



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Psicologia Generale**

**Corso di Laurea in Scienze e Tecniche Psicologiche**

## **Elaborato Finale**

**Sviluppo di una nuova procedura per lo studio delle abilità  
di discriminazione numeriche nelle larve di zebrafish (Danio rerio)**

**Development of a new procedure to investigate  
numerical discrimination abilities in zebrafish larvae (Danio rerio)**

***Relatore:*  
Angelo Bisazza**

***Laureando:* Michele Peruzzi  
Matricola: 1221320**

**Anno Accademico 2021/2022**

# Indice

1.	Introduzione.....	4
1.1	Le Abilità numeriche negli animali.....	4
1.2	Le abilità numeriche dei pesci.....	7
1.3	L'uso delle larve di zebrafish come modello nella ricerca traslazionale e in neurobiologia.....	10
1.4	Capacità di apprendimento, di memoria e altre abilità cognitive delle larve di zebrafish.....	12
2.	Scopo della tesi.....	14
3.	Biologia della specie.....	16
4.	Materiali e metodi.....	20
4.1	Soggetti.....	20
4.2	Apparato sperimentale.....	21
4.3	Stimoli sperimentali.....	23
4.4	Procedura sperimentale.....	26
5.	Analisi statistiche.....	29
6.	Risultati.....	30
7.	Discussione.....	32

## ABSTRACT

Ad oggi gli zebrafish sono tra gli animali più utilizzati nell'ambito della ricerca scientifica. Questo successo è dovuto all'elevata fecondità, alla produzione di un gran numero di embrioni e al fatto che il sequenziamento del loro genoma ha evidenziato molte somiglianze con quello umano. Nonostante l'utilizzo di questa specie sia ampiamente diffuso nei laboratori, lo studio sulle loro facoltà cognitive è ancora un campo inesplorato. L'esperimento portato avanti nei laboratori dell'Università di Padova si è focalizzato sulle abilità di discriminazione numerica degli zebrafish in stadio larvale. Nel caso specifico si sono studiate le ratio 4vs12, 6vs12 e 9vs12. Le abilità numeriche infatti, sono una caratteristica fondamentale per la sopravvivenza delle specie in natura, esse per esempio permettono di riconoscere la numerosità dei propri conspecifici all'interno di un gruppo o la quantità di cibo presente in una determinata area. Le larve, all'età di 6 dpf, vengono introdotte in gruppi da 30 nelle vasche di abitudine, dove rimangono libere di nuotare ovunque vogliano. Dopo un giorno viene inserito nel mezzo della vasca un pannello con un foro al centro che divide la vasca in due compartimenti il cui collegamento è garantito unicamente dal foro. Il terzo giorno vengono aggiunti sui lati corti della vasca gli stimoli con rinforzo, che vengono invertiti di posizione a metà giornata. Terminata la fase di abitudine si passa ai test individuali nei quali le larve vengono inserite singolarmente nelle proprie vasche e ripetono ciò che è stato fatto nelle vasche di abitudine per 5 giorni consecutivi. Lo scopo dell'esperimento è verificare, in base al numero di passaggi da un settore all'altro della vasca e al tempo trascorso in quello giusto piuttosto che in quello sbagliato, se le larve siano effettivamente in grado di discriminare lo stimolo rinforzato da quello non. I risultati ottenuti sono stati positivi e hanno dimostrato una buona capacità di

apprendimento da parte delle larve con un numero significativo di passaggi effettuati  
nella fase di registrazione.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 LE ABILITA' NUMERICHE NEGLI ANIMALI

Lo studio delle abilità numeriche negli animali è un argomento che da sempre ha coinvolto psicologi, zoologi e filosofi. Ne è un esempio l'interesse che suscitò il caso del cavallo Clever Hans che, secondo la storia, era in grado di risolvere piccoli problemi matematici sbattendo lo zoccolo sul terreno per fornire la risposta corretta. Numerosi studi in laboratorio e sul campo hanno evidenziato come le abilità numeriche rappresentino un vantaggio di vitale importanza per le specie animali. Ne è un pratico esempio la possibilità per una scimmia di distinguere quale zona di una foresta offra una maggior abbondanza di cibo o quale albero metta a disposizione i frutti più grossi e per un leone di riconoscere in quale area della savana si concentri il maggior numero di zebre. I roditori del genere *Apodemus* preferiscono cacciare piccoli gruppi di formiche rosse per abbassare il rischio di venirse morsi. Ad oggi esiste un'ampia raccolta di studi condotti su uccelli e mammiferi che ne hanno indagato le abilità numeriche. Negli anni il numero di specie prese in esame ha visto un progressivo aumento coinvolgendo in un primo momento piccioni, scoiattoli, corvi e pappagalli sui quali si testavano prevalentemente le abilità con i numeri ordinali e cardinali. Successivamente l'interesse di etologi e ricercatori della psicologia comparata venne completamente assorbito dalle scimmie, sulle quali produssero una quantità notevole di articoli studiandone le aree cerebrali coinvolte durante le rappresentazioni mentali e durante i compiti matematici e di orientamento nel tempo e nello spazio (Agrillo & Bisazza, 2018; Figura 1).

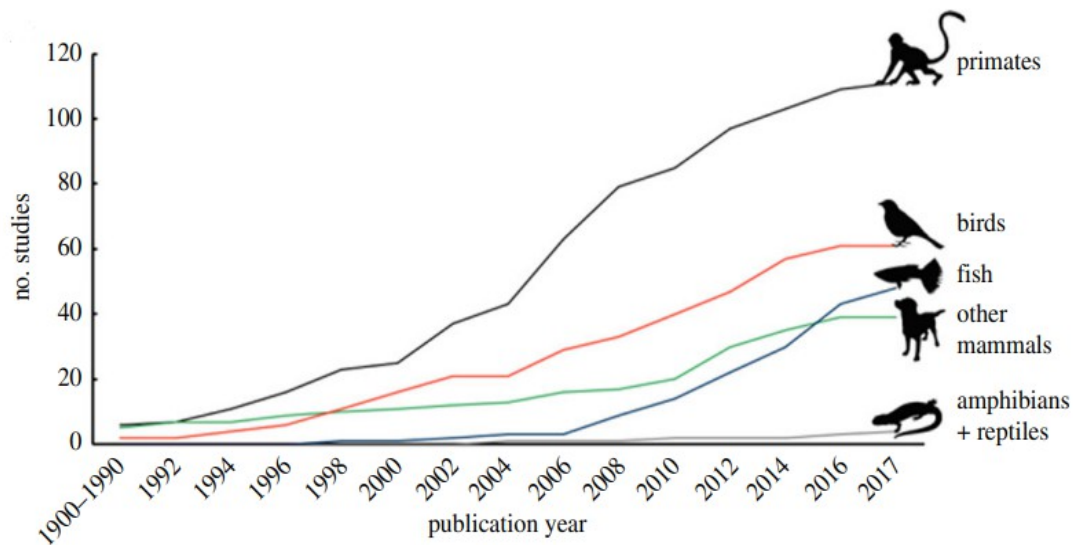


Figura 1 - Numero di pubblicazioni di studi condotti su vertebrati a partire dal 1900. Fonte: Agrillo & Bisazza, 2018

E' interessante osservare come spesso informazioni di natura numerica potrebbero essere dedotte da informazioni come il volume complessivo occupato dagli items, dall'area cumulativa occupata o dalla densità degli oggetti. Ad esempio nel caso dei roditori citati sopra la numerosità del gruppo di formiche potrebbe essere dedotta dall'area che occupano o dalla quantità totale di movimento osservato. La capacità di prendere decisioni ottimali dipende dal tipo di meccanismo cognitivo coinvolto. È importante comprendere il processo esatto attraverso il quale un animale stima il numero di oggetti, ovvero se enumera gli oggetti, se utilizza segnali non numerici che coincidono con il numero o se basa la sua valutazione su più meccanismi. Discriminare tra queste alternative è spesso complesso e si ottiene attraverso articolati esperimenti di

laboratorio nei quali sono controllati i diversi tipi di variabili (Beran & Beran, 2004; Gómez-Laplaza & Gerlai, 2013).

