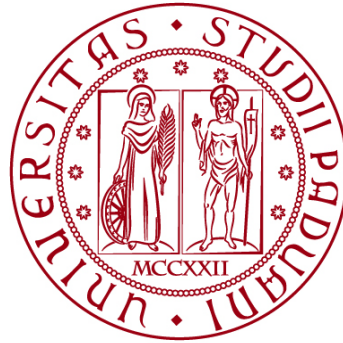


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze naturali



ELABORATO DI LAUREA

**Studio sull'utilizzo di illusioni ottiche come
possibile strumento di arricchimento per
*Danio rerio***

**Study on motion illusions as a possible tool of
enrichment for *Danio rerio***

**Tutor: Prof Christian Agrillo
Dipartimento di Psicologia generale**

Laureando: Gabriele Zanin

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 Studio del comportamento animale.....	1
1.1.1 Studio del comportamento nei pesci	3
1.1.2 Paradigmi di studio.....	7
1.2 Illusioni ottiche negli animali.....	9
1.2.1 Illusione ottiche nei pesci	11
1.3 Enrichment.....	13
1.3.1 Enrichment in Zebrafish	13
1.4 Scopo della tesi	15
2 MATERIALI E METODI	16
2.1 Soggetto sperimentale.....	16
2.2 Apparato sperimentale	17
2.4 Procedura	19
2.5 Analisi video	20
2.6 Raccolta dati e analisi statistica	20
3 RISULTATI	21
4 DISCUSSIONE	24
5 CONCLUSIONI	26
6 BIBLIOGRAFIA	27
7 RINGRAZIAMENTI	36

1 INTRODUZIONE

1.1 Studio del comportamento animale

L'etologia è quella branca della biologia che si occupa dello studio comparato del comportamento animale. Citando il padre dell'etologia Konrad Lorenz "consiste nell'applicare al comportamento degli animali e delle persone quei metodi divenuti d'uso corrente e naturali in tutti gli altri campi della biologia dopo Charles Darwin e di formulare gli interrogativi seguendo lo stesso criterio." (Lorenz, K. (2011).

La meraviglia dell'etologia sta nel farci capire i motivi ed i modi tramite cui agiscono gli animali e a far progredire le conoscenze zoologiche. Uno tra i padri fondatori della disciplina fu Nikolaas Tinbergen, vincitore del premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina con Konrad Lorenz e Karl von Frisch, ideatore delle famose quattro domande. Queste domande o livelli di analisi sono alla base degli studi etologici e permettono di analizzare comportamenti anche piuttosto complessi che possono interessare l'individuo di una specie, o un'intera popolazione ed ottenere delle risposte scientificamente accurate accompagnate da prove empiriche (Dawkins, 2014). Le 4 domande riguardano causazione, funzione, sviluppo ed evoluzione del comportamento.

1. Causazione: Il motivo del perché un comportamento si scatena piuttosto che un altro a livello di stimolo - risposta e meccanismi fisiologici mediatori.
2. Sviluppo: L'ontogenesi del comportamento, cioè come un comportamento si sviluppa nella vita di un individuo. Da che geni deriva e da quali relazioni fisiologiche.
3. Funzione: La funzione del comportamento e che vantaggi dà all'individuo in termini di fitness.
4. Evoluzione: Com'è cambiato il comportamento nella storia evolutiva dell'animale in questione.

Le quattro domande operano a due diversi livelli. Le domande 1 e 2 danno spiegazioni più immediate e vengono chiamate cause prossime. Queste sono risposte che esaminano le ragioni biologiche per cui un comportamento viene espresso. D'altra parte, le domande 3 e 4 danno spiegazioni più radicate nella storia evolutiva che ha portato alla nascita dell'individuo, chiamate cause ultime. Queste sono risposte che richiedono una ricerca più lunga e cercano di spiegare come e perché il comportamento si è evoluto. Per ottenere una piena comprensione dei costi, dei benefici e dei vincoli che hanno plasmato un determinato comportamento è necessario rispondere sia alle cause ultime che alle prossime.

Non tutte le ricerche utilizzano tutte le domande o cercano di rispondere a queste direttamente, ma stanno alla base di ogni esperimento sul comportamento animale e sono ciò che porta un etologo a compiere tali ricerche (Beer, 2020).

Grazie agli studi sul comportamento animale si è riusciti ad esplorare e a rispondere a sempre più quesiti sulla vita animale portando alla crescita dell'etologia e allo sviluppo di diverse branche della psicologia animale.

Strutturandosi sempre di più in termini teorici e metodologici, l'etologia divenne pienamente riconosciuta a livello scientifico e fu più facile per scienziati con diverse specializzazioni collegare le loro ricerche a quelle sul comportamento animale. (Strassmann & Joan Strassmann, 2014).

L'etologia andò a influenzare le diverse branche della biologia e della psicologia andando così a produrre risultati molto importanti come il "Gene egoista" di Richard Dawkins o il libro divulgativo "La scimmia nuda - Studio zoologico sull'animale uomo" di Desmond Morris tra i più conosciuti dal pubblico in generale. Inoltre, la pervasività dell'etologia ha portato miglioramenti in diversi ambiti come nel benessere animale (Millman et al., 2004), manipolazione genetica, tecnologie ambientali, fisiologia comportamentale, conservazione e relazioni uomo-animale (Appleby & Hughes, 1993).

Tra le branche della psicologia interessate all'etologia la psicologia cognitiva propone un modo di studiare i meccanismi del comportamento animale più concentrato sulle sue facoltà cognitive, espressione del sistema nervoso nella sua interezza. "Lo scopo della psicologia cognitiva è quello di spiegare il comportamento di un animale in termini della sua organizzazione mentale e come avvenga l'elaborazione delle informazioni (cioè, come l'animale acquisisce, memorizza e agisce sulle informazioni presenti nel suo mondo). Studiando i meccanismi cognitivi di un animale, si può studiare come l'animale percepisce, impara, memorizza e prende decisioni." (Britannica, 2023).

Nella ricerca cognitiva i modelli animali sono stati ampiamente usati, in quanto il cervello umano è molto complesso da studiare e non tutti gli esperimenti si possono condurre sugli uomini per ragioni etiche. Le ricerche si sono concentrate su specie diverse nell'ultimo secolo, comprendendo ad oggi rappresentanti di molte specie del regno animale: i mammiferi sono stati studiati estensivamente, principalmente utilizzando primati (Barrett et al., 2003) e topi (Nelson, 2016), ma anche molti altri come elefanti (Hart et al., 2001), delfini (Reiss et al., 1997), cani (Fuller et al., 1957) e pipistrelli (Vernes & Wilkinson, 2020), per menzionarne alcuni. La loro appartenenza alla nostra stessa classe rende particolarmente proficua la scoperta di omologie e similitudini tra i nostri sistemi cognitivi, così anche come la scoperta di differenze e specializzazioni peculiari di ogni sistema.

Molti anche i modelli di uccelli: tra i più celebri il piccione, modello di elezione della prima ricerca Skinneriana (Skinner, 1948) sul condizionamento operante e ancora oggi utilizzato (Fujita et al., 2012). Molti gli uccelli utilizzati per le straordinarie capacità di orientamento durante le migrazioni e il foraggiamento (Alerstam, 2011), mentre altri come il pappagallo (Pepperberg et al., 2008b) o Passeriformi sono stati studiati per le loro abilità canore, in una sorta di ricerca comparativa sui linguaggi (Salzen, 1967; Williams, 2004). I corvidi, ritenuti il vertice più alto dell'intelligenza aviaria, o per meglio dire simile al nostro stile e livello, sono stati studiati in compiti di problem solving (Eppes et al., 2022), di memoria prospettica (Brandimonte et al., 2014) e perfino di cognizione sociale (Holzhaider et al., 2010). Infine, il pollo (*Gallus gallus domesticus*), sfruttando lo straordinario meccanismo dell'imprinting e l'indipendenza alla nascita dei pulcini ha contribuito in maniera decisiva a distinguere con chiarezza il concetto di abilità innate e apprese (Seddon, 1990). Relativamente diffusi anche gli studi sui pesci, che approfondiremo nel seguente paragrafo, mentre la ricerca su rettili e anfibi (Bisazza et al., 1998) è rimasta sempre scarsa. In ultimo gli invertebrati, da sempre considerati alla stregua di automi incapaci di azioni complesse, si sono rivelati una preziosa fonte di informazioni. Ad un'osservazione attenta si è scoperto che molti invertebrati sono in grado di portare a termine compiti complessi, come l'orientamento (Janssen et al., 1998), l'ottimizzazione dei percorsi (Stelinski & Tiwari, 2013), le abilità numeriche (Butterworth et al., 2018). Di conseguenza si è posto il problema di come organismi così "rigidi" cognitivamente potessero avere successo in compiti tradizionalmente ritenuti appannaggio di menti complesse, plastiche e associative.

1.1.1 Studio del comportamento nei pesci

Uno dei gruppi di vertebrati più utilizzati recentemente per studiare il comportamento animale e collegarlo a quello umano è infatti il gruppo degli Osteitti(pesci).

Per cominciare, i pesci mostrano un'estrema diversità. Comprendono più della metà di tutte le specie di vertebrati esistenti (circa 33 000 specie descritte su 64 000 specie di vertebrati). Hanno colonizzato una grande varietà di habitat, dagli oceani aperti alle rocce costiere, dalle profondità abissali agli ambienti terrestri e mostrano anche una gamma molto ampia di adattamenti comportamentali, fisiologici ed ecologici. Molte specie depongono le uova, alcune sono vivipari e altre mostrano cure parentali delle uova e degli avannotti. Molti pesci vivono in grandi aggregati sociali, alcuni formano legami di coppia stabili e altri sono solitari. Queste differenze interspecifiche associate alla diversità delle specie e agli adattamenti forniranno uno strumento prezioso per verificare diverse ipotesi sperimentali permettendo di ampliare gli esperimenti su diverse specie (Norton & Bally-Cuif, 2010). I pesci sono animali da ricerca ideali anche per motivi logistici. Circa 5400 specie sono disponibili grazie all'industria dell'acquariofilia e da allevatori dilettanti e quasi l'80% di tutte le specie d'acqua dolce sono attualmente allevate in cattività (Dahm & Geisler, 2006). Diverse specie hanno tempi di riproduzione molto brevi, consentendo studi genetici quantitativi ed effetti cross-generazionali. Altri vantaggi sono la loro rapida riproduzione che permette di avere molti soggetti a disposizione, il loro rapido sviluppo, le dimensioni ridotte di diverse specie (come gli Zebrafish) che consentono di ridurre gli spazi e i costi di mantenimento, la possibilità di manipolazione genetica e la possibilità di manipolazione dei fattori ambientali. Altri fattori di grande importanza sono il basso sviluppo neurologico dei pesci, che permette così di individuare con maggiore precisione i meccanismi fisiologici alla base delle abilità cognitive e l'elevata omologia genetica che vi è tra l'uomo e i pesci (Norton & Bally-Cuif, 2010).

Nonostante tutti questi vantaggi la psicologia cognitiva aveva a lungo ignorato il gruppo degli Osteitti, considerandoli organismi semplici, senza abilità particolari, o tutt'al più frutto di un meccanismo automatico (Brown, Laland & Krause, 2011). Negli anni più recenti invece si è scoperto come questi abbiano abilità cognitive non banali, in certi casi paragonabili a quelle dei primati non umani (Bshary, Wickler & Fricke, 2002). Inoltre, si è data maggiore attenzione ai vantaggi che l'uso di questo tipo di animali come soggetti sperimentali può apportare. Tra i primi e più importanti studi che utilizzarono i pesci come organismi sperimentali ci fu "The Curious Behavior of the Stickleback" grazie al vincitore premio Nobel e uno dei padri fondatori della moderna biologia comportamentale Niko Tinbergen (Tinbergen, 1952). Questo lavoro si limita a dimostrare l'esistenza di un collegamento automatico tra uno stimolo semplice ed una risposta comportamentale complessa. La vista di una macchia rossa scatenava nel soggetto maschio una reazione aggressiva, come se avesse davanti a sé un altro maschio.

Se questo esperimento diede inizio ad un proliferare di studi sullo spinarello (vedi figura 1), nel corso degli anni si iniziarono ad utilizzare anche altre specie e la concezione dei pesci come autonomi lasciò sempre più spazio all'apprezzamento delle complessità cognitive proprie di questo gruppo.

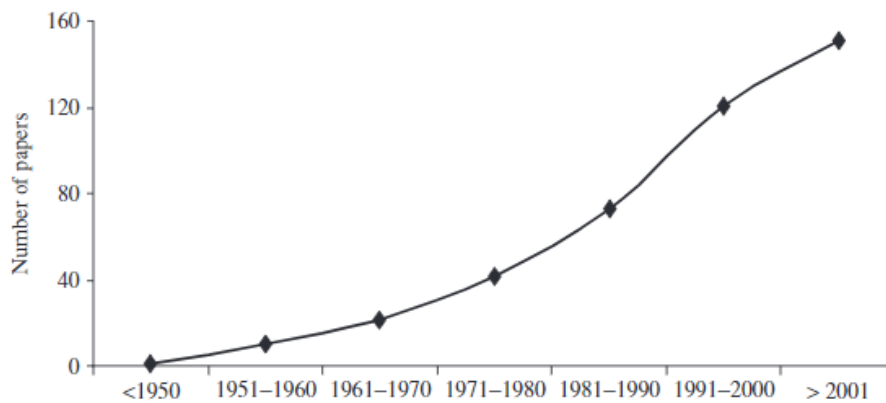


Figura 1: grafico che riporta il numero di articoli riguardanti lo spinarello (Huntingford & Ruiz-Gomez, 2009).

