammals. En: Kleiman, D.G., Allen, M.E., Thompson, K.V. & Lumpkin, C.S. (eds.) *Wild mammals in captivity: principles and techniques*, pp. 317-333. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

- 
- Caro, T. (1999). The behaviour-conservation interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 366-369.
- Caro, T.M. & Durant, S.M. (1995). The importance of behavioral ecology for conservation biology: examples from Serengeti carnivores. En: Sinclair, A.R.E. & Arcese, P. (eds.) *Serengeti II: Dynamics, Management, and Conservation of an Ecosystem*, pp. 451-472. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho, E. & Harvey, B.J. (2003). Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63: 472-489.
- Carrillo, A.M. (1989). Planes de recuperación de especies. *Ecología*, 3: 23-42.
- Carroll, S.P. & Fox, C.W. (2008). *Conservation biology: evolution in action*. Oxford University Press, New York, USA.
- Changeux, T. & Pont, D. (1995). Current status of the riverine fishes of the French Mediterranean basin. *Biological Conservation*, 72: 137-158.
- Charmantier, A., McCleery, R.H., Cole, L.R., Perrins, C., Kruuk, L.E.B. & Sheldon, B.C. (2008). Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, 320: 800-803.
- Chivers, D. P. & Smith, R.J.F. (1994). Fathead minnows, *Pimephales promelas*, acquire predator recognition when alarm substance is associated with the sight of unfamiliar fish. *Animal Behaviour*, 48: 597-605.
- Clutton-Brock, T.H. (1991). *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Coe, T.S., Hamilton, P.B., Hodgson, D., Paull, G.C., Stevens, J.R., Sumner, K. & Tyler, C.R. (2008). An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting



- sexual selection in group-spawning fish. *Environmental Science & Technology*, 42: 5020-5025.
- Collares-Pereira, M.J., Cowx, I.G., Ribeiro, F., Rodrigues, J.A. & Rogado, L. (2000). Threats imposed by water resource development schemes on the conservation of endangered fish species in the Guadiana River Basin in Portugal. *Fisheries Management and Ecology*, 7: 167-178.
- Costa, S.S., Andrade, R., Carneiro, L.A., Gonçalves, E.J., Kotrschal, K. & Oliveira, R.F. (2011). Sex Differences in the Dorsolateral Telencephalon Correlate with Home Range Size in Blenniid Fish. *Brain, Behaviour and Evolution*, 77: 55-64.
- Cote, J., Dreiss, A. & Clobert, J. (2008). Social personality trait and fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 2851-2858.
- Côté, I.M., Vinyoles, D., Reynolds, J.D., Doadrio, I. & Perdices, A. (1999). Potential impacts of gravel extraction on Spanish populations of river blennies *Salaria fluviatilis* (Pisces, Blenniidae). *Biological Conservation*, 87: 359-367.
- Covich, A.P., Austen, M.C., Bärlocher, F., Chauvet, E., Cardinale, B.J., Biles, C.L., Inchausti, P., Dangles, O., Solan, M., Gessner, M.O., Statzner, B. & Moss, B. (2004). The role of biodiversity in the functioning of freshwater and marine benthic ecosystems. *BioScience*, 54: 767-775.
- Darwin, C.R. (1872). *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London, UK.
- De Fraipont, M., FitzGerald, G.J. & Guderley, H. (1993). Age-related differences in reproductive tactics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, 46: 961-968.

- 
- Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dingemanse, N.J. & Réale, D. (2005). Natural selection and animal personality. *Behaviour*, 142: 9-10.
- Dingemanse, N.J., Both, C., Drent, P.J. & Tinbergen, J.M. (2004). Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271: 847-852.
- Dingemanse, N.J., Wright, J., Kazem, A.J., Thomas, D.K., Hickling, R. & Dawnay, N. (2007). Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *Journal of Animal Ecology*, 76: 1128-1138.
- Doadrio, I. (2001). *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. CSIC Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España.
- Doadrio, I., Perea, S. & Yahyaoui, A. (2011). Análisis morfológico y molecular de los blenios de agua dulce: una nueva especie del género *Salaria* Forsskål, 1775 (Actinopterygii, Blennidae) en Marruecos. *Graellsia*, 67: 151-173.
- Dodson, J.J. (1988). The nature and role of learning in the orientation and migratory behavior of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 23: 161-182.
- Dudgeon, D. (2003). The contribution of scientific information to the conservation and management of freshwater biodiversity in tropical Asia. *Hydrobiologia*, 500: 295-314.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., PrieurRichard A.H., Soto, D., Stiassny, L.J. & Sullivan, C.A.

