

# De aard van het beestje

Speelt persoonlijkheid een rol bij de predatorgeïnduceerde stressrespons?



**Sarah PRINCEN**

Promotor: Prof. Dr. R. Stoks

Begeleider: Marie Van Dievel

Proefschrift ingediend tot het  
behalen van de graad van  
Master of Science in de Biologie

Academiejaar 2014-2015

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

## Voorwoord

Met het uitvoeren van deze masterproef hoop ik het belang van persoonlijkheid bij (ongewervelde) dieren in ecologisch en fysiologisch onderzoek te onderstrepen. Gebruikmakend van de stoerheid persoonlijkheidstak wil ik aantonen dat factoren zoals zwemsnelheid, groei en de fysiologische respons op predatorstress bij waterjufferlarven niet kunnen onderzocht worden zonder ook de individuele persoonlijkheid in acht te nemen. Ik gebruik hiervoor twee soorten waterjuffers: de Watersnuffel (*Enallagma cyathigerum*) en het Lantaarntje (*Ischnura elegans*), om zo te laten zien dat persoonlijkheid niet alleen op individueel vlak kan inwerken, maar ook op soort- en genusniveau.

Graag zou ik gebruik maken van deze ruimte om de supermensen die op de een of andere manier hebben bijgedragen tot het welslagen van deze masterproef, te bedanken.

Allereerst wil ik mijn promotor, Prof. Dr. Robby Stoks, bedanken voor het delen van zijn inzichten, ervaring en raad. Onze constructieve besprekingen hebben zeker (bij mij althans) hun vruchten afgeworpen.

In een adem hierbij bedank ik ook Marie Van Dievel. Je bent heel geduldig geweest met je eerste thesisstudent, gezien jij de eerste persoon was tot wie ik me richtte wanneer er problemen of vragen opdoken. Bovenal heb ik heel veel handige tips and tricks opgestoken uit je verbeteringen. Hiervoor verdien jij op jouw beurt een milkshake!

Ria Van Houdt, jij verdient hier ook een dikke dankjewel voor je hulp met het fysiologische gedeelte. Ook aan de andere mensen uit het labo bij wie ik terecht kon voor (technische) raad en hulp: Bedankt.

Verder wil ik mijn vrienden bedanken voor de steun en vooral het begrip (dit jaar was ik iets minder aanwezig). Vienna en Julie, die ook in Robby's team hun masterproef afleggen, wil ik specifiek bedanken voor het delen van een lach en een (figuurlijke) traan. Ik geef verder mijn lieve Eli een dikke kus voor het delen van ideeën, het opgescheept zitten met niet alleen zijn, maar ook mijn thesis in zijn gedachten en het tijd nemen voor de occasionele knuffel. Mijn broer Dimi verdient een vuistje voor het luchtiger maken van de gesprekken en gedachten. Tenslotte bedank ik Omami, die altijd klaarstond met haar kookkunsten, knuffels, gelach en rotsvast vertrouwen.

Graag bedank ik als laatste mijn ouders, Nathalie en Bruno Princen. Zij zagen van jongs af aan het potentieel in hun 'Saartje' en hebben het nooit nagelaten van er voor te (proberen) zorgen dat ik dat potentieel ook benutte. Ik ben blij dat ik jullie hier nu voor kan bedanken door jullie fier te maken. Want ik weet dat jullie dat zijn.

## Lijst van afkortingen

- CRF: *corticotropine releasing factor*
- *E. cyathigerum*: *Enallagma cyathigerum*
- GLZ: *generalised linear model*
- HHA-as: hypothalamus-hypofyse-adrenale as
- Hsp: *heat shock* proteïne
- H-zin: *hazard* zin, gevaarsaanduiding
- *I. elegans*: *Ischnura elegans*
- Latentietijd A: latentietijd tot de eerste beweging (twitch)
- Latentietijd B: latentietijd tot de eerste verplaatsing (move)
- *Move*: eerste verplaatsing
- P-zin: *precaution* zin, voorzorgsmaatregel
- RM-AN(C)OVA: *repeated measures analysis of (co)variance*
- SAM-as: sympathisch-adrenaal-medullaire as
- SE: standaardfout
- sp.: species
- *Twitch*: eerste beweging
- ZG: zwemgeneigdheid
- ZS: zwemsnelheid

# Inhoud

Voorwoord .....	iii
Lijst van afkortingen .....	iv
1 Literatuurstudie.....	1
1.1 <i>Predatie</i> .....	1
1.1.1 Antipredator gedrag.....	1
1.1.2 Morfologische verdediging .....	2
1.1.3 Algemeen stressparadigma .....	4
1.2 <i>Gedragssyndromen</i> .....	7
1.2.1 Algemeen.....	8
1.2.2 Schuw-stoer syndroom .....	9
1.2.3 Persoonlijkheid en fysiologie .....	10
1.3 <i>Predatie en gedragssyndromen geïntegreerd</i> .....	11
1.3.1 Proactief-reactief continuüm .....	12
1.3.2 Kosten van antipredator gedrag .....	13
1.4 <i>Doelstelling en hypotheses</i> .....	14
1.4.1 Doelstelling.....	14
1.4.2 Hypotheses.....	14
2 Materiaal en methoden .....	16
2.1 <i>Studieorganismen</i> .....	16
2.1.1 Waterjufferlarven.....	16
2.1.2 Predatoren: libellenlarven.....	17
2.2 <i>Verzameling en kweek</i> .....	18
2.3 <i>Persoonlijkheidsexperiment</i> .....	18
2.3.1 Groei.....	19
2.3.2 Persoonlijkheidstoetsen.....	19
2.3.3 Meting van de zwemsnelheid .....	19
2.3.4 Predator- of controlebehandeling .....	20
2.4 <i>Fysiologie</i> .....	21
2.4.1 Glucose en glycogeen.....	21
2.4.2 Proteïnegehalte .....	22
2.4.3 Totaal vetgehalte.....	22

2.5	<i>Dataverwerking</i>	22
2.5.1	Assumpties	22
2.5.2	Effect van soort en behandeling	23
2.5.3	Relatie tussen groei, zwemsnelheid, persoonlijkheid en fysiologie	23
2.6	<i>Risicoanalyse</i>	24
3	Resultaten	25
3.1	<i>Groei en zwemsnelheid</i>	25
3.2	<i>Persoonlijkheid</i>	26
3.3	<i>Fysiologie</i>	29
4	Discussie	32
4.1	<i>Effect van soort en behandeling op groei</i>	32
4.2	<i>Effect van soort en behandeling op zwemsnelheid</i>	33
4.3	<i>Effect van soort en behandeling op persoonlijkheid</i>	33
4.4	<i>Effect van soort en behandeling op de fysiologische stressrespons</i>	35
4.5	<i>Relatie tussen de groei, zwemsnelheid, persoonlijkheid en fysiologische stressrespons</i>	37
4.5.1	Groei en zwemsnelheid	37
4.5.2	Groei en stoerheid	37
4.5.3	Groei en fysiologie	37
4.5.4	Zwemsnelheid en stoerheid	38
4.5.5	Zwemsnelheid en fysiologie	39
4.5.6	Stoerheid en fysiologie	39
5	Conclusie	41
	Samenvatting	43
	Summary	44
	Literatuurlijst	45
	Bijlage I - H- en P-zinnen	I
	Bijlage II - Groei ANCOVA's	III
	Bijlage III - Correlaties tussen fysiologische variabelen	IV

# 1 Literatuurstudie

## 1.1 Predatie

---

De fitness of het evolutionair succes van een individu is zijn reproductief succes, of nog het aantal kopieën van allelen dat hij kan bijdragen aan de volgende generaties (Alcock, 2013). Gedood worden voor reproductie heeft kunnen plaatsvinden resulteert dan in een gigantisch fitnessverlies, wat predatie tot een sterke selectieve kracht maakt. Het investeren in antipredator strategieën is van cruciaal belang en predatie katalyseert zo de evolutie van allerhande adaptaties (Lima & Dill, 1990). Deze adaptaties kunnen ruwweg opgedeeld worden in drie niveaus: gedragsmatige, morfologische en fysiologische antipredator adaptaties. Deze drie niveaus worden in de volgende delen afzonderlijk uitgewerkt.

### 1.1.1 Antipredator gedrag

Predator en prooi coëvolueren onder invloed van natuurlijke selectie. Predatoren moeten prooien kunnen detecteren, vangen en gevangen houden. De prooi moet hierop kunnen reageren (Cooper, 2014). Zodoende kan antipredator gedrag ook opgedeeld worden in drie categorieën.

De eerste categorie is zorgen voor een verminderde detectie door predatoren (Alcock, 2013). Het gedrag dat hierbij het meeste soelaas biedt, is een verminderde activiteit, zowel permanent als flexibel. Dit laatste betekent dat de activiteit naargelang de aanwezigheid van een predator verminderd of vermeerderd kan worden (Cooper, 2014). Vele predatoren, en vooral invertebraten, maken gebruik van bewegingsdetectoren voor hun zicht. Hierdoor hebben ze moeite om stilzittende prooien te detecteren (Cooper, 2014). Ook het actief verschuilen in vegetatie bijvoorbeeld of nachtelijke activiteit zijn gedragsmatige manieren om detectie te vermijden (Sih, 1987). De tweede categorie is het voorkomen van een aanval of vangst. Het vormen van groepen kan hierbij een goede strategie zijn: het zorgt voor een dilutie effect, de waakzaamheid is groter en predatoren kunnen afgeleid en/of zelfs weggejaagd worden. Ook kan opvallend gedrag het signaal geven dat het prooidier een goede conditie heeft en dus moeilijk te vangen is (Alcock, 2013). De conditie van het prooidier is hier van vitaal belang. Indien een predator een uitval doet, is het best dat het prooidier kan weggelopen. In een aquatisch milieu is wegzwemmen een manier om te ontkomen. De strategie wordt gebruikt door een hele reeks waterorganismen, gaande van vissen tot kreeften (Spanier *et al.*, 1991) en aquatische insecten (Janssens & Stoks, 2014). De laatste categorie beslaat het gedrag bij vangst door een predator (Alcock, 2013; Cooper, 2014). Waterjufferlarven bijvoorbeeld doen aan thanatosis wanneer ze gevangen worden, d.i. ze doen alsof ze dood zijn (Gyssels & Stoks, 2005).

Verscheidene dieren kunnen ook een gevangen lichaamsdeel afwerpen, zoals de Egeïsche muurhagedis (*Podarcis erhardii*) zijn staart kan afwerpen (Li *et al.*, 2014) en waterjufferlarven hun lamellen (Gyssels & Stoks, 2005). Dit wordt met de term autotomie aangeduid (Maginnis, 2006).

Antipredator gedrag kan variabiliteit vertonen tussen individuen van eenzelfde populatie. Een eerste reden hiervoor wordt gegeven door de *threat-sensitivity* (Eng., dreiginggevoeligheid) hypothese, die zegt dat prooidieren de intensiteit van hun gedragsrespons kunnen aanpassen aan de waargenomen predatiedruk (Sih, 1986, 1987). Deze is zowel afhankelijk van het absolute risico dat de predator vormt, als de kwetsbaarheid van het prooidier zelf. David *et al.* (2014) bijvoorbeeld hebben aangetoond dat de zoetwatervlokreeft *Gammarus fossarum* zijn schuilplaats vaker opzoekt en meer fotofoob is naargelang het predatierisico. Een tweede reden voor de variabiliteit in antipredator gedrag kan zijn dat er covariatie optreedt tussen antipredator gedrag en bepaalde morfologische kenmerken. Het bekendste voorbeeld hiervan is dat van de Noordwesterse kousenbandslang. De gestreepte slangen gaan eerder vluchten en keren minder in hun vlucht, terwijl de gestippelde slangen sneller keren om zo terug te vallen op hun crypsis (hun capaciteit om zich te verbergen) (Brodie III, 1989). Op de interactie tussen antipredator gedrag en morfologische verdediging wordt in het volgende deel teruggekomen.

### **1.1.2 Morfologische verdediging**

De drie bovenvermelde categorieën (d.i. voorkomen van detectie en vangst en het vermijden van predatie na vangst) kunnen ook hier gebruikt worden om morfologische aanpassingen aan predatie te bespreken. Ten eerste kan detectie door een predator voorkomen worden door het gebruik van camouflage, zoals bij kameleons en spinnen (Stevens & Merilaita, 2009), waarbij dieren trachten in hun omgeving op te gaan met behulp van schutkleuren. Een aangepaste lichaamsvorm kan hierbij helpen, dit wordt een maskerade genoemd. Voorbeelden hiervan zijn wandelende takken en de Gehoornde pad (Edmunds, n.d.).

Ten tweede kan kleuring ook een uitweg bieden bij het voorkomen van vangst. Een aposematische kleuring bijvoorbeeld impliceert dat het dier giftig is, zoals het zwart-gele patroon bij de wesp. Verscheidene zweefvliegen bootsen dan weer het kleurpatroon van de wesp na. Deze tactiek wordt Batesian mimicry genoemd, waarbij een eetbaar dier zich gaat voordoen als niet-eetbaar, door hetzelfde kleurpatroon van een niet-eetbaar dier aan te nemen. Kleuren en patronen kunnen er ook voor zorgen dat predatoren zich verkeerdelijk richten op een bepaald lichaamsdeel, zodat de prooi toch nog kan ontsnappen. Veranderende kleurpatronen tijdens de vlucht zorgen er voor dat predatoren verward geraken (Edmunds, 1974).



Behalve kleuring kunnen ook andere morfologische kenmerken de vangst voorkomen. Zo kan een goede ontwikkeling van een bepaald lichaamsdeel de vlucht vergemakkelijken en verbeteren. Waterjufferlarven bijvoorbeeld zwemmen door met hun abdomen heen en weer te bewegen. Ze gebruiken hierbij hun drie caudale lamellen om krachtige stoten te kunnen genereren (Brackenbury, 2002). Strobbe en collega's (2009) vonden dat bij de waterjufferlarve *Enallagma annexum* onder predatiedruk door een libellenlarve, geselecteerd werd op meer circulaire caudale lamellen, wat bijdroeg tot een verhoogde zwemsnelheid.

Ook bij vangst kunnen morfologische verdedigingsmechanismen het prooidier nog redden. Er kan bijvoorbeeld gif vrijgelaten worden, zoals bij giftige boomkickers of bij Hymenoptera (e.g. bijen, wespen en mieren) (zie ook review Omar, 2013). Een bekend voorbeeld is de kogelvis. Bij dreiging of vangst door een predator, blaast deze zich op. Dit maakt het moeilijker voor de predator om hem te verzwelgen. Daarbij bezit hij vaak stekels, die recht komen te staan bij het opblazen. Bovendien kunnen kogelvissen giftig zijn (Guzik, n.d.). De kogelvis vertoont dus morfologische antipredator mechanismen binnen de drie categorieën.

Morfologische verdedigingen kunnen ook geïnduceerd worden binnen één generatie, en men kan hier dus spreken van fenotypische plasticiteit. Induceerbare morfologische verdedigingen kunnen voorkomen als aan vier voorwaarden voldaan zijn. Er moet vooreerst sprake zijn van een variërende en onvoorspelbare, maar toch ook sterke predatiedruk. Ten tweede moeten de prooidieren in staat zijn om het predatierisico te kunnen inschatten door middel van een signaal. Ze moeten ten derde een kenmerk tot expressie brengen dat effectief bescherming biedt tegen de predator en ten vierde moet de expressie van het kenmerk een hogere kost dan voordeel inhouden wanneer er geen predator aanwezig is (Tollrian & Harvell, 1990). Voorbeelden van induceerbare morfologische verdedigingen kunnen onder de drie vernoemde categorieën vallen. Bij vangst door een *Triops* kunnen *Daphnia magna* watervlooien schade beperken door het verdikken en verharderen van hun cuticula (Rabus *et al.*, 2013). Gelijkaardig hieraan vonden Flenner en collega's (2009) dat er bij de libellenlarf *Leucorrhinia dubia* selectieve synthese van cuticulair materiaal optrad, waarbij er meer geïnvesteerd werd in een laterale stekel ter verdediging dan in de voorpoten.

Tenslotte kan er ook covariatie optreden tussen antipredator gedrag en morfologische verdediging. Hierbij zijn vier scenario's mogelijk (Dewitt *et al.*, 1999).

(1) Coafhankelijkheid. De kenmerken zijn hier mechanisch gelinkt, zoals ontsnappingsgedrag afhangt van de vorm van de caudale lamellen bij waterjuffers (Strobbe *et al.*, 2009). (2) Kenmerk compensatie. Hierbij gebruikt de prooi maar één type van verdediging. In een studie van Dewitt *et al.* (1999) blijkt bijvoorbeeld dat kleine zoetwaterslakken meer antipredator gedrag gaan uitoefenen ter compensatie.

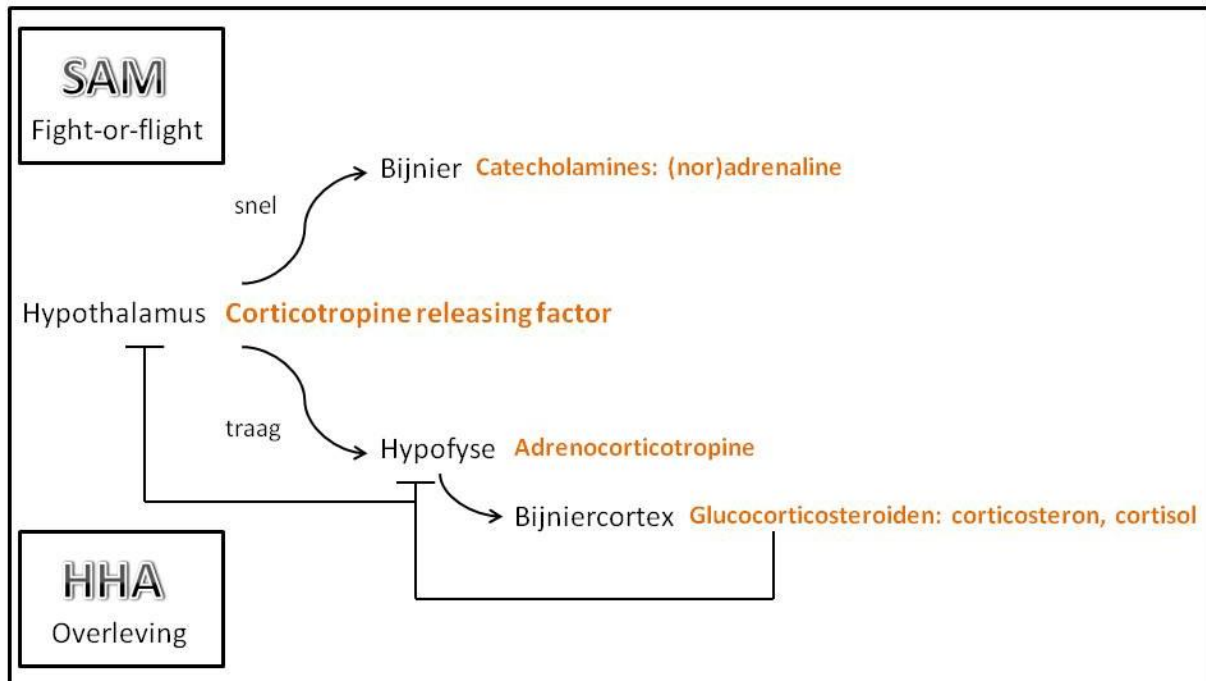
(3) Complementeren. Dit komt voor wanneer twee kenmerken niet mechanisch gelinkt zijn, maar toch in combinatie moeten gebruikt worden. Hierbij kan het gedrag van de Noordwesterse kousenbandslangen (vermeld in 1.1.1) als voorbeeld dienen. (4) Cospecialisatie. Wanneer de prooi twee types van antipredator gedrag tot zijn beschikking heeft, gaat hij ze simultaan gebruiken om zo een superieure verdediging te ontwikkelen. Dewitt en collega's (1999) zagen in dezelfde studie dat slakken met kleine aperturen ook meer antipredator gedrag gingen vertonen, wat zorgde voor een dubbele verdediging.

### 1.1.3 Algemeen stressparadigma

Stress is de conditie waarbij de homeostasis, d.i. het dynamisch evenwicht van dieren, bedreigd of verstoord wordt door interne of externe stimuli die stressoren worden genoemd (Chrousos & Gold, 1992; Bonga, 1997; Sørensen *et al.*, 2003). Stress houdt de paradox in van enerzijds adaptief te zijn, maar anderzijds ook kosten in te houden. Het concept allostasis (McEwen & Wingfield, 2003) beschrijft het adaptief proces van het actief behouden van homeostasis door middel van veranderingen (Korte *et al.*, 2005) en verheldert zo dus de schijnbare paradox. *Allostatic load* is de kost die met allostasis gepaard gaat wanneer de allostatische mediators zoals neurotransmitters en adrenale hormonen te vaak aangesproken moeten worden, zoals bijvoorbeeld onder aanhoudend predatierisico (McEwen & Wingfield, 2003).

De fysiologische stressrespons of de '*general stress paradigm*' (algemeen stressparadigma) houdt specifiek in dat levensbedreigende situaties overleefd kunnen worden door een syndroom van neuroëndocriene responsen die de allocatie van energie naar vitale functies teweegbrengen en die de homeostasis proberen te behouden (Bonga, 1997; Hawlena *et al.*, 2011). De neuroëndocriene responsen en de belangrijkste moleculen zijn goed geconserveerd doorheen de evolutie, wat maakt dat de stress responsen gelijkend zijn over phyla heen (Hawlena & Schmitz, 2010; Hawlena *et al.*, 2011). Ze zijn dus waarschijnlijk vroeg in simpele organismen ontstaan en dan verbeterd geweest doorheen de evolutie, wat maakt dat het beschouwde neuroëndocriene systeem in Invertebrata een subset betreft van dat van de Vertebrata (Hawlena & Schmitz, 2010).

Chemische, visuele en vocale stimulatie door predatoren bijvoorbeeld kan stress responsen opwekken, alsook of samen met alarmsignalen van conspecifieken (Sunardi *et al.*, 2007, Hawlena & Schmitz, 2010). Na deze sensorische stimuli ontvangen te hebben, begint de fysiologische cascade van processen die de stress respons inzetten. Deze cascade staat afgebeeld in Figuur 1.