A conferma delle abilità cognitive dei pesci seguono diversi articoli che ne mostrano alcune capacità, un articolo del 1994 è riuscito a mostrare come gruppi di Pomacentridi che si nutrono di zooplancton cercano luoghi dove nutrirsi in modo metodico e molto lento, ma dopo aver scoperto queste zone riescono a nuotare molto velocemente tra queste posizioni di foraggiamento, dimostrando dunque di star coinvolgendo la memoria spaziale e l'aspettativa di utilizzo delle risorse (Noda et al., 1994). I pesci hanno quindi mostrato capacità cognitive nell'eseguire azioni importanti per la loro sopravvivenza. (Brown et al., 2015). Un articolo del 2000 è riuscito a dimostrare come i pesci possano essere addestrati a nutrirsi in un determinato luogo e in un particolare momento della giornata, ad esempio, i Golden Shiners (*Notemigonus crysoleucas* (Mitchill, 1814)) hanno imparato ad aspettarsi il cibo esattamente a mezzogiorno in uno degli angoli luminosi della loro vasca (Reebs, 2000). Più si avvicinavano le dodici più i pesci iniziavano a nuotare molto velocemente ed agitarsi nelle aree dove normalmente veniva rilasciato il cibo. Dunque, dimostrano un comportamento di anticipazione alimentare quotidiana molto simile agli esperimenti sul condizionamento automatico di Pavlov.

Molto recentemente nei laboratori dell'Università di Padova c'è stato un grande aumento di esperimenti riguardanti proprio i pesci, con ottimi risultati che confermano le abilità cognitive di questi ultimi. Ad esempio, nel campo della numerosità ci si potrebbe aspettare che i pesci, dati i loro cervelli relativamente più piccoli dei grandi vertebrati, abbiano abilità quantitative più scarse dei vertebrati superiori. Al contrario, studi di laboratorio basati sull'osservazione del comportamento spontaneo e sul condizionamento operante hanno dimostrato che l'accuratezza dei pesci nei giudizi di numerosità relativa è uguale alle capacità di molti uccelli e mammiferi (Agrillo et al., 2009).

In uno degli esperimenti recenti dell'università di Padova riguardante proprio la numerosità nei pesci sono stati scelti diversi individui di *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859), i quali dopo diverse procedure di addestramento dovevano discriminare tra due gruppi di stimoli e scegliere quello corretto. Gli stimoli rappresentavano diversi ordini di grandezza e con i risultati ottenuti si è riuscito a dimostrare come i pesci riuscissero a distinguere i diversi ratio come 2:1 o 3:2 (Agrillo et al., 2008).

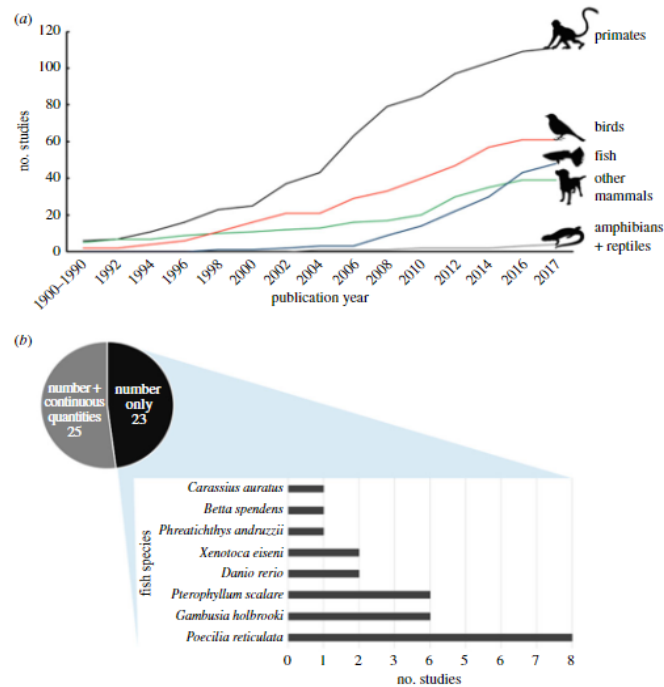


Figura 2: Questo grafico mostra proprio l'aumento dell'utilizzo dei pesci negli studi di psicologia e i diversi organismi che più vengono utilizzati, con l'aggiunta anche degli articoli dell'Università di Padova (Agrillo & Bisazza, 2018).

Tra questi pesci è presente anche *Danio rerio* (HAMILTON, 1882) che è cresciuto in popolarità grazie a molti dei vantaggi che può portare il suo utilizzo in laboratorio come organismo modello (Al-Imari & Gerlai, 2008) (Sison & Gerlai, 2010) (Al-Imari & Gerlai, 2008) (Sison & Gerlai, 2010). Zebrafish è un pesce tropicale appartenente alla famiglia dei Cyprinidae. A differenza di altri pesci di laboratorio lo Zebrafish adulto è un animale diurno e sociale che preferisce sempre la presenza di conspecifici (Engeszer et al., 2007), rendendo così facile l'osservazione di comportamenti in gruppo e in orari lavorativi. Infatti, diversi studi sono già stati eseguiti con Zebrafish come organismo modello per creare protocolli di studio riguardanti aggressività (Way et al., 2015), reazione in allarme (Parker et al., 2012), comportamento antipredatorio (Gerlai, 2010), ansia (Maximino et al., 2010), locomozione (Drapeau et al., 2002), apprendimento (Sison & Gerlai, 2010), memoria (Roberts et al., 2013), sonno (Zhdanova, 2011), ricompense (Al-Imari & Gerlai, 2008) ed infine comportamento sociale (Dreosti et al., 2015). Dunque, sono eccellenti modelli per l'osservazione del comportamento soprattutto riguardanti questioni di socialità (Norton & Bally-Cuif, 2010). Infine, Zebrafish, è un organismo modello per la genetica, la fisiologia e la ricerca sullo sviluppo. Questo consentirà ai ricercatori di collegare i risultati degli studi comportamentali alla fisiologia e alla genetica (Oliveira, 2013).

Zebrafish è diventato nel corso degli ultimi anni un organismo modello molto importante per i vertebrati soprattutto grazie alla sua utilità in ambiti come embriologia, biologia dello sviluppo e analisi genetiche (Bilotta & Saszik, 2001; Linney et al., 2004; Norton & Bally-Cuif, 2010; Oliveira, 2013). Tra le somiglianze riscontrate con i vertebrati forse la più importante sta nelle sue componenti anatomiche, fisiologiche e comportamentali del sistema visivo (Fleisch & Neuhauss, 2006). Diverse procedure sono già state sviluppate proprio per studiare lo sviluppo ed il comportamento visivo in Zebrafish.

Ad esempio, lo studio del nistagmo optocinetico (OKR), un movimento ondulatorio ma involontario effettuato dai bulbi oculari. È un riflesso che appare ogni volta che si fissano degli oggetti che presentano un rapido movimento regolare presente anche in Zebrafish, che si manifesta quando osserva pattern a strisce in movimento, probabilmente perché porta a pensare ad un conspecifico. Questo metodo è stato utilizzato per osservare come possibili pesci con mutazioni della retina rispondessero a questi pattern (Neuhauss et al., 1999). L'OKR è stato utilizzato anche per dimostrare come Zebrafish sia in grado di svolgere esperimenti visivi da quando è in grado di nuotare. Creando degli apparati sperimentali in grado di mostrare i pattern a strisce si è riusciti a provare come Zebrafish migliori in accuratezza visiva con l'età ed allo stesso modo sia in grado di scappare più efficacemente in caso di predazione. Seguendo sempre la stessa procedura in una ricerca è stato possibile studiare il ritmo circadiano, la risposta a mutazioni della retina ed effetti di mancanza di dopamina in Zebrafish (Li & Dowling, 2000). Tutto ciò va a confermare come Zebrafish rappresenti un ottimo organismo modello sia per l'embriologia, la biologia dello sviluppo, il comportamento animale ed anche per l'analisi genetica grazie alla sua versatilità ed il semplice fatto che sia un vertebrato (Oliveira, 2013).

Un altro aspetto molto importante per la ricerca è dato dal fatto che gli Zebrafish sono animali sociali e che necessitano di stare in gruppo per sopravvivere e in caso si ritrovino da soli cercheranno un conspecifico in modo tale da sentirsi sicuri. Questo loro istinto di ricerca conspecifici ha proprietà gratificanti e che, come rinforzo, può supportare l'apprendimento associativo in Zebrafish. (Al-Imari & Gerlai, 2008).

Diversi esperimenti hanno esplorato infatti la tendenza alla gregarietà in Zebrafish e che influenze abbia sulla sua attività (Moretz et al., 2007; Nunes et al., 2020; Suriyampola et al., 2016). Nel 2001 l'Università di Leeds ha eseguito dei test su diversi individui cercando di capire come la temperatura dell'acqua ed altre condizioni dell'acquario andasse ad interferire con la shoal-choice utilizzando come possibili stimoli da uno a quattro conspecifici. A temperatura ambiente i pesci preferivano sempre gruppi più grandi, se invece lo shoal maggiore era a temperatura minore e dunque ad attività minore la loro attrattività diminuiva. Dimostrando così come gli Zebrafish prendano in considerazione l'attività di uno shoal prima di unirsi a loro, preferendo in molti casi quello più attivo (Pritchard et al., 2001).

La propensione degli Zebrafish di unirsi agli conspecifici in base a segnali visivi come colore ed attività (Gerlai, 2014) è stata utilizzata per osservare come i pesci reagissero a robot simili a conspecifici. In questo studio robot Zebrafish di colori diversi e con attività simulate da un motore hanno suscitato nei veri pesci risposte molto interessanti. Per esempio, in presenza di un cospicuo quantitativo di robot gli Zebrafish cercavano di avvicinarsi al gruppo, mentre nel caso venisse presentato un robot solo che nuotava molto velocemente, questo provocava nel soggetto di studio movimenti erratici ed un aumento di stress. Tutto ciò denota dunque una risposta complessa data dagli Zebrafish, i quali però non hanno mai riconosciuto i robot come conspecifici, probabilmente anche perché spaventati dai rumori dei motori e dall'innaturalità dei modelli. Secondo l'articolo, comunque, i risultati ottenuti sono molto importanti e probabilmente l'utilizzo di immagini o robot simili a pesci potrà portare in futuro un nuovo strumento di enrichment nei diversi stabulari del mondo (Butail et al., 2014).

1.1.2 Paradigmi di studio

In psicologia cognitiva vengono utilizzati dei paradigmi per studiare i comportamenti degli animali. Tra questi normalmente si usano paradigmi di scelta spontanea e/o di apprendimento tramite condizionamento operante, nel quale si usano diversi tipi di rinforzi in base all'animale scelto come soggetto di studio (Agrillo, Miletto Petrazzini & Bisazza, 2017).

La scelta spontanea consiste nella presentazione di stimoli biologicamente rilevanti e l'osservazione della naturale risposta dell'animale. Ciò che rende molto utile questo metodo è la sua relativa semplicità: si presenta lo stimolo al soggetto non addestrato e si osserva la sua risposta comportamentale. Gli stimoli devono essere salienti per l'individuo, poiché il loro scopo è scatenare le sue risposte innate. Si può utilizzare del cibo, dei conspecifici se i soggetti sono animali sociali, predatori naturali oppure oggetti mai visti prima dall'individuo nelle specie tendenti all'esplorazione.

L'opportunità di modulare sperimentalmente i fattori degli stimoli prima di presentarli ai soggetti è un grande vantaggio dato da questa modalità. Da qui si può constatare come al variare dello stimolo cambi anche la risposta dell'individuo, il tutto senza il bisogno di addestrarlo con nuove associazioni stimolo-risposta (Dadda, 2022). Questa procedura evita possibili errori o difficoltà sperimentali che potrebbero accadere in una ipotetica fase di addestramento verso una discriminazione non innata (Agrillo & Bisazza, 2014). Dunque, il metodo delle scelte spontanee implica un'alta validità ecologica, dato che si osservano reazioni spontanee a stimoli naturali, non condizionati (Agrillo & Bisazza, 2014). Il suo vantaggio è anche il suo più grande limite: infatti il carattere finito dei possibili comportamenti e delle risposte innate limita le possibilità di progettazione sperimentale.

Utilizzando però un ambiente controllato e le giuste accortezze in modo tale che il pesce si senta a suo agio, si possono eseguire diversi esperimenti molto importanti senza rischiare di stressare troppo il soggetto di studio o modificare la sua risposta per cause esterne ed ottenere i risultati voluti.

Questo metodo è ottimale per studiare i pesci nel modo più naturale possibile, ovvero ciò che interessa a noi in questa tesi, ad esempio, in una recente ricerca, è stata utilizzata la risposta innata di *D. rerio*, *Xenotoca eiseni* (Rutter, 1896) e *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) per definire la cognizione dell'orientamento. Lo "spontaneous social cued memory task" è stato utilizzato per questo test. Nell'esperimento i pesci venivano osservati in un acquario labirintico e grazie alle registrazioni veniva valutato il comportamento di riorientamento dei pesci. I ricercatori hanno concluso che queste tre specie utilizzano il sistema visivo per definire le geometrie ambientali ed in certi contesti utilizzavano anche altri sensi (Miletto Petrazzini et al., 2020);

L'altro metodo molto utilizzato è l'apprendimento tramite condizionamento operante, più comunemente chiamato addestramento, che consiste nella presentazione di rinforzi in seguito a specifici comportamenti e quindi nell'apprendimento di una regola. Il vantaggio di questa metodologia consiste nel poter utilizzare virtualmente qualsiasi stimolo, astratto o concreto, nello studio (Dadda et al., 2022).

Gli stimoli sono associati a una ricompensa alimentare sulla base di alcune regole, solitamente la scelta dello stimolo considerato corretto (Peruzzi, 2022). Spesso nell'addestramento dei pesci vengono utilizzati come rinforzi pezzi di cibo o l'introduzione di conspecifici, l'uso di questo tipo di rinforzo funziona perché i pesci hanno la stessa tendenza istintiva alla massimizzazione dell'alimentazione degli altri animali, mentre per quanto riguarda i conspecifici si ritiene che siano animali altamente sociali che cercano il gruppo più numeroso di simili come strategia antipredatoria, diminuendo così il loro stress se in gruppo (Agrillo et al., 2017).