- (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81: 163-182.
- Dugatkin, L.A. & Alfieri, M.S. (2003). Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethology Ecology & Evolution*, 15: 43-49.
- Dzieweczynski, T.L. & Crovo, J.A. (2011). Shyness and boldness differences across contexts in juvenile three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* from an anadromous population. *Journal of Fish Biology*, 79: 776-788.
- Economidis, P.S. (1995). Endangered freshwater fishes of Greece. *Biological Conservation*, 72: 201-211.
- Elvira, B. (1995a). Conservation status of endemic freshwater fish in Spain. *Biological Conservation*, 72 : 129-136.
- Elvira, B. (1995b). Native and exotic freshwater fishes in Spanish river basins. *Freshwater Biology*, 33: 103-108.
- Fagundes, T., Gonçalves, D.M. & Oliveira, R.F. (2007). Female mate choice and mate search tactics in a sex role reversed population of the peacock blenny *Salaria pavo* (Risso, 1810). *Journal of Fish Biology*, 71: 77-89.
- Ferrito, V. & Tigano, C. (1996). Decline of *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) and *Salaria fluviatilis* (Blenniidae) populations in freshwater of eastern Sicily. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 7: 181-184.
- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29: 305-327.
- Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17: 325-333.
- Frankham, R., Briscoe, D.A. & Ballou, J.D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- 
- Fraser, D.F., Gilliam, J.F., Daley, M.J., Le, A.N. & Skalski, G.T. (2001). Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration. *The American Naturalist*, 158: 124-135.
- Freeman, M.C., Vinyoles, D., Grossman, G.D. & De Sostoa, A. (1990). Microhabitat use by *Blennius fluviatilis* in the Rio Matarrana, Spain. *Freshwater Biology*, 24: 335-345.
- Fu, P., Neff, B.D. & Gross, M.R. (2001). Tactic-specific success in sperm competition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268: 1105-1112.
- Garduño-Paz, M.V., Couderc, S. & Adams, C.E. (2010). Habitat complexity modulates phenotype expression through developmental plasticity in the threespine stickleback. *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 407-413.
- Garnier, J.N., Bruford, M.W. & Goossens, B. (2001). Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. *Molecular Ecology*, 10: 2031-2041.
- Geist, J. (2011). Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators*, 11: 1507-1516.
- George, A.L., Kuhajda, B.R., Williams, J.D., Cantrell, M.A., Rakes, P.L. & Shute, J.R. (2009). Guidelines for propagation and translocation for freshwater fish conservation. *Fisheries*, 34: 529-545.
- Giacomello, E. & Rasotto, M.B. (2005). Sexual dimorphism and male mating success in the tentacled blenny, *Parablennius tentacularis* (Teleostei: Blenniidae). *Marine Biology*, 147: 1221-1228.
- Gibbons, E.F., Jr, Durrant, B.S. & Demarest, J. (1995). *Conservation of Endangered Species in Captivity*. State University of New York Press, New York, USA.

- Gil, F., Faria, C. & Almada, V.C. (2010). An Efficient Technique for the Captive Breeding of an Endangered Freshwater Fish *Salaria fluviatilis* (Pisces: Blenniidae), with a Description of Its Ontogeny. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41: 49-56.
- Gillet, C. (1994). Egg-production in arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) broodstock-effects of photoperiod on the timing of ovulation and egg quality. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 334-338.
- Girvan, J.R. & Braithwaite, V.A. (1998). Population differences in spatial learning in three-spined sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265: 913-918.
- Godin, J.G.J. & Davis, S.A. (1995). Who dares, benefits-predator approach behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*) deters predator pursuit. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 259: 193-200.
- Godin, J.G. & Dugatkin, L.A. (1996). Female mating preference for bold males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 10262-10267.
- Gonçalves, E.J. & Almada, V.C. (1997). Sex differences in resource utilization by the peacock blenny. *Journal of Fish Biology*, 51: 624-633.
- Gosling, S.D. (2008). Personality in Non-human Animals. *Social and Personality Psychology Compass*, 2: 985-1001.
- Gosling, S.D., Lilienfeld, S.O. & Marino, L. (2003). Personality. In Maestripieri, D. (ed.) *Primate Psychology: The Mind and Behavior of Human and Nonhuman Primates*, pp. 254-288. Harvard University Press, Cambridge, UK.

- 
- Goss-Custard, J.D. & Sutherland, W.J. (1997). Individual behaviour, populations and conservation. En: Krebs, J.R. & Davies, N.B. (eds.) *Behavioural Ecology*, pp. 373-395. Blackwells, Oxford, UK.
- Greene, C., Umbanhowar, J., Mangel, M. & Caro, T. (1998). Animal breeding systems, hunter selectivity, and consumptive use in wildlife conservation. En Caro, T. (ed.) *Behavioral Ecology and Conservation Biology*, pp. 271-305. Oxford University Press, New York, USA.
- Grether, G.F. (1996). Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution*, 50: 1949-1957.
- Gross, M.R. (1996). Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 92-98.
- Hale, R.E., St. Mary, C.M. & Lindström, K. (2003), *Parental Responses to Changes in Costs and Benefits Along an Environmental Gradient*. Springer, Netherlands.
- Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I. & Erikstad, K.E. (2005). Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. *Proceedings of the Royal Society*, 272: 1039-1046.
- Hare, J.A. & Cowen, R.K. (1997). Size, growth, development, and survival of the planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Ecology*, 78: 2415-2431.
- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.W. & Applebaum, S.W. (1994) The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *British Journal of Nutrition*, 72: 45-58.

- Harvey, B.C. & Stewart, A.J. (1991). Fish size and habitat depth relationships in headwater streams. *Oecologia*, 87: 336 -342.
- Heal, G.M. (2000). *Nature and the Marketplace : Capturing the Value of Ecosystem Services*. Island Press, Washington D.C., USA.
- Hebb, D.O. (1946). Emotions in man and animals: An analysis of the intuitive process of recognition. *Psychological Review*, 53: 88-106.
- Heezik, Y.V., Seddon, P.J. & Maloney, R.F. (1999). Helping reintroduced houbara bustards avoid predation: effective anti-predator training and the predictive value of pre-release behaviour. *Animal Conservation*, 2: 155-163.
- Helfman, G.S. (1999). Behavior and fish conservation: introduction, motivation, and overview. *Environmental Biology of Fishes*, 55: 7-12.
- Helfman, G.S., Collette, B.B. Facey, D.E. (1997). The diversity of fishes. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Hernández, R., Lacomba, R.T., Uviñas, Y.N. & Oltra, R. (2000). Distribution pattern of river blennies in the Júcar River basin (eastern Spain). *Journal of Fish Biology*, 57: 250-254.
- Höjesjö, J., Johnsson, J. I. & Bohlin, T. (2002). Can laboratory studies on dominance predict fitness of young brown trout in the wild? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52: 102-108.
- Homski, D., Goren, M. & Gasith, A. (1994). Comparative evaluation of the larvivorous fish *Gambusia affinis* and *Aphanius dispar* as mosquito control agents. *Hydrobiologia*, 284: 137-146.