Figuur 1: Schema van de primaire neuroëndocriene systemen SAM en HHA bij zoogdieren. SAM: sympathisch-adrenaal-medullaire as. HHA: hypothalamus-hypofyse-adrenale as. Hormonen zijn in het oranje aangeduid.

Wanneer de hypothalamus geactiveerd wordt, laat hij *corticotropine releasing factor* (CRF) vrij (De Souza & Nemeroff, 1990). Dit hormoon activeert de SAM as (pathway bovenaan) en de HHA as (pathway onderaan). De SAM as bestaat eruit dat de bijnier snel reageert in antwoord op de verhoogde levels CRF en catecholamines, zoals adrenaline en noradrenaline, vrijgeeft (Goligorsky, 2001; Hawlena & Schmitz, 2010). De excitatie van de SAM as eindigt ten laatste na een paar minuten. De HHA as wordt trager geactiveerd, maar blijft langer werkzaam. Bij verhoogd level van CRF laat de hypofyse adrenocorticotropine vrij. Grote hoeveelheid van dit hormoon zorgt voor de aanmaak en secretie van glucocorticosteroiden, zoals corticosteron en cortisol, door de bijniercortex of adrenocorticale homologen in andere taxa (Hawlena & Schmitz, 2010). Door de feedback loop van de glucocorticosteroiden naar de hypothalamus en de hypofyse, wordt verdere uitscheiding van CRF en adrenocorticotropine geïnhibeerd (Rich & Romero, 2005; Hawlena & Schmitz, 2010).

Activering van de SAM as (zie Figuur 1 bovenaan) door een stressor gebeurt binnen tienden van een seconde en maakt het lichaam klaar voor een plotse fysieke reactie (Hawlena & Schmitz, 2010). Deze is de '*fight-or-flight reaction*' (vecht-of-vlucht reactie), waarbij het organisme dus ofwel nadert en vecht ofwel wegvlucht (Cannon, 1915; Goligorsky, 2001). De respiratie, de bloeddruk en de hartslag worden verhoogd en de activiteit van het spijsverteringsstelsel verlaagt. De HHA as daarentegen wordt trager geactiveerd, maar blijft ook langer werkzaam (tot een paar uur). Deze as zorgt ervoor dat vitale organen zoals de hersenen voldoende energie toebedeeld krijgen, zodat organismen kunnen overleven zolang de dreiging aanwezig is. Glucocorticosteroiden bevorderen de gluconeogenese, d.i. de synthese van glucose uit de afbraak van noncarbohydrate precursors (Berg *et al.*, 2002). Ze verhogen ook de cardiovasculaire functie, de bloeddruk en respiratie (Bonga, 1997). Daartegenover staat dat ze de reproductie en groei tegenhouden en de immuunfunctie inhiberen (Hawlena & Schmitz, 2010).

De verhoogde synthese van 'heat shock' proteïnen (Hsp) is een andere fysiologische respons op stress. Deze goed geconserveerde proteïnen zijn belangrijk voor het transport van proteïnen doorheen membranen in de cel, assisteren bij het maken van correcte proteïnenconformaties en voorkomen ongewilde proteïneaggregaties. Met andere woorden, *heat shock* proteïnen beschermen cellulaire functies en zijn in groter aantal nodig bij stress. Anderzijds brengt een verhoogde aanmaak ervan ook kosten met zich mee. Veel energie is nodig voor de synthese van Hsp's, normale celfuncties kunnen aangetast worden en ze kunnen zelfs toxisch worden. Bijgevolg vermindert de aanmaak van *heat shock* proteïnen na een paar uur weer tot op het normale niveau (Sørensen *et al.*, 2003; Hawlena & Schmitz, 2010).

Zoals hierboven vermeld is de stress respons van Invertebrata en Vertebrata waarschijnlijk uit eenzelfde ancestrale systeem geëvolueerd (Hawlena & Schmitz, 2010; Adamo & Baker, 2011). Gelijkend aan het SAM systeem in vertebraten is het octopaminergisch systeem in invertebraten (Adamo *et al.*, 2013). Bij aanvang van de stress respons in insecten wordt octopamine, een afgeleide van tyrosine en chemisch verwant aan noradrenaline, vrijgelaten door neuronen van het centrale zenuwstelsel (corpus cardiacum) in de hemolymfe (Fields & Woodring, 1991; Adamo & Baker, 2011). Door te binden met receptoren van het  $\alpha$ -adrenerge type en zo via cAMP (cyclisch adenosinemonofosfaat) het fosforylase systeem te activeren, verhoogt octopamine de lipiden- en suikerniveaus (Fields & Woodring, 1991). Evenals het HHA systeem in vertebraten, wordt bij insecten door de invloed van octopamine na ongeveer 30 minuten een tweede hormoon vrijgelaten, het peptide 'adipokinetisch hormoon' (Adamo & Baker, 2011). Dit hormoon verhoogt ook het vetniveau (Fields & Woodring, 1991). Adamo en Baker (2011) toonden aan dat in de Texaanse veldkrekkel (*Gryllus texensis*) door aanhoudende *fight-or-flight* stress de basale niveaus van het neurohormoon octopamine verhoogd waren. Dit onderbouwt de hypothese dat de stijging van stresshormoon niveaus een fylogenetisch gelijkende respons is. Bovendien zijn er ook bij insecten baten en kosten verbonden aan een stress reactie (Adamo *et al.*, 2013). Bij krekels is bijvoorbeeld een verlaagde resistentie aan ziekten en gewichtsverlies aangetoond (Adamo & Parsons, 2006; Adamo & Baker, 2011).

Wanneer een organisme enkel te maken krijgt met een korte termijn blootstelling aan een stressor, kan het fysiologische evenwicht voor verstoring volledig hersteld worden zonder schade. Wanneer er echter meerdere korte termijn blootstellingen zijn of een continue blootstelling, kan het zijn dat de hormoon- en Hsp-balans niet naar het originele niveau hersteld kunnen worden (Hawlena & Schmitz, 2010). Zo blijft het organisme in een verlengde staat van '*emergency life-history stage*' (Wingfield *et al.*, 1998), wat betekent dat essentiële lichaamsfuncties verlengd geïnhibeerd blijven,

dat de nutritionele balans verstoord blijft en dat destructieve effecten op moleculair en cellulair niveau zich opstapelen. Deze kosten verbonden aan de stress reactie kunnen dieren oplossen door bijvoorbeeld de kracht van de stress respons te laten afnemen met de tijd en de grootte van hun responsen aan te passen aan het effectieve predatie risico. De directe effecten van fysiologische stress kunnen opgesomd worden als zijnde inhibitie van groei, reproductie en ontwikkeling, alsook het aantasten van de immunocompetentie en de werking van het spijsverteringsstelsel. Stress heeft daarenboven ook indirecte effecten. Door de verhoogde hormoon levels verhoogt het metabolisme en de cardiovasculaire functie. Samen met de verhoogde levels van Hsp's zorgt dit voor meer energieverbruik door het dier, ook wanneer het in rust is. In nutriëntarme omgevingen kan dit tot energietekort voor productie leiden. Onthoud hierbij ook de verminderde spijsverteringsfunctie, en door dit alles vermindert de normale conversie efficiëntie van geassimileerde nutriënten naar lichaamssweefsels (Hawlana & Schmitz, 2010). Door de verhoogde aanmaak van glucose en dus het gebruik van proteïnen voor gluconeogenese, stijgt daarbij de excretie van stikstof en verhoogt de C:N ratio in het lichaam (Hawlana & Schmitz, 2010; Costello & Michel, 2013). Sunardi *et al.* (2007) bijvoorbeeld hebben bij Blauwbandgrondels (*Pseudorasbora parva*) in reactie op predatiestress een verhoogde metabolische activiteit, verhoogde ventilatie en een verlaagde algemene activiteit waargenomen. De sterkte van de responsen hingen af van het type signalen dat de vissen kregen en van andere omgevingsfactoren, hier de snelheid van de stroming. Stoks *et al.* (2005) vonden een verlaagde proteïne- en vetinhoud bij de waterjuffer *Enallagma aspersum* na predatiedruk. Steiner en Van Buskirk (2009) tenslotte zagen bij kikkervisjes van de Bruine kikker (*Rana temporaria*) als korte termijnreactie een verhoogd zuurstofgebruik, maar bij verlengde predatorblootstelling verlaagde het zuurstofgebruik weer.

## **1.2 Gedragssyndromen**

---

De studie van persoonlijkheid bij dieren kent de laatste 15 tot 20 jaar een enorme bloei. Dit lijkt historisch-wetenschappelijk gezien nog niet lang. Het pioniersonderzoek echter dateert van begin 20ste eeuw, wanneer Ivan Pavlov op basis van zijn onderzoek op honden persoonlijkheidskenmerken van dieren kwantificeerde (Gosling, 2008). Ook Robert Yerkes met zijn onderzoek naar gedrag bij primaten in 1939 (Trewin, 2007) droeg bij tot het pioniersonderzoek. Afgezien van deze onderzoeken echter werd dierlijke persoonlijkheid in de 20ste eeuw weinig tot niet bestudeerd. Het bestaan ervan werd zelfs sterk betwijfeld (Gosling, 2008). In het volgende deel wordt dieper ingegaan op algemene aspecten van persoonlijkheid of ook gedragssyndromen bij dieren, waarna het deel '1.1.2 Schuw-stoer syndroom' zich specifiek richt op de '*boldness*' (stoerheid) persoonlijkheidstak.

### 1.2.1 Algemeen

Mensen verschillen onderling in persoonlijkheid, waarbij sommige mensen bijvoorbeeld eerder ingetogen zijn en andere dan weer uitbundig. Het feit dat personen consistent kunnen verschillen in gedrag (hier mate van uitbundigheid) over situaties (vb. zowel in aanwezigheid van onbekende mensen als in familiale kring) heen, kan worden uitgedrukt als een gedragscorrelatie aanwezig over verschillende situaties. Een analoog van persoonlijkheid werd aanvankelijk bestudeerd bij primaten, knaagdieren en gedomesticeerde dieren (Sih *et al.*, 2004). 'Dierlijke persoonlijkheid' werd recenter door gedragsecologen en ethologen aanvaard en gedocumenteerd bij een breder taxonomisch spectrum van diergroepen (Gosling, 2001). Dieren kunnen namelijk geen onbeperkt flexibel gedrag vertonen en vertonen intraspecifieke verschillen in gedrag. Deze verschillen blijken bovendien grotendeels consistent over tijd en situatie te zijn. Dit alles pleitte voor het erkennen van het bestaan van persoonlijkheid (of 'temperament') bij dieren (Sih *et al.*, 2004; Bell, 2007; Réale *et al.*, 2007).

Reeksen van gecorreleerde kenmerken, zoals bijvoorbeeld levensgeschiedenissenkenmerken, worden 'syndromen' genoemd door evolutiebiologen ('levensgeschiedenis syndromen'). Bijgevolg refereerden Sih *et al.* (2004) naar series van gecorreleerd gedrag met 'gedragssyndromen' als ecologisch synoniem voor persoonlijkheid. Een gedragssyndroom wordt gedefinieerd als verschillen in gecorreleerd gedrag tussen individuen over tijd, zowel binnen een gegeven gedragscontext als tussen contexten (Sih *et al.*, 2004; Dingemanse & Réale, 2005; Gosling, 2008). Een gedragscontext is een functionele gedragscategorie zoals paren, eten, vechten en antipredator gedrag (Sih *et al.*, 2004). Gecorreleerd gedrag wijst dan weer op consistentie van gedrag over situaties heen en series hiervan kunnen vertoond worden door populaties of soorten, terwijl een individu *in se* een bepaald gedragstype (zoals stoer of schuw) bezit (Sih *et al.*, 2004). Met consistentie wordt vooral bedoeld dat het verschil in gedrag tussen individuen grotendeels bewaard blijft en niet zozeer dat het gedragstype niet kan veranderen door omgevingsveranderingen of door leeftijd (Réale *et al.*, 2007). Bij het beschouwen van bijvoorbeeld een activiteitssyndroom zijn er actieve en eerder passieve organismen. Ze kunnen hun graad van activiteit wel aanpassen naargelang de omstandigheden, maar in beperkte mate, zodat de originele 'rangorde' behouden blijft (Sih *et al.*, 2004). Actieve individuen gaan het beter doen dan passieve in bepaalde contexten (bv. foerageergedrag) afhankelijk van de situatie (predator aanwezig of niet) en *vice versa*. In (gedrags)ecologische studies is het dus best om rekening te houden met gedragssyndromen. Allereerst tonen gedragssyndromen aan dat gedrag niet oneindig plastisch is, zoals eerder vaak aangenomen. Individuen zijn met andere woorden niet in staat om in iedere context het optimale gedrag te vertonen.

Dit lijkt misschien niet adaptief, maar door onvoorspelbaarheid van de omgeving zou de kost van het fouten maken door plasticiteit groter zijn dan dat de dieren een consistent, stabiel gedragstype bezitten en daarmee rekening kunnen houden. Gedragssyndromen zijn dus wel adaptief, omdat zo met variabele omstandigheden kan omgegaan worden. Gedragssyndromen zelf kunnen dan ook evolueren in populaties. Hierbij kan ook frequentieafhankelijke selectie het naast elkaar bestaan van verschillende gedragstypes vergemakkelijken (Sih *et al.*, 2004). Wanneer de kost van flexibiliteit, en/of het voordeel van consistentie groot is, kunnen onderscheiden gedragstypes behouden blijven en naast elkaar bestaan (Dall *et al.*, 2004). De beperkte individuele plasticiteit in gedrag is vooral belangrijk in het kader van klimaatsverandering en de vraag of organismen ermee kunnen omgaan.

Daarnaast helpen gedragssyndromen inter-individuele variatie in gedrag te behouden omdat wisselende omstandigheden selecteren voor gepaste gedragstypes. Bovendien brengt het bestaan van gedragssyndromen met zich mee dat gedrag en prestatie best overheen meerdere situaties en in verscheidene gedragscontexten worden bestudeerd (Sih *et al.*, 2004). Door de verscheidenheid aan impacten en interacties is persoonlijkheid dus een belangrijke factor om rekening mee te houden in iedere vorm van ecologisch onderzoek. Zo hebben Hulthén en collega's (2014) ook een correlatie gevonden tussen een gedragssyndroom en induceerbare morfologische verdedigingen bij de Kroeskarper (*Carassius carassius*). Stoere organismen blijken na predatorbehandeling meer uitgesproken verdedigingen, specifiek een grotere lichaamsdiepte, te vertonen en ook een grotere morfologische plasticiteit te bezitten.

Een gedragssyndroom kan tenslotte ook een associatie betekenen tussen verschillende gedragstypes, zoals een agressiviteit-stoerheid syndroom (Sih *et al.*, 2004; Niemelä *et al.*, 2012). Het feit dat deze gedragstypes gecorreleerd kunnen zijn, houdt in dat onderzoek zich best focust op de evolutie van gedragscontexten samen in plaats van apart (Sih *et al.*, 2004). Reeds bij vele groepen van dieren is persoonlijkheid bestudeerd, vooral binnen de Vertebrata (Gosling, 2008; Baugh *et al.*, 2012; Hebert *et al.*, 2014). Gosling (2001) geeft een overzicht van bestudeerde soorten en zie Mittelbach *et al.* (2014) voor een overzicht van persoonlijkheidsonderzoek op vissen. Recent onderzoek focust zich echter niet alleen op Vertebrata, maar ook op Invertebrata (Gosling, 2008). Dit is belangrijk om een algemener beeld te kunnen krijgen op dierlijke persoonlijkheid, gezien Invertebrata toch 98% van het dierenrijk uitmaken (Kralj-Fišer & Schuett, 2014).

### **1.2.2 Schuw-stoer syndroom**

Gedragssyndromen worden meestal gescoord door middel van kwantificeerbare gedragscontexten (Gosling, 2008). Gedrag dat men hierbij kan onderzoeken is bijvoorbeeld de activiteit in een nieuwe situatie of antipredator gedrag (Carazo *et al.*, 2014; Clary *et al.*, 2014).

Dit specifiek gedrag (bv. activiteit) wordt dan op een persoonlijkheidsas geprojecteerd (hier: as gaande van passief naar actief), en men kwantificeert het individuele gedrag naargelang zijn plaats op de as (bv. eerder passief). Ieder gedragstype (bv. stoerheid) beslaat een persoonlijkheidsas, zoals de schuw-stoer as. Binnen de context van antipredator gedrag bijvoorbeeld, kan één organisme eerder schuw ('*shy*') reageren en een ander meer stoer ('*bold*') zijn. Op deze manier kunnen individuele dieren geclassificeerd worden naargelang hun specifieke respons. Réale *et al.* (2007) stellen vijf categorieën van gedragstypes voor: stoerheid, activiteit, nieuwsgierigheid, agressiviteit en socialiteit. Stoerheid of het schuw-stoer continuüm is een goed bestudeerde persoonlijkheidsas. Deze as betreft de mate waarin een individu risico neemt of nog hoe het zich gedraagt in een risicovolle, doch geen nieuwe, situatie (Réale *et al.*, 2007). Een concrete terminologie voor de verschillende gedragstypes zoals voorgesteld door Réale *et al.* (2007), is aangewezen zodat tests kunnen geoptimaliseerd worden en geen twijfel laten over welk gedragstype er onderzocht wordt. Zo zou er in stoerheidtests geen nieuw element mogen zitten. Immers vaak wordt stoerheid verward met nieuwsgierigheid, waarbij gekeken wordt naar exploratiegedrag in nieuwe situaties. Een strikte definitie voor stoerheid en unaniem gebruikte contexten om stoerheid te bestuderen zijn er echter niet. Maten om stoerheid te scoren zijn nog steeds arbitrair en meestal wordt getracht om binnen het specifieke onderzoek de meest gepaste gedragscontext te gebruiken.

Van het schuw-stoer continuüm is al meermaals de herhaalbaarheid bewezen. Dieren blijken effectief binnen situaties (Thomson *et al.*, 2011; Hulthén *et al.*, 2014) en over de loop van hun leven heen (Sinn *et al.*, 2008; Brodin, 2009) een consistente stoerheid te bezitten, wat mede het bestaan bewijst van gedragssyndromen bij verscheidene taxa. Er worden echter uiteenlopende resultaten gevonden wat betreft het inter-situationele gedrag (zie bijvoorbeeld Sinn *et al.* (2008) en Hebert *et al.* (2014)).

### **1.2.3 Persoonlijkheid en fysiologie**

Volgens de theorie van Tinbergen is er om de verschillen in persoonlijkheid (*ultimate causes*) volledig te verklaren, ook kennis nodig van de fysiologische en genetische basis (*proximate causes*) (Alcock, 2013). Verschillen in persoonlijkheid lopen namelijk zeker gedeeltelijk samen met verschillen in neuroëndocriene activiteit tussen individuen (Koolhaas *et al.*, 1999; Carere *et al.*, 2010; Sepp *et al.*, 2014). Er zijn drie mogelijke manieren waarop verschillen in stressfysiologie en verschillen in persoonlijkheid gelinkt kunnen worden. Ofwel bepaalt stressfysiologie de persoonlijkheid, ofwel bepaalt gedrag de stressfysiologie, ofwel worden ze allebei samen bepaald door additionele factoren (Carere *et al.*, 2010). Bekeken vanuit het *ultimate* perspectief kan correlatie misschien een beter licht werpen op de relatie tussen persoonlijkheid en stressfysiologie in plaats van een causaal verband tussen de twee. Het is zeer goed mogelijk dat de twee kenmerken door correlationele selectie zijn gecoëvolueerd.



Persoonlijkheid zou volgens de "*pace-of-life syndrome*" hypothese geëvolueerd zijn als gedragscomponent van specifieke levensgeschiedenisstrategieën in populaties of gerelateerde soorten. Deze kunnen namelijk in verschillende ecologische omstandigheden leven, waardoor ze aangepaste levensgeschiedenissen kenmerken hebben die geëvolueerd zijn met bepaalde fysiologische kenmerken (Réale *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012). Zo kunnen er organismen zijn die onder aanhoudende predatiedruk leven en bijvoorbeeld een hoog metabolisme, een lage immuunrespons en een hoge gevoeligheid aan oxidatieve stress bezitten. Deze fysiologische kenmerken hangen samen met levensgeschiedenissen kenmerken als een snelle groei, een vroege reproductie en een korte levensduur. Gedragskenmerken die bij zulke organismen dan vaak terugkomen zijn hoge agressiviteit en activiteit (d.i. snelle *pace-of-life*, zie 1.3.1) (Réale *et al.*, 2010). Het is echter belangrijk dat persoonlijkheid onderscheiden wordt van *coping style* (omgangsstrategie). Waar persoonlijkheid enkel de gedragscomponent omvat, is omgangsstrategie een individuele coherente set van gedrag en neuroëndocriene responsen die ook consistent is doorheen de tijd (Koolhaas *et al.*, 1999). Omgangsstrategie beslaat m.a.w. het geheel van gedrag en fysiologische responsen waarmee het een evolutionaire en adaptieve aanpassing is in respons op uitdagingen uit de natuurlijke omgeving (Réale *et al.*, 2007).

### ***1.3 Predatie en gedragssyndromen geïntegreerd***

---

Predatiedruk kan als selectieve kracht een rechtstreekse invloed hebben op de fitness van gedragssyndromen. Uit een studie door Teyssier *et al.* (2014) is gebleken dat vrouwelijke Levenbarende hagedissen (*Zootoca vivipara*) in een omgeving met predatoren, eerder paren met schuwe mannetjes. In een predatorluwe omgeving daarentegen, kiezen ze voor stoere mannetjes. Paarkeuze van een vrouwtje kan dus afhangen van de predatiedruk (zie ook Pilakouta & Alonzo, (2014)). Stoere organismen hebben meer te lijden onder predatiedruk (Smith & Blumstein, 2008) en dus selecteert het wijfje schuwe mannetjes in aanwezigheid van een predator. Predatiedruk heeft echter niet alleen effect op de fitness en dus selectie op stoerheid, maar ook rechtstreeks op het gedragstype van een individu. Onder predatiedruk kan de variantie in gedrag vergroten. Schuwe individuen van de Veldkrekkel (*Gryllus integer*) werden meer stoer in aanwezigheid van een predator en *vice versa* (Niemelä *et al.*, 2012). Bovendien kunnen omgevingseffecten, zoals predatie en pollutie, gedragssyndromen verstoren (Hebert *et al.*, 2014). Zo kan verhoogd predatie risico de consistentie van verschillen in gedrag verbreken (Niemelä *et al.*, 2012). In het volgende deel wordt de theorie achter omgangsstrategieën belicht omdat deze een manier biedt om voorspellingen te maken over de link tussen gedragssyndromen, antipredatie gedrag en fysiologie. In het deel '1.3.2 Kosten van antipredator gedrag' tenslotte wordt kort ingegaan op de groei/predatierisico ruilfunctie.