Il meccanismo di training è stato utilizzato per studiare illusioni ottiche come la "solitaire illusion", un'illusione ottica di numerosità composta da puntini bianchi e neri, questi ultimi sono disposti in modo da sembrare in numero maggiore dei primi ma la numerosità è la stessa, in un esperimento del 2018 dei Guppy sono stati addestrati a scegliere un'immagine con un quantitativo di puntini maggiori. I risultati del test hanno dimostrato che i Guppy venivano influenzati dalla illusione anche se c'erano differenze individuali importanti (Miletto Petrazzini et al., 2018);

Uno dei metodi molto importanti per studiare il comportamento animale è il reversal learning. (Izquierdo et al., 2017; Shahan & Sweeney, 2011) (Izquierdo et al., 2017; Shahan & Sweeney, 2011). Il reversal learning è un test che utilizza i meccanismi del condizionamento operante, per testare la plasticità mentale. Ai soggetti viene insegnato tramite addestramento a preferire uno stimolo. Quando è chiaro che i soggetti abbiano appreso quello stimolo, si inizia a rinforzarne uno diverso. Il numero di prove che il soggetto impiega a imparare la nuova "regola", ovvero che la scelta giusta non è più quella di prima, è indice della sua plasticità mentale. Il training in uno studio con Zebrafish è stato utilizzato per indurre questo comportamento, facendo imparare delle azioni per poi addestrare a eseguire il comportamento opposto. Dopo questo test iniziale, sono stati riproposti gli stimoli dei primi addestramenti dimostrando come questi riemergessero, come se fossero delle abitudini (Kuroda et al., 2017). Riuscendo così a dimostrare come il "reversal learning" sia possibile in Zebrafish così come anche l'insorgenza di comportamenti estinti (Kuroda et al., 2017).

Terminati gli esempi possiamo invece alle possibili problematiche del metodo dell'addestramento, il quale è molto delicato e impegnativo: le sessioni spesso sono svolte quotidianamente, possono anche richiedere tempi lunghi ed è sempre necessaria la presenza di una persona per effettuare le prove dall'inizio alla fine. La necessità della presenza di almeno uno sperimentatore aumenta il rischio di errori umani nelle fasi di training e di valutazione dei risultati di ogni soggetto a causa dell'eccessiva interpretazione soggettiva del comportamento dei soggetti in esame. Per ovviare a tali limiti si può adoperare l'addestramento automatico, che utilizza i medesimi comportamenti della controparte manuale ma senza l'ausilio di una figura umana nelle fasi più critiche degli esperimenti, utilizzando invece macchinari adibiti a fare questi esperimenti. Un esempio di tali macchinari è l'acquario Zantiks, un apparato sperimentale con uno schermo in grado di mostrare immagini ai pesci ed una telecamera sensibile ai movimenti per registrare i comportamenti esibiti. Zantiks è stata utilizzata per studiare come la lateralizzazione possa influire sull'utilizzo di un occhio rispetto ad un altro in Zebrafish (Petrazzini et al., 2020), oppure i possibili cambiamenti di riflessi o di comportamento in base alla dieta (Anwer et al., 2022), così come anche possibili cambiamenti fisiologici dovuti a cambiamenti nella composizione dell'acqua (Fontana et al., 2021) ed infine i diversi effetti di medicinali per quanto riguarda le prestazioni di nuoto (Fontana et al., 2022).

Per quanto riguarda invece l'esperimento trattato da questa tesi si è preferito utilizzare il metodo delle scelte spontanee per cercare di ottenere la risposta più naturale possibile. Il nostro scopo era di osservare se i soggetti sperimentali venissero ingannati dagli stimoli illusori presentati e li riconoscessero erroneamente come dei conspecifici, eseguendo comportamenti tipici dello *shoaling*. Gli animali sociali come gli Zebrafish vivono in banchi (o shoal) e sin da quando sono larve cercano di stare in questi gruppi e necessitano dunque di distinguere i propri conspecifici e di avere un istinto a raggrupparsi insieme. Proprio per questo istinto di raggrupparsi la presenza di conspecifici viene usata come stimolo o rinforzo e ottiene ottimi risultati (Al-Imari & Gerlai, 2008). L'utilizzo di conspecifici come stimolo negli esperimenti con pesci è chiamato Shoal-choice (Pritchard et al., 2001). Nel caso dello Zebrafish nello specifico sono stati eseguiti diversi esperimenti che utilizzano e studiano la shoal-choice, anche nel caso dello studio delle abilità cognitive come il riconoscimento di illusioni (Agrillo et al., 2020).

1.2 Illusioni ottiche negli animali

Negli ultimi trenta anni la neuroscienza ha fatto passi da gigante nello studio del sistema visivo arrivando alla conclusione che i meccanismi molecolari che stanno alla base del funzionamento della fototrasduzione sono simili tra gli organismi (Shichida & Matsuyama, 2009), che si tratti di meduse o di esseri umani lo sviluppo del sistema visivo è molto simile (Gori et al., 2014). Le somiglianze non finiscono qui, tramite studi su gatti, umani e macachi si è scoperto come persino l'organizzazione principale del sistema visivo ed i suoi circuiti neurali siano estremamente affini (H., 1977; Hubel & Wiesel, 1959). Il processo secondo cui un animale percepisce il mondo visivo, dunque, è molto simile nel mondo animale ma non necessariamente porta agli stessi risultati, cervelli diversi possono elaborare in modo attivo immagini in maniere a noi sconosciute e lo studio della percezione è infatti molto complicato (Agrillo et al., 2020). Proprio per questo motivo lo studio del sistema visivo tramite le illusioni ottiche può aiutarci a capire come funzioni la percezione animale, osservando le differenze nel comportamento animale in seguito ad una illusione si possono fare diverse ipotesi su come il cervello di quest'ultimo stia elaborando quell'informazione (Smith, 1978).

A questo proposito, le illusioni ottiche possono essere un ottimo strumento non invasivo, che integra l'investigazione neurobiologica permettendoci di capire come un animale percepisce il mondo. La ricerca sulle illusioni ha dimostrato, ad esempio, che i sistemi visivi di mammiferi, uccelli ed insetti seguono principi simili per la segregazione degli oggetti di sfondo (Gori et al., 2014).

Ci sono tante possibili illusioni utilizzate nello studio della psicologia animale e della percezione, tra le più importanti troviamo: illusioni geometriche, illusioni di numerosità, illusioni di movimento, illusioni di lucentezza ed illusioni dei contorni (Agrillo et al., 2020). Ecco alcuni esempi:

- L'illusione di Ponzo:

Una delle illusioni più utilizzate negli animali è l'illusione geometrica, ovvero un'illusione che distorce le dimensioni di un oggetto, molto importante nello studio della percezione globale. Tra queste troviamo l'illusione di Ponzo comunemente usata per studiare la percezione nei piccioni (Fujita et al., 1991). Questa semplice illusione di prospettiva fa vedere allo spettatore due oggetti di dimensioni diverse, quando in realtà questi sono esattamente uguali. In un esperimento del 1997 è stato confermato come 2 specie di primati non umani vengano ingannati dall'illusione di Ponzo. (Fujita, 1997). Altre ricerche più avanti nel tempo hanno confermato che questa illusione riusciva da ingannare anche cavalli (Timney & Keil, 2016), pappagalli (Pepperberg et al., 2008a), scimmie (Fujita, 1997), scimpanzè (Bayne & Davis, 1983) e piccioni (Salva et al., 2014).

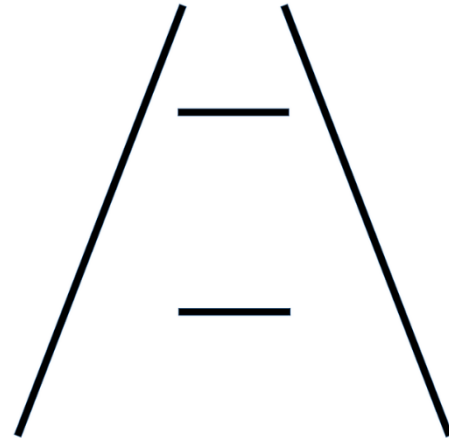


Figura 3: illusione di Ponzo.

- L'illusione Rotating Snakes

Un'altra illusione globale molto importante e popolare è l'illusione di movimento. Queste illusioni ingannano lo spettatore nel pensare che un'immagine statica sia in realtà in movimento. Un perfetto esempio è l'illusione dei Rotating Snakes o RS, un'immagine statica di cerchi concentrici che sembrano girare tra di loro. Questa illusione è stata utilizzata ad esempio per studiare l'effetto di possibili illusioni come strumenti di enrichment nelle leonesse dello zoo di Verona. Le leonesse sembravano molto interessate alle immagini e presentavano dei comportamenti propositivi durante e dopo le sessioni di gioco confermando quindi come riuscissero a vedere l'RS muoversi (Regaioli et al., 2019).

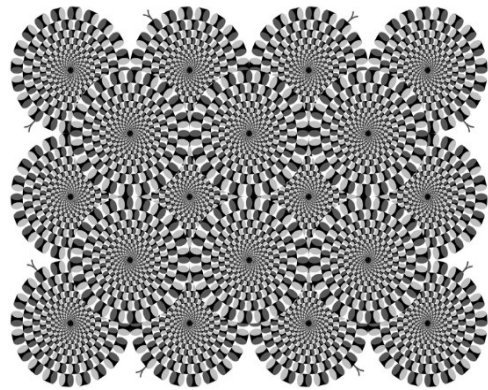


Figura 4: illusione dei Rotating Snakes.

1.2.1 Illusione ottiche nei pesci

Ad oggi, l'osservazione del comportamento animale per quanto riguarda le illusioni ottiche è stata in gran parte confinata agli studi sui mammiferi e sugli uccelli. Recentemente, c'è stato un crescente interesse anche per le indagini sui pesci. L'attenzione è stata particolarmente focalizzata su Guppy, *Xenotoca eiseni* (Rutter, 1896), squali bambù (*Chiloscyllium punctatum*, Müller & Henle, 1838) e come abbiamo visto ultimamente anche in Zebrafish (Gori et al., 2014).

Nel complesso, è stato dimostrato che queste specie ed altre testate sperimentano una percezione simile a quella umana di diversi fenomeni illusori che possono coinvolgere illusioni di dimensione, numero, movimento, stima della luminosità e contorni illusori (Agrillo et al., 2013). Tuttavia, in alcuni casi, non sono stati segnalati effetti illusori.

Tra i diversi studi eseguiti per scoprire l'effetto delle illusioni ottiche nei pesci troviamo, ad esempio:

- La ricerca sul “completamento amodale” ovvero la capacità di vedere un intero oggetto nonostante parti di esso siano coperte da un altro oggetto di fronte ad esso, il cui effetto è stato confermato essere visibile dal pesce *Xenotoca eiseni* (Rutter, 1896) tramite procedure di training (Sovrano & Bisazza, 2008);
- L'illusione di Muller-Lyer, ovvero una linea che può essere vista allungata o accorciata nel caso questa termini con dei segmenti angolati, addestrando ancora *Xenotoca eiseni* a scegliere sempre il segmento più lungo si è riusciti a confermare come questi venissero ingannati dall'illusione (Sovrano et al., 2016);
- L'illusione di Delboeuf, un'illusione di grandezza che inganna il soggetto facendo ingrandire o rimpicciolire un'immagine in base allo sfondo, in uno studio è stato confermato come i Guppies vengano influenzati da questa illusione ma in modo contrario agli esseri umani (Tyrone Lucon-Xiccato et al., 2018);

Molto importante per questa tesi è invece la Rotating Snakes, un'illusione di movimento che è stata recentemente testata anche nei pesci, vista nel capitolo precedente. Nella ricerca chiamata “Do Fish Perceive Illusory Motion?” (Gori et al., 2014) diversi individui di Guppy e Zebrafish sono stati addestrati ad avvicinarsi fisicamente ad un'immagine circolare in movimento e ad ottenere del cibo come ricompensa. Nel test il soggetto sperimentale era posizionato al centro di un acquario con due immagini ai lati, una falsa Rotating Snake di controllo ed una reale RS che doveva dunque ingannare il pesce. Questa è la ricerca madre che ha portato al concepimento dell'esperimento alla base di questa tesi. Nel risultato il 25% dei pesci non riconosceva la RS ma il resto dei pesci invece veniva ingannato; dunque, il risultato è molto simile allo stesso test eseguito negli esseri umani in cui il 16% della popolazione non riesce a vedere i cerchi girare. Questo dimostra dunque come i pesci dovrebbero essere in grado di vedere le illusioni ottiche di movimento, anche se ovviamente più ricerche sono necessarie per arrivare a questa esatta conclusione. (Gori et al., 2014)

Infine, l'illusione di Ouchi-Spillman, ovvero l'illusione di movimento utilizzata nell'esperimento discusso in questa tesi. Questa illusione visiva consiste in un disco con rettangoli bianchi e neri orientati verticalmente circondati da una pedana di rettangoli orientati orizzontalmente dello stesso colore (Jazi et al., 2011; Spillmann, 2013). In caso la si osservi muovendosi o venga mossa l'immagine il disco al centro sembrerà vibrare o scivolare sui suoi contorni.

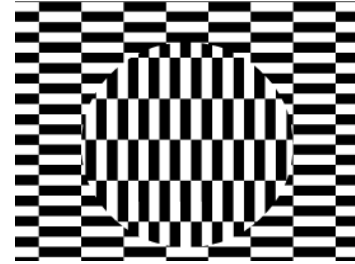


Figura 5: illusione di Ouchi-Spillman.

L'illusione di Ouchi-Spillman dovrebbe essere dunque, una buona illusione di movimento statica adatta ai pesci che, come organismi, non smettono quasi mai di muoversi ed osservano perifericamente il mondo circostante in ogni occasione. Purtroppo, però non ci sono esempi di funzionamento di questa illusione in animali al di fuori degli esseri umani, quindi, sarà molto interessante provare ad osservare il suo funzionamento con i pesci.

L'illusione funziona tramite le differenze di luminosità e di grandezza tra il cerchio interno e lo sfondo (Pinna et al., 2005). Come si vede nella figura 6 man mano che il cerchio interno aumenta di dimensione l'illusione sparisce.

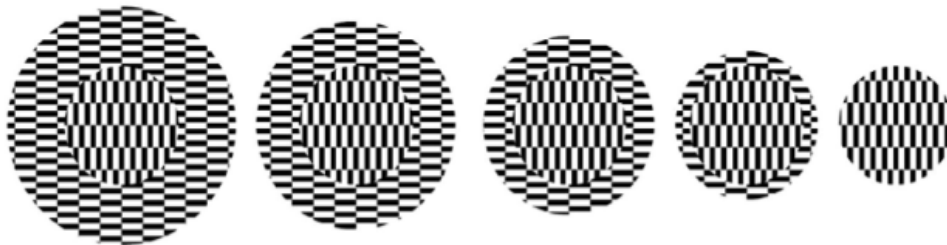


Figura 6: illusione di Ouchi-Spillman e come si degrada.