- 
- Howell, W.M., Black, D.A. & Bortone, S.A. (1980). Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia*, 1980: 676-681.
- Hughes, K.A., Rodd, F.H. & Reznick, D.N. (2005). Genetic and environmental effects on secondary sex traits in guppies (*Poecilia reticulata*). *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 35-45.
- Huntingford, F. & Adams, C. (2005). Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 142: 1207-1221.
- Huntingford, F.A. & Giles, N. (1987). Individual variation in antipredator responses in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus L.*). *Ethology*, 74: 205-210.
- Immler, S., Mazzoldi, C. & Rasotto, M.B. (2004). From sneaker to parental male: change of reproductive traits in the black goby, *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301: 177-185.
- Jager, H.I., Rose, K.A. & Vila-Gispert, A. (2008). Life history correlates and extinction risk of capital-breeding fishes. *Hydrobiologia*, 602: 15-25.
- Jones, J.C. & Reynolds, J.D. (1999). Costs of egg ventilation for male common gobies breeding in conditions of low dissolved oxygen. *Animal Behaviour*, 57: 181-188.
- Karino, K. & Haijima, Y. (2001). Heritability of male secondary sexual traits in feral guppies in Japan. *Journal of Ethology*, 19: 33-37.
- Karr, J.R. (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6: 21-27.
- Karr, J.R. (1987). Biological monitoring and environmental assessment: a conceptual framework. *Environmental Management*, 11: 249-256.



- Kelley, J.L., Magurran, A.E. & Macías-García, C. (2005). The influence of rearing experience on the behaviour of an endangered Mexican fish, *Skiffia multipunctata*. *Biological Conservation*, 122: 223-230.
- King, R.C., Mulligan, P. & Stansfield, W. (2012). *A dictionary of genetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Kirkpatrick, M. (1987). Sexual selection by female choice in polygynous animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 43-70.
- Klug, H., Chin, A. & St Mary, C.M. (2005). The net effects of guarding on egg survivorship in the flagfish, *Jordanella floridae*. *Animal Behaviour*, 69: 661-668.
- Knouft, J.H. & Page, L.M. (2004). Nest Defense against Predators by the Male Fringed Darter (*Etheostoma crossopterum*). *Copeia*, 4: 915-918.
- Kodric-Brown, A. (1998). Sexual dimorphism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *The American Zoologist*, 38: 70-81.
- Kottelat, M. (2004). *Salaria economidisi*, a new species of freshwater fish from Lake Trichonis, Greece, with comments on variation in *S. fluviatilis* (Teleostei: Blenniidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 111: 121-137.
- Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland.
- Kraak, S.B.M. (1996). A quantitative description of the reproductive biology of the Mediterranean blenny *Aidablennius sphinx* (Teleostei, Blenniidae) in its natural habitat. *Environmental Biology of Fishes*, 46: 329-342.
- Kurvers, R.H., Prins, H.H., van Wieren, S.E., van Oers, K., Nolet, B.A. & Ydenberg, R.C. (2010). The effect of personality on social foraging: shy barnacle geese

- 
- scrounge more. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277: 601-608.
- Kvarnemo, C., Svensson, O. & Forsgren, E. (1998) Parental behaviour in relation to food availability in the common goby. *Animal Behaviour*, 56: 1285-1290.
- Le Comber, S.C., Faulkes, C.G., Formosinho, J. & Smith, C. (2003). Response of territorial males to the threat of sneaking in the threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): a field study. *Journal of Zoology*, 261: 15-20.
- Lengkeek, W. & Didderen, K. (2006). Breeding cycles and reproductive behaviour in the river blenny *Salaria fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 69: 1837-1844.
- Lindenmayer, D. & Burgman, M. (2005). *Practical conservation biology*. CSIRO publishing, Australia.
- Lindenmayer, D.B. & Franklin, J.F. (2002). *Conserving forest biodiversity: a comprehensive multiscaled approach*. Island Press, Washington D.C., USA.
- Little, T.J., Perutz, M., Palmer, M., Crossan, C. & Braithwaite, V.A. (2008). Male three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* make antibiotic nests: a novel form of parental protection? *Journal of Fish Biology*, 73: 2380-2389.
- Lorenzo-Lacruz, J., Vicente-Serrano, S.M., López-Moreno, J.I., Morán-Tejeda, E. & Zabalza, J. (2012). Recent trends in Iberian streamflows (1945–2005). *Journal of Hydrology*, 414: 463-475.
- Lundberg, G., Kottelat, M., Smith, G.R., Stiassny, M.L.J. & Gill, A.C. (2000). So many fishes, so little time : an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, 87: 26-62.

- Mackiewicz, M., Brady, A., Porter, E., Dakin, E. & Avise, J.C. (2005). Cuckoldry rates in the Molly Miller (*Scartella cristata*; Blenniidae), a hole-nesting marine fish with alternative reproductive tactics. *Marine Biology*, 148: 213-221.
- Maitland, P.S. (1987). Fish in the Clyde and Leven systems - a changing scenario. *Proceedings of the Institute of Fisheries Management Conference*, 13-20.
- Manica, A. (2004). Parental fish change their cannibalistic behaviour in response to the cost-to-benefit ratio of parental care. *Animal Behaviour*, 67: 1015-1021.
- Marconato, A. & Bisazza, A. (1988). Mate choice, egg cannibalism and reproductive success in the river bullhead, *Cottus gobio* L. *Journal of Fish Biology*, 33: 905-916.
- Markel, R.W. (1994). An adaptive value of spatial learning and memory in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsi*. *Animal Behaviour*, 47: 1462-1464.
- Markowitz, H. (1982). *Behavioral enrichment in the zoo*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Materna, E. (2001). Temperature interaction, Issue Paper 4. Temperature Water Quality Criteria Guidance Development Project, EPA-910-D-01-004, Environmental Protection Agency Region 10. U.S. Fish and Wildlife Service, Seattle, Washington.
- Matthews, W.J. & Marsh-Matthews, E. (2003). Effects of drought on fish across axes of space, time and ecological complexity. *Freshwater Biology*, 48: 1232-1253.
- McCullough, D.A. (1999). A Review and Synthesis of Effects of Alterations to the Water Temperature Regime on Freshwater Life Stages of Salmonids, with Special Reference to Chinook Salmon. U.S. Environmental Protection Agency, Region 10, Seattle, Washington.

