



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione - DPSS

Corso di laurea in Scienze e Tecniche Psicologiche (L-24)

## ELABORATO FINALE

### **Discriminazione visiva in larve di zebrafish utilizzando un paradigma di training estensivo**

*Pattern discrimination in zebrafish larvae using an extensive training procedure*

***Relatore***

Prof. Dadda Marco

***Correlatore esterno***

Dott.ssa Gjinaj Gabriela

***Laureanda:*** Dalla Muta Altea

***Matricola:*** 2011953

Anno Accademico 2022/2023

## INDICE

0. Abstract .....	1
1. Introduzione .....	2
2. Scopo .....	6
3. Materiali e metodi .....	7
3.1. Biologia della specie .....	7
3.2. Soggetti sperimentali .....	8
3.3. Apparati sperimentali .....	9
3.4. Procedura sperimentale .....	12
3.5. Analisi video .....	13
4. Risultati .....	15
5. Discussione .....	19
6. Bibliografia .....	20

## ABSTRACT

La seguente ricerca prende inizio dalla volontà degli autori di replicare studi precedenti (Santacà et al., 2022) in merito alle capacità cognitive di memoria e di apprendimento nei soggetti di zebrafish in fase larvale, andando a superare i limiti in essi riscontrati e permettendo di fornire alla letteratura risultati su questo argomento ancora inesplorato.

Il paradigma utilizzato prevede una procedura di condizionamento operante con ricompensa appetitiva somministrata collettivamente e individualmente.

L'obiettivo è quello di indagare e valutare i seguenti effetti sul condizionamento:

- effetti della presentazione di stimoli diversi:
  - diversi modelli di stimolo (punti vs strisce) che prevedono una scelta dicotomica spontanea;
  - diverso tempo di inversione degli stimoli (tra il primo e il secondo studio rispetto alla fase antecedente) e la loro presenza nell'apparato.
- effetti dei diversi tipi di addestramento delle larve (collettivamente o individualmente).

I risultati ottenuti dimostrano che il comportamento dei soggetti non è stato influenzato dal fattore temporale, dallo stimolo rinforzato, dal tipo di presentazione e dall'ordine di inversione degli stimoli tra le sessioni giornaliere previste (due).

## 1. INTRODUZIONE

La ricerca sul comportamento e le capacità cognitive degli organismi acquatici è un campo affascinante e in continua espansione. Tra le specie di pesci che hanno attirato l'attenzione dei ricercatori, il pesce zebra (*Danio rerio*) si è dimostrato un modello particolarmente promettente per studi comportamentali e neurobiologici. Il pesce zebra è una specie di piccolo pesce d'acqua dolce originario del sud dell'Asia ed è ampiamente utilizzato come organismo modello in molti campi della biologia. La sua popolarità deriva in gran parte dalla sua elevata fecondità oltreché dai rapidi tempi di riproduzione; la femmina di zebrafish arriva infatti a deporre 200-300 uova al giorno in condizione di corretta manutenzione e la schiusa avviene in 2-3 giorni permettendo alle larve di svilupparsi nell'ambiente esterno.

Altre motivazioni per cui questa specie è preferita nell'ambiente di ricerca sono da ricondursi al minor spazio necessario per ospitarle, ne consegue un minor costo anche di manutenzione a carico di questa tipologia di soggetti, rispetto ai comuni mammiferi da laboratorio come i topi e i pulcini.

Inoltre la trasparenza delle prime fasi di vita, la sua facile manipolazione (garantita anche dalla schiusa precoce e dallo sviluppo esterno sopracitato), uniti alla loro grande omologia con il genoma umano e al fatto che i meccanismi neurologici coinvolti nel comportamento e nella percezione sono ampiamente conservati rispetto a quelli dei vertebrati superiori, compresi gli esseri umani, designano questa specie come il candidato ideale per studi genetici e neurobiologici. Pertanto, il pesce zebra si è rivelato uno strumento prezioso per esplorare i fondamenti biologici del comportamento e della cognizione.

Inizialmente, gran parte della ricerca si è concentrata sullo studio delle capacità sensoriali del pesce zebra, in particolare la visione, per via del rapido sviluppo che coinvolge il sistema visivo di questa specie (entro il 5 giorno dopo la fecondazione – dpf – il sistema visivo dei soggetti è ben sviluppato). Rinner, Rick e Neuhauss (2005) hanno infatti testato le prestazioni visive delle larve di pesce zebra geneticamente modificate, analizzando la risposta optocinetica (OKR) e andando a rivelare la loro sensibilità al contrasto e alle caratteristiche spazio-temporali degli stimoli visivi.

I vantaggi delle misurazioni OKR risiedono nella non necessità di un addestramento preliminare dell'animale e nel fatto che si servono di un comportamento stereotipato. L'OKR consiste in un movimento lento in risposta di un movimento percepito nella stessa direzione, seguito da un rapido movimento di ritorno denominato saccade. Per i colori caratteristici occhi grandi, i *D. rerio* sono soggetti prediletti per la rilevazione dell'OKR.