Ci sono diverse teorie sul funzionamento di questa illusione e su come noi esseri umani siamo in grado di percepirla. Come Rotating Snake alcune persone non sono in grado di vederla, ma non sono chiari i motivi di queste differenze individuali (Agrillo et al., 2020). Dunque, come abbiamo visto le illusioni ottiche sono un ottimo modo per studiare la psicologia cognitiva nei pesci, così come anche la loro percezione, ma i benefici e le possibilità non finiscono qui. Recentemente diversi studi hanno iniziato ad utilizzare le abitudini sociali dei pesci nei loro esperimenti, come abbiamo già visto la shoal-choice è un importante meccanismo utilizzato in psicologia animale e può anche essere utilizzato attraverso le illusioni ottiche. Inoltre, un'altra opportunità offerta dai pesci nelle illusioni ottiche proviene dal fatto che gli osteitti non presentano corteccia, che nei diversi studi sui mammiferi sembra essere il componente chiave per l'emergenza di illusioni ottiche. Ma come abbiamo visto nei diversi esperimenti avvenuti finora i pesci sembrano avere tutte le componenti necessarie per percepire le illusioni ottiche (Gori et al., 2014), quindi potrebbe essere molto interessante scoprire i possibili circuiti neuronali adibiti a tali mansioni in animali senza corteccia proprio tramite pesci, usando magari Zebrafish già utilizzato come modello nelle neuroscienze. Inoltre, studiando la storia evolutiva di questi sviluppi si potrebbe scoprire in quale momento l'elaborazione di tali processi è passato alla corteccia nei vertebrati e un giorno scoprire quali siano i motivi dell'esistenza delle differenze percettive tra gli esseri viventi (Dadda, 2022).

Quindi, è necessario ampliare la nostra conoscenza sulle illusioni ottiche nei pesci per formare una più ampia comprensione dei sistemi percettivi dei vertebrati. Inoltre, questo tipo di indagine potrebbe aiutarci ad affrontare questioni generali importanti negli studi percettivi, come il ruolo dell'ecologia nella formazione dei sistemi percettivi, l'esistenza della variabilità interindividuale nella percezione visiva delle specie non umane ed il ruolo della corteccia nella comprensione delle illusioni ottiche. (Agrillo et al., 2020).

1.3 Enrichment

Il termine enrichment o arricchimento ambientale indica “ogni cambiamento nella vita di un animale o nell’ambiente in cui vive in grado di avere un effetto positivo per il suo benessere senza comportare alcuna conseguenza negativa. L'arricchimento ambientale è in grado di stimolare la manifestazione di comportamenti tipici della specie, che rappresentano un indice molto importante dello stato di benessere degli animali” (Arricchimento Ambientale | Parco Natura Viva, 2023).

Esistono diverse tipologie di arricchimento, le principali sono:

- Arricchimenti alimentari: con lo scopo di prolungare l’esperienza di alimentazione rendendola più impegnativa ed interessante per l’animale;
- Arricchimenti strutturali o educativo-occupazionali: qualunque variazione, temporanea o permanente, dell’ambiente fisico in cui un animale vive costituisce un importante arricchimento strutturale, che questi siano giochi o aggiunte all’ambiente che garantiscono un miglioramento del suo stato fisico e mentale;
- Arricchimenti sociale: l’interazione con altri animali rappresenta un’importante forma di arricchimento e una fonte di stimolazione sociale dinamica ed imprevedibile, per questo motivo è fondamentale fornire agli animali un adeguato contesto sociale nel loro ambiente controllato;
- Arricchimenti sensoriale: in ambiente naturale gli animali vengono esposti ad una miriade di stimoli sensoriali che difficilmente possono essere replicati in laboratorio. Fornendo arricchimento sensoriale come diversi stimoli visivi, olfattivi, uditivi e tattili, si può essere in grado di emulare parte della complessità dell’ambiente naturale (Stevens et al., 2021);

1.3.1 Enrichment in Zebrafish

Anche se non c’è ancora un accordo generale sul fatto che i pesci siano senzienti, diversi autori ritengono che esista un ampio e convincente insieme di prove a sostegno dell’opinione che lo siano, come il fatto che possano soffrire e possano provare dolore, sperimentare stati mentali positivi e negativi (Franks et al., 2018; Sneddon et al., 2018). Quindi se si ha intenzione di analizzare il benessere animale nei pesci è necessario tenere conto non solo del loro benessere fisico ma anche del loro stato mentale. Non solo per motivi etici e di regolazioni ma anche per il semplice fatto che pesci in condizioni precarie di salute o con livelli di stress elevati portino a risultati poco affidabili negli esperimenti (Ohnesorge et al., 2021).

La nostra tesi verte su un pesce molto importante come organismo modello per le neuroscienze ovvero Zebrafish. Uno dei suoi pregi come animale sperimentale è la sua facilità di mantenimento, ma questo potrebbe essere un'arma a doppio taglio che porta a sottovalutare le sue condizioni di vita.

Per quanto riguarda l'enrichment strutturale ed alimentare le scelte sono abbastanza semplici: Zebrafish è un pesce d'acqua dolce il cui habitat è prevalentemente piccoli fiumi o ruscelli d'acqua poco profondi con ghiaia ed argilla come substrato. Preparare dunque un acquario con ghiaia, piccole piante anche di plastica e del cibo vivo qualche volta a settimana può portare ad un forte miglioramento del benessere animale di tutti gli Zebrafish al suo interno (Stevens et al., 2021). Importante per i pesci è anche ovviamente il loro benessere fisico, questo comprende la loro salute, la loro dieta e la manutenzione dell'acquario. Zebrafish necessita di un ricambio dell'acqua stabile così come una dieta ferrea, inoltre è importante controllare le ore di luce in modo tale da permettere un ritmo circadiano corretto. La pulizia dell'acquario dovrebbe essere eseguita periodicamente in base alle necessità e alle caratteristiche dell'enclosure, lavare con acqua sia le piante che il substrato è d'obbligo così come rendere trasparente il vetro, permettendo così una facile osservazione dei diversi pesci (Lawrence, 2007).

Passando invece a possibili arricchimenti, non necessari ma di aiuto allo stato fisico e mentale di Zebrafish troviamo: immagini di sfondo agli acquari come il letto di un fiume, musica classica (Barcellos et al., 2018) ad intervalli regolari, l'aggiunta di vere piante e altri organismi tipici di un acquario d'acqua dolce ed infine la formazione di un tappeto algale controllato può aiutare a diminuire lo stress perché può essere utilizzato dai Zebrafish per nascondersi od evitare la luce (Stevens et al., 2021).

Portando la discussione invece all'arricchimento sensoriale le cose diventano più difficili, gli Zebrafish sono abituati a vivere in ambienti con correnti d'acqua anche importanti; dunque, proporre all'interno dell'acquario una corrente forzata o degli esercizi di nuoto potrebbe migliorare le capacità fisiche dei pesci. Però questi arricchimenti sono difficili da implementare, da mantenere e non sempre portano ai risultati voluti, alcuni test eseguiti con diversi campioni di acquari hanno portato all'evidenza che sì i pesci che fanno esercizio sono più in salute, ma allo stesso tempo l'aggressività all'interno del banco tende ad aumentare (Woodward et al., 2019). Parlando sempre di stress ed aggressività questa è molto importante in animali gregari come Zebrafish ed andrebbe sempre considerata, si consiglia un controllo periodico del banco e della salute soprattutto delle femmine, le quali vengono disturbate molto spesso dai maschi, soprattutto in contesti stressanti (Stevens et al., 2021).

La parte però più importante per il benessere animale di Zebrafish è data dall'arricchimento sociale e sensoriale. Lo Zebrafish è un organismo estremamente sociale, così tanto da essere stimolato ad unirsi a branchi di Zebrafish animati da computer o da fantocci in 3d mossi da motori (Bartolini et al., 2016; Polverino et al., 2012). Se lasciato da solo un Zebrafish inizierà a dimostrare comportamenti inusuali dovuto all'aumento esponenziale di stress, cercherà disperatamente conspecifici e di nascondersi, cambierà colore e sarà estremamente erratico o immobile (Maximino et al., 2010). Invece lasciando Zebrafish vivere in banco porterà ad una diminuzione di stress ed ad un comportamento molto più naturale, soprattutto se aggiunto a tutti gli altri arricchimenti già citati. Ad esempio, uno studio di shoal-choice ci ha confermato come gli Zebrafish necessitino di stare in gruppi e come l'esplorazione e la ricerca di conspecifici sia molto stimolante per i singoli individui,

portando ad una forte diminuzione dello stress ed un aumento nell'accuratezza nel saper distinguere i conspecifici (Graham et al., 2018). Dunque, l'enrichment sociale è il più importante per la stabilità comportamentale in Zebrafish e sarebbe importante riuscire a darlo persino ai soggetti sperimentali in cui è necessario l'isolamento sociale (Stevens et al., 2021). Un metodo per poter implementare enrichment sociale a costo quasi zero senza dover veramente inserire nell'acquario un conspecifico potrebbe essere attraverso le illusioni ottiche. Come abbiamo osservato nel capitolo riguardante le illusioni si ha abbastanza prove da poter affermare che i pesci vengono ingannati dalle illusioni di movimento, come Rotating Snakes (Gori et al., 2014), quindi se si riuscisse ad implementare queste illusioni come enrichment sociale, si riuscirebbe a rendere un possibile isolamento forzato di Zebrafish molto meno stressante per il pesce, perché ingannato da possibili conspecifici in movimento illusorio. Questa tesi tratta proprio di un esperimento che ha cercato di confermare questa possibilità. Nel nostro caso, inserendo sulle pareti di un acquario immagini di Zebrafish con l'illusione di Ouchi-Spillman crediamo di poter emulare dei conspecifici in movimento, per produrre così dell'enrichment sociale a Zebrafish soli nella loro enclosure senza creare problemi di contaminazione tra conspecifici. Ovviamente si è ai primi stadi di questo studio e c'è bisogno di molta più ricerca per riuscire ad affermare che questo enrichment funzioni, ma se si riuscisse porterebbe grande beneficio sia agli Zebrafish che ai ricercatori.

1.4 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è di studiare l'effetto di alcune illusioni ottiche di movimento su *Danio rerio*. In particolare, le illusioni sono state utilizzate per cercare di rendere più realistiche delle sagome statiche di Zebrafish, col fine di studiare il comportamento gregario di Zebrafish e sviluppare possibili nuovi strumenti di arricchimento. I risultati ricavati dall'analisi di dati comportamentali non hanno mostrato preferenze significative per gli stimoli presentati.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Soggetto sperimentale

Danio Rerio (Hamilton, 1822) è un teleosteo di acqua dolce appartenente alla famiglia dei Cyprinidae. Questa specie presenta un corpo fusiforme di dimensioni ridotte e non supera i 40 mm di lunghezza (Spence et al., 2008). Il suo aspetto è caratterizzato da cinque a sette striature longitudinali di colore blu scuro che si estendono dall'opercolo alla pinna caudale (Barman, 1991), presenti anche sulla pinna anale (Spence et al., 2008) e per questo che è comunemente noto come Zebrafish. Lo Zebrafish presenta un lieve dimorfismo sessuale, che permette di distinguere i due sessi: le femmine hanno colori meno vivaci, una forma del corpo più arrotondata per via della presenza delle uova e una papilla genitale davanti alla pinna anale (Laale, 1977). In natura lo Zebrafish si trova principalmente nel nord est indiano, in Bangladesh e in Nepal (Spence et al., 2008). Il suo habitat naturale sono acque calde, poco mobili e di bassa profondità come risaie ma si trovano anche in ruscelli e rive dei fiumi (Spence et al., 2008). Come alimentazione è una specie onnivora, si nutre dunque di zooplankton, insetti acquatici e terrestri (Spence et al., 2008) ma anche elementi inorganici come i detriti (Lawrence, 2007). Il ciclo riproduttivo avviene nel periodo dei monsoni (da giugno ad agosto) che permette alle acque di formare un ambiente ideale per temperatura e disponibilità di cibo (Spence et al., 2008). Che sia in ambiente naturale o in laboratorio Zebrafish è un animale gregario, impara a riconoscere i suoi conspecifici dal periodo larvale e tenderà sempre di stare con il banco (Spence et al., 2008). In base alla tipologia e dimensione del corso d'acqua si formano banchi di diverse dimensioni e con comportamenti diversi, in piccole masse d'acqua un banco raggiunge al massimo 12 pesci;

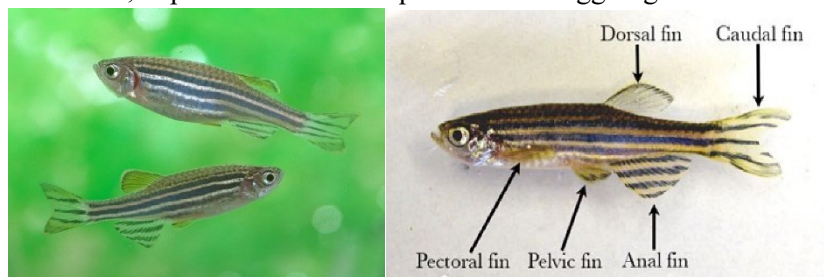


Figura 7: immagini di Zebrafish, la prima con un maschio ed una femmina, la seconda dimostrante l'anatomia.

invece, con l'aumentare del bacino si può arrivare ad avere banchi coesi di 300 pesci (Engeszer et al., 2007; Suriyampola et al., 2016). Nel caso l'acqua sia calma gli Zebrafish tenderanno a essere poco aggressivi; invece, nel caso di una forte corrente o di pesci di altre specie l'aggressività aumenterà (Suriyampola et al., 2016). Saper riconoscere un conspecifico ed unirsi al giusto banco (shoal-choice) è molto importante ed i meccanismi secondo cui uno Zebrafish si unisce ad un altro o ad un gruppo di conspecifici sono vari: le differenze genetiche, fattori dati da chemiocettori (Kalueff et al., 2013), i pattern delle strisce di conspecifici con cui è cresciuto come larva (Nunes et al., 2020), la presenza o meno di membri dell'altro sesso, l'attività del banco e la sua grandezza, così come i colori ed i riflessi dati dalle scaglie e la lunghezza e le forme del corpo (Bartolini et al., 2016). Non tutti questi meccanismi sono stati completamente accertati e le condizioni ambientali possono far variare la preferenza; dunque, è necessario essere molto attenti agli esperimenti riguardanti la scelta di conspecifici. Negli esperimenti osservati in questa tesi sono stati testati in totale 56 Zebrafish in età adulta (dai 12-16 mesi), di cui 16 nel primo esperimento

(Illusione di Ouchi-Spillman) e 20 ciascuno per i seguenti due esperimenti. Ogni pesce proviene dallo stabulario del laboratorio di Psicologia Comparata, che si trova all'interno del dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova. Tutti gli individui utilizzati nell'esperimento provengono dallo stesso gruppo con all'incirca 30 conspecifici di sesso misto mantenuti all'interno di un acquario da 150L. Gli acquari dello stabulario contenenti Zebrafish sono in plastica grigia (70x45x55 cm) ed equipaggiati con filtri d'aria, ghiaia naturale e piante vive, il tutto con una temperatura controllata di 25 ± 1 °C per ricreare la temperatura del loro habitat naturale (Lawrence, 2007). I pesci venivano alimentati due volte al giorno: la prima con normale mangime in fiocchi commerciale ed una seconda volta con piccoli crostacei d'acqua salata (*Artemia Salina*), il tutto in un fotoperiodo da 12:12h di luce a buio (L:D) con una luce fluorescente di 18 W. Il comitato etico locale dell'Università di Padova ha approvato lo studio (numero di permesso: 12/2021).