Due approcci principali sono stati adottati in letteratura per studiare le abilità numeriche: test a libera scelta che richiedono poco o nessun tipo di addestramento e test con procedure di addestramento più estese come il training. Diversi autori ritengono che queste due metodologie potrebbero reclutare circuiti neurali parzialmente diversi e quindi portare a risultati diversi (Agrillo & Bisazza, 2014).

I test a libera scelta in genere sfruttano la tendenza naturale di una specie a preferire maggiori o minori quantità. Generalmente si presentano ad un animale due serie contenenti un numero diverso di stimoli biologicamente rilevanti. La scelta tra diverse quantità di prodotti alimentari è la più comune. Ad esempio, uno studio ha testato la capacità spontanea degli elefanti di scegliere la quantità maggiore di carote presentate su due piatti separati (Perdue, Talbot, Stone, & Beran, 2012). Per ottenere una delle due opzioni, i soggetti dovevano raggiungere il piatto preferito. L'ipotesi alla base di questo tipo di studio è che, se i soggetti sono in grado di esprimere giudizi quantitativi relativi, ci si aspetta che selezionino spontaneamente la quantità maggiore.

Gli studi di training consentono di implementare un paradigma di condizionamento operante nel quale i soggetti sono addestrati ad apprendere una regola numerica per ricevere una ricompensa. Gli stimoli sono associati a una ricompensa alimentare sulla base di alcune regole come la scelta del maggior numero di elementi. Ad esempio, una scimmia può essere addestrata a selezionare il gruppo più ampio di punti presentati sul monitor al fine di ottenere una singola pallina di cibo.

In generale, sembrerebbe che nella discriminazione di quantità subentrino due sistemi non verbali diversi: uno per le piccole quantità e uno per le grandi numerosità, entrambi

comuni sia a uomini che ad animali. La prima è la Approximate Number System (ANS) e la sua peculiarità sembra quella di essere un sistema di discriminazione numerica innato per bassi confronti numerici. E' stato osservato infatti che bambini di 12 mesi siano in grado di scegliere l'insieme più numeroso in confronti che arrivino fino a 3 (Feigenson et al., 2002). Risultati simili sono stati ottenuti con scimmie rhesus (*Macaca mulatta*) che hanno dimostrato di risolvere con successo confronti numerici che arrivano fino a 4 (Hauser, Carey & Hauser, 2000). Il meccanismo deputato alla discriminazione di grosse quantità invece è l' *Object Tracking System* (OTS). La dimostrazione che la discriminazione di quantità via via maggiori si affini con l'età è data dai bambini: a 2 giorni distinguono elementi con ratio 1:3 (Izard, Sann, Spelke & Streri, 2009), a 6 mesi distinguono elementi con ratio 1:2 (Xu & Spelke, 2000), a 10 mesi distinguono elementi con ratio 2:3 (Xu & Arriaga 2007), a 6 anni distinguono elementi con ratio 5:6 e gli adulti distinguono elementi con ratio 10:11 (Halberda & Feigenson, 2008).

## **1.2 LE ABILITA' NUMERICHE DEI PESCI**

Solo a partire dagli anni 2000 gli studi si sono allargati anche ai vertebrati inferiori ed in particolare ai pesci. I teleostei infatti rappresentano una preziosa risorsa per il mondo

della ricerca, non solo quello della psicologia comparata, grazie ai molteplici vantaggi che il loro impiego comporta. Il loro sviluppo infatti è molto più rapido rispetto alle altre specie, sono indipendenti sin dalla nascita e hanno una vita media sufficientemente longeva da poterne permettere studi approfonditi scientificamente rilevanti. In alcune specie come gli zebrafish (*Danio Rerio*), sia gli embrioni che le larve sono trasparenti, il che facilita notevolmente l'impiego di tecniche in vivo, come il neuroimaging, per lo studio dell'intero cervello.

Dato il loro cervello relativamente più piccolo, ci si potrebbe aspettare che i pesci abbiano capacità quantitative più scarse di quelle di molti vertebrati. Al contrario, studi di laboratorio basati sull'osservazione del comportamento spontaneo e sulle procedure di condizionamento operante hanno dimostrato che l'accuratezza nelle scelte dei pesci su quantità relative è uguale a quelle di molti uccelli e mammiferi.

In natura queste abilità hanno una funzione fondamentale per aumentare le proprie probabilità di sopravvivenza e non è un caso che essi abbiano la tendenza a raggrupparsi in gruppi molto numerosi, infatti, per un meccanismo di diluizione del rischio, la probabilità di un individuo di essere predato diminuisce all'aumentare della numerosità del gruppo di appartenenza. Questo inoltre garantisce una maggior protezione poiché produce nei predatori un effetto confondente e aumenta la probabilità di poterli individuare.

Anche in laboratorio i pesci hanno confermato tali abilità, è stato scoperto come i guppy (*Poecilia reticulata*) siano in grado di discriminare il confronto 4vs5 (ratio 0.80) mentre gli spinarelli (*Gasterosteus aculeatus*) possono arrivare a 6vs7 (ratio 0.86). Complessivamente le capacità numeriche dei pesci sono ragionevolmente inferiori a quelle degli esseri umani, dei gorilla (ratio 0.9), delle scimmie (0.88), ma sono molto

simili e talvolta superiori a quelle di mammiferi come i cani (ratio 0.75), i cavalli (ratio 0.66) e a quelle di alcuni uccelli come i piccioni (ratio 0.86) e i polli (ratio 0.66) (Agrillo C, Piffer L, Bisazza A. 2010 ).

Le informazioni numeriche spesso covariano con diversi attributi fisici degli stimoli, che sono comunemente chiamati quantità continue. Ad esempio, il gruppo più grande di oggetti ha in genere una superficie cumulativa più ampia e una densità maggiore.

Le prove in letteratura mostrano che anche i pesci tendono discriminare tra le quantità usando sia le quantità continue che i numeri.

Ad esempio, se posti in presenza di due banchi, le gambusie sono in grado di discriminare il banco più grande sia con confronti piccoli 1vs2, 2vs3 e 3vs4 conspecifici sia con confronti di maggiore numerosità come 4vs8 e 4vs10 (Henik A. 2016).

Tra i pesci teleostei invece si è documentato che il Goodeide dalla coda rossa (*Xenotoca eiseni*), il pesce angelo (*Pterophyllum scalare*), il pesce combattente (*Betta splendens*), lo zebrafish (*Danio rerio*) e il guppy (*Poecilia reticulata*) sono in grado di discriminare 5vs10 e 6vs12 elementi, e che i primi tre riescono a generalizzare la regola anche nel confronto 2vs4 (Agrillo, Miletto Petrazzini, Tagliapietra & Bisazza, 2012).

Anche il sesso sembra essere un fattore incisivo nella discriminazione numerica (Lucon-Xiccato T, Bisazza A. 2017). In un compito di 4vs6 infatti mettendo a confronto un gruppo di maschi con uno di femmine di *P. Reticulata*, si è osservato che i risultati pur essendo simili mostravano delle differenze nei tempi di esecuzione. Questo sembra essere dovuto al fatto che in natura i predatori preferiscono le femmine che, in risposta, potrebbero aver sviluppato una maggior rapidità nel riconoscimento di eventuali predatori. Negli ultimi 10 anni gli studi sui pesci si sono intensificati molto, ma nonostante ciò le lacune conoscitive che permangono sulle loro reali capacità di

apprendimento sono ancora molte, soprattutto se paragonate a quelle acquisite su altri vertebrati come roditori o uccelli. Le motivazioni sono legate prevalentemente all'habitat in cui queste specie si sviluppano. La maggior parte delle tecnologie impiegate nello studio delle abilità numeriche infatti fanno affidamento su dispositivi touchscreen, che al momento risultano ancora scarsamente compatibili con gli ambienti acquatici.