- 
- McDougall, P.T., Réale, D., Sol, D. & Reader, S.M. (2006). Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation*, 9: 39-48.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A. & Marschall, E.A. (1988). Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45; 1657-1670.
- Møller, A.P. (2010). When climate change affects where birds sing. *Behavioral Ecology*, arq200.
- Møller, A.P. (2011). Behavioral and life history responses to extreme climatic conditions: Studies on a migratory songbird. *Current Zoology*, 57: 351-362.
- Møller, A.P. & Szép, T. (2005). Rapid evolutionary change in a secondary sexual character linked to climatic change. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 481-495.
- Møller, A.P., Flensted-Jensen, E., Klarborg, K., Mardal, W., & Nielsen, J.T. (2010). Climate change affects the duration of the reproductive season in birds. *Journal of Animal Ecology*, 79: 777-784.
- Mrakovcic, M., Misetic, S. & Povz, M. (1995). Status of freshwater fish in Croatian Adriatic River systems. *Biological Conservation*, 72: 179-185.
- Munkwitz, N.M., Turner, J.M., Kershner, E.L., Farabaugh, S.M. & Heath, S.R. (2005). Predicting release success of captive-reared loggerhead shrikes (*Lanius ludovicianus*) using pre-release behavior. *Zoo Biology*, 24: 447-458.
- Nagahama, N. (1994) Molecular biology of oocyte maturation in fish. En: Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S. (eds.) *Perspectives in Comparative Endocrinology*, pp. 193-198. Ottawa: National Research Council of Canada.

- Neat, F. & Lengkeek, W. (2009). Sexual selection in Blennies. En: Patzner, R.A, Gonçalves, E., Hastings, P. & Kapoor, B.G (eds.) *The Biology of Blennies*, pp. 249-278. Science Publishers, Enfield, USA.
- Neat, F.C., Lengkeek, W., Westerbeek, E.P., Laarhoven, B. & Videler, J.J. (2003). Behavioural and morphological differences between lake and river populations of *Salaria fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 63: 374-387.
- Neves, R. (2004). Propagation of endangered freshwater mussels in North America. *Journal of Conchology Special Publication*, 3: 69-80.
- Oliveira, R.F., Canario, A. V. & Bshary, R. (1999a). Hormones, behaviour and conservation of littoral fishes: current status and prospects for future research. En: Almada, V.C., Oliveria, R.F. & Gonçalves, E.J. (eds.) *Behaviour and conservation of littoral fishes*, pp. 149-178. Instituto Superior de Psicologia Aplicada, Lisboa, Portugal.
- Oliveira, R.F., Ros, A.F.H. & Gonçalves, D.M. (2005). Intra-sexual variation in male reproduction in teleost fish: a comparative approach. *Hormones and Behavior*, 48: 430-439.
- Oliveira, R.F., Taborsky, M. & Brockmann, H.J. (2008). *Alternative reproductive tactics: an integrative approach*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Oliveira, R.F, Almada, V.C., Forsgren, E. & Gonçalves, E.J. (1999b). Temporal variation in male traits, nesting aggregations and mating success in the peacock blenny. *Journal of Fish Biology*, 54: 499-512.
- Oliveira, R.F., Carneiro, L.A., Gonçalves, D.M., Canario, A.V.M. & Grober, M.S. (2001). 11-Ketotestosterone Inhibits the Alternative Mating Tactic in Sneaker Males of the Peacock Blenny, *Salaria pavo*. *Brain, Behavior and Evolution*, 58: 28-37.

- 
- Oliveira, R.F., Carvalho, N., Miranda, J., Gonçalves, E.J., Grober, M. & Serrao Santos, R. (2002). The relationship between the presence of satellite males and nest-holders' mating success in the Azorean rock-pool blenny *Parablennius sanguinolentus parvicornis*. *Ethology*, 108: 223-235.
- Ospina-Alvarez, N. & Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One*, 3: 2837.
- Östlund, S. & Ahnesjö, I. (1998). Female fifteen-spined sticklebacks prefer better fathers. *Animal Behaviour*, 56: 1177-1183.
- Parker, G.A. (1998). Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. En: Birkhead, T.R. & Møller, A.P. (eds.) *Sperm Competition and Sexual Selection*, pp. 3-54. Academic Press, London, UK.
- Pavlov, I.P. (1906). The scientific investigation of the psychical faculties or processes in the higher animals. *Science*, 24: 613-619.
- Payne, A.G., Smith, C. & Campbell, A.C. (2004). A model of oxygen-mediated filial cannibalism in fishes. *Ecological Modelling*, 174: 253-266.
- Pearce, D. (1998). Auditing the Earth: the value of the worlds ecosystem services and natural capital. *Environment*, 40: 23-27.
- People Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L. & Mugnier, C. (1993). Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 211-224.
- Perdices, A., Doadrio, I., Côté, I.M., Machordom, A., Economidis, P. & Reynolds, J.D. (2000). Genetic divergence and origin of Mediterranean populations of the river blenny *Salaria fluviatilis* (Teleostei: Blenniidae). *Copeia*, 2000: 723-731.