2.2 Apparato sperimentale

Gli esperimenti sono stati eseguiti in una stanza apposita con un acquario modificato e diversi acquari di riserva per gli spostamenti ed il riciclo dell'acqua. L'acquario modificato è stato rivestito all'interno ed all'esterno di Poliplack verde, un materiale plastico semi opaco così da stressare il meno possibile il pesce, nei due lati lunghi invece sono state posizionate due luci a led da 16W (746 lm). Infine, l'acquario è stato diviso da due triangoli di Poliplack andando a creare all'interno dell'acquario una struttura a clessidra isolata dall'esterno e senza possibili nascondigli per il pesce ed evitando così possibili complicazioni dovute alla visione simultanea degli stimoli. Come mostrato dalla figura le misure dell'acquario sono 60x40x30, l'acqua sale fino a 25cm di altezza e 80cm al di sopra dell'apparato sperimentale è stata montata una telecamera per registrare gli esperimenti. Lo stimolo illusorio e quello di controllo sono stati posti ai due lati corti dell'apparato, fissati poi con del nastro adesivo e le loro posizioni venivano scambiate ad ogni test. Le regioni di interesse considerate per le analisi sono rappresentate dai settori nelle immediate vicinanze degli stimoli (10 cm).

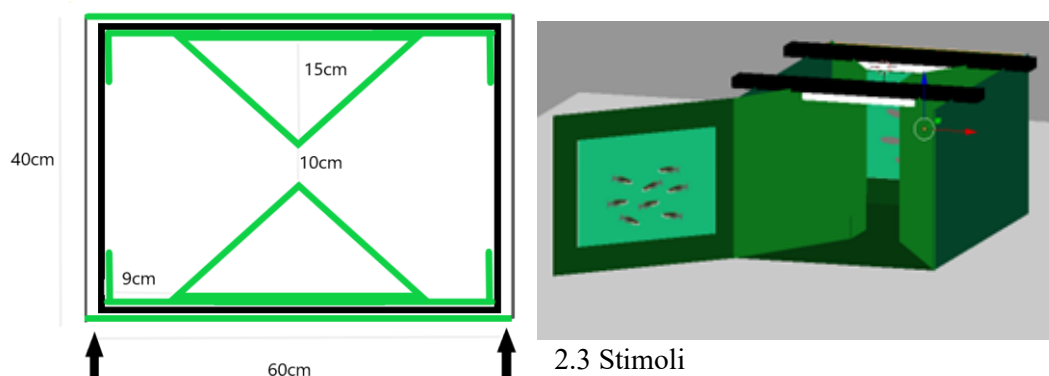


Figura 8: la prima immagine è rappresentativa dell'apparato sperimentale visto dall'alto senza luci, la seconda invece è una sezione laterale di un disegno 3d.

L'obiettivo dell'esperimento descritto in questa tesi è di riuscire a creare un'immagine fittizia di Zebrafish, in grado di suscitare nel pesce una spontanea reazione sociale positiva, uguale o simile alla vista di un vero conspecifico. Per ottenere questo risultato si è provato a costruire un'immagine di Zebrafish con dei pattern a strisce artificiali in bianco e nero, cercando di selezionarne di più simili possibili ai pattern dei conspecifici.

Gli stimoli sono stati creati utilizzando il software grafico vettoriale Inkscape, inserendo i pattern a strisce nel torace dell'animale e mantenendo il resto del corpo intatto. Otto immagini di Zebrafish fantoccio sono state inserite in un foglio verde rettangolare (30cm x 21 cm) per ogni stimolo prodotto. Tutte le sagome sono state posizionate con orientazioni ed inclinazioni diverse cercando dunque di creare un pattern abbastanza simile ad un banco di Zebrafish in movimento.

Stimolo A: Illusione di Ouchi-Spillman

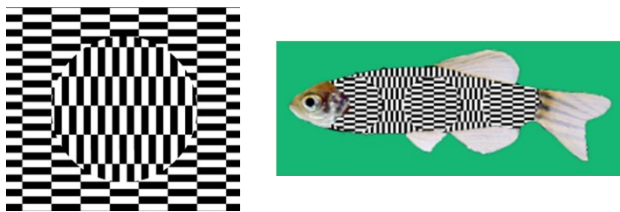


Figura 9 con Stimolo A: Illusione di Ouchi-Spillman.

Come abbiamo già visto questa illusione visiva consiste in un disco con rettangoli bianchi e neri orientati verticalmente circondati da una pedana di rettangoli orientati orizzontalmente dello stesso colore. L'illusione funziona molto bene negli esseri umani ed è percepita al meglio quando si è in movimento, allo stesso modo si è in grado di vederla anche usando un solo occhio o nel caso sia sfocata (Pinna & Spillmann, 2005). Questa illusione non era mai stata testata nei pesci prima d'ora ma si pensa che possa essere ottimale proprio per i motivi già citati ma anche perché si è in grado di percepirla anche solo utilizzando la visione periferica; dunque, il pesce nell'apparato sperimentale dovrebbe essere sempre in grado di osservarla.

Stimolo B: illusione di profondità 1

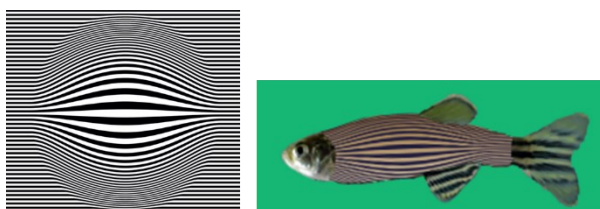


Figura 10 con Stimolo B: illusione di profondità 1.

In questo stimolo le strisce sono state modificate per ottenere un effetto di profondità 3D. Ingrandendo le linee centrali nel corpo di Zebrafish si dovrebbe ottenere come effetto un'illusione di prossimità, inoltre l'illusione di sfondo crea un effetto sfarfallante che dovrebbe incuriosire i soggetti sperimentali.

Stimolo C: illusione di profondità 2

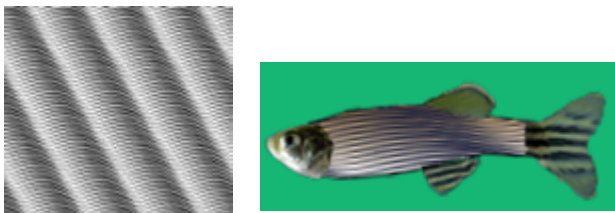


Figura 11 con Stimolo C: illusione di profondità 2.

In questo stimolo le strisce sono state modificate per ottenere un effetto di profondità 3D. Inserendo il pattern non lineare di strisce nel corpo del fantoccio si è cercato di ottenere un effetto di riflessione della luce, più simile dunque ad un pesce che si muove in natura, inoltre l'ombreggiatura dovrebbero dare un effetto di prossimità, movimento ed attirare il soggetto sperimentare con un effetto sfarfallante della luce grazie allo sfondo.

Stimolo di controllo: sagoma ad elisse



Figura 12 con Stimolo di controllo: sagoma ad elisse.

Il controllo corrisponde ad un'ellisse grigia (RGB: 123 119 120) delle stesse dimensioni di un Zebrafish lunga 4 cm. La sagoma non presenta alcuna caratteristica importante per il riconoscimento in Zebrafish come occhi o pinne e non possiede effetti illusori che potrebbero suscitare una risposta sociale nei pesci o nemmeno in esseri umani.

2.4 Procedura

Gli esperimenti sono stati eseguiti durante la giornata, ovvero dalle 10:00 (2 ore dopo l'alimentazione del mattino) fino alle 15:00 (2 ore prima dell'alimentazione serale). Ogni soggetto sperimentale veniva scelto dall'acquario iniziale ed immesso in un piccolo secchio di plastica bianco opaco (1L) della stessa temperatura, per poi essere trasportato nella stanza apposita per gli esperimenti.

Dopo circa un minuto il soggetto veniva gentilmente rilasciato nell'apparato sperimentale con gli stimoli già predisposti ed il ricercatore lasciava la stanza. Al passare di 60 secondi l'esperimento incominciava e la telecamera iniziava a riprendere. Passati 20 minuti, il test è completato e la telecamera smetteva di registrare; dunque, il soggetto era preso con un retino e di nuovo tramite il secchio trasportato nello stabulario. Ogni soggetto sperimentale dopo il test veniva rilasciato in un acquario dedicato da cui non avrebbe più preso parte ad altri test. Alla fine di ogni esperimento l'apparato sperimentale veniva svuotato di circa il 70% dell'acqua presente e rimpiazzata con l'acqua all'interno negli acquari al disotto dell'apparato, i quali venivano mantenuti allo stesso modo degli acquari dello stabulario, ma completamente privi di pesci. Queste misure sono state prese in considerazione per evitare possibili contaminazioni di ormoni o altri segnali chimico/fisici presenti nell'acqua dell'apparato. Infine, la posizione dello stimolo e del controllo veniva scambiata e la posizione annotata per evitare possibili errori.

2.5 Analisi video

Gli esperimenti sono tutti stati registrati attraverso una telecamera posizionata al di sopra dell'apparato sperimentale, come visto nei capitoli precedenti. Ogni registrazione alla fine degli esperimenti è stata analizzata da tre diversi tirocinanti addestrati a questo compito. Ogni video era diviso in: 1) routine di preparazione: veniva mostrato alla telecamera l'ID del soggetto e la posizione dello stimolo ed il controllo, 2) un minuto di abitudine per il pesce in modo tale da diminuire l'effetto dello stress sull'esperimento, 3) 20 minuti di registrazione del test vero e proprio, 4) fine dell'esperimento. Durante l'analisi video del test le aree di interesse erano i due lati dell'acquario, ovvero i due rettangoli adiacenti agli stimoli (10 cm x 40 cm ciascuno settore), per registrare queste variabili veniva utilizzata l'applicazione Ciclic Timer in differita. Il cambio di settore veniva catalogato solo quando più della metà del corpo del soggetto sperimentale entrava nell'area di interesse.

2.6 Raccolta dati e analisi statistica

Le analisi statiche sono state eseguite con il programma R, nella versione 3.5.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.r-project.org>).

Le preferenze per lo stimolo illusorio sono state valutate calcolando la proporzione del tempo speso dal soggetto sperimentale nel settore associato allo stimolo illusorio, nel dettaglio:

Preferenza per lo stimolo illusorio = (tempo passato nel settore dello stimolo illusorio) / (tempo speso nel settore dello stimolo di controllo + tempo speso nel settore dello stimolo illusorio)

Allo stesso modo sono state calcolate le preferenze per il settore di stimolo contro i settori centrali. Per chiarezza i diversi test sono stati nominati in base allo stimolo utilizzato dunque, il primo esperimento è stato nominato A perché utilizza lo stimolo A-Ouchi-Spillman, il secondo invece è stato contrassegnato con la lettera B perché usa lo stimolo B-illusione di profondità 1, lo stesso per il terzo test identificato dalla lettera C perché sfrutta lo stimolo C-illusione di profondità 2. Per le analisi statistiche sono stati eseguiti dei T-test, per verificare la significatività della preferenza per uno dei due settori. Per mostrare questi risultati sono stati creati dei grafici a box plot che consentono di visualizzare il centro e la distribuzione dei dati per ogni test.

3 RISULTATI

In ogni esperimento i settori laterali sono stati preferiti in confronto ai centrali, questo è un ottimo risultato considerando che lo spazio nell'acquario corrispondente alle aree di interesse è il 40% dell'area totale. Ricordiamo che ogni stimolo è stato chiamato A, B, C così come è stato mostrato nei capitoli precedenti, ovvero il primo esperimento è stato nominato A perché utilizza lo stimolo A-Ouchi-Spillman, il secondo invece è stato contrassegnato con la lettera B perché usa lo stimolo B-illusione di profondità 1, lo stesso per il terzo test identificato dalla lettera C perché sfrutta lo stimolo C-illusione di profondità 2. La percentuale media di tempo speso nei due settori laterali comparata al settore centrale è stata del:

- $69,18 \pm 14.72$ per la versione originale dell'illusione di Ouchi-Spillman ($t = 7.928$, $df = 15$, $p\text{-value} = 9.617e-07$, $\text{Cohen's } d = 1.98$)
- $77,24 \pm 7.88$ per l'illusione 3D di movimento V1 ($t = 21.134$, $df = 19$, $p\text{-value} = 1.166e-14$, $\text{Cohen's } d = 4.73$)
- $78,78 \pm 10.86$ per l'illusione 3D di movimento V2 ($t = 16.024$, $df = 19$, $p\text{-value} = 1.713e-12$, $\text{Cohen's } d = 3.58$)

Questi risultati implicano dunque che i nostri stimoli, sia di controllo che illusori, attiravano i soggetti sperimentali, come dimostrato in figura 13.