### 1.3.1 Proactief-reactief continuüm

Koolhaas *et al.* (1999) beschreven het proactief-reactief continuüm. Dit is het spectrum van omgangsstrategieën waarover gesproken in 1.2.3. Stoere organismen zijn veelal organismen met een proactieve omgangsstrategie. Dit betekent dat ze territoriaal zijn, over het algemeen ook actiever en agressiever zijn en meer foerageergedrag vertonen, waardoor ze makkelijker aan voedsel geraken. Dit impliceert echter ook dat ze een makkelijkere prooi kunnen vormen (Smith & Blumstein, 2008). Hierdoor gaan ze vroeger matureren en reproduceren om hun fitness te vergroten. Hun metabolisme werkt dan ook sneller, ze hebben een hogere productiviteit en een hogere groeisnelheid (Careau *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012). Dit alles kan dus geassocieerd worden met een snelle *pace-of-life* (Réale *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012). Reactieve en dus schuwe organismen zijn daarentegen minder productief, hebben een trager metabolisme en worden dus in het algemeen geassocieerd met een trage *pace-of-life* (David *et al.*, 2012). Ze zijn veel minder actief en agressief en trekken zich makkelijker terug (Koolhaas *et al.*, 1999). Zij moeten goed zoeken naar voedsel, en zijn daardoor gevoeliger aan veranderingen in hun omgeving. Dit maakt ze reactiever ten opzichte van bijvoorbeeld stressoren en ze vertonen meer plasticiteit in hun gedrag (Thomson *et al.*, 2011). Ze hebben dus een groter aanpassingsvermogen dan een proactief organisme (Koolhaas *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008). Reactieve individuen zijn kortom bevoordeeld in een veranderende omgeving, maar in stabiele omgevingen hebben proactieve dieren het voordeel (Sih *et al.*, 2004). Hulthén *et al.* (2014) hebben inderdaad gezien dat schuwe Kroeskarpers (*Carassius carassius*) hun stoerheid score meer konden veranderen dan de stoere vissen.

Fysiologisch gezien activeert een stresssituatie bij reactieve, schuwe individuen vooral het parasympathisch zenuwstelsel, waardoor de responsen van de HHA as groter zijn en er dus meer glucocorticosteroiden aangemaakt worden. Proactieve, stoere individuen daarentegen reageren vooral op stress door activering van het sympathisch zenuwstelsel, een vergrote SAM respons dus een toename in noradrenaline excretie (Carere *et al.*, 2010; Clary *et al.*, 2014; Sepp *et al.*, 2014). Een verhoogde activering van het sympathisch zenuwstelsel binnen de omgangsstrategie (vooral de proactieve) heeft een vergrote kans op hartonregelmatigheden en -problemen in het latere leven tot gevolg (Carere *et al.*, 2010). Ook hier echter is er geen eenzijdig resultaat gekomen. Kralj-Fišer *et al.* (2010) zagen bij de Grauwe gans (*Anser anser*) dat in een stresssituatie de agressieve (proactieve) individuen een hogere hoeveelheid aan stresshormoon produceerden. Garamszegi *et al.* (2012) vonden zelfs helemaal geen verband tussen corticosteron levels en gedragsyndromen bij de Withalsvliegenvanger (*Ficedula albicollis*), en Sepp *et al.* (2014) bij de Groenling (*Carduelis chloris*) evenmin. Belangrijk dus bij onderzoek naar de link tussen stressfysiologie en gedragsyndromen is dat vele factoren in acht genomen worden, zoals intensiteit en duur van de stressor, de controleerbaarheid en voorspelbaarheid van de stresssituatie en de

adaptieve capaciteit en het proactief/reactief karakter van het organisme (Koolhaas *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Kosten van antipredator gedrag

Het vertonen van antipredator gedrag draagt kosten met zich mee. Lima (1998) beschreef de ruilfunctie waarmee prooidieren in aanwezigheid van een predator te kampen krijgen. Een organisme moet energie steken in antipredator gedrag en moet het zoeken naar eten ook uitstellen. Zo kunnen ze met andere woorden minder energie steken in hun groei. Deze ruilfunctie wordt de groei/predatierisico ruilfunctie genoemd. De ruilfunctie doet zich in twee situaties voor (Sih *et al.*, 2003). De eerste betreft een intrasituationeel conflict, waarbij er meestal sprake is van een tijdsbudget conflict. Wanneer organismen actiever zijn, vinden ze meer voedsel en groeien ze sneller. De tweede is dan een conflict overheen situaties. In de aanwezigheid van een predator lijden de actievere organismen namelijk meer onder de predatiedruk, maar ze doen het beter als er geen predatoren in de buurt zijn. Een onbeperkte plasticiteit van gedrag zou in deze situatie dus ook soelaas bieden, maar het bestaan van gedragssyndromen en het intersituationeel conflict leggen wederom uit waarom de plasticiteit beperkt is (zie ook 1.2.1) (Sih *et al.*, 2003; Brodin, 2009). De groei/predatierisico ruilfunctie kan bewerkstelligd worden door een verlaagde foerageeractiviteit zodat minder voedsel wordt opgenomen. Hij kan echter ook een fysiologische basis hebben. Indien energie gestoken wordt in overleving van de dreiging en niet in productie, groeit het organisme niet verder (zie 1.1.3) (Steiner & Van Buskirk, 2009). Hiertegenover biedt een studie van Jones *et al.* (2011) een andere kijk op de ruilfunctie tussen foerageren en zich gedeisd houden voor predatoren. Hier wordt specifiek de ruilfunctie bedoeld waarmee intermediaire predatoren te maken krijgen, zoals waterjufferlarven en spinnen. Jones en collega's hebben de invloed van de stoffen octopamine en serotonine op antipredator gedrag bij de Rietkruisspin (*Larinioides cornutus*) bekeken. Octopamine blijkt op korte termijn de duur van de thanatosis te verkorten. Serotonine daarentegen verlengt de thanatosis en dit langer dan 24 uur. Op activiteit en zwemsnelheid daarentegen blijken de stoffen geen invloed uit te oefenen. De hormonen hebben dus enkel effect op het antipredator gedrag, het foerageergedrag (activiteit) staat hier los van. Doordat er sprake is van twee hormonen met tegengesteld effect, kunnen spinnen hun antipredator gedrag aanpassen naargelang het effectieve gevaar. Indien enkel serotonine geactiveerd wordt, zou de spin kostbare foerageertijd verliezen wanneer de predatiedreiging geweken is. Indien echter enkel octopamine wordt vrijgegeven, zou de spin uit zijn thanatosis komen voordat de predator weg is. Zij hebben hiermee dus een fysiologische ondersteuning blootgelegd voor het feit dat spinnen tegelijk actief moeten kunnen jagen, maar zelf voorzichtig moeten zijn. Dit voorbeeld bewijst wederom dat er nog steeds zeer weinig geweten is over de link tussen gedragssyndromen en het algemeen stressparadigma.

## **1.4 Doelstelling en hypotheses**

---

### **1.4.1 Doelstelling**

Verscheidene literaire bronnen melden variatie in het algemeen stress paradigma, zowel tussen soorten (bijvoorbeeld Stoks *et al.*, 2005), als binnen soorten (reviews: Carere *et al.*, 2010; Koolhaas *et al.*, 2010). Het hoofddoel van dit thesisonderzoek is om verschillen in de sterkte van de predatorgeïnduceerde stressrespons te verklaren aan de hand van persoonlijkheid. Hiervoor gebruiken we twee soorten waterjufferlarven, *Enallagma cyathigerum* en *Ischnura elegans*.

(1) We gaan focussen op de schuw-stoer persoonlijkheidsas om persoonlijkheid van de waterjufferlarven te scoren en we gaan de individuele stoerheid bepalen. We scoren tweemaal de persoonlijkheid in standaard omstandigheden, waarna we de larven zullen onderwerpen aan een controle- of predatorbehandeling. Nadien wordt wederom de persoonlijkheid gescoord. Binnen één soort is het de bedoeling om de consistentie van de stoerheid te onderzoeken, zowel in eenzelfde situatie (d.i. voor het toedienen van een behandeling en voor en na een controlebehandeling) als tussen verschillende situaties (d.i. voor en na een predatorbehandeling).

(2) Vervolgens bekijken we de fysiologische stress respons van iedere larf. Dit doen we aan de hand van enkele sleutelcomponenten van het algemeen stressparadigma, met name glucose, glycogeen, triglyceriden en proteïnen. We gaan statistisch na of de intraspecifieke variatie in predatorgeïnduceerde stress gelinkt is aan de individuele persoonlijkheidsverschillen. Daarbij willen we ook de invloed van predatiedruk op de zwemsnelheid van de ontsnappingsspurten en de gezamenlijke invloed van persoonlijkheid en predatiestress op de groei van de larven nagaan.

(3) We onderzoeken tenslotte of er een persoonlijkheidsverschil bestaat tussen twee soorten, *Enallagma cyathigerum* en *Ischnura elegans*. Daarbij bekijken we of de persoonlijkheidsgebonden variatie tussen de soorten samenhangt met een interspecifiek verschil in de predatorgeïnduceerde stressrespons.

### **1.4.2 Hypotheses**

(1) We verwachten dat we binnen een soort een bereik van persoonlijkheden gaande van schuw naar stoer zullen zien, met een consistentie van deze persoonlijkheid zowel binnen als tussen situaties (Sih *et al.*, 2004; Réale *et al.*, 2007). De predatorbehandeling zou een grotere variatie in individuele persoonlijkheid kunnen veroorzaken (Niemelä *et al.*, 2012). Aangezien geweten is dat reactieve en dus schuwe individuen een groter aanpassingsvermogen hebben en meer plasticiteit vertonen in hun gedrag (Wolf *et al.*, 2007, 2008) en stoere individuen minder, verwachten we dat de stoere individuen een relatief minder grote persoonlijkheidsaanpassing ondergaan.

De schuwe organismen daarentegen zouden een breder persoonlijkheidsbereik hebben, waardoor ze relatief meer stoer kunnen worden bij predatorblootstelling.

(2) De theorie van de fysiologische stressrespons voorspelt een algemene daling van de hoeveelheid opgeslagen proteïnen en vetten bij blootstelling aan een predator (Hawlana & Schmitz, 2010). Schuwe organismen zouden daarentegen wel hogere glucose waarden bezitten na predatorbehandeling, daar ze een reactieve omgangsstrategie hebben (Carere *et al.*, 2010; Hawlana & Schmitz, 2010; Clary *et al.*, 2014; Sepp *et al.*, 2014). Ook verwachten we door de verhoogde adipokinetische respons bij schuwe insecten een hoger vetgehalte (Fields & Woodring, 1991; Hawlana & Schmitz, 2010) We verwachten een daling van zwemsnelheid bij de predatorgeïnduceerde larven door de verhoogde fysiologische stressrespons (Janssens & Stoks, 2014). Stoere individuen zouden bovendien een hogere groeisnelheid hebben (Careau *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012), en bij larven die een predatorbehandeling ondergaan hebben, verwachten we volgens de groei/predatierisico ruilfunctie een verminderde groei (Lima, 1998).

(3) McPeck (2004) vond een hogere activiteit in afwezigheid van een predator bij *Ischnura verticalis* larven dan bij *Enallagma* sp. larven. Daar activiteit en stoerheid een gedragsyndroom kunnen vormen en gelinkt zijn volgens de omgangsstrategieën (*coping styles*) theorie, verwachten we bijgevolg dat de *Ischnura elegans* larven in het algemeen stoerder zullen zijn dan *Enallagma cyathigerum* larven (Koolhaas *et al.*, 1999; Hawlana & Schmitz, 2010). Bovendien is aangetoond dat *Ischnura* sp. larven sneller groeien bij predatiedreiging doordat ze efficiënter geassimileerd voedsel omzetten in hun lichaam (McPeck *et al.*, 2001; McPeck, 2004; Stoks *et al.*, 2005). Stoks *et al.* (2005) toonden aan dat *Enallagma* sp. larven lagere hoeveelheden proteïnen en triglyceriden bezitten bij predatordreiging, terwijl de waarden bij *Ischnura* sp. gelijk blijven. Er is echter geen verschil gevonden in de glucose- en glycogeenwaarden. Dus we verwachten tenslotte dat *Enallagma cyathigerum* larven bij predatorbehandeling lagere hoeveelheden proteïne en triglyceriden bezitten dan de *Ischnura elegans* larven uit dezelfde behandeling, maar dat er geen verschil te zien zal zijn in glucose waarden tussen de twee soorten.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Studieorganismen

---

#### 2.1.1 Waterjufferlarven

Waterjuffers behoren tot het fyllum van de Arthropoda (geleedpotigen), klasse Insecta (insecten), orde Odonata (libellen) en suborde Zygoptera (juffers). In dit onderzoek werden twee soorten gebruikt, *Enallagma cyathigerum* (Watersnuffel; zie Figuur 2 a en b) en *Ischnura elegans* (Lantaarntje; Figuur 2 c en d). Deze behoren beide tot de familie van de Coenagrionidae (waterjuffers) (Suhling *et al.*, 2015). De libellen behoren tot de superorde van de Exopterygota of Heterometabola en tot de groep der Hemimetabola. Dit wil zeggen dat ze geen volledige metamorfose ondergaan en ze overgaan van het larfstadium naar het imagostadium, zonder een popstadium. Hierbij ontwikkelen de larven geleidelijk externe vleugels. (Suhling *et al.*, 2015) Waterjuffers kennen een semi-aquatische levenscyclus, waarbij de larven in zoet water leven en de adulten op het land. Zowel de larven als de adulten zijn predatoren en de larven vormen een groep van intermediaire aquatische predatoren die bovendien kannibalistisch zijn (Johnson, 1991; Suhling *et al.*, 2015). Dit maakt dat ze geschikt zijn voor gedragsecologisch onderzoek, in die zin dat ze niet alleen zelf prooi moeten lokaliseren, maar daarbij ook zelf moeten voorkomen om zichtbaar te zijn voor predatoren (Johnson, 1991). Hieraan hebben ze zich onder andere gedragsmatig aangepast door persoonlijkheden te ontwikkelen (zie 1.2.1). Zowel persoonlijkheid (Brodin, 2009; Slos *et al.*, 2009), als antipredator gedrag (McPeck *et al.*, 2001; Gyssels & Stoks, 2005) en fysiologische stressreacties op predatie (Stoks *et al.*, 2005; Slos & Stoks, 2008) zijn reeds uitvoerig onderzocht bij waterjufferlarven.

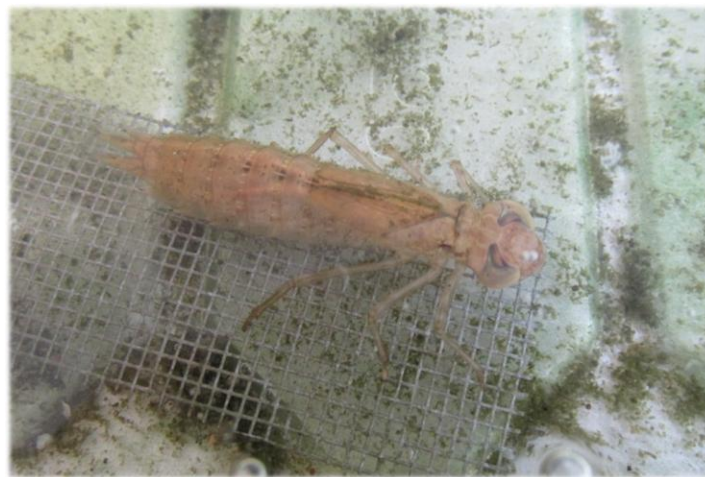


Figuur 2: a) en b) tonen resp. een larve en een paringswiel van *Enallagma cyathigerum*. In het paringswiel is de blauwe het mannetje en de bruine het wijfje. c) en d) tonen resp. een larve en een paringswiel van *Ischnura elegans*. In het paringswiel zit het mannetje bovenaan en het wijfje onderaan. (b) [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Enallagma\\_cyathigerum\\_1%28loz%29.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Enallagma_cyathigerum_1%28loz%29.jpg) en d) [http://www.libellulesmaizieres.fr/zygoptera/ischnura\\_elegans\\_accouplements.html](http://www.libellulesmaizieres.fr/zygoptera/ischnura_elegans_accouplements.html))

Door een verschillende groei/predatierisico strategie, kunnen larven van Noord-Amerikaans *Enallagma* en *Ischnura* soorten co-existeren. In aanwezigheid van een predator, groeien *Ischnura* larven sneller dan *Enallagma* larven, maar lijden ze tegelijkertijd onder een verhoogde mortaliteit (McPeek, 1996, 2004; McPeek & Peckarsky, 1998). Dit verschil in groeisnelheid ligt niet aan een verschillend eetgedrag, maar een verhoogde voedselomzetting in het lichaam bij *Ischnura* (McPeek *et al.*, 2001). Meer bepaald converteren deze laatste efficiënter geassimileerd voedsel naar eigen lichaamsmassa in aanwezigheid van predatoren en dit vertaalt zich in een hogere concentratie aan proteïnen en triglyceriden bij *I. verticalis* dan bij *E. aspersum* onder predatiestress. Glucose waarden blijven wel gelijk tussen de twee soorten (Stoks *et al.*, 2005). Het feit dat deze twee genera (althans de Noord-Amerikaanse vertegenwoordigers) onderling verschillen, maakt het interessant om de effecten van persoonlijkheid op stressfysiologie te bekijken over deze twee soorten heen.

### 2.1.2 Predatoren: libellenlarven

Natuurlijke predatoren van waterjufferlarven zijn libellenlarven (orde Odonata, suborde Anisoptera: echte libellen), die in visloze vijvers mee het bovenste trofisch niveau uitmaken (McPeek, 1990). De echte libellen ondergaan dezelfde levenscyclus als de juffers, zoals beschreven in 2.1.1. In dit onderzoek worden larven van de Grote keizerlibel (*Anax imperator*) als predatoren gebruikt (zie Figuur 3). *Anax* en andere libellenlarven zijn belangrijke predatoren van waterjuffers en zijn al veelvuldig gebruikt in onderzoek naar antipredator gedrag van waterjufferlarven (McPeek, 2004; Gysels & Stoks, 2005; Stoks *et al.*, 2005).



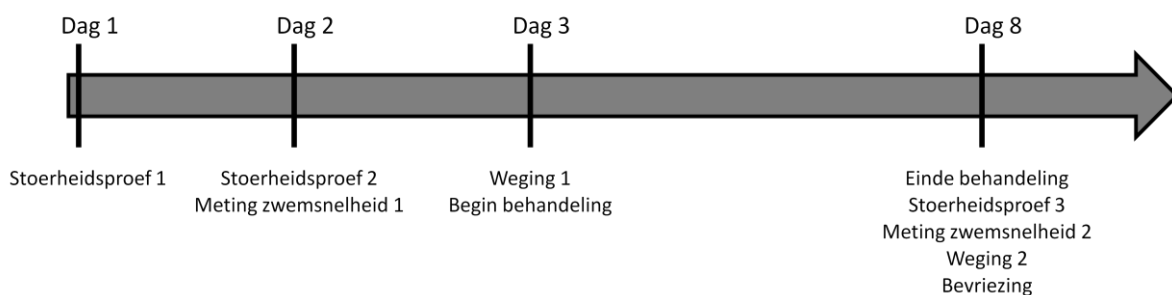
**Figuur 3:** *Anax imperator* larve.

## 2.2 Verzameling en kweek

In de zomer van 2014 werden verspreid over twee weken (gaande van 31 juli tot 13 augustus) in totaal 44 gepaarde vrouwtjes van *I. elegans* verzameld in zowel het natuurreservaat 'Torfbroek' te Kampenhout en in natuurgebied 'Vijvers van Oud-Heverlee', gelegen in Oud-Heverlee. In totaal werden 37 gepaarde vrouwtjes van *E. cyathigerum* eveneens in 'Torfbroek' en in natuurgebied 'Bergerven', nabij Dilsen-Stokkem en Maaseik, gevangen. Deze natuurgebieden zijn rijk aan waterjuffer- en libellenpopulaties, waaronder ook van de Grote keizerlibel. De ouderdieren kenden *Anax imperator* dus als predator. Wijfjes die gepaard hadden werden gevangen en apart gehouden tot ze hun eitjes legden. Nadien werden de filters met eitjes in een potje met water gehouden. Per soort werden 80 larven van 20 moeders individueel in 200 ml plastic bekertjes gehouden (40 larven per populatie). De bekertjes waren gevuld met ongeveer 150 ml geconditioneerd water (verouderd kraanwater geconditioneerd met gras en stro). De larven werden opgekweekt onder constante condities (watertemperatuur van 20°C (gemiddeld 19,8°C; SE=0,14; n=21) en een lichtdonker regime van 14L:10D). De larven werden zes dagen per week gevoederd met *Artemia* nauplii (gemiddelde dagelijkse dosis = 205; SE = 53.57; n = 10 voedselporities). Wanneer de larven het laatste larvale stadium (F<sub>0</sub>-stadium) bereikten, namen ze deel aan het gedragsexperiment en werden ze iedere dag gevoederd.