- Perrin, J. (1988). Maintien en aquarium de l'apron du Rhone, *Zingel asper* (L.), espèce menacée d'extinction. *Revue Française d'Aquariologie*, 15: 17-20.
- Pizzolon, M., Giacomello, E., Marri, L., Marchini, D., Pascoli, F., Mazzoldi, C. & Rasotto, M.B. (2010). When fathers make the difference: efficacy of male sexually selected antimicrobial glands in enhancing fish hatching success. *Functional Ecology*, 24; 141-148.
- Plaut, I. (1998). Comparison of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19: 181-188.
- Plarromaní, J. (2009). *Estudi ecològic de la ictiofauna del riu Segre*. Projecte fi de carrera. Universitat de Lleida.
- Poly, W.J. (2003). Design and evaluation of a translocation strategy for the fringed darter *Etheostoma crossopterum* in Illinois. *Biological Conservation*, 113: 13-22.
- Price, E.O. (1999). Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science*, 65: 245-271.
- Rabin, L.A. (2003). Maintaining behavioural diversity in captivity for conservation: natural behaviour management. *Animal Welfare*, 12: 85-94.
- Rakes, P.L., Shute, J.R. & Shute, P.W. (1999). Reproductive behavior, captive breeding, and restoration ecology of endangered fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 55: 31-42.
- Rall, W.F. (1993). *Genetic conservation of salmonid fishes*. Springer, USA.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T. & Dingemanse, N.J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82: 291-318.

- 
- Reichard, M., Le Comber, S.C. & Smith, C. (2007). Sneaking from a female perspective. *Animal Behaviour*, 74: 679-688.
- Rios-Cardenas, O. & Webster, A.S. (2005). Paternity and paternal effort in the pumpkinseed sunfish. *Behavioral Ecology*, 16: 914-921.
- Rowe, S. & Hutchings, J.A. (2003). Mating systems and the conservation of commercially exploited marine fish. *Trends in Ecology & Evolution*, 18: 567-572.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774.
- Salvanes, A.G.V., Moberg, O. & Braithwaite, V.A. (2007). Effects of early experience on group behaviour in fish. *Animal Behaviour*, 74: 805–811.
- Sapolsky, R.M. (1990). Adrenocortical function, social rank, and personality among wild baboons. *Biological Psychiatry*, 28: 862-878.
- Saraiva, J.L., Gonçalves, D.M. & Oliveira, R.F. (2010). Environmental modulation of androgen levels and secondary sex characters in two populations of the peacock blenny *Salaria pavo*. *Hormones and behavior*, 57: 192-197.
- Saraiva, J.L., Pignolo, G., Gonçalves, D. & Oliveira, R.F. (2012). Interpopulational variation of the mating system in the peacock blenny *Salaria pavo*. *Acta Ethologica*, 15: 25-31.
- Sarkar, U.K., Deepak, P.K., Negi, R.S., Singh, S. & Kapoor, D. (2006). *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation*. Springer, Netherlands.



- Sarrazin, F. & Legendre, S. (2000). Demographic approach to releasing adults versus young in reintroductions. *Conservation Biology*, 14: 488-500.
- Schmitz, O.J., Grabowski, J.H., Peckarsky, B.L., Preisser, E.L., Trussell, G.C. & Vonesh, J.R. (2008). From individuals to ecosystem function: toward an integration of evolutionary and ecosystem ecology. *Ecology*, 89: 2436-2445.
- Seal, U.S., Ellis, S.A., Foose, T.J. & Byers, A.P. (1993). Conservation assessment and management plans (CAMPs) and global action plans (gcaps). *Captive Breeding Specialist Group Newsletter*, 4: 5-10.
- Sheenaja, K.K. (2011). Importance of hatchery enrichment in laboratory rearing and conservation of critically endangered fish *Nandus nandus*. *Advances in Applied Science Research*, 2: 572-576.
- Shepherdson, D.J. (2001). *Training and Enrichment Course for Captivity Species*. Guadalajara Zoo, Guadalajara, México.
- Shiri Harzevili, A., De Charleroy, D., Auwerx, J., Vught, I., Van Slycken, J., Dhert, P. & Sorgeloos, P. (2003). Larval rearing of burbot (*Lota lota* L.) using *Brachionus calyciflorus* rotifer as starter food. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 84-87.
- Shohet, A.J. & Watt, P.J. (2009). Female guppies *Poecilia reticulata* prefer males that can learn fast. *Journal of Fish Biology*, 75: 1323-1330.
- Shute, J.R., Rakes, P.L. & Shute, P.W. (2005). Reintroduction of four imperiled fishes in Abrams Creek, Tennessee. *Southeastern Naturalist*, 4: 93-110.
- Sih, A., Ferrari, M.C.O. & Harris, D.J. (2011). Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. *Evolutionary Applications*, 4: 367-387.

- 
- Sih, A., Bell, A. & Johnson, J.C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19: 372-378.
- Sinn, D.L., Apiolaza, L.A. & Moltschaniwskyj, N.A. (2006). Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1437-1447.
- Sinn, D.L., Cawthen, L., Jones, S.M., Pukk, C. & Jones, M.E. (2014). Boldness towards novelty and translocation success in captive-raised, orphaned Tasmanian devils. *Zoo Biology*, 33: 36-48.
- Sloan Wilson, D., Clark, A.B., Coleman, K. & Dearstyne, T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 442-446.
- Smith, C. & Reichard, M. (2005). Females solicit sneakers to improve fertilization success in the bitterling fish (*Rhodeus sericeus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272: 1683-1688.
- Snyder, N.F., Derrickson, S.R., Beissinger, S.R., Wiley, J.W., Smith, T.B., Toone, W.D. & Miller, B. (1996). Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biology*, 10: 338-348.
- Solé, M., Raldua, D., Barceló, D. & Porte, C. (2003). Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 373-380.
- Solé, M., Castillo, M., de Alda, M. L., Porte, C. & Barceló, D. (2000). Estrogenicity determination in carp, *Cyprinus carpio*. *Analisis*, 28: 183-788.
- Sostoa, A. de, Caiola, N., Vinyoles, D., Sánchez, S. & Franch, C. (2010). Development of a biotic integrity index (IBICAT) based on the use of fish as indicators of the