### **1.3 L'USO DELLE LARVE DI ZEBRAFISH COME MODELLO NELLA RICERCA TRASLAZIONALE E IN NEUROBIOLOGIA**

Come si accennava in precedenza, l'impiego dei pesci nel mondo della ricerca comporta degli indiscutibili vantaggi dal punto di vista pratico e organizzativo, in special modo le larve di zebrafish (*Danio Rerio*) si sono rivelate particolarmente adatte. Tra i teleostei infatti, questa specie rappresenta il modello per eccellenza nella ricerca traslazionale. La trasparenza ottica nella forma embrionale garantisce un pregio per lo studio in vivo delle funzioni cerebrali tramite tecniche di neuroimaging. Inoltre la schiusa delle uova avviene già a 2-3 giorni dalla fecondazione dell'uovo (days post-fertilization o *dpf*) mentre a 6 *dpf* raggiungono un'autonomia completa che consente loro di nuotare e nutrirsi liberamente. Oltre a ciò, bisogna considerare gli scarsi costi di mantenimento e l'alta fecondità della specie e la sua particolarità a livello genetico. In seguito al sequenziamento genetico del suo genoma si è riscontrata un'elevata omologia con quello

umano, il che rappresenta una preziosissima risorsa per l'indagine scientifica su malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer o la sclerosi multipla.

Studiando l'anatomia del Sistema Nervoso Centrale (SNC) dello zebrafish ci si è accorti dell'assenza dell'ippocampo, che nei mammiferi è la ghiandola sede della memoria e responsabile dell'orientamento spaziale. In suo luogo c'è un'altra struttura che prende il nome di pallio laterale o mediale (Gerlai, 2020). L'assenza dell'ippocampo dunque non ha impedito al D. Rerio di ottenere risultati simili a quelli dell'uomo. Un altro importante tema affrontato nel campo della ricerca con gli zebrafish è lo studio della memoria e dell'apprendimento.

La capacità di apprendere e memorizzare le caratteristiche di un oggetto per poterlo riconoscere quando lo si incontra di nuovo, è una caratteristica fondamentale per le attività legate alla fitness come procurarsi il cibo, evitare predatori o interagire con conspecifici. La memoria di riconoscimento consente di discriminare gli stimoli familiari da quelli nuovi e di adattare il proprio comportamento di conseguenza (Antunes & Biala, 2012;Blaser & Heyser, 2015) . Nei mammiferi e negli uccelli, la memoria di riconoscimento sembra apparire molto presto, gli zebrafish invece hanno un sistema nervoso molto meno sviluppato e i dati raccolti sulle loro capacità cognitive sono ancora scarsi. E' stato dimostrato che le larve di zebrafish possono imparare ad evitare un determinato lato della vasca associando tale posizione ad una scossa di elettroschock (Valente,2012). In questo esperimento la fase di apprendimento è iniziata a 21 *dpf* e le prestazioni sono state raggiunte dopo circa 3 settimane, ovvero quando gli zebrafish erano già completamente sviluppati. Tuttavia non è ancora chiaro se questa specie sia in grado di memorizzare le caratteristiche degli oggetti che incontra per poterle riconoscere e distinguere da oggetti nuovi.

#### **1.4 CAPACITA' DI APPRENDIMENTO, DI MEMORIA E ALTRE ABILITA' COGNITIVE DELLE LARVE DI ZEBRAFISH**

Nel *D. Rerio*, il tempo di sviluppo dalla fecondazione alla schiusa è tra i più brevi di tutti i vertebrati, durando tra le 48 e le 72 h. Dopo la schiusa, le larve trascorrono la maggior parte del tempo inattive, sdraiate su un fianco. Lo Zebrafish inizia a nuotare libero da 120 *hpf* (hour post fecondation). Tuttavia, è solo dopo 140 *hpf* che lo sviluppo del tubo digerente è completato e iniziano a nutrirsi (Balon, 1975; Strähle et al., 2012).

Nel periodo successivo all'inizio dell'alimentazione autonoma, lo zebrafish non mostra comportamenti complessi diversi dal nuoto e dall'alimentazione. L'attrazione per i conspecifici e il comportamento sociale complesso appare molto più tardi, a circa tre settimane di vita (Dreosti et al., 2015). Semplici forme di apprendimento possono essere dimostrate nella larva di zebrafish. Ad esempio, 7-10 giorni dopo la fecondazione (dpf) le larve possono essere condizionate per evitare il lato più oscuro del loro acquario erogando una lieve scossa elettrica (Yang et al., 2019). È stato dimostrato che il sistema visivo dello zebrafish è già notevolmente sviluppato al momento della nascita. Le larve hanno mostrato una risposta sorprendente a un rapido cambiamento nell'intensità della luce a circa 72 *hpf* e il rilevamento dei movimenti oculari si è sviluppato a circa 80 *hpf* (Pasqua e Nicola, 1996). Poco si sa sulla capacità di discriminare gli oggetti nella prima settimana dopo la schiusa. Prove indirette suggeriscono che a partire da 14 dpf, la larva di *D. Rerio* sia in grado di riconoscere uno stimolo familiare basato sul suo colore o

forma (Bruzzone et al., 2020). Inoltre, a 14 dpf, le larve hanno marcate preferenze per determinati modelli visivi, suggerendo che a questa età possono discriminare le loro caratteristiche (Gatto et al., 2021). Studi precedenti hanno dimostrato che lo zebrafish appena nato può imparare a rispondere a semplici stimoli. Ad esempio, possono essere condizionati a girare la coda per ottenere sollievo dall'esposizione al calore o imparare a stare lontano dalla parte più buia della vasca per evitare una scossa elettrica (Yang et al., 2019). Utilizzando un nuovo paradigma di apprendimento appetitivo, è stato dimostrato che, una settimana dopo la schiusa, le larve di *D. Rerio* associano rapidamente uno schema visivo a una ricompensa alimentare e possono discriminare accuratamente due oggetti in base al loro colore o forma (Santacà et al. 2022). Il paradigma in questione prevede l'esposizione delle larve di zebrafish da 8 dpf a 12 dpf per due volte al giorno a due modelli visivi, fornendo cibo in corrispondenza di uno dei due. Come conseguenza di questo accoppiamento, le larve hanno aumentato il tempo trascorso in associazione con il modello rinforzato. Non sono state riscontrate differenze tra i soggetti allenati sull'uno o sull'altro stimolo, escludendo così la possibilità che i risultati fossero spiegati da preferenze innate per alcuni pattern. I primi due giorni di training sono stati condotti in gruppo, mentre nei 3 successivi si sono andate a registrare le prestazioni individuali. Si è osservato che l'apprendimento avviene molto rapidamente, con una performance significativa già nel primo giorno di training individuale, ovvero a 10 dpf.

Questa è stata una scoperta particolarmente interessante perché, per la prima volta, mostra l'esistenza dell'apprendimento appetitivo nel *D. Rerio* già nella prima settimana dopo la schiusa. È stato suggerito che la capacità di una larva di imparare a evitare un luogo buio dove ha precedentemente ricevuto una scossa elettrica sia adattativa perché, in natura, questa capacità consente loro di evitare parti pericolose del loro habitat, come

quelle contenenti predatori (Yang et al., 2019). Allo stesso modo, è probabile che sia utile per gli zebrafish nati di recente imparare e ricordare una posizione particolare o le caratteristiche del microhabitat in cui avevano precedentemente consumato cibo.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo del seguente lavoro è quello di analizzare lo sviluppo della capacità di discriminare quantità numeriche nelle larve di *D. Rerio*. Nonostante la ricca produzione letteraria su questo argomento, la cui crescita ha visto una considerevole impennata nell'ultimo decennio, soprattutto per quanto riguarda gli esemplari adulti, si sa ancora poco sulle larve e sull'ontogenesi della loro conoscenza. Per far luce su ciò che ancora c'è da scoprire in tale direzione, si è utilizzato un paradigma di condizionamento operante con l'uso di rinforzo alimentare al fine di addestrare i soggetti a discriminare grandi numerosità. In particolare, si è andati ad osservare il comportamento di larve di

zebrafish utilizzando i seguenti confronti numerici: 4vs12, 6vs12 e 9vs12. La procedura sperimentale utilizzata prevede una fase di gruppo seguita da una fase individuale. Gli stimoli, raffiguranti i confronti numerici mediante l'uso di pallini, sono stati controllati per le variabili continue di convex hull e densità, in modo tale da garantire che il criterio di apprendimento si basasse sulla sola informazione numerica.