## 2.3 Persoonlijkheidsexperiment

Het gehele gedragsexperiment van een larve besloeg acht dagen. Figuur 4 toont de chronologische opdeling van het experiment vanaf de eerste of tweede dag nadat het F<sub>0</sub>-stadium bereikt was. Op dagen 1 en 2 werden stoerheidsproeven uitgevoerd. Van dag 3 tot 8 ondergingen de larven de behandeling, met name een predator- of controlebehandeling. Op dag 8 werd tenslotte nog een stoerheidsproef afgenomen, waarna ze gewogen en ingevroren werden.



**Figuur 4: Chronologische voorstelling van het volledige gedragsexperiment per larve, dat een of twee dagen nadat het F<sub>0</sub>-stadium vastgesteld was, gestart werd.**



### 2.3.1 Groei

De individuele larven werden op dag 3 nuchter gewogen tot op 0.01 mg nauwkeurig vlak voordat ze *random* toegewezen werden aan een behandeling (zie 2.3.2). Na het ondergaan van de behandeling werden de larven op dag 8 opnieuw gewogen. De groeisnelheid per dag werd berekend aan de hand van de volgende formule.

$$Groei = \frac{\ln(massa2) - \ln(massa1)}{n} \text{ met } n = \text{aantal dagen tussen metingen.}$$

In dit experiment stond n gelijk aan 5 (dag 3 tot 8, zie Figuur 4).

### 2.3.2 Persoonlijkheidstoetsen

Op dag 1 (Figuur 4) werden larven onderworpen aan een eerste persoonlijkheidstoets, met name stoerheidproef 1, die een stoerheidscore moest toewijzen aan iedere larve. Daarvoor werden ze individueel in een witte bak van 20 x 26 cm gevuld met 600 ml geconditioneerd water geplaatst, waarin ze eerst vijf minuten konden acclimatiseren. De toets bestond uit twee delen: een zwemgeneigdheidstest en een zwem-vries test. Voor de zwemgeneigdheidstest werd het abdomen van de larve vijfmaal aangetikt met een stompe probe en werd er gekeken of de larve al dan niet wegzwom in respons. Deze tik komt overeen met een vangstpoging door een libellenlarve (Gyssels & Stoks, 2005). Er werd dan een score van nul (nooit weggezwommen) tot vijf (bij iedere tik weggezwommen) toegekend. Hoe hoger deze score, hoe hoger de stoerheidscore. De zwem-vries test bestond uit het tikken van de larve conferator de zwemgeneigdheidstest. Vervolgens werd de periode van stilstand of 'bevrozing' (= latentietijd) na de initiële zwemspurt gemeten in seconden tot op 20 minuten. Er werd onderscheid gemaakt tussen de eerste *twitch* (latentietijd A), het bewegen van een pootje, het abdomen of de kop en de eerste verplaatsing (*move*, latentietijd B). Hoe langer het duurt voor een larve weer beweegt, hoe lager de stoerheidscore en dus hoe schuwer het individu. Op dag 2 werd de stoerheid bij de larven rond hetzelfde tijdstip en volgens dezelfde werkwijze opnieuw getoetst (2).

### 2.3.3 Meting van de zwemsnelheid

Op de tweede testdag werd eveneens de zwemsnelheid gemeten (Figuur 4). Dit werd driemaal gedaan per larve, waarbij zijn zwemspurt opgenomen werd aan 33,5 frames per seconde met het Streampix 3.55.0 programma door middel van een Basler vision technologies Scout camera, met Pentax CCTV lens (Hoya Corporation; B1214D-2 (KP); C21211KP; 12.5 mm F/1.4).

De zwemsnelheid werd dan bepaald aan de hand van het programma ImageJ en de plug-in MTrackJ. Larven werden telkens 15 frames gevolgd vanaf wanneer ze begonnen aan hun vlucht. De output was de lengte in pixels die de larve in ongeveer 0,45 seconden tijd had afgelegd (want 33,5 frames per seconde, zie boven). Via calibratie met een meetlat werd dan 15 cm omgezet in het overeenkomende aantal pixels voor iedere individuele meetdag en daaruit werd dan het aantal pixels gehaald per cm.

De lengte in pixels die de larve had afgelegd werd dan gedeeld door dit aantal om zo het aantal cm uit te komen, waarna enkel nog moest omgezet worden naar 1 seconde. Voor iedere larve werd de zwemsnelheid driemaal voor en driemaal na de behandeling gemeten. De gemiddelde waarden voor en na werden gebruikt voor verdere analyses. Om te corrigeren voor het verschil in zwemsnelheid dat toegeschreven wordt aan de massa, werden deze gemiddelde waarden nog eens gedeeld door de massa. De gecorrigeerde waarden voor zwemsnelheid werden in iedere test gebruikt.

### 2.3.4 Predator- of controlebehandeling

Op dag 3 werden de larven per soort vijf dagen toegewezen aan een behandeling: een predator- of een controlebehandeling (Figuur 4). De opstellingen hiervoor bestonden uit een plastic bakje (500 ml, 18 x 13 cm) bedekt door een ijzeren net waarin vier spuwpotjes (50 ml) gehangen werden. De potjes waren langs twee zijanten doorboord met een diameter van 25 mm en behangen met een gaas (maaswijdte 250  $\mu$ l) (zie Figuur 5). Het bakje was gevuld met geconditioneerd water en in ieder spuwpotje zat een individuele larve. Indien er niet genoeg larven van een soort tegelijk aan een behandeling begonnen om de vier spuwpotjes te bezetten, werd er een dummy larve van dezelfde soort in de plaats gezet. Het water in de plastic bakjes werd doorborreld door twee zuurstofblokjes om te garanderen dat ook in de spuwpotjes genoeg zuurstof kwam.



**Figuur 5: Foto van twee controleopstellingen (achteraan) en twee predatoropstellingen (vooraan).**

De predatorbehandeling omvatte het overbrengen van chemische en visuele cues. In het bakje zwom namelijk een *A. imperator* larve rond die de larven konden zien en ruiken, maar die hun niet kon raken. De larven konden elkaar bovendien zien, wat ook geldt als predatiedruk daar ze kannibalistisch zijn (zie 2.1.1).

Tenslotte werd er ook dagelijks 10 ml predatorcue mix toegevoegd. Voor de predatorcues werd water (initieel verouderd kraanwater) uit een half literbakje waarin een libellenlarve zwom, telkens gevoed met waterjufferlarven, gebruikt. Er werd daarbij 30 mg cue van conspecificen per 40 ml predatorcue toegevoegd. Cues van conspecificen werden bekomen door larven te verpletteren. Per spuwpotje werd dagelijks 1 ml toegevoegd en de overige 6 ml werd in het bakje gedaan. De zuurstofblokjes zorgden voor een stroming zodat de cues verdeeld werden over het bakje.

Bij de controlebehandeling konden de verschillende larven elkaar niet zien doordat er een afscheiding tussen de spuwpotjes hing en de wanden van de bakjes waren afgeplakt. Er zat geen libellenlarve in het water en er werd dagelijks 10 ml verouderd kraanwater toegevoegd op dezelfde manier als bij de predatorbehandeling.

Op dag 8 werd de behandeling gestopt. Dan werd stoorheidproef 3 afgenomen en werd de zwemsnelheid nogmaals gemeten (zie 2.3.3 en Figuur 4). Nadien werden de larven gewogen en werden ze tenslotte ingevroren in eppendorf tubes bij een temperatuur van  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4 Fysiologie**

---

Het individuele glucose-, glycogeen-, proteïne- en vetgehalte werd bepaald. Vooraleer aan de individuele tests begonnen kon worden, diende een fosfaatbuffer (PBS) (1M; pH 7,4) gemaakt te worden. Hiervoor moest ten eerste een natriumfosfaatoplossing gemaakt worden door 13,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  op te lossen in 500 ml Milli-Q water. Ten tweede werd 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 50 ml Milli-Q water opgelost om een kaliumfosfaatoplossing te bekomen. Hiervan werd dan 34 ml bij 466 ml natriumfosfaatoplossing gevoegd. De pH kon waar nodig aangepast worden middels NaOH of  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Voor het gebruik van de PBS diende deze nog eens 20 keer verdund te worden. Ze werd bewaard in een koele ruimte ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Na de eppendorftube 5 seconden onder te dompelen in vloeibare stikstof, werden de larven gemalen. Vervolgens werden de stalen gehomogeniseerd na toevoeging van 5 keer hun massa Milli-Q water. Nadien werden de stalen 10 minuten gecentrifugeerd aan 16.000 rcf in een Eppendorf 5424 centrifuge. 35  $\mu\text{l}$  supernatans werd tenslotte verdund in 70  $\mu\text{l}$  PBS, zodat uiteindelijk een verdunning van 15 bekomen werd.

### **2.4.1 Glucose en glycogeen**

Een door Stoks *et al.* (2006) gemodificeerde versie van het protocol van de Sigma-Aldrich glucose kit werd gevolgd voor het bepalen van het suikergehalte. Allereerst werd alle glycogeen omgezet in glucose door 12,5  $\mu\text{l}$  homogenaat in duplo op te lossen in 32,5  $\mu\text{l}$  Milli-Q water en 5  $\mu\text{l}$  amyloglucosidase (1 unit/10  $\mu\text{l}$ ; Sigma A7420) in een transparante 96-wellplaat met platte bodem. Vervolgens werden de stalen 30 minuten geïncubeerd op  $37^{\circ}\text{C}$  waarna alle glycogeen was omgezet. Hieruit werd dan het totale suikergehalte gehaald.

Nadien werd opnieuw in duplo 12,5 µl homogenaat opgelost in 37,5 µl Milli-Q water op dezelfde wellplaat, maar zonder toevoeging van amyloglucosidase om specifiek de hoeveelheid glucose te meten. De glucoseniveaus konden vervolgens bepaald worden door toevoeging van 100 µl ijskoud glucosereagens (Sigma G3293) aan alle stalen, waarna de stalen nog eens 20 minuten geïncubeerd werden aan 30°C. Tenslotte werd de absorptantie aan 340 nm in een plaatlezer (Tecan Infinite M200) gemeten. De bekomen waarde van de hoeveelheid glucose werd dan afgetrokken van de waarde van de totale hoeveelheid suiker om de hoeveelheid glycogeen te bekomen. Het glucose- en glycogeen gehalte werd in duplo getest. Het suiker-, proteïne- en vetgehalte werd uitgedrukt in µg per mg.

#### **2.4.2 Proteïnegehalte**

Het proteïnegehalte werd bepaald aan de hand van de Bradford methode (Bradford, 1976). 1 µl homogenaat werd in triplo opgelost in 160 µl Milli-Q water in een 96-wellplaat. Daarbij werd 40 µl Bio-Rad Protein Assay reagens gevoegd en hevig gemixt met een pipet. De stalen werden vervolgens 5 minuten geïncubeerd op kamertemperatuur en de absorptantie werd afgelezen aan 595 nm in de plaatlezer. Het proteïnegehalte werd in triplo gemeten.

#### **2.4.3 Totaal vetgehalte**

Het totale vetgehalte werd bepaald volgens een protocol gebaseerd op dat van Bligh en Dyer (Bligh & Dyer, 1959). Per staal werd 8 µl homogenaat in vetvrije, glazen tubes gepipetteerd. Hieraan werd telkens 56 µl zwavelzuur (100%) toegevoegd. De tubes werden vervolgens 20 minuten verhit aan 150°C. Nadat ze afgekoeld waren, werd er 64 µl Milli-Q water toegevoegd. Per tube werden tenslotte 3 keer 30 µl aliquots in een 384-wellplaat (transparant, platte bodem) gepipetteerd en gemeten door de plaatlezer aan 340 nm. Het vetgehalte werd per staal in triplo gemeten.

### **2.5 Dataverwerking**

---

Voor alle statistische analyses werd STATISTICA 12.0 (© StatSoft Inc.) gebruikt. Het vooropgestelde significantieniveau werd gezet op  $\alpha \leq 0.05$ .

#### **2.5.1 Assumpties**

Alvorens AN(C)OVA's werden uitgevoerd, werden assumpties van normaliteit, constante variantie en lineariteit nagegaan aan de hand van respectievelijk de Shapiro-Wilk en de Levene's test en door de residuen tegenover de andere covariaten in het model te plotten. De variabelen groei, zwemsnelheid en de fysiologische variabelen glucose-, glycogeen-, proteïne- en vetgehalte voldeden aan de assumpties. De drie latentietijd A (*twitch*) en latentietijd B (*move*) variabelen uit de zwem-vriestesten werden  $\ln(x+1)$  getransformeerd om normaliteit te verkrijgen en het vetgehalte onderging een Briggse logtransformatie omdat de residuen in de ANCOVA niet normaal verdeeld waren. De variabele zwemgeneigdheid werd getest op basis van een geordende multinomiale verdeling.

Significante interacties werden verder onderzocht via post hoc Tukey HSD testen. Initieel werden 'vangstatum genest in populatie', en bij de predatorbehandeling ook 'predator ID genest in predator populatie' en de predatorgrootte als covariaten in de modellen gebracht, maar deze hadden geen significant effect en werden uit de modellen verwijderd.

### **2.5.2 Effect van soort en behandeling**

Om het effect van soort en behandeling op groei te bekijken, werd een ANOVA uitgevoerd. De zwemsnelheid werd geanalyseerd door middel van een '*Repeated Measures*' (RM)-ANOVA. Zwemgeneigdheid werd onderzocht met behulp van een *Generalized Linear Model* (GLZ) waarin wederom soort en behandeling als categorische variabelen getest werden. De zwemgeneigdheid (ZG) scores werden eerst per run (dag 1, 2 en 8; Figuur 4) individueel getest. Vervolgens werd het verschil tussen ZG 2 en ZG 1 en tussen ZG 3 en ZG 2 getest. Het effect van soort en predatorbehandeling op de latentietijd A en B werd geanalyseerd door middel van een RM-ANOVA, op dezelfde manier als de zwemsnelheid. De correlatie volgens de RM-ANOVA tussen latentietijd A 1 en 2 en latentietijd B 1 en 2 werd gebruikt als maat voor consistentie binnen eenzelfde situatie. De correlatie tussen latentietijd A 2 en 3 en latentietijd B 2 en 3 werd dan gezien als de mate van consistentie over verschillende situaties heen (d.i. de predatorbehandeling). Tot slot werd het effect van soort en behandeling ook getest op het glucose-, glycogeen-, proteïne- en vetgehalte middels een ANOVA.

### **2.5.3 Relatie tussen groei, zwemsnelheid, persoonlijkheid en fysiologie**

Allereerst werd het effect van de continue variabelen groei, zwemsnelheid en de persoonlijkheidskenmerken op elkaar onderzocht. Dit werd gedaan d.m.v. een volledige ANCOVA met resp. groei, zwemsnelheid na behandeling, latentietijd A 3 of latentietijd B 3 als afhankelijke variabele aan te duiden, soort en behandeling als categorische en telkens de fysiologische maten en overblijvende persoonlijkheidsmaten, groei en zwemsnelheid als continue predictors. Vervolgens werd het effect van behandeling en soort, samen met het effect van groei, zwemsnelheid en stoerheid op de fysiologische variabelen bekeken. Hiervoor werd iedere fysiologische maat in een ANCOVA getest als afhankelijke variabele, met als categorische variabelen soort en behandeling en groei, zwemsnelheid en latentietijd A en B 3 als continue predictors. Nadien werd dit opnieuw gedaan, maar met enkel de categorische variabelen en de persoonlijkheidsmaten (latentietijd A en B 3) om de individuele effecten van persoonlijkheid te bekijken. Onderling werden de latentietijden A en B vergeleken in een ANCOVA model met soort en waar toepasbaar behandeling als categorische variabelen en de resp. andere latentietijden als continue predictors samen met de zwemsnelheid voor en waar toepasbaar ook zwemsnelheid na en de groei. De fysiologische maten werden ook ieder met elkaar vergeleken in een ANCOVA waarbij telkens een ervan de afhankelijke variabele uitmaakte en de drie andere maten de continue predictors waren.

## ***2.6 Risicoanalyse***

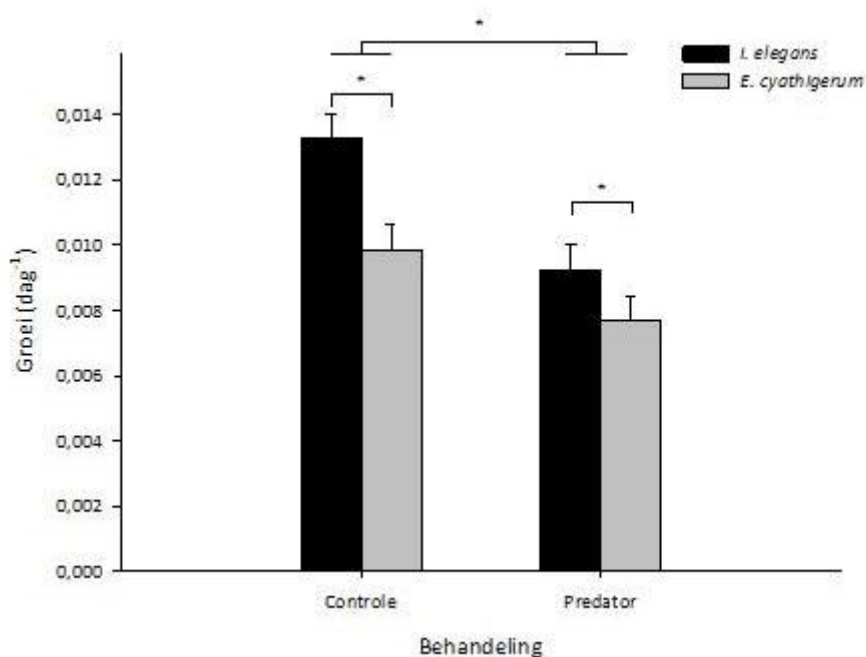
---

Een eerste gevaar waar rekening mee moest gehouden worden was het in aanraking komen met schadelijke stoffen. Een algemene veiligheidsmaatregel die dit moet voorkomen is het ten allen tijde dragen van labo jas, gepaste schoenen en nitril handschoenen die regelmatig vervangen worden. Specifiek gedurende deze thesis werden ethanol (100% en 80%), aceton (100%), Bio-Rad Protein Assay reagens, waterstofperoxide (35%), dettol (100% en 5%) en zwavelzuur (100%) gebruikt. Bijlage I toont een tabel met de H- en P-zinnen van deze stoffen. Het Bio-Rad Protein Assay reagens werd volledig verbruikt en kwam als dusdanig niet in het riool terecht. Hetzelfde geldt voor zwavelzuur. De platen waarop Bio-Rad gebruikt was, werden achteraf in de blauwe afvalton categorie 5 gestoken. Bij het verlaten van het labo moesten telkens de handen gewassen en ontsmet worden en de labo jas uitgetrokken worden.

Een ander gevaar besloeg het werken met bepaalde objecten. Er moest ten eerste gewerkt worden met naalden. Deze moesten we telkens manipuleren met handschoenen aan en ze mochten niet herkapt worden om prikgevaar te voorkomen. Na gebruik moesten ze veilig weggegooid worden in een naaldencontainer. Verder moest er regelmatig op een ladder gestaan worden. Hierbij was het van belang gepaste schoenen te dragen en telkens voorzichtig en aandachtig te zijn.

### 3 Resultaten

#### 3.1 Groei en zwemsnelheid

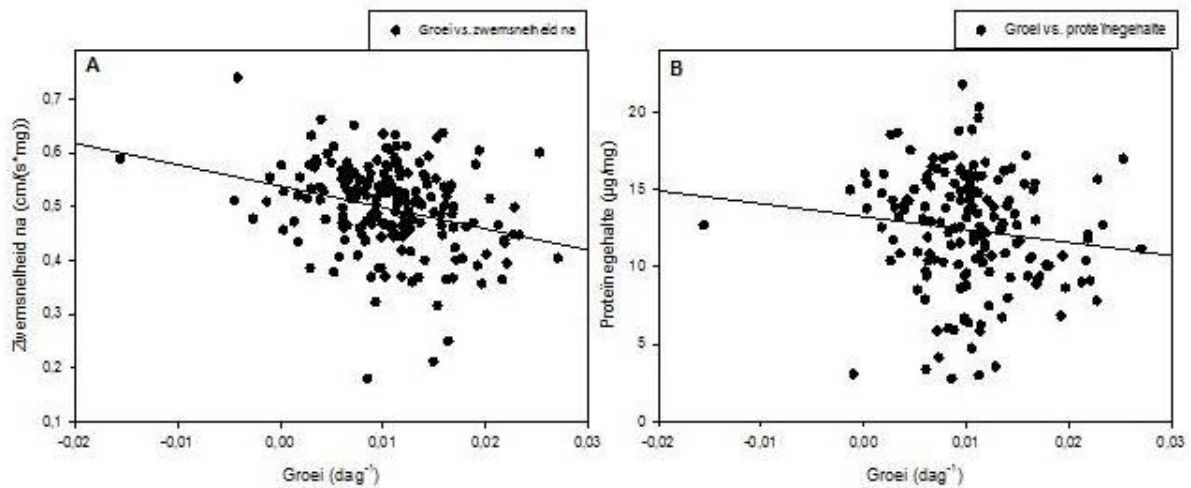


**Figuur 6: Effect van predatierisico en soort op de groei. Grafiek toont de gemiddelde groei met standaardfout van waterjufferlarven als functie van de behandeling en soort. Significantie wordt aangeduid met een sterretje.**

Zowel soort ( $F_{1,210} = 10.8, p < .005$ ) als behandeling ( $F_{1,210} = 16.8, p < .0001$ ) hebben een significant effect op de groei: *I. elegans* larven vertoonden een hogere groeisnelheid dan *E. cyathigerum* larven, en larven blootgesteld aan predatie risico groeiden gemiddeld trager dan de controle larven. De interactieterm soort\*behandeling had geen effect ( $F_{1,210} = 1.56, p = 0.213$ ) (Figuur 6). Daarnaast bleek dat de groeisnelheid van alle gedragsparameters enkel beïnvloed werd door de zwemsnelheid voor ( $F_{1,180} = 6.47, p < .05$ ) en na ( $F_{1,180} = 17.8, p < .0001$ ; Figuur 7A) de predatiebehandeling, waarbij larven met een hogere groeisnelheid een lagere zwemsnelheid hadden. Uit de totale ANCOVA van groei (met soort, behandeling, zwemsnelheid, stoerheid en fysiologische maten) blijkt tenslotte dat naast soort, behandeling en zwemsnelheid, ook proteïnegehalte een significante invloed uitoefent op de groei ( $F_{1,143} = 4.63, p < .05$ ): hoe lager het proteïnegehalte, hoe sneller de groei (Figuur 7B) en deze correlatie is bovendien significant binnen de controlebehandeling ( $r = -0.271, p < .05$ ). Zie bijlage II voor de volledige ANCOVA's.