- environmental quality of the rivers of Catalonia. Report to the Catalan Water Agency, Barcelona. Disponible en: <http://aca-web.gencat>.
- Sousa-Santos, C., Robalo, J. & Almada, V. (2014). Spawning behaviour of a threatened Iberian cyprinid and its implications for conservation. *Acta Ethologica*, 17: 99-106.
- Sovrano, V.A., Bisazza, A. & Vallortigara, G. (2002). Modularity and spatial reorientation in a simple mind: encoding of geometric and nongeometric properties of a spatial environment by fish. *Cognition*, 85: 51-59.
- St Mary, C.M., Noureddine, C.G. & Lindström, K. (2001). Environmental Effects on Male Reproductive Success and Parental Care in the Florida Flagfish *Jordanella floridae*. *Ethology*, 107: 1035-1052.
- Stamps, J.A. (2007). Growth-mortality tradeoffs and 'personality traits' in animals. *Ecology Letters*, 10: 355-363.
- Stephens, P.A., Sutherland, W.J. & Freckleton, R.P. (1999). What is the Allee effect? *Oikos*, 87: 185-190.
- Strayer, D.L. & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29: 344-358.
- Sundström, L.F., Petersson, E., Höjesjö, J., Johnsson, J.I. & Järvi, T. (2004). Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (*Salmo trutta*): implications for dominance. *Behavioral Ecology*, 15: 192-198.
- Sutherland, W.J. (1998). The importance of behavioural studies in conservation biology. *Animal Behaviour*, 56: 801-809.

- 
- Taborsky, M. (1994). Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behaviour in fish reproduction. *Advances in the Study of Behavior*, 23: 1-100.
- Taborsky M. (1998). Sperm competition in fish: "bourgeois" males and parasitic spawning. *Trends in Ecology and Evolution*, 13:222-227.
- Taborsky, M. (2001). The evolution of bourgeois, parasitic, and cooperative reproductive behaviors in fishes. *Journal of Heredity*, 92: 100-110.
- Tear, T.H., Scott, J.M., Hayward, P.H. & Griffith, B. (1993). Status and Prospects for Success of the Endangered Species Act. *Science*, 262: 12.
- Tulley, J.J. & Huntingford, F.A. (1988). Additional Information on the Relationship between Intra-specific Aggression and Anti-predator Behaviour in the Three-spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ethology*, 78: 219-222.
- Vicente-Serrano, S.M. & Cuadrat-Prats, J.M. (2007). Trends in drought intensity and variability in the middle Ebro valley (NE of the Iberian peninsula) during the second half of the twentieth century. *Theoretical and Applied Climatology*, 88: 247-258.
- Viera, V.M., Nolan, P.M., Côté, S.D., Jouventin, P. & Groscolas, R. (2008). Is territory defence related to plumage ornaments in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*? *Ethology*, 114: 146-153.
- Vincent, A.C.J. & Sadovy, Y. (1998). Reproductive ecology in the conservation and management of fishes. En: Caro, T. (ed.) *Behavioural Ecology and Conservation Biology*, pp. 209-245. Oxford University Press, New York, USA.
- Vinyoles, D. (1993). Biologia i ecologia de *Blennius fluviatilis* (Pisces: Blenniidae) al Riu Matarranya. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

- Vinyoles, D. & De Sostoa, A. (2007). Life-history traits of the endangered river blenny *Salaria fluviatilis* (Asso) and their implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, 70: 1088-1108.
- Vinyoles, D., Côté, I.M. & De Sostoa, A. (1999). Egg cannibalism in river blennies: the role of natural prey availability. *Journal of Fish Biology*, 55: 1223-1232.
- Vörösmarty, C.J., Green, P., Salisbury, J. & Lammers, R.B. (2000). Global water resources: vulnerability from climate change and population growth. *Science*, 289: 284–288.
- Watson, P.J. (1991). Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigiosa* (Linyphiidae). *Animal Behaviour*, 41: 343-360.
- Watters, J.V. (2005). Can alternative male tactics 'fighter' and 'sneaker' be considered 'coercer' and 'cooperator'? *Animal Behaviour*, 70: 1055-1062.
- Wedekind, C. (1992). Detailed information about parasites revealed by sexual ornamentation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 247: 169-174.
- West-Eberhard, M.J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York, USA.
- Wickler, W. (1957a). Vergleichende Verhaltensstudien an Grundfischen. I. Beiträge zur Biologie, besonders zur Ethologie von *Blennius fluviatilis* Asso im Vergleich zu einigen anderen Bodenfischen. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 14: 393-428.
- Wickler, W. (1957b) Das ei von *Blennius fluviatilis* Asso (= *Bl. vulgaris* Poll.). *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 45: 641-648.

- 
- Williot, P., Rouault, T., Pelard, M., Mercier, D. & Jacobs, L. (2009). Artificial reproduction of captive endangered European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. *Endangered Species Research*, 6: 251-257.
- Willmott, H.E. & Foster, S.A. (1995). The effects of rival male interaction on courtship and parental care in the fourspine stickleback, *Apeltes quadracus*. *Behaviour*, 132: 997-1010.
- Willson, M.F. & Halupka, K.C. (1995). Anadromous fish as keystone species in vertebrate communities. *Conservation Biology*, 9: 489-497.
- Wolf, M. & Weissing, F.J. (2010). An explanatory framework for adaptive personality differences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365: 3959-3968.
- Wong, B.B., Candolin, U. & Lindström, K. (2007). Environmental deterioration compromises socially enforced signals of male quality in three-spined sticklebacks. *The American Naturalist*, 170: 184-189.
- Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Briscoe, D.A., & Frankham, R. (2002). Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. *Conservation Genetics*, 3: 277-288.
- Yalden, D.W. (1993). The problems of reintroducing carnivores. *Symposia of the Zoological Society of London*, 65: 289-306.
- Yerkes, R.M. (1939). The life history and personality of the chimpanzee. *The American Naturalist*, 73: 97-112.
- Zander, C.D. (1975). Secondary sex characteristics of blennioid fishes (Perciformes). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 39: 717-727.