### 3. BIOLOGIA DELLA SPECIE

*Danio rerio* (Hamilton), è uno degli organismi vertebrati più importanti in genetica, neurofisiologia e biomedicina grazie alle numerose e pregevoli caratteristiche che lo contraddistinguono come ottimo esemplare per la ricerca in questi ambiti (Vascotto, Beckham & Kelly, 1997).

Lo zebrafish è un Ciprinide, ovvero appartiene alla famiglia di pesci di acqua dolce nativi dell'America del Nord, Africa e Eurasia. In natura la sua presenza è stata confermata con una maggiore concentrazione nei bacini fluviali del Gange e del Brahmaputra nelle aree nord-orientali di India, Bangladesh e Nepal (Figura 2), ma alcuni dati suggeriscono una non trascurabile distribuzione anche sul resto del territorio indiano.

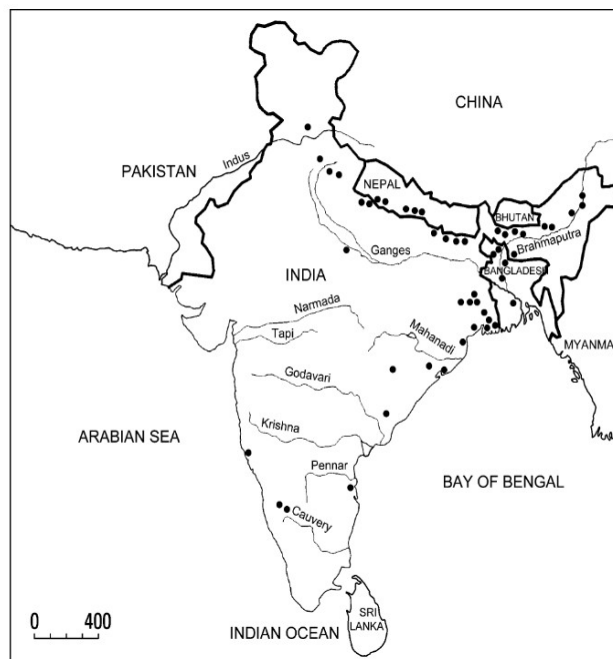


Figura 2- Distribuzione Zebrafish su territorio indiano

La sua elevata adattabilità gli consente di sopravvivere in ambienti diversi tra loro, come ad esempio in acque che hanno una temperatura, un pH ed una durezza molto variabili.

Tuttavia tende a prediligere corsi d'acqua lenti e poco profondi o pozze (tipiche nelle stagioni dei monsoni) nelle quali l'acqua può essere sia limpida sia torbida e vi è, nella maggior parte dei casi, la presenza di vegetazione acquatica. Ne sono un tipico esempio risaie (Engeszer, Patterson, Rao & Parichy, 2007; Spence et al., 2008), ma anche ruscelli e rive dei fiumi (Spence et al., 2008).

Lo zebrafish è una specie onnivora, si nutre prevalentemente di zooplancton come piccoli crostacei, insetti e larve, ma anche di fitoplancton, alghe filamentose, spore e uova di invertebrati. La posizione della sua bocca, che è rivolta verso l'alto, conferma la sua preferenza per il cibo che si trova in superficie.

In ambiente naturale è una preda e per questa ragione preferisce muoversi all'interno di ambienti ricchi di vegetazione nella quale potersi mimetizzare in caso di attacco.

E' un pesce di taglia piccola dal corpo affusolato, compresso ai lati, tendenzialmente non supera i 40 mm. Il dorso è di color olivastro mentre il ventre argenteo. La livrea è solcata da 5 a 7 strisce orizzontali dal colore bluastro, intervallate da strisce bianche che si estendono dall'opercolo della pinna caudale (Barman, 1999). La specie presenta un lieve dimorfismo corporeo tra maschi e femmine (Figura 3), i primi infatti presentano un corpo più affusolato ed una pinna anale più grande rispetto alle femmine che invece hanno un ventre più pronunciato, in modo ancor più evidente durante il periodo riproduttivo (Laale, 1977; Spence et al., 2008).



*Figura 3- Esempari di D.Rerio femmina (in alto) e maschio (in basso)*

L'accoppiamento in natura avviene durante la stagione dei monsoni e sembra essere fortemente condizionato dall'esposizione alla luce, sia artificiale che solare, suggerendo che la specie sia fotosensibile.

Il corteggiamento da parte del maschio avviene con un inseguimento della partner, seguendo una traiettoria a cerchio o a forma di otto, mentre la picchietta lateralmente col muso per indirizzarla verso quella che sarà la sede dell'accoppiamento. Una volta raggiunta la zona ritenuta più adatta, il maschio nuota lateralmente alla femmina aprendole intorno le pinne caudali e dorsali affinché i propri pori genitali siano allineati. Oscillando il proprio corpo ad alta frequenza e bassa ampiezza il maschio elicitava nella femmina la deposizione delle uova che vengono immediatamente irrorate dallo sperma e dunque fecondate (Spence et al., 2008). Questa sequenza viene ripetuta per un periodo che va dalla mezz'ora all'ora; la femmina espelle circa 5-20 uova per volta. In natura le

uova vengono depositate su superfici limose, tipiche dell'habitat della specie, ma qualora vengano messi a loro disposizione, gli zebrafish prediligono siti con superfici ghiaiose e floride di vegetazione che garantiscono una maggior ossigenazione agli embrioni e che forniscono maggior protezione alle larve (Spence, Ashton & Smith, 2007).

Le uova hanno un diametro di 0.7 mm e si schiudono tra le 48-72h dopo la fecondazione. Subito dopo la schiusa, la vescica natatoria si gonfia e la larva è libera di nuotare nei vari livelli della colonna d'acqua. Già a 5 dpf le larve sono in grado di mettere in atto una serie di schemi comportamentali come la ricerca di cibo e la risposta di evitamento (Spence et al., 2008).

Durante la prima settimana di vita gli zebrafish non mostrano particolari preferenze sociali, ma maturano in poco tempo attrazione verso altri individui, per poi manifestare comportamenti di coordinazione reciproca (Dreosti et al., 2015), mentre a partire dalla terza settimana dalla fecondazione si iniziano ad osservare eventi di coesione e sincronizzazione dei movimenti tra conspecifici.

Prima di raggiungere la maturità sessuale passano attraverso quello che può essere definito uno “stadio intersessuale”: le gonadi inizialmente si sviluppano come ovari in entrambi i sessi e il loro differenziamento avviene intorno alla quinta settimana di vita (Maack & Segner, 2003). Entro i tre mesi di età, gli zebrafish diventano adulti.

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 SOGGETTI

In questi esperimenti sono state impiegate larve di *Danio rerio* a 10 dpf (Figura 4).

Le uova di zebrafish provenivano da adulti di tipo wild type allevati nel laboratorio del Dipartimento Generale dell'Università di Padova.