De RM-ANOVA uitgevoerd op de ongecorrigeerde zwemsnelheid toonde een significant effect van soort ( $F_{1,188} = 44.0, p < .0001$ ), waarbij *E. cyathigerum* larven sneller zwommen, maar bij de voor massa gecorrigeerde waarden van zwemsnelheid was dit effect verdwenen.

De gemiddelde massa verschilt dan ook significant tussen de twee soorten ( $F_{1,212} = 58.8, p < .0001$ ; *I. elegans*:  $32.33 \pm 2.98$  mg; *E. cyathigerum*:  $35.52 \pm 3.11$  mg). Daarom werd verder consequent de gecorrigeerde maat gebruikt. De RM-ANOVA van de gecorrigeerde zwemsnelheid toont enkel een significante verlaging van de zwemsnelheid ( $F_{1,188} = 11.9, p < .001$ ).



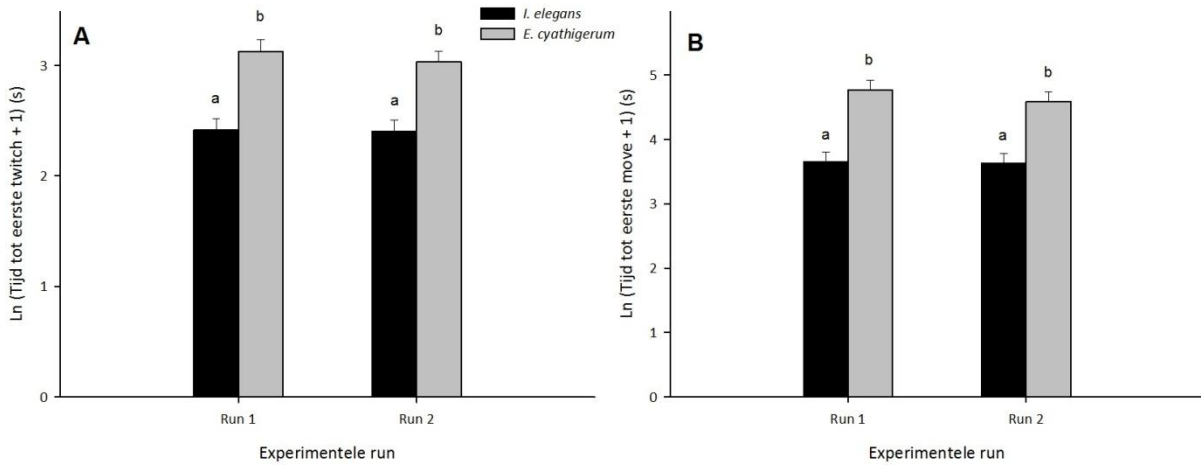
**Figuur 7: Scatterplots van zwemsnelheid na behandeling (A), en proteïnegehalte (B) ten opzichte van groei. De vergelijkingen van de regressierechten zijn  $y = 0.5405 - 3.9139 \cdot x$  en  $r^2 = 0.0834$  (A) en  $y = 13.2585 - 83.7574 \cdot x$  en  $r^2 = 0.0164$  (B).**

### 3.2 Persoonlijkheid

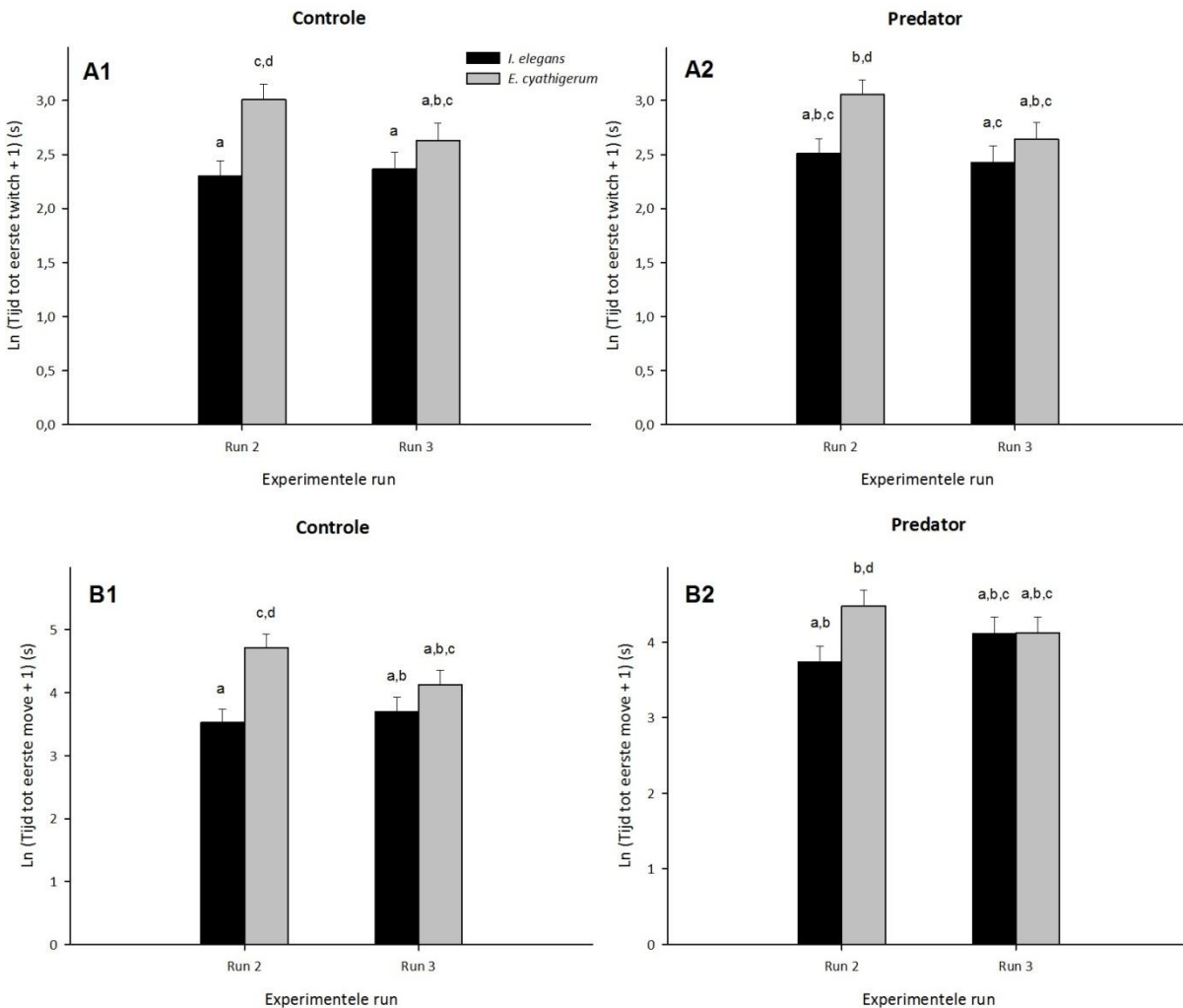
Zwemgeneigdheid werd niet verder gebruikt als stoerheidmaat. Dit was omdat hij allereerst niet gelinkt was met de andere stoerheidmaten en ten tweede ook andere en zelfs tegenstrijdige resultaten leverde, indien er al significanties uitkwamen. Deze waren bovendien inconsistent binnen de zwemgeneigdheid zelf. Latentietijden A en B werden verder als stoerheidmaat geanalyseerd. Er was geen verschil tussen latentietijd A 1 en 2 ( $F_{1,215} = 0.262, p = 0.609$ ), enkel een significant soortverschil, waarbij *I. elegans* stoerder is ( $F_{1,215} = 41.1, p < .0001$ ; Figuur 8A). Bij de vergelijking tussen latentietijd B 1 en 2 werd hetzelfde soorteffect ( $F_{1,215} = 39.1, p < .0001$ ) aangeduid, en wederom geen verschil tussen de twee onderling ( $F_{1,215} = 0.472, p = 0.493$ ; Figuur 8B).

De RM-analyse van latentietijd A 2 en 3 toonde wederom een hogere stoerheid bij *I. elegans* aan, maar geen significant effect van behandeling en van de interactieterm evenmin (Tabel 1). De *within effects* toonden een significante verhoging van de stoerheid bij latentietijd A 3 ten opzichte van latentietijd A 2 aan, en ook een significante interactie tussen latentietijd A 2 - 3 en soort. Bij *E. cyathigerum* verhoogt de stoerheid namelijk, terwijl ze gelijk blijft bij *I. elegans* (Figuur 9 A1 en 2). Bij latentietijd B 2 - 3 was *I. elegans* significant stoerder, maar bij deze soort verlaagt de stoerheid terwijl bij *E. cyathigerum* de stoerheid verhoogt (significante latentietijd B 2 - 3\*soort interactie; zie Tabel 1 en Figuur 9 B1 en 2). Ook bij latentietijd B 2 - 3 was er geen significant effect van behandeling.





**Figuur 8:** Grafieken van gemiddelde latentietijd tot eerste *twitch* (A) en *move* (B) 1-2 met standaardfout. A. Effect van experimentele run en soort op de tijd tot de eerste *twitch*. B. Effect van experimentele run en soort op de latentietijd tot de eerste *move*. Verschil in letters geeft significantie weer.

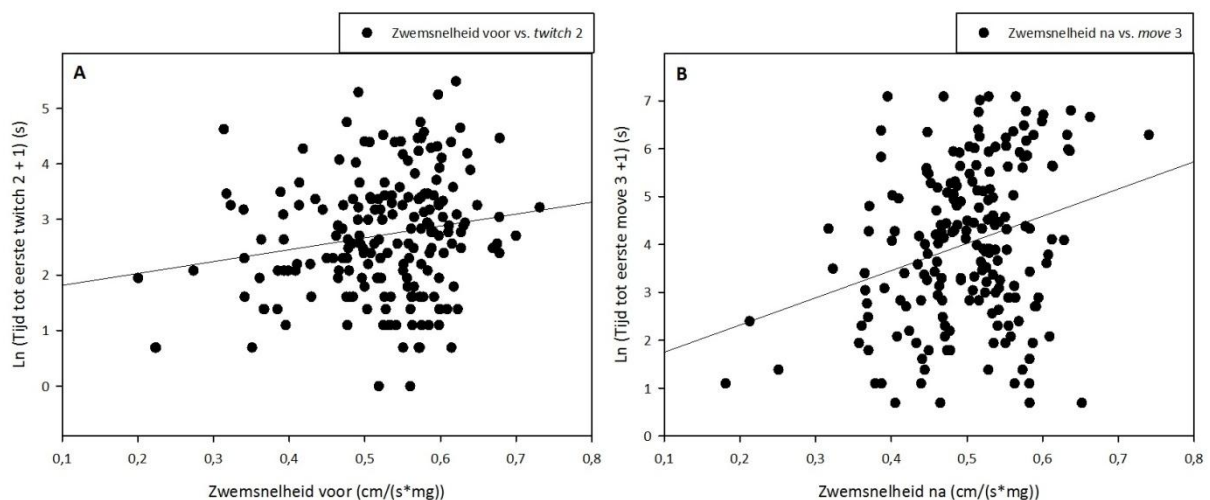


**Figuur 9:** Grafieken van gemiddelde latentietijd tot eerste *twitch* en *move* 2-3 met standaardfout. A1 en 2 tonen resp. het effect van controlebehandeling en predatorbehandeling, evenals soort en experimentele run, op de tijd tot de eerste *twitch*. Verschil in letters geeft significantie weer en geldt voor effecten uit A1 en A2. B1 en 2 tonen resp. het effect van controlebehandeling en predatorbehandeling, evenals soort en experimentele run, op de tijd tot de eerste *move*. Letters gelden voor B1 en B2. Significanties zijn gebaseerd op post hoc Tukey HSD testen.

**Tabel 1: Repeated measures ANOVA's van resp. latentietijd (LT) A 2-3 en latentietijd B 2-3. Significantie wordt aangeduid met een sterretje.**

Gedagsvariabele	Effect	df1, df2	F-waarde	p-waarde
Latentietijd A	Soort (S)	1,213	15.5	< .0005*
	Behandeling (B)	1,213	0.570	0.451
	S*B	1,213	0.236	0.628
	LT A 2 - 3 (A)	1,213	4.35	< .05*
	A*S	1,213	3.95	< .05*
	A*B	1,213	0.227	0.634
	A*S*B	1,213	0.080	0.778
Latentietijd B	Soort (S)	1,213	12.2	< .001*
	Behandeling (B)	1,213	0.335	0.564
	S*B	1,213	1.64	0.202
	LT B 2 - 3 (LT)	1,213	0.506	0.478
	LT*S	1,213	7.68	< .01*
	LT*B	1,213	0.613	0.434
	LT*S*B	1,213	0.003	0.957

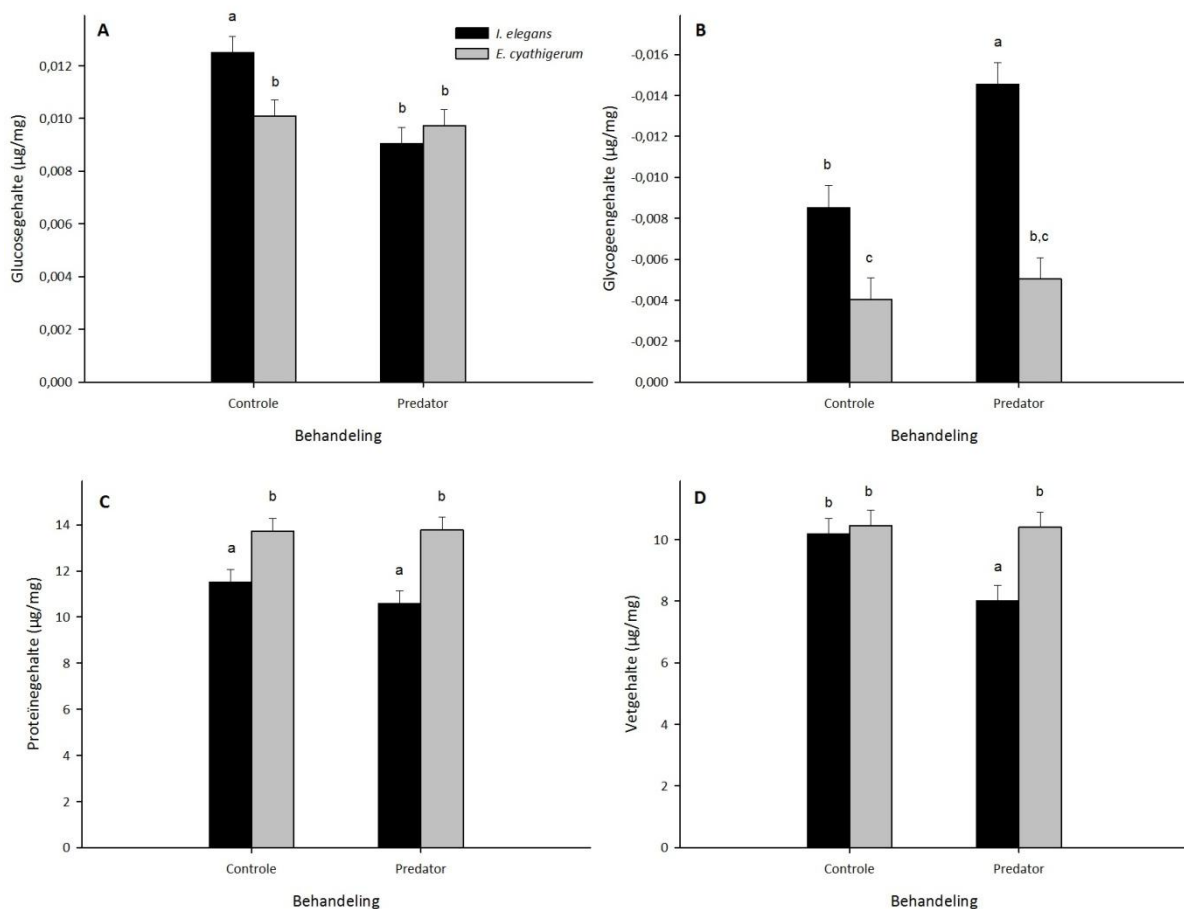
Onderling waren latentietijd A en de bijhorende latentietijd B telkens significant positief gelinkt (1<sup>ste</sup> run:  $r = 0.592$ ,  $F_{1,210} = 92.0$ ,  $p < .0001$ ; 2<sup>e</sup> run:  $r = 0.636$ ,  $F_{1,210} = 111$ ,  $p < .0001$ ; 3<sup>de</sup> run:  $r = 0.485$ ,  $F_{1,208} = 57.6$ ,  $p < .0001$ ). Latentietijd B 2 ( $F_{1,210} = 6.49$ ,  $p < .05$ ) en latentietijd B 3 ( $F_{1,208} = 7.57$ ,  $p < .01$ ) hingen bovendien beide positief af van latentietijd B 1. In geen van de tests was er een significant effect van persoonlijkheid op de groei of omgekeerd. Qua zwemsnelheid waren enkel zwemsnelheid voor en latentietijd A 2 ( $F_{1,189} = 5.43$ ,  $p < .05$ ) en zwemsnelheid na en latentietijd B 3 ( $F_{1,187} = 14.4$ ,  $p < .0005$ ) significant positief gelinkt (Figuur 10A en B), lees: schuwere individuen hebben een hogere zwemsnelheid.



**Figuur 10: Scatterplots met regressierechten van steerheidsmaten ten opzichte van voor massa gecorrigeerde zwemsnelheid. A: twitch 2 t.o.v. zwemsnelheid voor ( $y = 1.4888 + 2.2509*x$  en  $r^2 = 0.0351$ ). B: move 3 t.o.v. zwemsnelheid na behandeling. ( $y = 1.2201 + 5.5948*x$  en  $r^2 = 0.0752$ ).**

### 3.3 Fysiologie

Glucose ondervindt significante effecten van de behandeling en de interactieterm, met een significante daling bij *I. elegans* na een predatorbehandeling. Glycogeengehalte ligt significant lager bij *I. elegans* dan bij *E. cyathigerum* en na een predatorbehandeling. Ook hier verlaagt het gehalte na een predatorbehandeling sterker bij *I. elegans* dan bij *E. cyathigerum* (soort\*behandeling). Het proteïnegehalte ligt significant lager bij *I. elegans* (zie Tabel 2 en Figuur 11). Tenslotte is er een significante daling in vetgehalte te zien bij *I. elegans* na een predatorbehandeling.



**Figuur 11:** Grafieken van het gemiddelde glucosegehalte (A), gemiddelde glycogeengehalte (B), gemiddelde proteïnegehalte (C) en gemiddelde vetgehalte (D) met standaardfout. In elke grafiek wordt het effect van behandeling en soort weergegeven. Verschil in letters duidt significantie aan, gebaseerd op post hoc Tukey HSD testen. Waarden van glycogeen worden negatief weergegeven en zijn relatief ten opzichte van de standaardcurve.

Vetgehalte heeft een significant positieve relatie met de drie andere fysiologische maten. Glycogeengehalte heeft daarbij nog een significant positieve relatie met proteïnegehalte (Tabel 3). Bijlage III bevat de scatterplots met regressierechte.

Met uitzondering van proteïnegehalte, covarieert geen van de fysiologische waarden significant met de persoonlijkheidskenmerken. Het proteïnegehalte ondervond een significant effect van latentietijd B 3 ( $F_{1,154} = 4.09, p < .05$ ) - hoe schuwer de larve hoe hoger zijn proteïnegehalte - maar enkel wanneer zwemsnelheid na en groei niet mee in rekening gebracht werden. Groei oefent een significant effect uit op glycogeengehalte ( $F_{1,152} = 6.00, p < .05$ ) en op vetgehalte ( $F_{1,151} = 4.99, p < .05$ ), met een verhoogd gehalte aan deze reservemoleculen bij een hogere groeisnelheid. Bij *I. elegans* waren deze correlaties significant (glycogeen:  $r = 0.338, p < .005$ ; vet:  $r = 0.373, p < .001$ ), niet bij *E. cyathigerum* (glycogeen:  $r = 0.170, p = 0.133$ ; vet:  $r = 0.0459, p = 0.688$ ). Verder was de positieve relatie tussen vetgehalte significant voor de predatorbehandeling ( $r = 0.238, p < .05$ ). Enkel proteïnegehalte tenslotte ondervindt een significant effect van de zwemsnelheid na de behandeling ( $F_{1,152} = 8.98, p < .005$ ), waarbij een hoger proteïnegehalte samenhangt met een hogere zwemsnelheid.

**Tabel 2: Resultaten van de two-way ANOVA's die het effect van soort en behandeling op de fysiologische variabelen nagaan.**

Fysiologische maat	Effect	df1, df2	F-waarde	p - waarde
Glucosegehalte	Soort (S)	1,156	2.04	0.156
	Behandeling (B)	1,156	9.87	< .005*
	S*B	1,156	6.51	< .05*
Glycogeengehalte	Soort (S)	1,156	43.1	< .0001*
	Behandeling (B)	1,156	10.8	< .005*
	S*B	1,156	5.51	< .05*
Proteïnegehalte	Soort (S)	1,156	24.0	< .0001*
	Behandeling (B)	1,156	0.604	0.438
	S*B	1,156	0.792	0.375
Vetgehalte	Soort (S)	1,156	5.53	< .05*
	Behandeling (B)	1,156	5.86	< .05*
	S*B	1,156	3.36	0.0689

Tabel 3: Significante resultaten van de ANCOVA's die de fysiologische maten ten opzichte van elkaar testten.