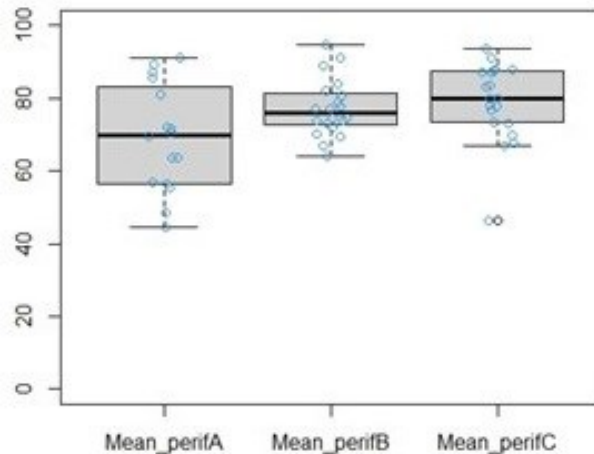


Figura 13: Percentuale del tempo speso nei settori laterali nella durata totale dei 3 test.

D'altro canto, i risultati non indicano nessuna preferenza per lo stimolo illusorio. La percentuale media del tempo speso vicino allo stimolo illusorio è di:

- 50.24 ± 7.58 per la versione originale dell'illusione di Ouchi-Spillman ($t = 0.1283$, $df = 15$, $p\text{-value} = 0.8996$)
- 48.78 ± 11.55 per l'illusione 3D di movimento V1 ($t = -0.4705$, $df = 19$, $p\text{-value} = 0.6433$, $\text{Cohen's } d = -0.105$)
- 47.72 ± 14.38 per l'illusione 3D di movimento V2 ($t = -0.7085$, $df = 19$, $p\text{-value} = 0.4872$, $\text{Cohen's } d = -0.158$).

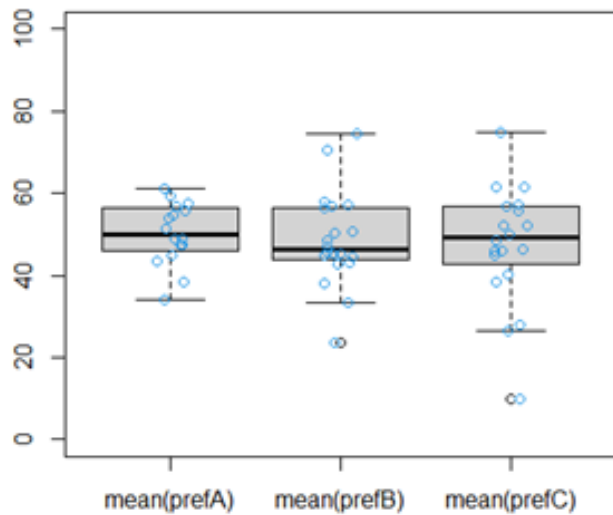


Figura 14: Percentuale che presenta la preferenza per lo stimolo illusorio in confronto al tempo speso nei settori laterali nella durata totale dei 3 test.

Inoltre, abbiamo accertato che le preferenze dei settori non cambiavano nel tempo. Le preferenze nel tempo dimostrano proprio questo:

- ILL-A: $F = 0.023$ $\Pr(>F) = 0.879$.
- ILL-B: $F = 0.842$ $\Pr(>F) = 0.359$;
- ILL-C: $F = 0.314$ $\Pr(>F) = 0.575$;

Come si può osservare nelle figure sottostanti la fluttuazione nei grafici sembra essere casuale, questo indica che non c'è una vera e propria preferenza dei settori e dunque i risultati non sono significativi.

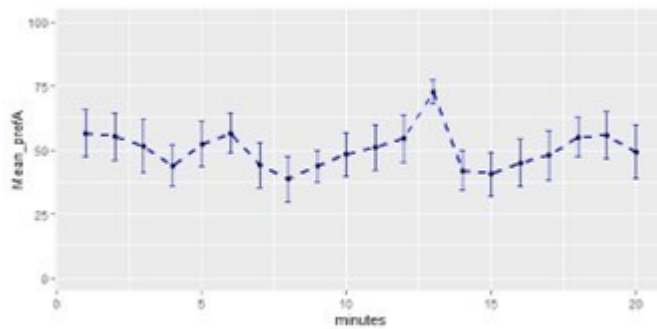


Figura 9: preferenza nel tempo degli stimoli illusori A.

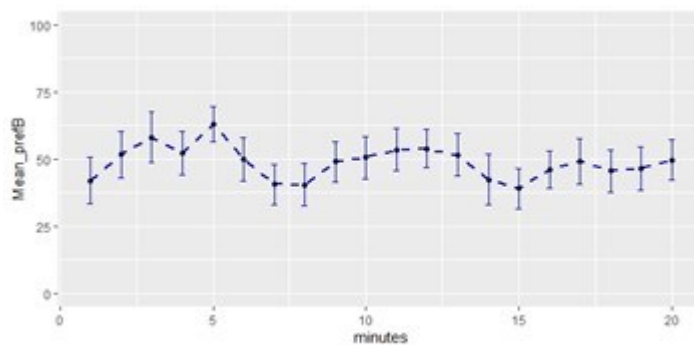


Figura 10: preferenza nel tempo degli stimoli illusori B.

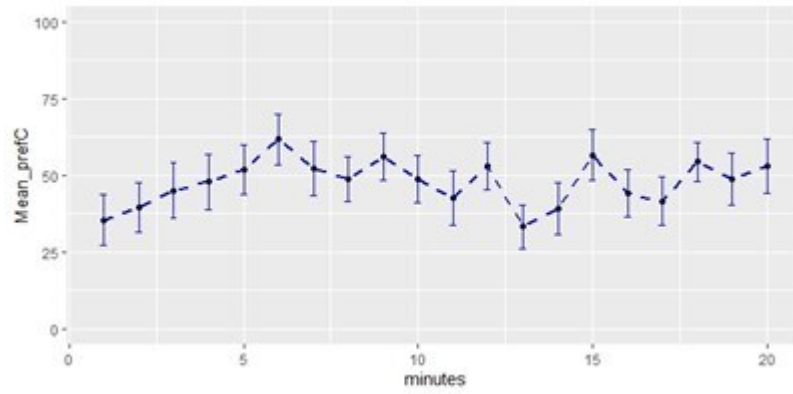


Figura 9: preferenza nel tempo degli stimoli illusori C.

4 DISCUSSIONE

Zebrafish, organismo modello per la genetica, la fisiologia e la ricerca sullo sviluppo è un animale sociale che ha bisogno di vivere in gruppo. Il suo utilizzo nei laboratori è in grande crescita e così anche la necessità di un enrichment sociale per gli Zebrafish isolati negli esperimenti. Lo scopo del presente lavoro è quello di riuscire a creare un'immagine fittizia di Zebrafish, in grado di suscitare nel pesce una spontanea reazione sociale positiva, uguale o simile alla vista di un vero conspecifico, il tutto per provare a simulare tramite queste immagini dell'arricchimento sociale per Zebrafish, mantenendone i livelli di stress bassi.

Nel riconoscimento di conspecifici gli Zebrafish preferiscono un banco di pesci con strisce simili a quelle con cui è cresciuto da quando era una larva e di sesso misto, inoltre è importante anche l'attività del banco ovvero il suo movimento (Qin et al., 2014), Zebrafish fermi o stressati verranno ignorati o non approcciati (Saverino & Gerlai, 2008). Il colore e la taglia sono fattori molto importanti, il giallo ad esempio è estremamente preferito (Saverino & Gerlai, 2008), così come anche Zebrafish di taglia più minuta o simile a quella del soggetto (Fernandes et al., 2015). Considerando dunque questi diversi fattori, nei nostri stimoli ogni fantoccio manteneva tutte le caratteristiche dello Zebrafish, come colori e forme dell'originale, tranne nel corpo le cui strisce venivano modificate negli stimoli illusori.

Per quanto riguarda invece le procedure, dalla cattura del pesce all'inizio del test queste azioni sono state tutte eseguite cercando di stressare il minimo possibile il pesce, in modo tale da non creare possibili "bias" durante l'esperimento, allo stesso modo l'apparato sperimentale è stato costruito cercando di ricreare le stesse condizioni dell'acquario di origine del soggetto, privo di altri possibili stimoli esterni. Questo perché i pesci possono essere spaventati da diversi tipi di sollecitazioni, come vibrazioni o luce; dunque, i ricercatori lasciavano la stanza appena rilasciato il pesce nell'acquario e le luci rimanevano soffuse come nello stabulario.

Purtroppo, anche prendendo tutte queste precauzioni, i risultati ricavati dall'analisi dei dati comportamentali non hanno mostrato preferenze significative per gli stimoli presentati. Gli Zebrafish sono stati interessati agli stimoli illusori tanto quanto gli stimoli di controllo. In esperimenti passati Zebrafish aveva reagito positivamente ad immagini 2D e 3D di conspecifici (Qin et al., 2014), quindi ci possono aiutare a capire i motivi del fallimento del nostro esperimento.

Partendo dai possibili stimoli esterni che potrebbero veramente aver avuto effetti sul nostro lavoro, questi potrebbero essere dati dalla rifrazione della luce sulle immagini e dalla mancanza di raggi UV. In natura il riflesso della luce sulle scaglie potrebbe essere importante per il riconoscimento di conspecifici. L'assenza di queste caratteristiche però avrebbe dovuto influenzare anche i risultati di altri esperimenti che utilizzano immagini di Zebrafish e non stimoli vivi. Lo stesso a riguardo dei raggi UV i quali non sono considerati significativi per la percezione in Zebrafish se non nelle larve (Kalueff et al., 2013).

Considerando invece un fattore interno si potrebbe pensare ai segnali chimici. Come spiegato nei metodi, ad ogni test l'acqua veniva sostituita con quella presente all'interno di acquari senza pesci al di sotto dell'apparato. Secondo uno studio del 2001, parte dei fattori di riconoscimento tra conspecifici in Zebrafish è dato dai segnali chimici rilasciati dai pesci stessi (Pritchard et al., 2001), riciclando noi l'acqua tra i test, questa doveva essere quasi completamente priva di segnali chimici di Zebrafish. Dunque, questo potrebbe aver influito in parte alla riuscita del test. Anche in questo caso però, questo fattore non ha pregiudicato i risultati di altri esperimenti incentrati sul riconoscimento sociale in Zebrafish. Quindi, il problema dovrebbe trovarsi nei nostri stimoli, le immagini presentate agli Zebrafish rappresentano un piccolo banco di pesci tutti con caratteristiche uguali al soggetto sperimentale, solo che nel corpo le strisce sono state sostituite con le illusioni ottiche.

Negli esperimenti di shoal-choice un fattore estremamente importante è il movimento dei pesci. Come abbiamo già discusso nei capitoli precedenti, presentando stimoli fermi a Zebrafish questi non rispondono o non considerano conspecifici tali figure; infatti, negli esperimenti con risultato positivo in cui venivano presentate immagini di Zebrafish, queste erano sempre in movimento e più il nuoto era calmo e tipico di un pesce in natura più questo veniva considerato come un conspecifico (Pritchard et al., 2001). I nostri stimoli cercavano di emulare un pesce in movimento tramite illusioni, ma anche se si è stato dimostrato che i pesci riescano a vedere alcune illusioni di movimento (Agrillo et al., 2013), sembra che le nostre illusioni invece non siano percepite da Zebrafish o non abbiano alcun effetto su di loro. Se le illusioni avessero avuto effetto, i soggetti avrebbero dimostrato interesse verso le immagini in simil-movimento, rispondendo dunque come nei casi già riportati di pesci che reagiscono a video dei loro conspecifici che nuotano. Si potrebbe supporre che le illusioni confondessero o spaventassero i soggetti sperimentali ma questo non sembra essere il caso, perché in ogni esperimento da noi eseguito, gli Zebrafish dimostravano tanto interesse per lo stimolo illusorio tanto quanto per il controllo; dunque, ogni possibile spiegazione punta verso il fatto che Zebrafish non venga influenzato dai nostri prototipi di fantocci illusori. Per il momento, il miglior metodo per introdurre arricchimento sociale a Zebrafish isolati è quello di utilizzare video di conspecifici che nuotano in piccoli banchi, tramite uno schermo accanto all'acquario.

5 CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri stimoli non sono stati considerati come conspecifici ed i nostri risultati non sono significativi probabilmente perché l'illusione di movimento non è stata percepita o non ha convinto gli Zebrafish. Per dimostrare questi fatti bisognerebbe riproporre l'esperimento, provando ad utilizzare immagini statiche di Zebrafish originali e video per comprovare le nostre conclusioni. Per migliorare invece questo esperimento si potrebbe aggiungere migliori dettagli alle immagini e provare altri tipi di illusioni, magari lo stesso IRS o altre illusioni già comprovate nei pesci. Altri possibili ritocchi potrebbero essere: rendere la maggior parte dei fantocci femmina, aggiungere più colore giallo ed utilizzare acqua che aveva Zebrafish presenti all'interno per attirare di più i pesci verso lo stimolo illusorio.

In questo momento la ricerca sulle illusioni ottiche in Zebrafish è ancora agli albori e studi futuri dovrebbero essere condotti nell'ottica di comprendere a meglio la percezione illusoria ed il riconoscimento di conspecifici in Zebrafish. Le procedure descritte in questo esperimento potrebbero essere riutilizzate a tale scopo, implementando le migliori discusse e consentendo forse un risultato più accurato e significativo. Proseguire in questa direzione consentirà di comprendere in maniera sempre più completa le possibilità cognitive e i limiti di questa specie che, mai come oggi, è un importante modello per la scienza tutta.