Le uova, dopo essere state raccolte, venivano inserite in capsule petri ad una densità di 30 individui per ciascuna e riempite con una soluzione Fish Water 1x (0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.5 gr Instant Ocean, 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata) e blu di metilene (0,0016 g/l). Le uova venivano conservate in una stanza illuminata attraverso un ciclo luce:buio di 14:10 ore e mantenuta a una temperatura costante di  $28.5 \pm 1$  °C, dove sono state mantenute per 5 giorni con pulizia e ricambio dell'acqua quotidiano.

A 6 dpf le larve sono state trasferite all'interno di apparati aventi una forma a clessidra, ognuno dei quali contenente 30 individui. In questa fase iniziale di abituação, i soggetti sono stati nutriti due volte al giorno, mattino e pomeriggio, con cibo in polvere ed il successivo giorno è stata inserita una barriera avente un foro, avente la funzione di dividere l'apparato in due compartimenti e di non lasciar passare il cibo da un settore all' altro. Successivamente alla fase di abituação, i soggetti venivano addestrati per due giornate in gruppo.

Dopo questa prima fase di gruppo, le larve venivano inseriti in apparati più piccoli ed iniziavano la fase di test individuale della durata di 5 giorni.

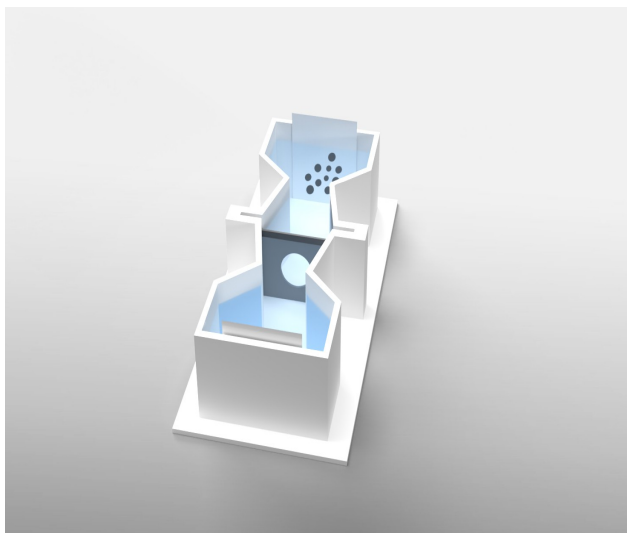


*Figura 4- Larve di D. Rerio*

#### **4.2 APPARATO SPERIMENTALE**

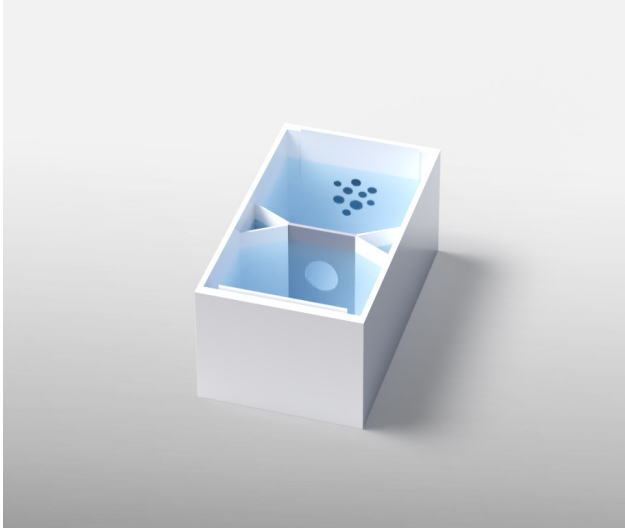
Nell'esperimento sono stati impiegati due tipi di apparati differenti: uno dedicato alla fase di abituação e al training di gruppo e uno per la fase individuale

Nella prima fase di gruppo è stato utilizzato un apparato a forma di clessidra (12 x 4.8 x 4cm) (Figura 5), formata da due compartimenti, uno anteriore e uno posteriore, collegati da un corridoio più stretto (lungo 4,3 cm).



*Figura 5- Apparato sperimentale a clessidra*

Nella fase di test individuale le larve sono state trasferite in vaschette aventi forma rettangolare (7,3 x 4,3 x 4 cm) (Figura 6).



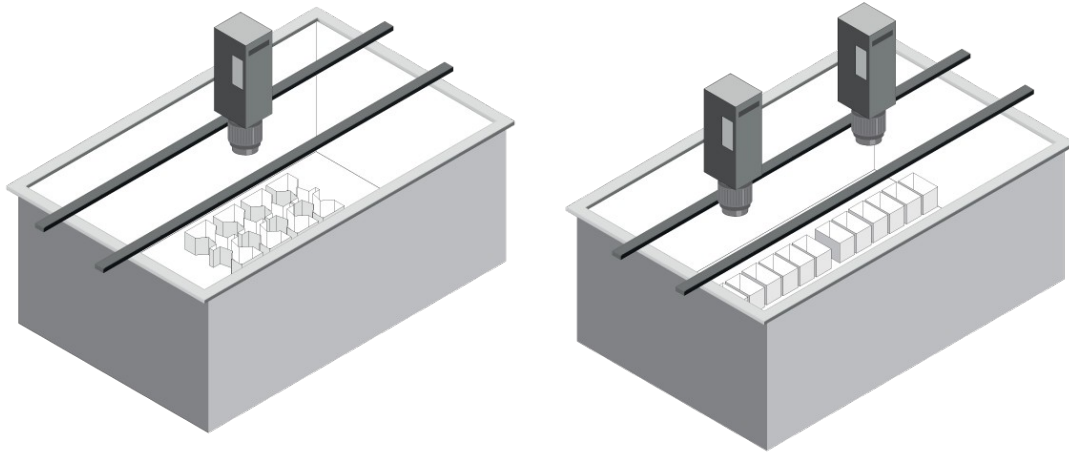
*Figura 6- Apparato sperimentale rettangolare*

Ogni apparato è stato realizzato in acido polilattico (PLA) tramite stampante 3D.

Al centro del corridoio di ognuno di essi è stato posto un pannello in PLA dotato di foro, del diametro di 1 cm, attraverso il quale le larve potevano spostarsi da un compartimento all'altro.

Ogni apparato è stato riempito con una dose di Fish Water fino a un'altezza di 3,5 cm.

L'illuminazione degli apparati è stata garantita da lampade a LED di 0,72 W, poste 27 cm al di sopra di ciascuna delle vasche che contenevano gli apparati sperimentali (Figura X). Al di sopra delle medesime vasche, sono state posizionate delle telecamere al fine di registrare i due trials giornalieri (Figura 7).



*Figura 7- Disposizione telecamere impiegate per videoregistrazione*

### **4.3 STIMOLI SPERIMENTALI**

Gli stimoli sperimentali utilizzati consistevano in fogli plastificati di dimensione 4,8 x 3,8 cm che venivano posizionati sul lato corto delle pareti degli apparati.

Ogni coppia di stimoli raffigurava una numerosità sotto forma di pallini neri che, a seconda dei casi, rappresentavano i seguenti confronti numerici: 4vs12, 6vs12, 9vs12.

Per ogni confronto sono state create 24 coppie di stimoli che rispettavano i criteri di area e disposizione dei pallini.

Ogni coppia di stimoli era formata nel seguente modo: veniva sommata l'area dei pallini appartenenti allo stimolo maggiore. Questa veniva moltiplicata per un coefficiente di correzione, differente per ogni coppia di stimoli, ed il risultato veniva diviso per 100.

Da quest'ultima divisione ciò che si otteneva era l'area complessiva dei pallini dello stimolo minore.

Numero Coppia	Coefficiente %
1	76
2	77
3	79
4	90
5	81
6	83
7	84
8	85
9	86
10	88
11	89
12	90
13	92
14	93
15	94
16	95
17	96
18	97
19	98
20	100
21	101
22	102
23	104
24	105

Per quanto riguarda la disposizione dei pallini sono stati utilizzati due criteri, quello di densità e di convex hull. Metà delle 24 coppie sono state create andando a disporre i

pallini alla medesima distanza (criterio di densità) e metà controllando la disposizione dei pallini dello stimolo maggiore e di quello minore in modo che seguissero il perimetro di un poligono (convex hull) (Figura 8).