Afhankelijke variabele	Covariaat	df1, df2	F - waarde	p - waarde
Proteïnegehalte	Glycogeengehalte	1,155	23.4	< .0001*
Vetgehalte	Glucosegehalte	1,155	41.6	< .0001*
	Glycogeengehalte	1,155	29.3	< .0001*
	Proteïnegehalte	1,155	5.18	< .05*

## 4 Discussie

In de discussie worden de resultaten van dit onderzoek geïnterpreteerd. Er wordt nagegaan of de bekomen resultaten al dan niet volgens de vooropgestelde hypothesen zijn. De hier bekomen resultaten worden vergeleken met de literatuur en er wordt getracht afwijkende resultaten te verklaren.

Allereerst worden de individuele effecten van soort en behandeling op resp. de groei, de zwemsnelheid, de persoonlijkheid en de fysiologische variabelen glucosegehalte, glycogeengehalte, proteïnegehalte en vetgehalte besproken. Vervolgens zullen de onderlinge relaties van deze responsvariabelen toegelicht worden.

### 4.1 *Effect van soort en behandeling op groei*

---

De groei/predatierisico ruilfunctie stelt dat bij predatiedreiging de groeisnelheid van een prooidier afneemt (Lima, 1998). In dit onderzoek werd inderdaad een verminderde groeisnelheid waargenomen na een korte (vijfdaagse) predatorbehandeling. Redenen hiervoor kunnen gedragsmatig zijn, zoals een verminderde foerageeractiviteit (Strobbe *et al.*, 2011), en/of fysiologisch een allocatie van energie van productie naar het overleven van de dreiging zijn (Steiner & Van Buskirk, 2009; Hawlena *et al.*, 2011). Het feit dat de vaak bewezen groei/predatierisico ruilfunctie ook hier uit de resultaten blijkt, wijst er op dat de predatorbehandeling effectief was.

*I. elegans* larven hadden een hogere groeisnelheid dan *E. cyathigerum* larven en beide soorten kennen een gelijkaardige groeidaling in aanwezigheid van predatoren. Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat *Ischnura verticalis* zonder predatiestress even snel groeit als *Enallagma aspersum* (Stoks *et al.*, 2005), hoewel Siepielski *et al.* (2011) een hogere groeisnelheid bij *Ischnura* sp. aantoonde ook in de afwezigheid van een predator. Bovendien bleken Noord-Amerikaanse *Ischnura* sp. sneller te groeien dan *Enallagma* sp. overheen meren met verschillende toppredatoren (McPeck, 1998). Dit is te wijten aan het feit dat *Ischnura* sp. zeer efficiënt zijn in het omzetten van geassimileerd voedsel in de eigen lichaamsmassa (McPeck, 2004), meer dan *Enallagma* sp. (Stoks & McPeck, 2006), terwijl deze laatste beter zijn in het ontwijken van predatoren (McPeck, 1998). Dat *Ischnura* sp. beter voedsel omzetten in biomassa, bleek zeker ook het geval te zijn wanneer er sprake was van predatierisico (McPeck *et al.*, 2001; McPeck, 2004; Siepielski *et al.*, 2011). Dit veronderstelt dat de groeisnelheid van *I. elegans* minder afneemt bij predatiedreiging dan bij *E. cyathigerum*. Stoks *et al.* (2005) hebben deze hypothese ook bevestigd. Ze hebben aangetoond dat onder predatiedruk de groeisnelheid daalt bij zowel *I. verticalis* als *E. aspersum*, maar dat *I. verticalis* wel significant sneller groeit dan *E. aspersum*. Er werd echter in dit thesisonderzoek geen verschil waargenomen in de vermindering van de groeisnelheid van de twee soorten als reactie op de predatorbehandeling.

Dit zou te wijten kunnen zijn aan het feit dat de larven iedere dag *Artemia* gevoederd kregen in hun individuele spuwpotje, waardoor *E. cyathigerum* zich toch meer dan voldoende kon voeden zonder zeer actief te moeten foerageren.

#### ***4.2 Effect van soort en behandeling op zwemsnelheid***

---

*E. cyathigerum* larven vertoonden een hogere absolute zwemsnelheid dan de *I. elegans* larven. Dit was echter volledig te wijten aan het feit dat de *E. cyathigerum* larven in dit onderzoek een beduidend hogere massa hadden, want na correctie voor massa was er geen significant soortverschil meer. Deze positieve relatie tussen grootte en zwemsnelheid is meermaals aangetoond bij waterjuffers (Robinson *et al.*, 1991; Stoks, 1999; Stoks & McPeck, 2006; Strobbe *et al.*, 2009).

Er deed zich bij de gecorrigeerde zwemsnelheid enkel een significante daling van de snelheid tussen de twee experimentele runs voor (zie Figuur 4, zwemsnelheid werd gemeten op dagen 2 en 8). Dit kan alleszins niet te wijten zijn aan de predatiebehandeling, daar die niet significant was en het interactie-effect tussen behandeling en experimentele run ook niet. Dit is niet volgens de hypothese die zei dat daling van de zwemsnelheid zich enkel zou mogen voordoen bij predatorgeïnduceerde larven, door oxidatieve stress (Janssens & Stoks, 2014). Het feit dat predatorbehandeling niet significant is, ligt niet aan de correctie voor massa, aangezien er geen massaverschil is tussen larven van beide behandelingen (binnen een soort). De algemene daling in de gecorrigeerde zwemsnelheid tussen dag 2 en dag 8 ligt waarschijnlijk aan het feit dat massa niet geïntegreerd is in de maat. Een grotere massa impliceert een hogere zwemsnelheid. Gezien de relatieve zwemsnelheid daalt, is de massatoename tussen dag 2 en 8 (Figuur 4) de oorzaak voor het behouden van de absolute zwemsnelheid. De absolute stijgt echter niet, wat normaal is gezien een periode van vijf dagen weinig invloed gaat hebben op de manier van zwemmen (bv. aantal abdominale slagen). Ook de vorm van de lamellen is ongewijzigd (want zie Strobbe *et al.*, 2009) en het proteïnegehalte, dat belangrijk is voor de zwemsnelheid, is ook gelijk tussen beide behandelingen (zie 4.5.5).

#### ***4.3 Effect van soort en behandeling op persoonlijkheid***

---

Maten om stoerheid te scoren zijn vaak arbitrair en kunnen zelfs andere gedragstypes zoals activiteit of nieuwsgierigheid omvatten. Daarom is het belangrijk om de maten te definiëren per individueel onderzoek en vooral naargelang welk studieorganisme er gebruikt wordt. Ook de context om stoerheid te onderzoeken moet weloverwogen zijn. De latentietijd, de tijd voordat een dier weer begint te zwemmen en foerageren na een predatoraanval, is meermaals gebruikt als een stoerheidmaat bij onder andere vissen, zoals de Driedoornige stekelbaars (Godin & Sproul, 1988; Wibe *et al.*, 2001). Ook bij waterjuffers is latentietijd reeds gebruikt als indicatie voor dreiginggevoeligheid (Gyssels & Stoks, 2005).

In dit thesisonderzoek waren latentietijd tot eerste beweging en de bijhorende latentietijd tot eerste verplaatsing bovendien telkens sterk positief gelinkt, wat bevestigt dat deze maten onderling hetzelfde verklarende patroon hebben.

Zwemgeneigdheid daarentegen werd hier als een twijfelachtige maat voor stoerheid beschouwd. De maat verklaarde amper variantie - want de larven zwommen bijna altijd weg - en deed dit bovendien inconsistent. Bovendien was er geen covariantie te zien tussen de zwemgeneigdheid en de latentietijden. Het is bekend dat larven die leven in visvrije vijvers zo goed als altijd snel wegzwemmen bij een predatoraanval, omdat dat de beste overlevingskans geeft bij een libellenlarve als predator (McPeck, 1990). Dit toont aan dat zwemgeneigdheid geen goede stoerheidsmaat is, omdat normaliter de meeste larven in een visvrije vijver wegzwemmen, onafhankelijk van hun stoerheid.

Op basis van de latentietijden bleek dat *I. elegans* een stoerdere soort is dan *E. cyathigerum*, zowel overheen dagen 1 tot 2, als overheen dagen 2 tot 8. De stoerheid van deze twee soorten ten opzichte van elkaar werd nog niet eerder getest. Hier wordt aangetoond dat *I. elegans* inderdaad volgens verwachting stoerder is dan *E. cyathigerum*. In de literatuur is namelijk de hogere activiteit van *Ischnura* sp. ten opzichte van *Enallagma* sp. aangetoond (McPeck, 2004). De theorie van gedragssyndromen zegt dat bepaalde gedragstypes een syndroom kunnen vormen, zoals het activiteit-stoerheid syndroom (Sih *et al.*, 2004). Dit betekent een correlatie van activiteit en stoerheid die ook consistent blijkt. Dit werd al vastgesteld bij vissen (Bell & Stamps, 2004; Cote *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2013). Ook de theorie van de omgangsstrategieën (*coping styles*) en de proactief-reactief as voorspelt een link tussen stoerheid en activiteit, met een hogere (foerageer)activiteit en agressiviteit bij stoerdere individuen (Koolhaas *et al.*, 1999). Dit is dan gelinkt met een sneller metabolisme en hogere groeisnelheid (zie 1.3.1).

Er zijn verschillende aanwijzingen gevonden in mijn onderzoek voor een stoerheidsyndroom bij waterjuffers. Zowel bij de latentietijd tot eerste beweging, als bij latentietijd tot eerste verplaatsing, is er geen verschil tussen de eerste experimentele run en de tweede (dag 1 en 2, Figuur 4). Dit impliceert dat de stoerheid van de larven consistent is en dat er dus daadwerkelijk sprake is van een stoerheidsyndroom doorheen de tijd, binnen eenzelfde situatie (Sih *et al.*, 2004). Dit is volgens de hypothese, want ook in de literatuur is het stoerheidsyndroom vaak onderbouwd (Niemelä *et al.*, 2012; Hulthén *et al.*, 2014). Een verhoging van de stoerheid van dag 2 naar dag 8 (Figuur 4) wordt waargenomen bij latentietijd A. Dit effect is voornamelijk te wijten aan *E. cyathigerum* larven die significant stoerder worden, terwijl *I. elegans* larven gelijk blijven doorheen de tijd maar absoluut nog steeds stoerder zijn. De behandeling echter kan dit patroon niet verklaren, want de stoerheid ondervindt geen effect van behandeling.



Aangezien wel de rangorde bewaard is gebleven, kan het zijn dat het om een individuele verandering in gedragstype doorheen de tijd gaat (Réale *et al.*, 2007). Deze verandering zou leeftijdsgerelateerd kunnen zijn of omgevingsgerelateerd (Réale *et al.*, 2007), zoals het feit dat de larven *ad libitum* voedsel kregen in de spuwpotjes, ongeacht de behandeling. Het toch in staat zijn tot een hoge foerageeractiviteit kan dan een hogere stoerheid (zij het beperkt - rangorde blijft bewaard) tot gevolg hebben, volgens dezelfde redenering van een activiteit-stoerheid syndroom. En volgens verwachting deed dit patroon zich dan voor bij de schuwere *E. cyathigerum*, daar die door zijn reactieve omgangstrategie meer plasticiteit kan ondergaan in zijn gedrag (Thomson *et al.*, 2011) en een grotere persoonlijkheidsverandering kan ondergaan dan *I. elegans* (Wolf *et al.*, 2007, 2008). Bij latentietijd B is er geen algemeen verschil tussen dag 2 en 8 maar wel een soortverschil tussen de twee dagen. *I. elegans* wordt namelijk iets schuwer gaande van dag 2 naar dag 8, en *E. cyathigerum* wordt stoerder. Dit effect kan wederom niet toegeschreven worden aan de behandeling die ertussen plaatsvond. Daar ze niet significant verschillen in stoerheid tussen dag 2 en dag 8 en de rangorde niet verandert, zouden ook hier natuurlijke fluctuaties aan de basis kunnen liggen. Literatuur heeft aangetoond dat zoals eerder gezegd schuwe individuen de neiging hebben stoerder te worden, maar stoere individuen kunnen ook beperkt schuwer worden (Niemelä *et al.*, 2012). Dit patroon werd wel veroorzaakt door predatiedruk, terwijl dat in dit thesisonderzoek geen effect had. Aangezien dus hier ook geen effect van behandeling op stoerheid werd waargenomen gaande van dag 2 naar 8, kan gezegd worden dat hier de theorie van gedragssyndromen ook opgaat tussen situaties (d.i. in aanwezigheid en afwezigheid van een predator) (Sih *et al.*, 2004). Een laatste resultaat dat in het voordeel van een stoerheidsyndroom spreekt, is het feit dat de maten latentietijd B 2 en 3 beiden significant afhankelijk zijn van latentietijd B 1, wat nogmaals benadrukt dat persoonlijkheid in de tijd en over situaties afhangt van de initiële eigen persoonlijkheid van de larve (Sih *et al.*, 2004).

#### ***4.4 Effect van soort en behandeling op de fysiologische stressrespons***

---

De vier reservemoleculen glucose, glycogeen, triglyceriden en proteïnen werden gebruikt om de fysiologische stressrespons te kwantificeren. Glucose voorziet energie aan organen op korte termijn en wordt opgeslagen in de vorm van glycogeen. Vetten dienen als lange termijn energiereserve en proteïnen liggen aan de basis van zo goed als iedere cellulaire activiteit (Garrett & Grisham, 2010). Het is dus logisch dat hier een positief verband gevonden wordt tussen de deze moleculen. De reden voor het gebrek aan een correlatie tussen glucose en glycogeen hier kan liggen aan het feit dat voor glycogeen relatieve en voor glucose absolute waarden zijn gebruikt.

Uit de literatuur blijkt dat in het algemeen suikergehalte gelijk blijft of zelfs stijgt na het ondergaan van de predatorbehandeling, door het activeren van de HHA-as (hypothalamus-hypofyse-adrenale as) in de fysiologische stressrespons, zie 1.1.3 (Stoks *et al.*, 2005; Hawlena & Schmitz, 2010). Uit de resultaten hier bleek echter een predatorgeïnduceerde daling in glucose- en glycogeen gehalte bij *I. elegans* in plaats van een stabiel gehalte zoals bij *I. verticalis* (Stoks *et al.*, 2005). Het zou kunnen dat de *I. elegans* larven veel meer energie moeten verbruiken om de predator dreiging te overleven, omdat ze stoerder zijn en de mate van dreiging niet zo lang kunnen weerstaan (Wolf *et al.*, 2008; Hawlena & Schmitz, 2010). Ze hebben daarentegen wel een hogere groeisnelheid en het suikergehalte is hier positief mee gecorreleerd (zie 4.5.3), en doordat ze meer investeren in hun groei is dit resultaat onverwacht. De reden waarom hier het glycogeen gehalte bij *E. cyathigerum* significant hoger ligt dan bij *I. elegans*, is waarschijnlijk wel omdat de eerstgenoemde reactiever zijn en meer gebruik maken van de analoge HHA-as, de adipokinetische respons bij insecten (Fields & Woodring, 1991), in hun stressrespons (Hawlena & Schmitz, 2010). Bij *E. cyathigerum* zijn verder zowel glucose- als glycogeen gehalte gelijk in aan- en afwezigheid van predatierisico, wat wel overeenkomt met wat in de literatuur beschreven staat voor *E. aspersum* (Stoks *et al.*, 2005). Het feit dat ze onder de predatiedruk niet meer teren op hun suikers, zoals verwacht volgens hun reactieve aard, is waarschijnlijk omdat ze *ad libitum* voedsel krijgen. In de natuur daarentegen zouden ze schuwer zijn en nog minder foerageren en dus meer afhankelijk van de suikers (Koolhaas *et al.*, 1999).

Proteïne- en vetgehalte liggen lager bij *I. elegans* larven, wat tegenstrijdig is met resultaten uit de literatuur die een algemeen lager proteïnegehalte en lager vetgehalte in respons op predatiedruk zagen bij *E. aspersum* (Stoks *et al.*, 2005). *I. verticalis* bleek een hogere conversie-efficiëntie te bezitten (Stoks *et al.*, 2005), waardoor verwacht wordt dat *Ischnura* sp. larven in het algemeen een hogere hoeveelheid aan deze moleculen moeten bezitten. Er wordt hier echter een andere soort gebruikt. Ook zouden de verlengde predator dreiging en de verplaatsing van energie in de algemene fysiologische stressrespons volgend op predatiedruk dit kunnen verklaren, omdat minder energie opgeslagen kan worden (Hawlena & Schmitz, 2010). Bovendien heeft *I. elegans* een hogere groeisnelheid. Een verlaagde opslag van vetten bij een hogere groeisnelheid is wel bewezen (Stoks *et al.*, 2006). Er is daarentegen geen daling in proteïnegehalte na predatorbehandeling gevonden, zelfs niet bij *E. cyathigerum*. Dit komt mogelijk door de verhoogde aanmaak van de noodzakelijke (stress)proteïnen door de fysiologische stressrespons (Slos & Stoks, 2008; Slos *et al.*, 2009).

## ***4.5 Relatie tussen de groei, zwemsnelheid, persoonlijkheid en fysiologische stressrespons***

---

Nu duidelijk is hoe de afzonderlijke responsvariabelen zich relateren ten opzichte van soort en behandeling, kan dieper ingegaan worden op de onderlinge relaties van deze variabelen.

### **4.5.1 Groei en zwemsnelheid**

Allereerst was zwemsnelheid negatief gecorreleerd met de groeisnelheid, wat volgens verwachting is. Een verklaring luidt dat er om snel te groeien veel zuurstof en energie moet verbruikt worden (d.i. metabolisme versnelt), die dan niet kunnen ingezet worden voor het zwemmen (Perez & Munch, 2015). Bovendien kan er door een verhoogde aanmaak van ROS (*reactive oxygen species*) bij het genereren van een versneld metabolisme, schade toegebracht worden aan spierweefsels (De Block & Stoks, 2008; Perez & Munch, 2015). Een verminderde zwemcapaciteit bij versnelde groei was zichtbaar bij de Driedoornige stekelbaars (Lee *et al.*, 2010). In dit thesisonderzoek werd gezien dat de sneller groeiende *I. elegans* een lagere vetopslag had. Ook bij *Lestes viridis* is reeds bewezen dat larven met een hogere groeisnelheid een verlaagde opslag van vetten hebben (Stoks *et al.*, 2006).

### **4.5.2 Groei en stoerheid**

Tegen de verwachtingen van de *pace-of-life* theorie in, was de groeisnelheid in dit onderzoek niet rechtstreeks gelinkt met de individuele stoerheid. Nochtans hebben vele studies deze link wel gevonden (bijvoorbeeld Careau *et al.*, 2010; Biro *et al.*, 2014). *I. elegans* larven blijken evenwel in het algemeen stoerder te zijn dan de *E. cyathigerum* larven (zie ook 4.3) en ze vertoonden daarbij een hogere groeisnelheid (zie 4.1). Omdat de mate van stoerheid dus ook gereflecteerd wordt in het soortverschil, kan op basis hiervan gesuggereerd worden dat in deze zin de hypothese klopt. Nyqvist *et al.* (2013) vonden echter ook geen rechtstreeks verband tussen groei en stoerheid bij de snoek (*Esox lucius*). Dit verklaarden ze door het gebrek aan een consistente stoerheid, wat in dit thesisonderzoek niet het geval is. Ze brachten wel naar voren dat de afwezigheid van densiteitseffecten (dominantie, competitie) door individuele huizing, het effect op groei kon tenietgedaan hebben. Een andere verklaring kan worden gezocht in het feit dat door een verhoogde activiteit (dat samenhangt met stoerheid, zie gedragsyndromen 1.2.1) juist minder energie in de groei kan gestoken worden, en er dus sprake is van een groei/foerageeractiviteit ruilfunctie (Rennie *et al.*, 2005; Nyqvist *et al.*, 2013). Het bestaan van deze tegenstrijdige theorieën kan een reden zijn om te geloven dat consistent gedrag groeionafhankelijk is (Nyqvist *et al.*, 2013).

### **4.5.3 Groei en fysiologie**

Het glycogeengehalte en vetgehalte hadden een positieve correlatie met de groeisnelheid. Suikers en vetten zijn energetische moleculen die, indien er geen stresserende omgevingsfactoren aanwezig zijn, ingezet worden voor de productie (d.i. groei) (Bonga, 1997).

Stoks *et al.* (2006) zagen minder geaccumuleerde suikers (korte termijn energieopslag) en minder geaccumuleerde triglyceriden (lange termijn energieopslag) bij *Lestes viridis* larven met een hoge groeisnelheid, omdat ze sneller verbruikt worden door het sneller metabolisme.

Bij het nader bekijken van de correlaties tussen glycogeen- en vetgehalte en de groei, bleek dat *I. elegans* de enige was die deze significant positieve correlaties bezat, en het vetgehalte was bovendien enkel in de predatorbehandeling significant positief gecorreleerd met de groei. Dit laatste zou kunnen komen doordat het vetgehalte bij *I. elegans* lager lag na de predatorbehandeling (zie 4.4), waardoor enkel de larven met nog afdoende beschikbare vetten in staat waren te groeien. *I. elegans* reageerde dus op het eerste zicht tegen de verwachting gebaseerd op Stoks *et al.* (2006) in, want daar is vet en suikergehalte negatief gecorreleerd met groei. Nu dient gezegd te worden dat de larven in dit thesisonderzoek in tegenstelling tot de larven uit Stoks *et al.* (2006) niet uitgehongerd werden, omdat het hier om de standaardgroei gaat en niet om de compensatiegroei. Daarbij betreft het andere soorten. *Ischnura* sp. zijn bovendien efficiënter in het omzetten van hun voedsel, wat maakt dat ze hun reserves beter kunnen beheren en als dusdanig ook in staat zijn sneller te groeien. Bij *E. cyathigerum* was er daarentegen geen correlatie tussen groei en vet-/glycogeengehalte. Dit werd verwacht door de lagere groeisnelheid van de soort.