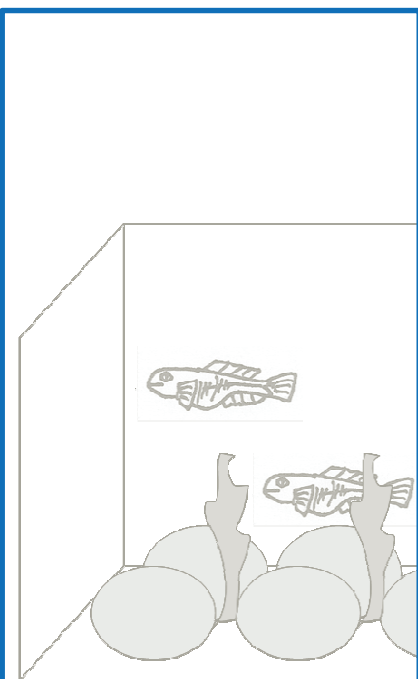
Zhuikov, A.Y. (1993). Avoidance learning and aggression in guppies. *Animal Behaviour*, 45: 825-826.

Zoran, M.J. & Ward, J.A. (1983). *Predators and prey in fishes*. Springer, Netherlands.

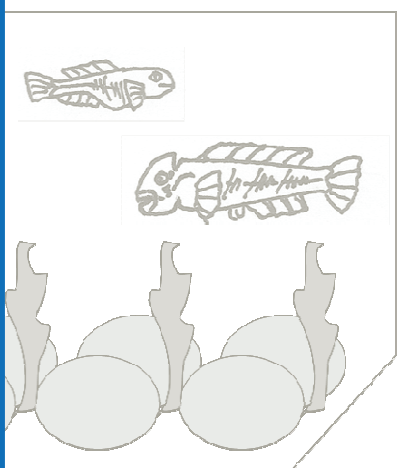
Zuk, M. & Stoehr, A.M. (2002). Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, 160: S9-S22.







# Apéndices

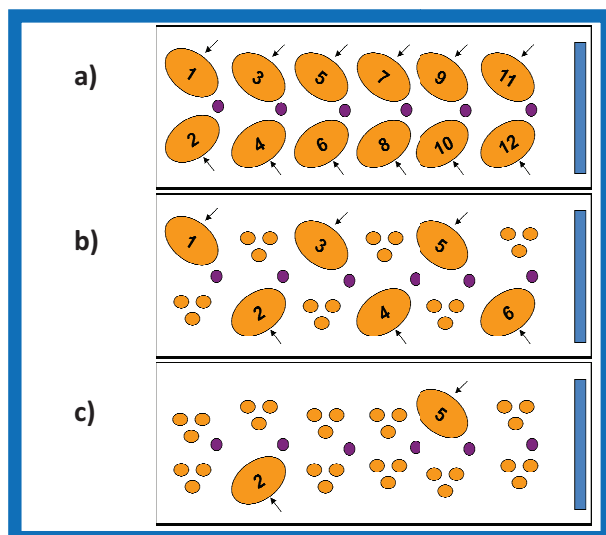




## APÉNDICE 1: ACUARIOS EXPERIMENTALES

En las investigaciones de la presente tesis el diseño experimental de los acuarios juega un papel muy importante. En esta sección se ilustran los acuarios con el fin de hacer más comprensible al lector las condiciones de mantenimiento así como los distintos escenarios a los que se sometieron los peces.

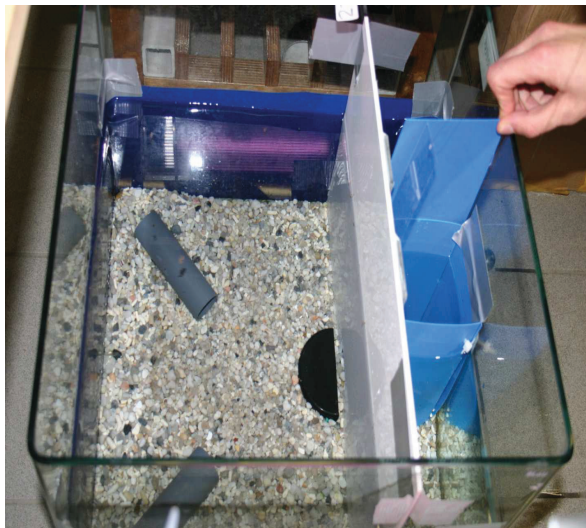
**Investigación “Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*)” (Capítulo 1, Sección 1).** En la imagen se puede ver uno de los acuarios del experimento “male-male size interaction”.



**Investigación “Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*)” (Capítulo 1, Sección 1).** En los esquemas se ilustra la disposición de los acuarios: a) male-male size interaction, b) nonlimiting nests, c) nest shortage condition. Los círculos naranja numerados indican las piedras nido. La línea de círculos violeta indica las plantas artificiales. Las flechas indican la orientación de los agujeros de entrada a los nidos. El rectángulo azul representa el filtro.



Investigación “La presencia de los padres afecta al desarrollo de los embriones en *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), un pez con cuidado parental” (Capítulo 1, Sección 2). En la primera imagen se ve una de las baterías de acuarios de 30 litros utilizados. En la segunda imagen se ve el detalle de uno de estos acuarios asignado a la condición “con-padres”, en la que había presente la pareja progenitora.



Investigación “La osadía se relaciona con el desarrollo de la cresta cefálica en el macho del blenio de río *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)” (Capítulo 2, Sección 1). La primera fotografía pertenece al acuario dónde se llevaron a cabo los test de boldness. En la segunda imagen se pueden ver los acuarios dónde se mantuvieron los peces del experimento, haciendo seguimiento de su reproducción.