Ogni soggetto vedeva due differenti coppie di stimoli al giorno e la loro posizione veniva cambiata tra una prova e l'altra. Dunque, se nella prima prova lo stimolo rappresentante la numerosità maggiore era posto sul lato posteriore dell'apparato, nella seconda prova veniva posto sul lato anteriore.

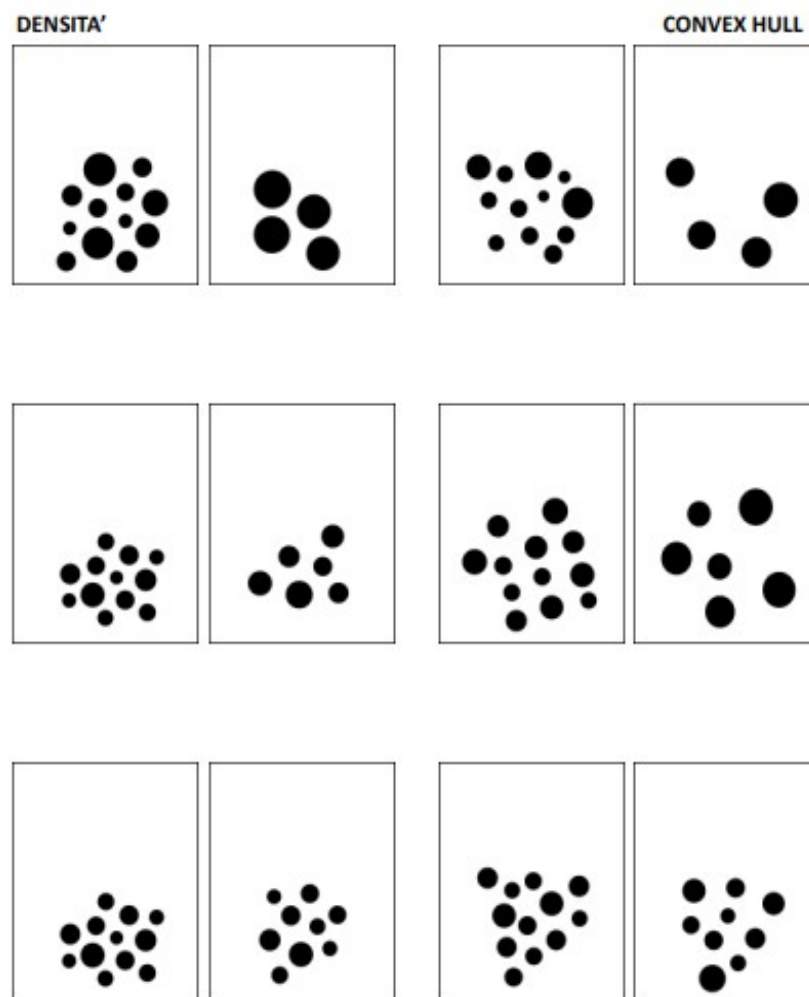


Figura 8- Stimoli sperimentali impiegati disposti secondo criteri di densità e convex hull

#### **4.4 PROCEDURA SPERIMENTALE**

Per questi esperimenti è stata utilizzata una procedura di condizionamento operante nel quale le larve sono state addestrate, tramite rinforzo positivo, a riconoscere stimoli visivi differenti.

L'esperimento è durato complessivamente 9 giorni distinti in una fase di gruppo ed una di test individuale.

##### ***Fase di abituação in gruppo***

- A 6 *dpf* le larve vengono inserite nella vasca di abituação in gruppo. In base alla disponibilità di soggetti, si inseriscono una media di 20/30 soggetti per vasca. Il primo giorno le larve sono libere di muoversi tra i due compartimenti dell'apparato. Dopo 90 minuti dall'inserimento nella vasca le larve vengono nutrite con cibo in polvere, operazione che viene ripetuta dopo circa 4 ore e mezzo.
- A 7 *dpf* viene inserito, nella parte centrale dell'apparato, un pannello avente un foro. Dopo 90 minuti dall'inserimento viene distribuito il cibo in entrambi i settori creati dal divisorio. La stessa operazione viene ripetuta dopo circa 4 ore e mezzo.

- A 8 dpf inizia la fase di training di gruppo, della durata di 2 giorni, che consiste nell'esporre le larve a due stimoli ciascuno rappresentate una numerosità diversa. I due trials giornalieri hanno inizio con l'inserimento degli stimoli agli estremi della vasca. Dopo 90 minuti viene erogata una piccola quantità di cibo in polvere in prossimità di uno dei due stimoli: per metà dei gruppi sarà lo stimolo rappresentante la numerosità minore, mentre per l'altra metà sarà lo stimolo maggiore. Nei giorni successivi lo stimolo rinforzato dovrà essere sempre lo stesso. Dopo 90 minuti dal rinforzo, la coppia di stimoli viene sostituita con un'altra rappresentante lo stesso confronto numerico, ma le posizioni iniziali degli stimoli maggiore e minore vengono invertite. Dopo 3 ore da questa operazione viene somministrato il secondo rinforzo in corrispondenza dello stimolo che era stato precedentemente rinforzato. La soluzione di Fish Water all'interno delle vasche viene cambiata ogni giorno per evitare che le scelte degli individui possano essere influenzate da eventuali residui di cibo.

### ***Fase di test individuale***

- Dopo la fase di gruppo, le larve vengono spostate individualmente in vasche rettangolari dove iniziano la fase di test della durata di 5 giorni.

Ad ogni individuo viene assegnato un numero di riconoscimento ed una precisa sequenza di stimoli per evitare che una coppia possa essere presentata più volte allo stesso soggetto. Trascorsi 90 minuti dall'inserimento della prima coppia di stimoli viene somministrato il rinforzo nello stesso settore in cui è presente lo stimolo che è stato rinforzato durante la fase di gruppo. Dopo altri 90 minuti, gli individui vengono trasferiti in delle nuove vasche pulite per evitare la presenza di eventuali residui di.

Come per il training di gruppo, viene inserita la nuova coppia di stimoli e dopo circa 3 ore viene dato il secondo ed ultimo rinforzo della giornata. Dopo 90 minuti vengono rimossi gli stimoli e si conclude la procedura.

Questo iter viene seguito per 5 giorni consecutivi cambiando le vasche prima di ogni nuovo trial e prima di ogni nuovo giorno di test.

## 5. ANALISI STATISTICHE

L'analisi partiva con l'osservazione delle registrazioni del comportamento delle larve tramite il lettore multimediale VLC media player attraverso il quale veniva considerato il numero di passaggi svolti tra i due settori. La variabile dipendente era rappresentata dalla proporzione di tempo trascorsa nel settore in cui era presente lo stimolo rinforzato rispetto al tempo totale di osservazione (90 minuti per sessione).