Het proteïnegehalte vertoonde een negatieve relatie met groei. Noteer dat deze correlatie niet significant was buiten de ANCOVA (in een regressie). Bij inbrengen van behandeling en soort was er enkel een significante correlatie in de controlebehandeling. Het feit echter dat in de predatorbehandeling en de regressie geen correlatie tussen proteïnegehalte en groeisnelheid werd waargenomen, werd ook door Janssens en Stoks (2014) bevonden. Bovendien zijn er vele andere factoren die ook inwerken op het proteïnegehalte en de groei, zoals behandeling en de fysiologische respons. De zwemspieren (en daarbij de proteïnen) zijn namelijk onaangetast door de predatorbehandeling, niet zoals bij Janssens en Stoks (2014). Stressproteïnen worden aangemaakt als respons op de predatiedruk (Slos & Stoks, 2009; Hawlena & Schmitz, 2010) en de groei wordt verstoord bij predatiedruk (zie 4.1). Andere factoren kunnen dus meer invloed gehad hebben op groei en proteïnegehalte dan deze op elkaar.

#### **4.5.4 Zwemsnelheid en stoerheid**

De gecorrigeerde zwemsnelheid bleek negatief gelinkt te zijn met stoerheid. Hoe stoerder dus het individu, hoe trager hij zwemt. Dit is op het eerste zicht niet volgens verwachting, omdat stoerdere individuen ook actiever zijn en meer foerageren (en dus zwemmen) volgens de theorie van de omgangsstrategieën (Koolhaas *et al.*, 1999). Een punt waar echter rekening mee gehouden moet worden is dat het hier geen gewoon foerageerzwemmen betreft, maar de ontsnappingspurt. Door de snelle *pace-of-life* die stoere organismen bezitten, steken ze meer energie in het foerageren.

Daardoor verhoogt hun mortaliteit in aanwezigheid van predators ten opzichte van schuwe organismen (Smith & Blumstein, 2008). Daarom matureren ze vroeger en hebben ze dus ook een hogere groeisnelheid. Uit de resultaten bleek dat de groeisnelheid negatief gecorreleerd is met zwemsnelheid (zie ook 4.1). Met andere woorden zorgt de snelle *pace-of-life* en dus het hoge metabolisme en de hoge foerageeractiviteit van de stoere organismen (Careau *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012) voor de verminderde zwemsnelheid. Bij vissen (*Pomacentrus wardi*) is aangetoond dat de stoerdere individuen inderdaad een tragere ontsnappingsspurt hadden (Fuiman *et al.*, 2010). Tenslotte, indien de zwemsnelheid niet gecorrigeerd zou zijn voor de massa, werd misschien een positieve link tussen stoerheid en zwemsnelheid verwacht. Dit werd evenwel niet gezien in een supplementaire ANOVA. Er bleek hier geen verband op te treden en is dus geen goede verklaring. Indien men verwacht dat zwemsnelheid en stoerheid zich enkel verbinden door de massa van het dier, zou er geen correlatie gezien mogen worden tussen de gecorrigeerde zwemsnelheid en de ongecorrigeerde stoerheid, wat hier niet het geval is.

#### **4.5.5 Zwemsnelheid en fysiologie**

De zwemsnelheid steeg naargelang het proteïnegehalte verhoogde. Dit is logisch, gezien musculaire proteïnen direct en transportproteïnen en enzymen zoals arginine kinase indirect belangrijk zijn voor de zwemsnelheid (Strobbe *et al.*, 2010; Janssens & Stoks, 2014). Noteer dat ook hier de bekomen negatieve correlaties tussen proteïnegehalte en groei en tussen groei en zwemsnelheid dit resultaat ondersteunen, aangezien bij verhoogde groeisnelheid de proteïnesynthese minderde en de zwemsnelheid daalde. In dit onderzoek is er geen verband gevonden tussen het suiker- en vetgehalte en de zwemsnelheid. Het is geweten dat zwemsnelheid en -capaciteit sterk afhankelijk zijn van de hoeveelheid opgeslagen energie (Kjørboe, 2008; Zhao *et al.*, 2012). Opnieuw dient echter indachtig gehouden te worden dat het gaat om de ontsnappingsspurt. Hiervoor is ook energie nodig, maar wordt deze aangeleverd in de vorm van fosfo-arginine die direct de nodige ATP aanlevert binnen de spieren zelf (Strobbe *et al.*, 2010).

#### **4.5.6 Stoerheid en fysiologie**

Over de verhouding tussen stoerheid (en gedragssyndromen in het algemeen) en het algemeen stressparadigma is nog niet veel geweten. Thomson *et al.* (2011) onderzochten het verband tussen stoerheid en de fysiologische stressrespons op lijnen van Regenboogforel die selectief geteeld waren op een resp. hoge en lage endocriene stressrespons. Ze zagen een hogere stoerheid bij de lijn met de hoge stressrespons, maar ze konden geen rechtstreeks verband met de individuele stoerheid aantonen. Mijn onderzoek heeft ook geen rechtstreekse link gevonden tussen een stoerheidsmaat en de fysiologische variabelen. Dit wilt echter niet zeggen dat er geen verband zou zijn. Allereerst was er een patroon te zien op soortniveau, met *I. elegans* de stoerdere en *E. cyathigerum* de schuwere soort.

Er is duidelijk een verschil gebleken in suikergehalte tussen *I. elegans* en *E. cyathigerum*, met een hoger gehalte bij de laatste (zie 4.4). Dit kan verklaard worden doordat de schuwere *E. cyathigerum* in samenhang met zijn reactievere omgangsstrategie meer suiker aanmaakt door een actievere gluconeogenese (Carere *et al.*, 2010; Hawlena & Schmitz, 2010; Clary *et al.*, 2014; Sepp *et al.*, 2014). Verder verbruikt de stoerdere *I. elegans* meer vetten en proteïnen, wat overeenstemt met het hoge metabolisme dat gepaard zou gaan met zijn proactief karakter (Réale *et al.*, 2010; David *et al.*, 2012). Tenslotte zijn de reservemoleculen niet de enige maten die gebruikt kunnen worden om de fysiologische stressrespons te kwantificeren. Er zijn er andere, zoals bijvoorbeeld hormonen (catecholamines en glucocorticosteroiden bij vertebraten en octopamine bij invertebraten; zie 1.1.3), misschien meer geschikt om specifiek de link te maken tussen de predatorgeïnduceerde stressrespons en persoonlijkheid. Deze zitten namelijk vervat in de stressrespons en zijn niet het gevolg van de stressrespons. Clary *et al.* (2014) vonden een positief verband tussen de hoeveelheid glucocorticosteroiden en de schuwheid. Dit betekent dan ook dat de schuwe dieren een verhoogde gluconeogenese ondergaan, zoals onrechtstreeks uit de resultaten van dit thesisonderzoek blijkt. Carere *et al.* (2010) geeft een overzicht van studies die soortgelijke links vonden tussen de HHA-as en stoerheid.

## 5 Conclusie

Onderzoek op dierlijke persoonlijkheid of gedragssyndromen kent een enorme bloei. Over de interactie echter tussen het stoerheid syndroom, de antipredator context en de onderliggende predatorgeïnduceerde stressrespons is nog weinig geweten. Bij twee soorten waterjufferlarven, *Ischnura elegans* en *Enallagma cyathigerum*, werd getracht het stoerheid syndroom aan te tonen en dit bovendien te linken met het algemeen stressparadigma. Deze laatste werd gekwantificeerd door het bepalen van glucose-, glycogeen-, proteïne- en vetgehaltes. Door tenslotte ook groei en zwemsnelheid te integreren, kon een volledig beeld gevormd worden. Het verkeerdelijk aanwijzen van verbanden werd zo geminimaliseerd, en er werd aangetoond dat ook vele andere kenmerken een invloed kunnen hebben op deze interactie.

Allereerst kon het bestaan van een stoerheid gedragssyndroom bij waterjufferlarven in mijn onderzoek bevestigd worden. Dit is belangrijk omdat zo aangetoond wordt dat gedragssyndromen bij dieren - en zelfs de lagere invertebraten - een gegeven is dat integraal moet ingebracht worden in (toegepast) ecologisch onderzoek. Het onderzoek hiernaar wordt steeds relevanter omdat het antwoorden biedt waar voorheen vragen rezen en hiaten in resultaten zichtbaar waren. Ook bij het testen van medicijnen bijvoorbeeld kan het rekening houden met dierlijke persoonlijkheid het proces vergemakkelijken en resultaten verduidelijken. Bovendien werd hier de hypothese bevestigd dat *Ischnura elegans* larven stoerder zijn dan *Enallagma cyathigerum* larven. Dit suggereert op zijn minst het bestaan van een stoerheid-activiteit syndroom op genusniveau, daar het activiteitsverschil tussen deze genera bewezen is (McPeck, 2004) en een hogere activiteit samenhangt met een hogere stoerheid.

Uit mijn onderzoek bleek vervolgens enkel een soortelijk verband tussen stoerheid en de predatorgeïnduceerde stressfysiologie. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een combinatie van factoren. In 4.5.6 werd al toegelicht dat fysiologische stoffen die misschien nog meer rechtstreeks afhangen van stoerheid, met name het hormoon octopamine, duidelijkere resultaten zouden kunnen geven. Bovendien bleken de stoerheidmaten en ook de soorten die de schuwe (*E. cyathigerum*) en stoere (*I. elegans*) organismen representeerden, soms onverwachte verbanden te hebben met de groei en zwemsnelheid (zie discussie). Dit wijst er op dat persoonlijkheid op individueel niveau afhankelijk is van de gehele conditie van het individu, wat het moeilijk maakt om consistent te onderzoeken. De link tussen stoerheid en de stressrespons is een belangrijk onderdeel van de omgangsstrategie theorie, die de persoonlijkheid en fysiologie als een samenhangend geheel bekijkt in het licht van evolutie en adaptatie.

Voor toekomstig onderzoek op de stoerheid persoonlijkheidstak, is het integreren van ook andere gedragstypes aanbevolen. Aangezien er op die manier zekerder een (eerder) proactieve of (eerder) reactieve persoonlijkheid kan toegewezen worden aan een organisme, kan er verder ingegaan worden op een meer onderbouwde link tussen persoonlijkheid en de predatorgeïnduceerde stressrespons. De stressrespons kan dan niet alleen gekwantificeerd worden door reservemoleculen, maar ook door hormonen, stressproteïnen, oxidatieve stress en zuurstofverbruik bijvoorbeeld. Verder spreekt het voor zich dat dit onderzoek aan te raden is op vele (relevante) organismen, tot op soortniveau en populatieniveau, omdat persoonlijkheid op het niveau van populaties en zelfs individueel inwerkt. Indien een soort interessant blijkt voor (ecologisch) onderzoek, dient de rol die persoonlijkheid speelt ingerekend te worden. Daarboven zou het interessant zijn mocht er onderscheid gemaakt worden tussen acute en chronische predatorstress. Er is namelijk een verschillende fysiologische stressrespons die opgewekt wordt. Indien ook dit in rekening gebracht wordt, met daarbij de persoonlijkheid volgens de proactief-reactief as, zou er een vollediger beeld kunnen geschetst worden van de nog ondoorgronde interactie tussen persoonlijkheid, antipredator gedrag en de fysiologische stressrespons.



## Samenvatting

Gedragssyndromen zijn de verschillen in consistent gedrag overheen situaties en tijd, zowel binnen een gedragscontext, als tussen contexten. Deze masterproef gebruikt antipredator gedrag als context om het stoerheid gedragssyndroom bij twee soorten waterjufferlarven, *Enallagma cyathigerum* en *Ischnura elegans*, bloot te leggen. Daarboven wordt het verband onderzocht tussen stoerheid en de predatorgeïnduceerde stressrespons (als onderdeel van de omgangsstrategie), waar tot nu toe weinig over geweten is. De stressrespons wordt gekwantificeerd op basis van het gehalte aan de reservemoleculen glucose, glycogeen, proteïnen en triglyceriden. De groei en de zwemsnelheid worden als extra factoren getest, om zo een volledig beeld te kunnen schetsen van de interacties. Dit onderzoek toont het bestaan van een stoerheidsyndroom binnen deze soorten aan, zowel in verschillende situaties als doorheen de tijd. Bovendien wordt een indirect verband aangetoond tussen het algemeen stressparadigma en de groei enerzijds en de stoerheid anderzijds, via het soortverschil. Bij de schuwe *E. cyathigerum* wordt namelijk een hoger suikergehalte en lagere groeisnelheid waargenomen dan bij *I. elegans*, wat wijst op resp. reactieve en proactieve omgangsstrategieën bij deze soorten. Een rechtstreeks verband tussen individuele stoerheid en de stressrespons wordt echter niet gevonden. Resultaten uit deze masterproef helpen de groeiende kennis over omgangsstrategieën te verbreden door bewijs te leveren voor het bestaan van gedragssyndromen in twee soorten waterjuffers, die bovendien een verschillende stressrespons uitoefenen bij predatierisico. Het gebruik van nog andere fysiologische variabelen en het bepalen van meerdere gedragstypes zijn in toekomstig onderzoek aan te raden om deze resultaten aan te vullen.

## Summary

Behavioural syndromes are the differences in correlated behaviour over time, within a behavioural context as well as across contexts. In this master's thesis, antipredator behaviour is the context in which the boldness syndrome in two species of damselfly larvae, *Enallagma cyathigerum* and *Ischnura elegans*, is being studied. Additionally, the poorly examined connection between boldness and the general stress paradigm is being explored. The physiological stress response is quantified by the amount of storage molecules, namely glucose, glycogen, proteins and total fat. Also the growth rate and swimming speed are included to provide a more detailed look on the different interactions taking place.

This research proves the existence of a boldness syndrome within these two species, across situations and over time. Furthermore, an indirect connection between on the one hand the general stress paradigm and growth rate and on the other hand boldness, is shown by means of the species difference. *E. cyathigerum* is more shy, with a higher sugar amount and slower growth rate compared to the bolder *I. elegans*. This result favours the presence of reactive and proactive coping styles in these respective species. However, no direct link between individual boldness and the general stress paradigm has been found. These results help to expand the growing knowledge about coping styles by providing the evidence for a boldness behavioural syndrome in two species of damselflies that have distinct predator induced stress responses. Future research using other physiological variables and integrating more behavioural types, is necessary to further complement this subject.

## Literatuurlijst

- Adamo, S. A., & Baker, J. L. (2011). Conserved features of chronic stress across phyla: the effects of long-term stress on behavior and the concentration of the neurohormone octopamine in the cricket, *Gryllus texensis*. *Hormones and Behavior*, **60**, 478–483. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.07.015
- Adamo, S. A., Kovalko, I., & Mosher, B. (2013). The behavioural effects of predator-induced stress responses in the cricket (*Gryllus texensis*): the upside of the stress response. *The Journal of Experimental Biology*, **216**, 4608–4614. doi:10.1242/jeb.094482
- Adamo, S. A., & Parsons, N. (2006). The emergency life-history stage and immunity in the cricket, *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*, **72**, 235–244. doi:10.1016/j.anbehav.2006.01.011
- Alcock, J. (2013). *Animal Behavior*. (S. Carroll, Ed.) (10th ed., p. 522). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Baugh, A. T., Schaper, S. V., Hau, M., Cockrem, J. F., de Goede, P., & van Oers, K. (2012). Corticosterone responses differ between lines of great tits (*Parus major*) selected for divergent personalities. *General and Comparative Endocrinology*, **175**, 488–494. doi:10.1016/j.ygcen.2011.12.012
- Bell, A. M. (2007). Animal personalities. *Nature*, **447**, 539–540.
- Bell, A. M., & Stamps, J. A. (2004). Development of behavioural differences between individuals and populations of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, **68**, 1339–1348. doi:10.1016/j.anbehav.2004.05.007
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Glucose can be synthesized from noncarbohydrate precursors. In *Biochemistry* (5th ed., p. 1050). New York, NY: W. H. Freeman.
- Biro, P. A., Adriaenssens, B., & Sampson, P. (2014). Individual and sex-specific differences in intrinsic growth rate covary with consistent individual differences in behaviour. *The Journal of Animal Ecology*, **83**, 1186–1195. doi:10.1111/1365-2656.12210
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Bonga, S. E. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**, 591–625.
- Brackenbury, J. (2002). Kinematics and hydrodynamics of an invertebrate undulatory swimmer: the damselfly larva. *The Journal of Experimental Biology*, **205**, 627–639.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999

- Brodie III, E. D. (1989). Genetic correlations between morphology and antipredator behaviour in natural populations of the garter snake *Thamnophis ordinoides*. *Nature*, **342**, 542–543.
- Brodin, T. (2009). Behavioral syndrome over the boundaries of life--carryovers from larvae to adult damselfly. *Behavioral Ecology*, **20**, 30–37. doi:10.1093/beheco/arn111
- Cannon, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage* (1st ed., p. 311). New York, NY: D. Appleton and Company.
- Carazo, P., Noble, D. W. A., Chandrasoma, D., & Whiting, M. J. (2014). Sex and boldness explain individual differences in spatial learning in a lizard. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**, 1–9.
- Careau, V., Réale, D., Humphries, M. M., & Thomas, D. W. (2010). The pace of life under artificial selection: personality, energy expenditure, and longevity are correlated in domestic dogs. *The American Naturalist*, **175**, 753–758. doi:10.1086/652435
- Carere, C., Caramaschi, D., & Fawcett, T. W. (2010). Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: converging evidence and hypotheses. *Current Zoology*, **56**, 728–740.
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders - overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of the American Medical Association*, **267**, 1244–1252.
- Clary, D., Skyner, L. J., Ryan, C. P., Gardiner, L. E., Anderson, W. G., & Hare, J. F. (2014). Shyness-boldness, but not exploration, predicts glucocorticoid stress response in Richardson's ground squirrels (*Urocitellus richardsonii*). *Ethology*, **120**, 1–9. doi:10.1111/eth.12283
- Cooper, W. E. (2014). *Antipredatory behavior*. Indiana University - Purdue University.
- Costello, D. M., & Michel, M. J. (2013). Predator-induced defenses in tadpoles confound body stoichiometry predictions of the general stress paradigm, **94**, 2229–2236.
- Cote, J., Fogarty, S., Weinersmith, K., Brodin, T., & Sih, A. (2010). Personality traits and dispersal tendency in the invasive mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Proceedings of the Royal Society B*, **277**, 1571–1579. doi:10.1098/rspb.2009.2128
- Dall, S. R. X., Houston, A. I., & McNamara, J. M. (2004). The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. *Ecology Letters*, **7**, 734–739. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00618.x
- David, M., Auclair, Y., Giraldeau, L.-A., & Cézilly, F. (2012). Personality and body condition have additive effects on motivation to feed in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Ibis*, **154**, 372–378.

- David, M., Salignon, M., & Perrot-Minnot, M.-J. (2014). Shaping the antipredator strategy: flexibility, consistency, and behavioral correlations under varying predation threat. *Behavioral Ecology*, **25**, 1148–1156. doi:10.1093/beheco/aru101
- De Block, M., & Stoks, R. (2008). Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, **275**, 781–785. doi:10.1098/rspb.2007.1515
- De Souza, E. B., & Nemeroff, C. B. (1990). *Corticotropin-releasing factor: basic and clinical studies of a neuropeptide* (1st ed., p. 367). Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Dewitt, T. J., Sih, A., & Hucko, J. A. (1999). Trait compensation and cospecialization in a freshwater snail: size, shape and antipredator behaviour. *Animal Behaviour*, **58**, 397–407.
- Dingemanse, N., & Réale, D. (2005). Natural selection and animal personality. *Behaviour*, **142**, 1165–1190. doi:10.1163/156853905774539445
- Edmunds, M. (n.d.). Animal defences. Retrieved March 27, 2015, from <http://malcolmedmunds.co.uk/animal-defences/>
- Edmunds, M. (1974). *Defence in animals: a survey of anti-predator defences* (1st ed., p. 357). Harlow: Longman.
- Fields, P. E., & Woodring, J. P. (1991). Octopamine mobilization of lipids and carbohydrates in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology*, **37**, 193–199.
- Flenner, I., Olne, K., Suhling, F., & Sahlén, G. (2009). Predator-induced spine length and exocuticle thickness in *Leucorrhinia dubia* (Insecta: Odonata): a simple physiological trade-off? *Ecological Entomology*, **34**, 735–740. doi:10.1111/j.1365-2311.2009.01129.x
- Fuiman, L. A., Meekan, M. G., & McCormick, M. I. (2010). Maladaptive behavior reinforces a recruitment bottleneck in newly settled fishes. *Oecologia*, **164**, 99–108. doi:10.1007/s00442-010-1712-3
- Garamszegi, L. Z., Rosivall, B., Rettenbacher, S., Markó, G., Zsebők, S., Szöllösi, E., ... Török, J. (2012). Corticosterone, avoidance of novelty, risk-taking and aggression in a wild bird: no evidence for pleiotropic effects. *Ethology*, **118**, 621–635. doi:10.1111/j.1439-0310.2012.02049.x
- Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2010). *Biochemistry* (4th ed., p. 1059). Boston, MA: Brooks/Cole.
- Godin, J.-G. J., & Sproul, C. D. (1988). Risk taking in parasitized sticklebacks under threat of predation: effects of energetic need and food availability. *Canadian Journal of Zoology*, **66**, 2360–2367. doi:10.1139/z88-350