6 BIBLIOGRAFIA

- Agras, W. S., Crow, S. J., Halmi, K. A., Mitchell, J. E., Wilson, G. T., & Kraemer, H. C. (2000). Outcome predictors for the cognitive behavior treatment of bulimia nervosa: Data from a multisite study. *American Journal of Psychiatry*, 157(8), 1302–1308. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.157.8.1302/ASSET/IMAGES/LARGE/Q220T2.JPEG>
- 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). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0511>
- Agrillo, C., Dadda, M., Serena, G., & Bisazza, A. (2009). Use of Number by Fish. *PLOS ONE*, 4(3), e4786. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004786>
- Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., & Bisazza, A. (2017). Numerical abilities in fish: A methodological review. *Behavioural Processes*, 141(Pt 2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2017.02.001>
- Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., Piffer, L., Dadda, M., & Bisazza, A. (2012). A new training procedure for studying discrimination learning in fish. *Behavioural Brain Research*, 230(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.025>
- Agrillo, C., Parrish, A. E., & Beran, M. J. (2016). How illusory is the solitaire illusion? Assessing the degree of misperception of numerosity in adult humans. *Frontiers in Psychology*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.01663>
- Agrillo, C., Parrish, A. E., Gori, S., Beran, M. J., & Bisazza, A. (n.d.). Optical illusions as a tool to understand visual perception in monkeys and fish. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.01663>
- Agrillo, C., Santacà, M., Pecunioso, A., & Miletto Petrazzini, M. E. (2020b). Everything is subjective under water surface, too: visual illusions in fish. *Animal Cognition*, 23(2), 251–264. <https://doi.org/10.1007/S10071-019-01341-7/TABLES/1>
- Alerstam, T. (2011). Optimal bird migration revisited. *Journal of Ornithology*, 152(1 SUPPL), 5–23. <https://doi.org/10.1007/S10336-011-0694-1/FIGURES/4>
- Al-Imari, L., & Gerlai, R. (2008a). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 189(1), 216–219. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.12.007>
- Al-Imari, L., & Gerlai, R. (2008b). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 189(1), 216–219. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.12.007>
- Animal behaviour - Cognitive mechanisms | Britannica. (n.d.). Retrieved January 24, 2023, from <https://www.britannica.com/science/animal-behavior/Cognitive-mechanisms>.
- Anwer, H., O’Dea, R. E., Mason, D., Zajitschek, S., Klinke, A., Reid, M., Hesselson, D., Noble, D. W. A., Morris, M., & Lagisz, M. (2022). The effects of an obesogenic diet on behaviour and cognition in zebrafish (*Danio rerio*): traits average, variability, repeatability, and behavioural syndromes. <https://doi.org/10.32942/OSF.IO/EWQ64>
- Apanius, V., Penn, D., Slev, P. R., Ruff, L. R., Potts ; Pritchard, W., Lawrence, J., Butlin, R. K., Krause ; M, J., Follet, C., Ryan, N., Hanney, N., Lusk-Yablick, J., Gerlach ; Atema, G., Kingsford, M., & Gerlach, G. (1997). Mate Choice in Zebrafish (*Danio rerio*) Analyzed With Video-Stimulus Techniques 225 *NEUROBIOLOGY AND BEHAVIOR*. In Z. 2001. *Behav. Process* (Vol. 17, Issue 6). Blackwell Scientific.

- Appelle, S. (1972). Perception and discrimination as a function of stimulus orientation: The “oblique effect” in man and animals. *Psychological Bulletin*, 78(4), 266–278.
<https://doi.org/10.1037/H0033117>
- Appleby, M. C., & Hughes, B. O. (1993). The future of applied ethology. *Applied Animal Behaviour Science*, 35(4), 389–395. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(93\)90089-8](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90089-8)
- Arricchimento ambientale | Parco Natura Viva. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from <https://www.parconaturaviva.it/mission/ricerca/arricchimento-ambientale>.
- Arthur, D., & Levin, E. D. (2001). Spatial and non-spatial visual discrimination learning in zebrafish (*danio rerio*). *Animal Cognition*, 4(2), 125–131.
<https://doi.org/10.1007/S100710100111/METRICS>
- Baciadonna, L., Jerwood, G. M., Farrar, B. G., Clayton, N. S., & Emery, N. J. (2022). Investigation of Mirror-Self Recognition in Ravens (*Corvus corax*). *Journal of Comparative Psychology*, 136(3), 194–198. <https://doi.org/10.1037/COM0000319>
- Backus, B. T., & Oruç, I. (2005). Illusory motion from change over time in the response to contrast and luminance. *Journal of Vision*, 5(11), 1055–1069.
<https://doi.org/10.1167/5.11.10>
- Bagatto, B., Pelster, B., & Burggren, W. W. (2001). Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. *Journal of Experimental Biology*, 204(24), 4335–4343. <https://doi.org/10.1242/JEB.204.24.4335>
- Bartolini, T., Mwaffo, V., Showler, A., Macri, S., Butail, S., & Porfiri, M. (2016). Zebrafish response to 3D printed shoals of conspecifics: the effect of body size. *Bioinspiration & Biomimetics*, 11(2), 026003. <https://doi.org/10.1088/1748-3190/11/2/026003>
- Bayne, K. A. L., & Davis, R. T. (1983). Susceptibility of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) to the Ponzo illusion. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 21(6), 476–478.
<https://doi.org/10.3758/BF03330013/METRICS>
- Barcellos, H. H. A., Koakoski, G., Chaulet, F., Kirsten, K. S., Kreutz, L. C., Kalueff, A. V., & Barcellos, L. J. G. (2018). The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ*, 6, e5162. <https://doi.org/10.7717/peerj.5162>
- Beer, C. (2020). Niko Tinbergen and questions of instinct. *Animal Behaviour*, 164, 261–265.
<https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2019.08.005>
- Bisazza, A., J. Rogers, L., & Vallortigara, G. (1998). The Origins of Cerebral Asymmetry: A Review of Evidence of Behavioural and Brain Lateralization in Fishes, Reptiles and Amphibians. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(3), 411–426.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00050-X)
- Bollmann, J. H. (2019). The Zebrafish Visual System: From Circuits to Behavior. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Vision-091718-014723>, 5, 269–293.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VISION-091718-014723>
- Brand, M., Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. (n.d.). Chapter 1 Keeping and raising zebrafish.
- Brandimonte, M. A., Einstein, G. O., & McDaniel, M. A. (Eds.). (2014). *Prospective Memory: Theory and Applications*. <https://doi.org/10.4324/9781315806488>
- Brown, C. (n.d.). Fish intelligence, sentience and ethics. <https://doi.org/10.1007/s10071-014-0761-0>
- Brown, C., Laland, K., & Krause, J. (n.d.). *Fish Cognition and Behavior* Edited by.
- Butail, S., Polverino, G., Phamduy, P., del Sette, F., & Porfiri, M. (2014). Influence of robotic shoal size, configuration, and activity on zebrafish behavior in a free-swimming

- environment. *Behavioural Brain Research*, 275, 269–280.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.09.015>
- Butterworth, B., Gallistel, C. R., & Vallortigara, G. (2018). Introduction: The origins of numerical abilities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1740). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2016.0507>
- Carr, H. (1911). Space illusions. *Psychological Bulletin*, 8(7), 235–239.
<https://doi.org/10.1037/H0073034>
- Chiandetti, C., & Vallortigara, G. (2008). Is there an innate geometric module? Effects of experience with angular geometric cues on spatial re-orientation based on the shape of the environment. *Animal Cognition*, 11(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/S10071-007-0099-Y/FIGURES/7>
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, 70(1), 19–31.
<https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2005.03.001>
- condizionamento operante in “Enciclopedia della Scienza e della Tecnica.” (n.d.). Retrieved January 4, 2023, from https://www.treccani.it/enciclopedia/condizionamento-operante_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/.
- Dadda, M., Zinourov, M., & di Montorio, R. (n.d.). UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA Dipartimento di Psicologia Generale Corso di Laurea Triennale in Scienze psicologiche cognitive e psicobiologiche Elaborato finale Discriminazione di grandi numerosità in larve di zebrafish Large numerosities discrimination in zebrafish larvae Relatore.
- Dadda, R.: M. (2022). Ruolo della percezione gerarchica degli stimoli in Zebrafish.
<https://thesis.unipd.it/handle/20.500.12608/30226>
- Dahm, R., & Geisler, R. (2006). Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, 8(4), 329–345.
<https://doi.org/10.1007/S10126-006-5139-0/FIGURES/5>
- Dawkins, M. S. (2014). Tribute to Tinbergen: Questions and How to Answer Them. *Ethology*, 120(2), 120–122. <https://doi.org/10.1111/ETH.12186>
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R., & Brustein, E. (2002a). Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology*, 68(2), 85–111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8)
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R., & Brustein, E. (2002b). Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology*, 68(2), 85–111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8)
- Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R., & Wilson, S. W. (2015). Development of social behavior in young zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 9(AUGUST), 39.
<https://doi.org/10.3389/FNCIR.2015.00039/BIBTEX>
- 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.
<https://Home.Liebertpub.Com/Zeb>, 4(1), 21–40. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2006.9997>
- Eppe, M., Gumbsch, C., Kerzel, M., Nguyen, P. D. H., Butz, M. v., & Wermter, S. (2022). Intelligent problem-solving as integrated hierarchical reinforcement learning. *Nature Machine Intelligence* 2022 4:1, 4(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/s42256-021-00433-9>
- Experiments_on_Animal_Space_Pe. (n.d.).
- Fagot, J., & Tomonaga, M. (2001). Effects of element separation on perceptual grouping by humans (*Homo sapiens*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*): Perception of Kanizsa

- illusory figures. *Animal Cognition*, 4(3–4), 171–177.
<https://doi.org/10.1007/S100710100109/METRICS>
- Feng, L. C., Chouinard, P. A., Howell, T. J., & Bennett, P. C. (2017). Why do animals differ in their susceptibility to geometrical illusions? *Psychonomic Bulletin and Review*, 24(2), 262–276. <https://doi.org/10.3758/S13423-016-1133-3/TABLES/11>
- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., & Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural Brain Research*, 234(2), 334–342. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2012.07.004>
- Fontana, B. D., Alnassar, N., & Parker, M. O. (2021). The impact of water changes on stress and subject variation in a zebrafish (*Danio rerio*) anxiety-related task. *Journal of Neuroscience Methods*, 363, 109347. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2021.109347>
- Fontana, B. D., Alnassar, N., & Parker, M. O. (2022). The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light–dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. *Psychopharmacology*, 239(1), 287–296. <https://doi.org/10.1007/S00213-021-05990-W/FIGURES/6>
- Franks, B., Sebo, J., & Horowitz, A. (2018). Fish are smart and feel pain: What about joy? *Animal Sentience*, 3(21), 16. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1368>
- Freeman, B. G., & Miller, E. T. (2018). Why do crows attack ravens? The roles of predation threat, resource competition, and social behavior. *The Auk*, 135(4), 857–867. <https://doi.org/10.1642/AUK-18-36.1>
- Fujita, K. (1997a). Perception of the Ponzo illusion by rhesus monkeys, chimpanzees, and humans: Similarity and difference in the three primate species. *Perception and Psychophysics*, 59(2), 284–292. <https://doi.org/10.3758/BF03211896/METRICS>
- Fujita, K., Nakamura, N., Sakai, A., Watanabe, S., & Ushitani, T. (2012). Amodal Completion and Illusory Perception in Birds and Primates. *How Animals See the World: Comparative Behavior, Biology, and Evolution of Vision*. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780195334654.003.0008>
- Fuller, J. L., Rosvold, H. E., & Pribram, K. H. (1957). The effect on affective and cognitive behavior in the dog of lesions of the pyriform-amygdala-hippocampal complex. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 50(1), 89–96. <https://doi.org/10.1037/H0045954>
- Gerlai, R. (2010). Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behavioural Brain Research*, 207(2), 223–231. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.10.008>
- Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5), 504–512. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2004.04.005>
- Gori, S., Agrillo, C., Dadda, M., & Bisazza, A. (2015). Do Fish Perceive Illusory Motion? *Scientific Reports*, 4(1), 6443. <https://doi.org/10.1038/srep06443>
- Graham, C., von Keyserlingk, M. A. G., & Franks, B. (2018). Free-choice exploration increases affiliative behaviour in zebrafish. *Applied Animal Behaviour Science*, 203, 103–110. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2018.02.005>
- H., H. D. (1977). Function architecture of macaque monkey visual cortex, Ferrier Lecture. *Proc. R. Soc. Lond., B*, 198, 1–59. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387449975328512>
- Hart, B. L., Hart, L. A., McCoy, M., & Sarath, C. R. (2001). Cognitive behaviour in Asian elephants: use and modification of branches for fly switching. *Animal Behaviour*, 62(5), 839–847. <https://doi.org/10.1006/ANBE.2001.1815>

- Holzhaider, J. C., Hunt, G. R., & Gray, R. D. (2010). Social learning in new Caledonian crows. *Learning & Behavior* 38:3, 38(3), 206–219. <https://doi.org/10.3758/LB.38.3.206>
- HorrIDGE, G. A., Zhang, S.-W., & O'carroll, D. (1992). Insect perception of illusory contours. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 337(1279), 59–64. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1992.0083>
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of Physiology*, 148(3), 574. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1959.SP006308>
- Huntingford, F. A., & Ruiz-Gomez, M. L. (2009). Three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* as a model for exploring behavioural biology. *Journal of Fish Biology*, 75(8), 1943–1976. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2009.02420.X>
- illusióne ottica nell'Enciclopedia Treccani. (n.d.). Retrieved February 3, 2023, from <https://www.treccani.it/enciclopedia/illusione-ottica/>
- Lucon-Xiccato, T., Santacà, M., Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., & Dadda, M. (2019). Guppies, *Poecilia reticulata*, perceive a reversed Delboeuf illusion. *Animal Cognition*. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01237-6>
- Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., & Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience*, 345, 12–26. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.03.021>
- Janssen, A., Pallini, A., Venzon, M., & Sabelis, M. W. (1998). Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. *Experimental and Applied Acarology*, 22(9), 497–521. <https://doi.org/10.1023/A:1006089924336/METRICS>
- Jesuthasan, S. J., & Mathuru, A. S. (2009). The Alarm Response in Zebrafish: Innate Fear in a Vertebrate Genetic Model. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/01677060802298475>, 22(3), 211–228. <https://doi.org/10.1080/01677060802298475>
- Jones, P. A. (2016). Intra-Cultural Differences in Susceptibility to Geometrical Illusions and in Pictorial Depth Perception. <http://Dx.Doi.Org/10.2466/Pms.1974.38.1.188>, 38(1), 188–190. <https://doi.org/10.2466/PMS.1974.38.1.188>
- Kalueff, A. v., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., ... Schneider, H. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2012.0861/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE1.JPEG>
- Kelley, L. A., & Kelley, J. L. (2014). Animal visual illusion and confusion: the importance of a perceptual perspective. *Behavioral Ecology*, 25(3), 450–463. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/ART118>
- Konrad Lorenz. (2011). *L'etologia* (Bollati Boringhieri, Ed.; 6°). Bollati Boringhieri.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2007.04.077>
- Lewis, K. P. (n.d.). A comparative study of primate play behaviour: Implications for the study of cognition.
- Li, L., & Dowling, J. E. (2000). Effects of Dopamine Depletion on Visual Sensitivity of Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 20(5), 1893–1903. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-05-01893.2000>