La variabile dipendente presa in considerazione era la proporzione di tempo trascorsa nel settore accanto lo stimolo rinforzato, che veniva calcolata attraverso la seguente proporzione:

$$\text{Tempo speso nel settore rinforzato} /$$

$$(\text{Tempo speso nel settore rinforzato} + \text{tempo speso nel settore non rinforzato})$$

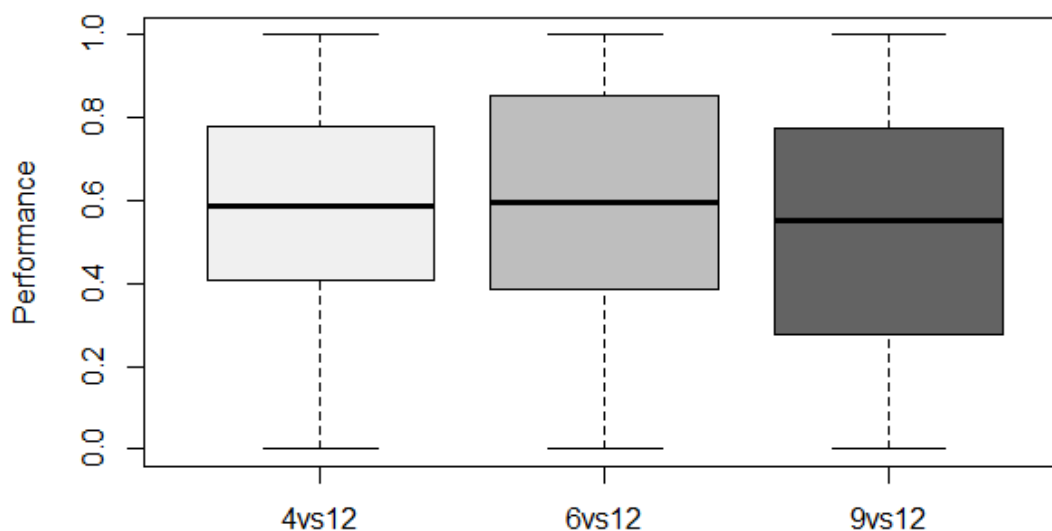
In questo modo si otteneva un indice i cui valori variavano da 0 a 1, dove 1 indicava la totalità del tempo passata nel settore rinforzato e 0 l'opposto.

La performance dei soggetti è stata valutata mettendo a fattore il trascorrere dei giorni e le variabili continue rappresentate da area, densità e convex hull; un'altra variabile presa a fattore era il rapporto di grandezza tra gli stimoli, ossia il ratio.

Le analisi sono state condotte utilizzando il software statistico SPSS.

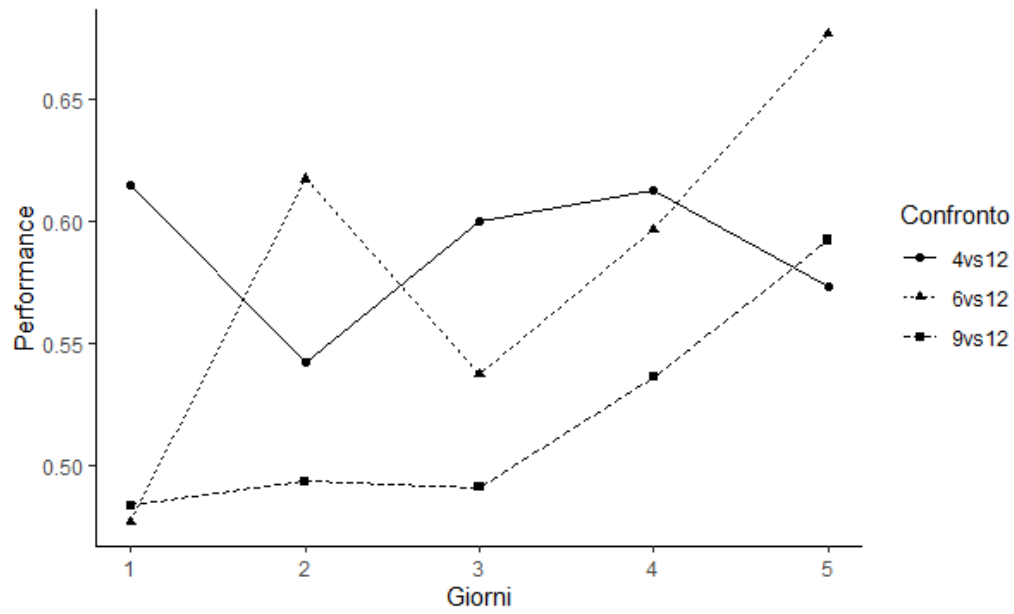
## 6. RISULTATI

Durante ogni trial di 90 minuti, gli zebrafish si sono mossi in media  $15 \pm 5$  volte (Media  $\pm$  Deviazione Standard) tra i due settori delle vasche. La proporzione di tempo che le larve hanno trascorso in prossimità dello stimolo rinforzato era statisticamente significativa per tutte le discriminazioni eccetto la 9 vs 12 (4 vs 12: Media  $\pm$  Deviazione Standard,  $58.88 \pm 2.50\%$ , test t a campione unico,  $t_{11} = 12.300$ ,  $p < 0.001$ ; 6 vs 12:  $58.02 \pm 3.44\%$ ,  $t_{11} = 8.075$ ,  $p < 0.001$ ; 9 vs 12:  $51.92 \pm 7.72\%$ ,  $t_{11} = 0.863$ ,  $p = 0.203$ ). La preferenza per lo stimolo rinforzato è significativa anche considerando il primo giorno del test individuale, ma solo per il confronto 4vs12 ( $61.50 \pm 15.66\%$ ,  $t_{11} = 2.28$ ,  $p = 0.044$ ).



L'analisi della varianza ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella performance tra i confronti ( $F_{2,36} = 6.644$ ,  $p = 0.004$ ). Inoltre un'analisi a misure ripetute non ha evidenziato un effetto significativo dovuto allo scorrere dei giorni

( $F_{4,120} = 1.068$ ,  $p = 0.375$ ), al tipo di rinforzo, ossia se sul numero maggiore o minore ( $F_{1,30} = 0.332$ ,  $p = 0.569$ ) e alla loro interazione ( $F_{1,46} = 0.732$ ,  $p = 0.399$ ).



## 7. DISCUSSIONE

Il panorama letterario attuale afferma che le larve di zebrafish siano in grado, già a pochi giorni dalla nascita, di discriminare basse numerosità sfruttando il sistema numerico non verbale *Object Tracking-system*. Il presente lavoro, che si inserisce in una serie di esperimenti volti allo sviluppo ed alla validazione di una metodologia manuale basata sul condizionamento per lo studio della cognizione numerica dello zebrafish, si è concentrato su confronti numerici elevati che fanno affidamento su un'altro sistema numerico non verbale, ossia l' *Approximate number system*, con lo scopo di indagare fin dove si spinga l'abilità di discriminazione numerica nelle fasi precoci dello sviluppo della larva zebrafish. La procedura standard adottata prevedeva l'inserimento dei soggetti a 6 dpf in un programma di addestramento collettivo della durata di 4 giorni (8 trials) in cui venivano esposti agli stimoli numerici e durante i quali una sola quantità (maggiore o minore) veniva rinforzata. Trascorsi i 4 giorni iniziava la fase di osservazione individuale della durata di 5 giorni, caratterizzata anch'essa dall'intervento dello sperimentatore solo per la sostituzione degli stimoli e per la somministrazione del rinforzo. Durante l'arco dell'osservazione individuale si stimava l'effettivo apprendimento della larva

I dati ottenuti hanno dimostrato che con le ratio 4vs12 e 6vs12 le larve raggiungono risultati significativi trascorrendo una proporzione di tempo in prossimità dello stimolo rinforzato pari al 58,8% nel primo caso e 58,02% nel secondo. Nel caso del confronto 9vs12 invece la proporzione di tempo trascorsa nel settore rinforzato non raggiunge un livello statisticamente rilevante fermandosi al 51,92%. Tali risultati rispecchiano una capacità di discriminazione non dissimile dagli adulti di molti pesci, uccelli e

mammiferi, anche se inferiore ai primati e ai corvidi, tuttavia stupisce che, a differenza dello zebrafish, altri animali come cani, gatti e salamandre non siano in grado di fare affidamento esclusivamente ad informazioni di tipo numerico (Miletto Petrazzini, 2017). Nei gatti per esempio si è osservato come le prestazioni migliorino significativamente a partire dalla seconda metà delle prove totali, ciò dimostra come l'apprendimento avvenga nel corso di queste e che potrebbe appoggiarsi ad informazioni di tipo non numerico come l'area o la densità degli stimoli (Pisa, P. E. & Agrillo, 2008). Nel nostro caso invece variabili continue come densità e volume, sono state specificamente controllate rispettando i criteri di densità e convex hull in modo tale che l'unico indizio attendibile per risolvere il compito fosse la differenza di numerosità. Tuttavia nonostante l'elevata acutezza numerica che li colloca vicino alla maggior parte dei vertebrati encefalizzati, la loro precisione non supera il 75% anche nelle attività numeriche più facili, percentuale che è notevolmente inferiore rispetto all'accuratezza del 90-95% comunemente osservata negli studi sui mammiferi e sugli uccelli. Le ragioni potrebbero risiedere nel fatto che le maggiori dimensioni del cervello di alcuni animali consentano una discriminazione più accurata. Inoltre c'è da considerare che gli esperimenti condotti su mammiferi e uccelli nella maggior parte dei casi sfruttano migliaia di trials e rinforzi, mentre con gli zebrafish non ci si spinge oltre le 120 prove (Bisazza, Santacà 2022).