- Goligorsky, M. S. (2001). The concept of cellular “fight-or-flight” reaction to stress. *American Journal of Renal Physiology*, **280**, 551–561.
- Gosling, S. D. (2001). From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin*, **127**, 45–86.
- Gosling, S. D. (2008). Personality in non-human animals. *Social and Personality Psychology Compass*, **2**, 985–1001. doi:10.1111/j.1751-9004.2008.00087.x
- Guzik, S. (n.d.). The puffer fish voucher library. Retrieved March 28, 2015, from [http://vertebrates.si.edu/fishes/fugu\\_highlight/fugu.html](http://vertebrates.si.edu/fishes/fugu_highlight/fugu.html)
- Gyssels, F. G. M., & Stoks, R. (2005). Threat-sensitive responses to predator attacks in a damselfly. *Ethology*, **111**, 411–423. doi:10.1111/j.1439-0310.2005.01076.x
- Hawlena, D., Kress, H., Dufresne, E. R., & Schmitz, O. J. (2011). Grasshoppers alter jumping biomechanics to enhance escape performance under chronic risk of spider predation. *Functional Ecology*, **25**, 279–288. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01767.x
- Hawlena, D., & Schmitz, O. J. (2010). Physiological stress as a fundamental mechanism linking predation to ecosystem functioning. *The American Naturalist*, **176**, 537–556. doi:10.1086/656495
- Hebert, O. L., Lavin, L. E., Marks, J. M., & Dzieweczynski, T. L. (2014). The effects of 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol on boldness and its relationship to decision making in male Siamese fighting fish. *Animal Behaviour*, **87**, 203–212. doi:10.1016/j.anbehav.2013.10.032
- Hulthén, K., Chapman, B. B., Nilsson, P. A., Hollander, J., & Brönmark, C. (2014). Express yourself: bold individuals induce enhanced morphological defences. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**, 1–8.
- Janssens, L., & Stoks, R. (2014). Chronic predation risk reduces escape speed by increasing oxidative damage: a deadly cost of an adaptive antipredator response. *PloS One*, **9**, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0101273
- Johnson, D. M. (1991). Behavioral ecology of larval dragonflies and damselflies. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 8–13.
- Jones, T. C., Akoury, T. S., Hauser, C. K., Neblett II, M. F., Linville, B. J., Edge, A. A., & Weber, N. O. (2011). Octopamine and serotonin have opposite effects on antipredator behavior in the orb-weaving spider, *Larinioides cornutus*. *Journal of Comparative Physiology A*, **197**, 819–825. doi:10.1007/s00359-011-0644-7
- Kjørboe, T. (2008). Optimal swimming strategies in mate-searching pelagic copepods. *Oecologia*, **155**, 179–192. doi:10.1007/s00442-007-0893-x

- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **35**, 1291–1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003
- Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Coppens, C. M., & Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **31**, 307–321. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.001
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., ... Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **23**, 925–935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., & McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **29**, 3–38. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.08.009
- Kralj-Fišer, S., & Schuett, W. (2014). Studying personality variation in invertebrates: why bother? *Animal Behaviour*, **91**, 41–52. doi:10.1016/j.anbehav.2014.02.016
- Kralj-Fišer, S., Weiß, B. M., & Kotrschal, K. (2010). Behavioural and physiological correlates of personality in greylag geese (*Anser anser*). *Journal of Ethology*, **28**, 363–370. doi:10.1007/s10164-009-0197-1
- Lee, W.-S., Monaghan, P., & Metcalfe, N. B. (2010). The trade-off between growth rate and locomotor performance varies with perceived time until breeding. *The Journal of Experimental Biology*, **213**, 3289–3298. doi:10.1242/jeb.043083
- Li, B., Belasen, A., Pafilis, P., Bednekoff, P., & Foufopoulos, J. (2014). Effects of feral cats on the evolution of anti-predator behaviours in island reptiles: insights from an ancient introduction. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**, 1–6. doi:10.1098/rspb.2014.0339
- Lima, S. L. (1998). Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. In *Stress and Behavior* (1st ed., pp. 215–290). San Diego, CA: Academic Press, Inc. doi:10.1016/S0065-3454(08)60366-6
- Lima, S. L., & Dill, L. M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, **68**, 619–640.
- Maginnis, T. L. (2006). The costs of autotomy and regeneration in animals: a review and framework for future research. *Behavioral Ecology*, **17**, 857–872. doi:10.1093/beheco/arl010
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, **43**, 2–15. doi:10.1016/S0018-506X(02)00024-7

- McPeck, M. A. (1990). Behavioral differences between *Enallagma* species (Odonata) influencing differential vulnerability to predators. *Ecology*, **71**, 1714–1726.
- McPeck, M. A. (1996). Trade-offs, food web structure, and the coexistence of habitat specialists and generalists, **148**, S124–S138.
- McPeck, M. A. (1998). The consequences of changing the top predator in a food web: a comparative experimental approach. *Ecological Monographs*, **68**, 1–23.
- McPeck, M. A. (2004). The growth/predation risk trade-off: so what is the mechanism? *The American Naturalist*, **163**, E88–E111.
- McPeck, M. A., Grace, M., & Richardson, J. M. L. (2001). Physiological and behavioral responses to predators shape the growth/predation risk trade-off in damselflies, **82**, 1535–1545.
- McPeck, M. A., & Peckarsky, B. L. (1998). Life histories and the strengths of species interactions: combining mortality, growth, and fecundity effects. *Ecology*, **79**, 867–879.
- Mittelbach, G. G., Ballew, N. G., & Kjelvik, M. K. (2014). Fish behavioral types and their ecological consequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **71**, 927–944.
- Niemelä, P. T., DiRienzo, N., & Hedrick, A. V. (2012). Predator-induced changes in the boldness of naïve field crickets, *Gryllus integer*, depends on behavioural type. *Animal Behaviour*, **84**, 129–135. doi:10.1016/j.anbehav.2012.04.019
- Nyqvist, M. J., Gozlan, R. E., Cucherousset, J., & Britton, J. R. (2013). Absence of a context-general behavioural syndrome in a solitary predator. *Ethology*, **119**, 156–166. doi:10.1111/eth.12049
- Omar, H. E. M. (2013). The biological and medical significance of poisonous animals. *Journal of Biology and Earth Sciences*, **3**, M25–M41.
- Perez, K. O., & Munch, S. B. (2015). Sustained costs of growth and the trajectory of recovery. *Functional Ecology*, **29**, 393–403. doi:10.1111/1365-2435.12343
- Pilakouta, N., & Alonzo, S. H. (2014). Predator exposure leads to a short-term reversal in female mate preferences in the green swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Behavioral Ecology*, **25**, 306–312. doi:10.1093/beheco/art120
- Rabus, M., Söllradl, T., Clausen-Schaumann, H., & Laforsch, C. (2013). Uncovering ultrastructural defences in *Daphnia magna*--an interdisciplinary approach to assess the predator-induced fortification of the carapace. *PloS One*, **8**, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0067856



- Réale, D., Garant, D., Humphries, M. M., Bergeron, P., Careau, V., & Montiglio, P.-O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **365**, 4051–4063. doi:10.1098/rstb.2010.0208
- 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. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x
- Rennie, M. D., Collins, N. C., Shuter, B. J., Rajotte, J. W., & Couture, P. (2005). A comparison of methods for estimating activity costs of wild fish populations: more active fish observed to grow slower. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **62**, 767–780. doi:10.1139/f05-052
- Rich, E. L., & Romero, L. M. (2005). Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **288**, R1628–1636. doi:10.1152/ajpregu.00484.2004
- Robinson, J. V., Hayworth, D. A., & Harvey, M. B. (1991). The effect of caudal lamellae loss on swimming speed of the damselfly *Argia moesta* (Hagen) (Odonata: Coenagrionidae). *American Midland Naturalist*, **125**, 240–244. doi:10.2307/2426228
- Sepp, T., Männiste, M., Kaasik, A., & Hõrak, P. (2014). Multidimensionality of fear in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **68**, 1173–1181. doi:10.1007/s00265-014-1728-5
- Siepielski, A. M., Mertens, A. N., Wilkinson, B. L., & McPeck, M. A. (2011). Signature of ecological partitioning in the maintenance of damselfly diversity. *The Journal of Animal Ecology*, **80**, 1163–1173. doi:10.1111/j.1365-2656.2011.01863.x
- Sih, A. (1986). Antipredator responses and the perception of danger by mosquito larvae. *Ecology*, **67**, 434–441.
- Sih, A. (1987). Prey refuges and predator-prey stability. *Theoretical Population Biology*, **31**, 1–12.
- Sih, A., Bell, A., & Johnson, J. C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 372–378. doi:10.1016/j.tree.2004.04.009
- Sih, A., Kats, L. B., & Maurer, E. F. (2003). Behavioural correlations across situations and the evolution of antipredator behaviour in a sunfish–salamander system. *Animal Behaviour*, **65**, 29–44. doi:10.1006/anbe.2002.2025
- Sinn, D. L., Gosling, S. D., & Moltschanivskyj, N. A. (2008). Development of shy/bold behaviour in squid: context-specific phenotypes associated with developmental plasticity. *Animal Behaviour*, **75**, 433–442. doi:10.1016/j.anbehav.2007.05.008

- Slos, S., Meester, L. D., & Stoks, R. (2009). Behavioural activity levels and expression of stress proteins under predation risk in two damselfly species. *Ecological Entomology*, **34**, 297–303. doi:10.1111/j.1365-2311.2008.01077.x
- Slos, S., & Stoks, R. (2008). Predation risk induces stress proteins and reduces antioxidant defense. *Functional Ecology*, **22**, 637–642. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01424.x
- Smith, B. R., & Blumstein, D. T. (2008). Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, **19**, 448–455. doi:10.1093/beheco/arm144
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, **6**, 1025–1037. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x
- Spanier, E., Weihs, D., & Almog-Shtayer, G. (1991). Swimming of the Mediterranean slipper lobster. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **145**, 15–31. doi:10.1016/0022-0981(91)90003-F
- Steiner, U. K., & Van Buskirk, J. (2009). Predator-induced changes in metabolism cannot explain the growth/predation risk tradeoff. *PloS One*, **4**, 1–4. doi:10.1371/journal.pone.0006160
- Stevens, M., & Merilaita, S. (2009). Animal camouflage: current issues and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **364**, 423–427. doi:10.1098/rstb.2008.0217
- Stoks, R. (1999). The effect of lamellae autotomy and sexual size dimorphism on startle-response performance in larvae of a lepid damselfly (Odonata). *Journal of Zoology*, **247**, 269–273.
- Stoks, R., De Block, M., & McPeck, M. A. (2005). Alternative growth and energy storage responses to mortality threats in damselflies. *Ecology Letters*, **8**, 1307–1316. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00840.x
- Stoks, R., De Block, M., & McPeck, M. A. (2006). Physiological costs of compensatory growth in a damselfly. *Ecology*, **87**, 1566–1574.
- Stoks, R., & McPeck, M. A. (2006). A tale of two diversifications : reciprocal habitat shifts to fill ecological space along the pond permanence gradient, **168**, S50–S72.
- Strobbe, F., McPeck, M. A., De Block, M., De Meester, L., & Stoks, R. (2009). Survival selection on escape performance and its underlying phenotypic traits: a case of many-to-one mapping. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1172–1182. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01733.x
- Strobbe, F., McPeck, M. A., De Block, M., & Stoks, R. (2010). Survival selection imposed by predation on a physiological trait underlying escape speed. *Functional Ecology*, **24**, 1306–1312. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01752.x

- Strobbe, F., McPeck, M. A., De Block, M., & Stoks, R. (2011). Fish predation selects for reduced foraging activity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 241–247. doi:10.1007/s00265-010-1032-y
- Suhling, F., Sahlén, G., Gorb, S., Kalkman, V. J., Dijkstra, K.-D. B., & van Tol, J. (2015). Order Odonata. In J. H. Thorp & D. C. Rogers (Eds.), *Ecology and general biology: Thorp and Covich's freshwater invertebrates* (4th ed., Vol. 1, pp. 893–932). Academic Press.
- Sunardi, Asaeda, T., & Manatunge, J. (2007). Physiological responses of topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva*, to predator cues and variation of current velocity. *Aquatic Ecology*, **41**, 111–118. doi:10.1007/s10452-006-9048-0
- Teyssier, A., Bestion, E., Richard, M., & Cote, J. (2014). Partners' personality types and mate preferences: predation risk matters. *Behavioral Ecology*, **25**, 723–733. doi:10.1093/beheco/aru049
- Thomson, J. S., Watts, P. C., Pottinger, T. G., & Sneddon, L. U. (2011). Physiological and genetic correlates of boldness: characterising the mechanisms of behavioural variation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Hormones and Behavior*, **59**, 67–74. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.010
- Tollrian, R., & Harvell, C. D. (1990). The evolution of inducible defenses: current ideas. In R. Tollrian & C. D. Harvell (Eds.), *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. (1st ed., p. 383). Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Trewin, S. A. (2007). History of Psychology: Robert Yerkes' multiple-choice apparatus, 1913–1939. *American Journal of Psychology*, **120**, 645–660.
- Wibe, A. E., Nordtug, T., & Jenssen, B. M. (2001). Effects of bis(tributyltin)oxide on antipredator behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Chemosphere*, **44**, 475–481.
- Wingfield, J. C., Maney, D. L., Breuner, C. W., Jacobs, J. D., Lynn, S., Ramenofsky, M., & Richardson, R. D. (1998). Ecological bases of hormone—behavior interactions: the “emergency life history stage.” *American Zoology*, **38**, 191–206. doi:10.1093/icb/38.1.191
- Wolf, M., van Doorn, G. S., Leimar, O., & Weissing, F. J. (2007). Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature*, **447**, 581–584. doi:10.1038/nature05835
- Wolf, M., van Doorn, G. S., & Weissing, F. J. (2008). Evolutionary emergence of responsive and unresponsive personalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 15825–15830. doi:10.1073/pnas.0805473105
- Wong, M. Y. L., Medina, A., Uppaluri, C., Arnold, S., Seymour, J. R., & Buston, P. M. (2013). Consistent behavioural traits and behavioural syndromes in pairs of the false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*. *Journal of Fish Biology*, **83**, 207–213. doi:10.1111/jfb.12133

Zhao, W.-W., Pang, X., Peng, J.-L., Cao, Z.-D., & Fu, S.-J. (2012). The effects of hypoxia acclimation, exercise training and fasting on swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**, 1367–1377.  
doi:10.1007/s10695-012-9624-2

## Bijlage I - H- en P-zinnen

Tabel S1: H- en P-zinnen van schadelijke stoffen gebruikt in het laboratorium.

Product	H- en P-zinnen
<b>Ethanol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp.</li> <li>- H302: Schadelijk bij inslikken.</li> <li>- H371: Kan schade aan organen veroorzaken.</li> <li>- P210: Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. - Niet roken.</li> <li>- P250: Malen/schokken/...wrijving vermijden.</li> </ul>
<b>Aceton</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp.</li> <li>- H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.</li> <li>- H336: Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken.</li> <li>- EUH066: Herhaalde blootstelling kan een droge of een gebarsten huid veroorzaken.</li> <li>- P210: Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. - Niet roken.</li> <li>- P233: In goed gesloten verpakking bewaren.</li> <li>- P305+P351+P338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.</li> </ul>
<b>Bio-Rad Protein Assay reagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H226: Ontvlambare vloeistof en damp.</li> <li>- H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden.</li> <li>- H332: Schadelijk bij inademing.</li> <li>- H370: Veroorzaakt schade aan organen.</li> <li>- P210: Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. - Niet roken.</li> <li>- P303+P361+P353: BIJ CONTACT MET DE HUID (of het haar): Verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken. Huid met water afspoelen/afdouchen.</li> <li>- P305+P351+P338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.</li> <li>- P310: Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen.</li> <li>- P405: Achter slot bewaren.</li> <li>- P501: Inhoud/verpakking afvoeren volgens regulaties.</li> </ul>

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H271: Kan brand of ontploffingen veroorzaken; sterk oxiderend.</li> <li>- H332: Schadelijk bij inademing.</li> <li>- H302: Schadelijk bij inslikken.</li> <li>- H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden.</li> <li>- P221: Vermenging met brandbare stoffen absoluut vermijden.</li> <li>- P280.1+3: Beschermende handschoenen en oogbescherming dragen.</li> <li>- P303+P361+P353: BIJ CONTACT MET DE HUID (of het haar): Verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken. Huid met water afspoelen/afdouchen.</li> <li>- P305+P351+P338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.</li> <li>- P312: Bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen.</li> </ul>
<b>Dettol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H302: Schadelijk bij inslikken.</li> <li>- H315: Veroorzaakt huidirritatie.</li> <li>- H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken.</li> <li>- H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie.</li> <li>- P280: Beschermende handschoenen, kleding, oogbescherming en gelaatsbescherming dragen.</li> <li>- P305+P351+P338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.</li> </ul>
<b>Zwavelzuur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden.</li> <li>- P280.1+3: Beschermende handschoenen en oogbescherming dragen.</li> <li>- P301+P330+P331: NA INSLIKKEN: De mond spoelen. GEEN braken opwekken.</li> <li>- P305+P351+P338: BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.</li> </ul>

## Bijlage II - Groei ANCOVA's

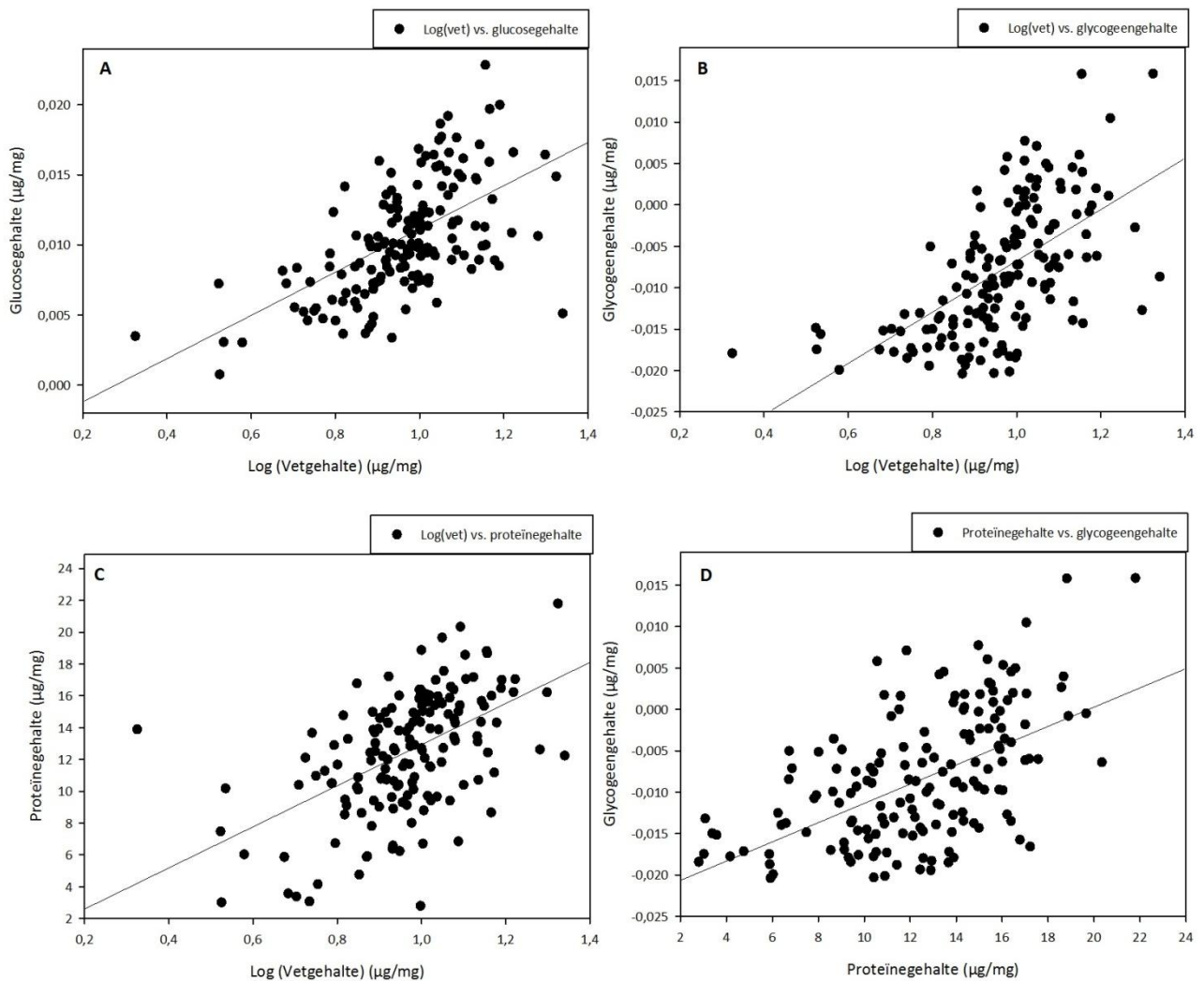
Tabel S2: ANCOVA van groei zonder inbegrip van de fysiologische maten. Sterretjes duiden significantie aan. ZS: zwemsnelheid (massa).

	Effect	df1,df2	F - waarde	p - waarde
<b>Groei</b>	Soort (S)	1,180	9.90	< .005*
	Behandeling (B)	1,180	14.7	< .0005*
	S*B	1,180	0.199	0.656
	LT A 1	1,180	1.35	0.247
	LT B 1	1,180	0.610	0.436
	LT A 2	1,180	0.148	0.701
	LT B 2	1,180	0.889	0.347
	LT A 3	1,180	1.50	0.222
	LT B 3	1,180	0.0925	0.761
	ZS voor	1,180	6.47	< .05*
	ZS na	1,180	17.8	< .0001*

Tabel S3: ANCOVA van groei met inbegrip van de fysiologische maten. Sterretjes duiden significantie aan. ZS: zwemsnelheid (massa).

	Effect	df1,df2	F - waarde	p - waarde
<b>Groei</b>	Soort (S)	1,143	7.07	< .01*
	Behandeling (B)	1,143	5.09	< .05*
	S*B	1,143	0.433	0.512
	LT A 1	1,143	0.994	0.320
	LT B 1	1,143	0.240	0.625
	LT A 2	1,143	0.142	0.707
	LT B 2	1,143	0.411	0.522
	LT A 3	1,143	0.0775	0.781
	LT B 3	1,143	0.0624	0.803
	ZS voor	1,143	5.10	< .05*
	ZS na	1,143	11.9	< .001*
	Glucose	1,143	0.720	0.398
	Glycogeen	1,143	2.38	0.125
	Proteïne	1,143	4.63	< .05*
	Vet	1,143	1.90	0.170

## Bijlage III - Correlaties tussen fysiologische variabelen



**Figuur S1:** Scatterplots van log (vetgehalte) t.o.v. glucosegehalte (regressierechte  $y = -0,0045 + 0,0067*x$ ;  $r^2 = 0,3476$ ; A), log (vetgehalte) t.o.v. glycogeengehalte ( $y = -0,0375 + 0,0133*x$ ;  $r^2 = 0,3536$ ; B), log (vetgehalte) t.o.v. proteïnegehalte ( $y = 0,2421 + 5,4855*x$ ;  $r^2 = 0,2682$ ; C) en proteïnegehalte t.o.v. glycogeengehalte ( $y = -0,0225 + 0,0012*x$ ;  $r^2 = 0,3093$ ; D).