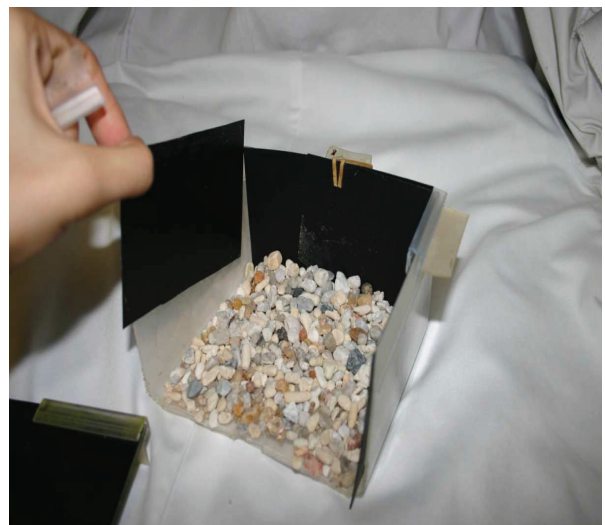
Investigación “Aprendizaje espacial basado en marcas visuales en el blenio de río *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)” (Capítulo 2, Sección 2). Acuario experimental en el cual se hicieron los exámenes para testar la capacidad de los peces en utilizar y aprender marcas visuales.

## APÉNDICE 2: NIDOS NATURALES Y ARTIFICIALES

En los experimentos se utilizaron dos tipos de nidos. El primer tipo consistió en una estructura a base de piedras (**nido natural**). Este nido fue utilizado en la investigación “Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*)” (Capítulo 1, Sección 1), ya que se pretendía simular de la forma más fiel posible las condiciones ambientales naturales. Un segundo tipo de nido (**nido artificial**), utilizado en las tres otras investigaciones, fue una estructura artificial consistente en una caja de plástico (12x13cm base y 7cm alto), abierta en su parte delantera, en cuyo interior había unas laminas de plástico negro que se podían extraer e intercambiar con facilidad. Este diseño permitía fotografiar y manipular las puestas según las necesidades de cada una de estas investigaciones.



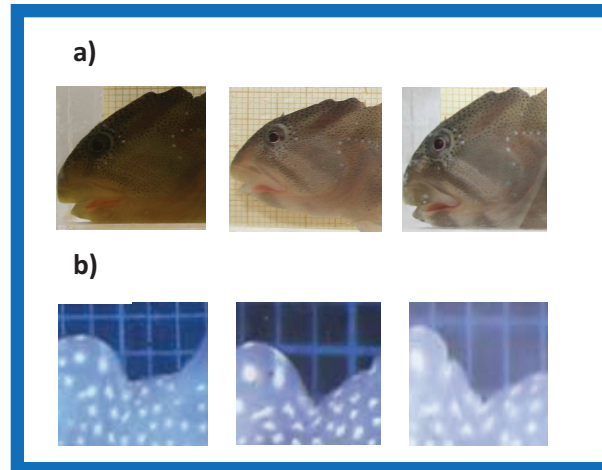
**Nido natural:** Este tipo de nido estaba constituido por un guijarro aplanado apoyado en tres piedras alargadas que evitaban que se hundiese y que permitía que los peces se escondiesen debajo.



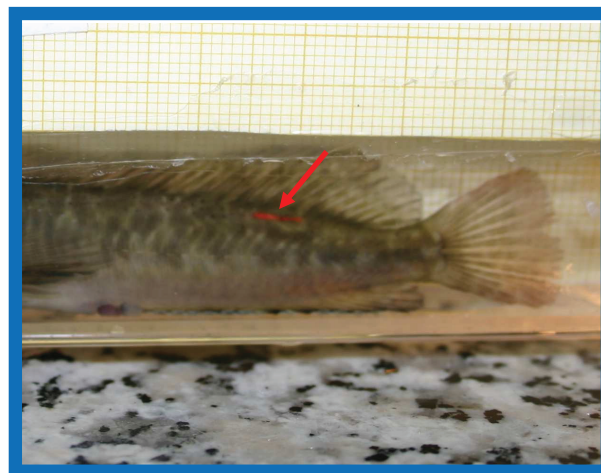
**Nido artificial:** Como se puede apreciar en las imágenes la estructura del nido permitía: el retirado del techo y el retirado de las láminas laterales.

## APÉNDICE 3: IDENTIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS

La identificación de los peces se hizo mediante dos sistemas: 1) **Identificación mediante características físicas de los ejemplares** y 2) **Marcaje mediante elastómero fluorescente**.



**Identificación mediante características físicas de los machos.** En estas secuencias se pueden ver que a lo largo de tres meses consecutivos hay características que permiten reconocer a los machos. El macho a) presentaba una cresta acabada en dos puntas fácilmente reconocible. La secuencia b) muestra el patrón de pigmentación final de la cresta en otro macho en el que podemos distinguir la constancia de la disposición de ciertos puntos.



**Marcaje mediante elastómero fluorescente** (Visible Implant Elastomer, VIE tag). Consiste en un material constituido por dos derivados de la silicona que se mezclan inmediatamente antes de su uso creado por la empresa Northwest Marine Technology (NMT). Se inyecta en forma líquida (mediante una jeringa) pero luego solidifica en un sólido flexible y biocompatible. Las marcas se hacen bajo tejidos transparentes o translúcidos y se pueden ver externamente. Este tipo de marcaje se usa frecuentemente en peces, crustáceos, reptiles y anfibios y es especialmente recomendado para animales de pequeño tamaño. Nosotros utilizamos el color rojo fluorescente. En la fotografía se puede ver la marca (señalada con una flecha) bajo la aleta dorsal.





## Comportamiento reproductor en el blenio de río (*Salaria fluviatilis*): aspectos relacionados con la estrategia reproductiva del macho

---

1. Plasticidad en los caracteres sexuales secundarios en el macho del blenio de río (*Salaria fluviatilis*)
2. La presencia de los padres afecta al desarrollo de los embriones en *Salaria fluviatilis* (Asso 1801), un pez con cuidado parental
3. La osadía se relaciona con el desarrollo de la cresta cefálica en el macho del blenio de río *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)
4. Aprendizaje espacial basado en marcas visuales en el blenio de río *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801)