Un altro dato interessante che emerge è la velocità di apprendimento. Per i compiti più facili sono necessari appena 3 giorni (6 trials), meno di quello che impiegano gli adulti nello stesso lasso di tempo. Questa differenza potrebbe essere legata a motivi ecologici dato che le larve muoiono entro poche ore se non imparano a trovare il cibo mentre un adulto può resistere molti giorni prima di morire di fame.

Dati i risultati ottenuti si può sostenere con buone probabilità che ci sia una componente innata nel giudizio numerico negli zebrafish. Inoltre tali risultati confermano quanto osservato in altre specie di teleostei, tra cui neonati di *Poecilia reticulata* (Bisazza et al., 2010).

Ci sono però naturalmente delle limitazioni. La principale forse è che non è detto che la capacità di discriminare tra grandezze non si manifesti prima del 10dpf. Nei *Poecilia* per esempio è possibile testare i soggetti sin dal primo giorno di vita in quanto questa specie presenta una pressoché totale autonomia a poche ore dalla nascita, mentre negli zebrafish è necessario effettuare un addestramento collettivo della durata di 4 giorni per far familiarizzare i soggetti con gli stimoli e con l'operazione di cambio di settore (la presenza di conspecifici garantisce un basso livello di stress).

Una possibile soluzione potrebbe essere orientata alla riduzione del periodo collettivo senza perderne i benefici allo scopo di misurare la performance cognitiva già a 7 o 8dpf quando il sistema visivo e il pattern di nuoto in zebrafish sono ben sviluppati. Inoltre la necessità di una fase di training collettivo comporta ulteriori svantaggi, poiché non è da escludere lo sviluppo di comportamenti aggressivi durante questo periodo con la conseguente difficoltà per alcuni soggetti nell'effettuare il passaggio verso il settore rinforzato.

Un altro limite strutturale è il segnale olfattivo lasciato dal cibo usato come rinforzo. Con la procedura attuale non si ha la garanzia che in tempi stretti l'odore di cibo diffonda rapidamente da un settore all'altro rendendo la scelta del soggetto meno vincolante. È necessario misurare con maggior precisione la tempistica di diffusione dell'odore e parametrarla con la tempistica di osservazione del soggetto.

Tenuto conto dei limiti di tale paradigma però, i pregi che il suo impiego comporta rendono i suoi difetti se non trascurabili perlomeno accettabili, trattandosi di uno strumento rapido, economico o e di facile implementazione per lo studio della cognizione in fasi precoci dello sviluppo in zebrafish.

### ***Bibliografia***

Agrillo, C., Piffer, L., & Bisazza, A. (2010). Large number discrimination by mosquitofish. *PLoS One*, 5(12), e15232.

Agrillo, C., & Bisazza, A. (2014). Spontaneous versus trained numerical abilities. A comparison between the two main tools to study numerical competence in non-human animals  
*Journal of Neuroscience Methods*, 234, 82–91.

Agrillo, C., & Bisazza, A. (2018). Understanding the origin of number sense: a review of fish studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1740), 20160511.

Agrillo, C., Dadda, M., Serena, G., & Bisazza, A. (2008). Do fish count Spontaneous discrimination of quantity in female mosquitofish. *Animal cognition*, 11(3), 495-503.

Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., Tagliapietra, C., & Bisazza, A. (2012). Interspecific differences in numerical abilities among teleost fish. *Frontiers in psychology*, 3, 483.

Agrillo, C., Piffer, L., & Bisazza, A. (2011). Number versus continuous quantity in numerosity judgments by fish. *Cognition*, 119(2), 281-287.

Antunes M, Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing* 13:93–110 DOI 10.1007/s10339-011-0430-z.

Barman, R. P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Records of the Zoological Survey of India, Occasional Paper*, 137: 1-91.

Beran, M. J., & Beran, M. M. (2004). Chimpanzees remember the results of one-by-one addition of food items to sets over extend

Blaser R, Heyser C. (2015). Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9:183 DOI 10.3389/fnbeh.2015.00183.

Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R., & Wilson, S. W. (2015). Development of social behavior in young zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 9, 39.

Ennaceur A. (2010). One-trial object recognition memory in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research* 215:244–254 DOI 10.1016/j.bbr.2009.12.036.

Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–38.

Gerlai R. (2016). Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). In: Detrich III W, Westerfield M, Zon LI, eds. *Methods cell biology*. Vol. 134. Cambridge: Academic Press, 551–586 DOI 10.1016/bs.mcb.2016.02.005.

Gómez-Laplaza, L. M., & Gerlai, R. (2013). Quantification abilities in angelfish (*Pterophyllum scalare*): the influence of continuous variables. *Animal Cognition*, 16(3), 373–383.

Halberda, J., & Feigenson, L. (2008). Developmental change in the acuity of the "Number Sense": The Approximate Number System in 3-, 4-, 5-, and 6-year-olds and adults. *Developmental psychology*, 44(5), 1457.

Henik A. (Ed.). (2016) *Continuous issues in numerical cognition: How many or how much*. New York, NY: Academic Press.

Izard, V., Sann, C., Spelke, E. S., & Streri, A. (2009). Newborn infants perceive abstract numbers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10382-10385.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.

Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121-173

Lucon-Xiccato T, Dadda M. (2014). Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behavioural Processes* 106:1–4 DOI 10.1016/j.beproc.2014.03.010.

Lucon-Xiccato, T., Dadda, M., Gatto, E., & Bisazza, A. (2017). Development and testing of a rapid method for measuring shoal size discrimination. *Animal Cognition*, 20(2), 149-157.

Maack, G., & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 895-906

Miletto Petrazzini, M. E. & Wynne, C. D. (2017) What counts for dogs (*Canis lupus familiaris*) in a quantity discrimination task?. *Behav. Process*

Pisa, P. E. & Agrillo, C. Quantity discrimination in felines: A preliminary investigation of the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *J. Ethol.* 27, 289–293

Panteleeva, S., Reznikova, Z., & Vygoniyailova, O. (2013). Quantity judgments in the context of risk/reward decision making in striped field mice: first “count,” then hunt. *Frontiers in Psychology*, 4, 53.

Perdue, B. M., Talbot, C. F., Stone, A. M., & Beran, M. J. (2012). Putting the elephant back in the herd: elephant relative quantity judgments match those of other species. *Animal Cognition*, 15(5), 955–961.

Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71(1), 304-309

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83, 13–34.

Valente, A., Huang, K. H., Portugues, R., & Engert, F. (2012). Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learning & Memory*, 19(4), 170-177.

Vascotto et al. (1997) S.G. Vascotto, Y. Beckham, G.M. Kelly. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem. Cell Biol.*, 75 (1997), pp. 479-485

Xu, F., & Arriaga, R. I. (2007). Number discrimination in 10-month-old infants. *British Journal of developmental psychology*, 25(1), 103-108.

Xu, F., & Spelke, E. S. (2000). Large number discrimination in 6-month-old infants. *Cognition*, 74(1), B1-B11