- Linney, E., Upchurch, L., & Donerly, S. (2004). Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6), 709–718. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2004.06.015>
- Mascalzoni, E., & Regolin, L. (2011). Animal visual perception. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 2(1), 106–116. <https://doi.org/10.1002/WCS.97>
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 157–171. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.05.031>
- Maximino, C., & Herculano, A. M. (2010). A Review of Monoaminergic Neuropsychopharmacology in Zebrafish. <https://Home.Liebertpub.Com/Zeb>, 7(4), 359–378. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2010.0669>
- May, Z., Morrill, A., Holcombe, A., Johnston, T., Gallup, J., Fouad, K., Schalomon, M., & Hamilton, T. J. (2016). Object recognition memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 296, 199–210. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2015.09.016>
- McGowan, K. J. (2001). Demographic and behavioral comparisons of suburban and rural American Crows. *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World*, 365–381. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9_17
- Miletto Petrazzini, M. E., Sovrano, V. A., Vallortigara, G., & Messina, A. (2020). Brain and Behavioral Asymmetry: A Lesson From Fish. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 11. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2020.00011/BIBTEX>
- Miller, N. Y., & Gerlai, R. (2011). Shoaling in zebrafish: What we don't know. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 17–25. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.004/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Millman, S. T., Duncan, I. J. H., Stauffacher, M., & Stookey, J. M. (2004). The impact of applied ethologists and the International Society for Applied Ethology in improving animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 299–311. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2004.02.008>
- Nelson, N. (2016). Model homes for model organisms: Intersections of animal welfare and behavioral neuroscience around the environment of the laboratory mouse. 11, 46–66. <https://doi.org/10.1057/biosoc.2015.19>
- Neuhauss, S. C. F. (2010). Zebrafish vision: Structure and function of the zebrafish visual system. *Fish Physiology*, 29, 81–122. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)02903-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)02903-1)
- Neuhauss, S. C. F., Biehlmaier, O., Seeliger, M. W., Das, T., Kohler, K., Harris, W. A., & Baier, H. (1999). Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 19(19), 8603–8615. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-19-08603.1999>
- Noda, M., Gushima, K., & Kakuda, S. (1994). Local prey search based on spatial memory and expectation in the planktivorous reef fish, *Chromis chrysurus* (Pomacentridae). *Animal Behaviour*, 47(6), 1413–1422. <https://doi.org/10.1006/ANBE.1994.1188>
- Norton, W., & Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/11/90>
- Ohnesorge, N., Heintz, C., & Lewejohann, L. (2021). Current Methods to Investigate Nociception and Pain in Zebrafish. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 378. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.632634/BIBTEX>
- Oliveira, R. F. (2013). Mind the fish: Zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. In *Frontiers in Neural Circuits* (Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00131>

- Optical Illusions - ProQuest. (n.d.). Retrieved January 15, 2023, from <https://www.proquest.com/openview/997f33071a94a4dcdb35a2d1b7abcaf4/1?cbl=296199&pq-origsite=gscholar&parentSessionId=dkuHnvIJ3Pb1N5dABSWmV5UB6kfSORrOTBNV3Q8MF98%3D>.
- Orger, M. B., & de Polavieja, G. G. (2017). Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Neuro-071714-033857>, 40, 125–147.
- Parker, M. O., Millington, M. E., Combe, F. J., & Brennan, C. H. (2012). Development and implementation of a three-choice serial reaction time task for zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 227(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2011.10.037>
- Pepperberg, I. M. (n.d.). *Animal Behavior and Cognition ABC 2017*, 4(3):378-395 Review of Studies on Visual Perception in Grey Parrots (*Psittacus erithacus*): The Müller-Lyer Illusion, Amodal and Modal Completion. <https://doi.org/10.26451/abc.04.03.14.2017>
- Pepperberg, I. M., Vicinay, J., & Cavanagh, P. (2008a). Processing of the Müller-Lyer illusion by a Grey parrot (*Psittacus erithacus*). *Perception*, 37(5), 765–781. <https://doi.org/10.1068/p5898>
- PERUZZI, M. (2022). Sviluppo di una nuova procedura per lo studio delle abilità di discriminazione numeriche nelle larve di zebrafish (*Danio rerio*). <https://thesis.unipd.it/handle/20.500.12608/34042>
- Petrazzini, M. E. M., Pecunioso, A., Dadda, M., & Agrillo, C. (2020). Does Brain Lateralization Affect the Performance in Binary Choice Tasks? A Study in the Animal Model *Danio rerio*. *Symmetry* 2020, Vol. 12, Page 1294, 12(8), 1294. <https://doi.org/10.3390/SYM12081294>
- Pinna, B., & Spillmann, L. (2005). New illusions of sliding motion in depth. *Perception*, 34(12), 1441–1458. <https://doi.org/10.1068/P3476>
- Polverino, G., Abaid, N., Kopman, V., MacRi, S., & Porfiri, M. (2012). Zebrafish response to robotic fish: Preference experiments on isolated individuals and small shoals. *Bioinspiration and Biomimetics*, 7(3). <https://doi.org/10.1088/1748-3182/7/3/036019>
- Prinzmetal, W., Shimamura, A. P., & Mikolinski, M. (2001). The Ponzo illusion and the perception of orientation. *Perception and Psychophysics*, 63(1), 99–114. <https://doi.org/10.3758/BF03200506/METRICS>
- Pritchard, V. L., Lawrence, J., Butlin, R. K., & Krause, J. (2001). Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: The influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*, 62(6), 1085–1088. <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1858>
- Qin, M., Wong, A., Seguin, D., & Gerlai, R. (2014). Induction of social behavior in zebrafish: Live versus computer animated fish as stimuli. *Zebrafish*, 11(3), 185–197. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2013.0969/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE7.JPEG>
- Reebs, S. G. (2000). Can a minority of informed leaders determine the foraging movements of a fish shoal? *Animal Behaviour*, 59(2), 403–409. <https://doi.org/10.1006/ANBE.1999.1314>
- Reiss, D., McCowan, B., & Marino, L. (1997). Communicative and other cognitive characteristics of bottlenose dolphins. *Trends in Cognitive Sciences*, 1(4), 140–145. [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(97\)01046-2](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(97)01046-2)
- Roberts, A. C., Bill, B. R., & Glanzman, D. L. (2013). Learning and memory in zebrafish larvae. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(JUL), 126. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2013.00126/BIBTEX>

- (90) Ronnie Coleman: “lightweight baby!!! - YouTube. (2013). Retrieved February 21, 2023, from <https://www.youtube.com/watch?v=8BNP126zgPU>.
- Salva, O. R., Sovrano, V. A., & Vallortigara, G. (2014). What can fish brains tell us about visual perception? *Frontiers in Neural Circuits*, 8(SEP), 119. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2014.00119/BIBTEX>
- Salzen, E. A. (1967). Imprinting in Birds and Primates. *Behaviour*, 28(3–4), 232–254. <https://doi.org/10.1163/156853967X00028>
- Saverino, C., & Gerlai, R. (2008). The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behavioural Brain Research*, 191(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.013>
- Seddon, P. J. (1990). Behaviour of the yellow-eyed penguin chick. *Journal of Zoology*, 220(2), 333–343. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1990.TB04311.X>
- Selderslaghs, I. W. T., Blust, R., & Witters, H. E. (2012). Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2011.08.003>
- Shahan, T. A., & Sweeney, M. M. (2011). A Model of Resurgence Based on Behavioral Momentum Theory. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 95(1), 91. <https://doi.org/10.1901/JEAB.2011.95-91>
- Shichida, Y., & Matsuyama, T. (2009). Evolution of opsins and phototransduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1531), 2881–2895. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2009.0051>
- Skinner, B. F. (1948). “Superstition” in the pigeon. *Journal of Experimental Psychology*, 38(2), 168–172. <https://doi.org/10.1037/H0055873>
- Smith, D. A. (1978). A descriptive model for perception of optical illusions. *Journal of Mathematical Psychology*, 17(1), 64–85. [https://doi.org/10.1016/0022-2496\(78\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0022-2496(78)90035-4)
- Sneddon, L. U., Wolfenden, D. C. C., Leach, M. C., Valentim, A. M., Steenbergen, P. J., Bardine, N., Broom, D. M., & Brown, C. (2018). Ample evidence for fish sentience and pain. *Animal Sentience*, 3(21), 17. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1375>
- Sovrano, V. A., Albertazzi, L., & Rosa Salva, O. (2015). The Ebbinghaus illusion in a fish (*Xenotoca eiseni*). *Animal Cognition*, 18(2), 533–542. <https://doi.org/10.1007/S10071-014-0821-5/FIGURES/5>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. In *Biological Reviews* (Vol. 83, Issue 1, pp. 13–34). <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Stelinski, L., & Tiwari, S. (2013). Vertical T-maze choice assay for arthropod response to odorants. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 72. <https://doi.org/10.3791/50229>
- Stevens, C. H., Reed, B. T., & Hawkins, P. (2021a). Enrichment for laboratory zebrafish—a review of the evidence and the challenges. In *Animals* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., & Kalueff, A. v. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. *Neuropharmacology*, 62(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2011.07.037>
- Strassmann, J. E., & Joan Strassmann, C. E. (2014). Tribute to Tinbergen: The Place of Animal Behavior in Biology. *Ethology*, 120(2), 123–126. <https://doi.org/10.1111/ETH.12192>

- Suriyampola, P. S., Shelton, D. S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A., & Martins, E. P. (2016). Zebrafish Social Behavior in the Wild. *Zebrafish*, 13(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1089/ZEB.2015.1159/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG>
- Szenczi, P., Velázquez-López, Z. I., Urrutia, A., Hudson, R., & Bánszegi, O. (2019). Perception of the Delboeuf illusion by the adult domestic cat (*Felis silvestris catus*) in comparison with other mammals. *Journal of Comparative Psychology*, 133(2), 223–232.
<https://doi.org/10.1037/COM0000152>
- Tang, B., Wang, Y., Zhu, J., & Zhao, W. (2015). Web resources for model organism studies. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(1), 64–68.
<https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.01.003>
- Timney, B., & Keil, K. (2016). Horses are Sensitive to Pictorial Depth Cues. <Http://Dx.Doi.Org/10.1068/P251121>, 25(9), 1121–1128. <https://doi.org/10.1068/P251121>
- Tinbergen, N. (1952). The Curious Behavior of the Stickleback. 187(6), 22–27.
<https://doi.org/10.2307/24944080>
- Vernes, S. C., & Wilkinson, G. S. (2020). Behaviour, biology and evolution of vocal learning in bats. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1789).
<https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0061>
- WASHIZUKA, K., & TANIUCHI, T. (2007). Proactive interference on the radial arm maze performance of zebrafish. *Japanese Journal of Animal Psychology*, 57(2), 73–79.
<https://doi.org/10.2502/JANIP.57.2.1>
- Way, G. P., Ruhl, N., Sneksner, J. L., Kiesel, A. L., & McRobert, S. P. (2015). A comparison of methodologies to test aggression in zebrafish. *Zebrafish*, 12(2), 144–151.
<https://doi.org/10.1089/ZEB.2014.1025/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>
- Westheimer, G. (2008). Illusions in the spatial sense of the eye: Geometrical–optical illusions and the neural representation of space. *Vision Research*, 48(20), 2128–2142.
<https://doi.org/10.1016/J.VISRES.2008.05.016>
- Williams, H. (2004). Birdsong and Singing Behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1016(1), 1–30. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1298.029>
- Woodward, M. A., Winder, L. A., & Watt, P. J. (2019). Enrichment Increases Aggression in Zebrafish. *Fishes 2019*, Vol. 4, Page 22, 4(1), 22.
<https://doi.org/10.3390/FISHES4010022>
- Wu, Y., dal Maschio, M., Kubo, F., & Baier, H. (2020). An Optical Illusion Pinpoints an Essential Circuit Node for Global Motion Processing. *Neuron*, 108(4), 722–734.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.027>
- You, Y., Liu, N., Zhou, X., Zheng, J., & Guo, D. (2020). Visual Illusion Induced by Uncertain Environment in Neural Dynamics Cognitive System. *Proceedings of the International Conference on Anti-Counterfeiting, Security and Identification, ASID, 2020-October*, 134–137. <https://doi.org/10.1109/ASID50160.2020.9271723>
- Yuan, B.-G., & Tian, Y. (2011). Maxwell’s fish-eye lens and the mirage of perfect imaging. *Journal of Optics*, 13(2), 024017. <https://doi.org/10.1088/2040-8978/13/2/024017>
- Zhdanova, I. v. (2011). Sleep and its regulation in zebrafish. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 27–36.
<https://doi.org/10.1515/RNS.2011.005/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- ZINOUROV RONCALLI DI MONTORIO, M. (2022a). Discriminazione di grandi numerosità in larve di zebrafish. <https://thesis.unipd.it/handle/20.500.12608/30414>

7 RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto il dottorando alla base di questo esperimento, il dottor Alberto Mair, mia guida in questa selva oscura che sia è rivelata essere la stesura di questa tesi e che mi ha sempre supportato e sopportato come suo tirocinante e tesista. Ringrazio inoltre il mio tutor, il dottor Christian Agrillo che ha fatto nascere questo esperimento e dunque questa tesi, ma soprattutto mi ha portato ad amare ancora di più lo studio della psicologia animale e riconfermato come l'etologo sia un lavoro meraviglioso. Una menzione è necessaria anche per tutte le persone all'interno del dipartimento di psicologia, le quali mi hanno permesso di raggiungere il mio traguardo ed offerto qualche più che necessario caffè.

Per quanto riguarda invece la parte più personale dei ringraziamenti devo includere assolutamente il mio pappagallo Speck, lo scaldacollo migliore di tutto il west che mi ha tenuto compagnia nelle notti insonni, così come l'opera del signor ONE, necessaria per continuare ad avere la giusta motivazione per andare avanti. Altri aiuti emotivi che devo citare assolutamente sono le mie diverse compagnie di amici, che con pizza e giochi da tavolo mi hanno permesso di vivere in questi momenti duri.

Infine, non posso omettere la palestra, l'unico posto al mondo in cui riesco a non pensare alla tesi e a concentrarmi su quanto in realtà laurearsi non fosse nient'altro che "Light weight baby" (Ronald Dean Coleman, 2013).