Tra le altre ricerche che si sono impegnate nello studio del nistagmo optocinetico vi è quella di Tappeiner et al. (2012), i quali hanno esplorato l'acuità visiva e la sensibilità al contrasto negli adulti di pesce zebra, fornendo informazioni fondamentali sulle loro capacità percettive. Questi studi hanno gettato le basi per una migliore comprensione di come il pesce zebra percepisce il mondo circostante.

Oltre alla percezione visiva, la capacità di apprendimento e memoria è un aspetto fondamentale del comportamento animale. Nel contesto dei pesci zebra, Santacà et al. (2022) hanno investigato l'apprendimento e la discriminazione visiva nelle larve appena schiuse. Esse hanno rapidamente imparato ad associare una ricompensa alimentare ad un modello visivo (8 dpf), dimostrando di saper discriminare gli stimoli tra colori e forme. Ciò ha fornito una preziosa conoscenza sulle capacità cognitive iniziali dei pesci zebra – molti simili a quelle dell'essere umano nonostante l'evidente differenza di dimensioni cerebrali – , gettando le basi per ulteriori indagini sullo sviluppo del comportamento.

Parallelamente, Bruzzone et al. (2020) hanno affrontato la sfida di misurare la memoria di riconoscimento (capacità di riconoscere oggetti, eventi o luoghi con cui si è venuti a contatto in precedenza) nelle larve di pesce zebra, identificando alcune delle sfide e delle limitazioni tecniche coinvolte nello studio delle capacità mnemoniche in queste fasi giovanili. In particolare, lo studio si servì di un nuovo test di riconoscimento degli oggetti (NORt), che sfrutta la tendenza di molte specie di vertebrati di esplorare gli oggetti nuovi rispetto a quelli familiari, per indagare quando la memoria di riconoscimento emerge nell'ontogenesi della specie. Sono state considerate larve di zebrafish di 7, 14 e 21 dpf, scoprendo che solo quelle del secondo gruppo hanno esplorato un nuovo stimolo (sulla base della tipologia ma non

sul colore) più a lungo di uno familiare; inoltre sembrerebbe emergere da un esperimento di controllo il fenomeno della neofobia per le larve di 21 dpf, meccanismo che spiegherebbe le scarse prestazioni a questa età.

In riferimento a ciò, uno degli aspetti cruciali della ricerca comportamentale è l'ambiente in cui vivono gli animali. Gatto et al. (2022) hanno esaminato l'effetto dell'arricchimento ambientale, ossia dell'aggiunta di elementi che incrementano la complessità strutturale dell'ambiente sterile di partenza, sul comportamento delle larve di pesce zebra (a 7 dpf, 14 dpf e 21 dpf), concentrandosi specificamente sulla riduzione dell'ansia. I risultati hanno dimostrato come gli animali esposti all'arricchimento ambientale siano più tolleranti all'introduzione di nuovi elementi. Questa scoperta suggerisce che la manipolazione dell'ambiente può influenzare il benessere mentale delle larve, aprendo la strada a future ricerche sulle interazioni tra ambiente e comportamento.

Altri studi invece si sono concentrati sulla fototassi (spostamento da aree scure a chiare) e l'evitamento degli stimoli UV nei larvali di pesce zebra (Guggiana-Nilo & Engert, 2016). Questo tipo di comportamento è cruciale per la sopravvivenza degli animali acquatici, poiché possono aiutarli a individuare rifugi sicuri o evitare situazioni pericolose. L'analisi della fototassi e dell'evitamento degli stimoli UV fornisce importanti informazioni sulle strategie di sopravvivenza dei larvali di pesce zebra e sulle risposte comportamentali a segnali ambientali specifici.

Come si può notare, in generale la maggior parte degli studi neurobiologici con soggetti zebrafish viene eseguita in individui allo stadio larvale. Esse sono coinvolte nella mappatura di screening comportamentale genetici per circuiti neurali (Wolman & Granato, 2012) di composti o farmaci neuroattivi, in studi neurodegenerativi e di ricerca comportamentale. Vi è quindi un enorme interesse per lo studio delle capacità sensoriali e cognitive in questa fase di sviluppo.

Quanto detto sino ad ora offre una panoramica dettagliata delle diverse prospettive di ricerca sul comportamento e la cognizione dei pesci zebra. Le varie indagini hanno esplorato le capacità sensoriali, l'apprendimento e la memoria, l'effetto dell'ambiente

sul comportamento e le risposte comportamentali a specifici stimoli ambientali. Questi studi svolgono un ruolo fondamentale nel migliorare la nostra comprensione dei meccanismi neurali e comportamentali del pesce zebra, aprendo nuove strade per la ricerca e fornendo ulteriori informazioni sui fondamenti biologici del comportamento animale. Il pesce zebra continua ad emergere come un modello di riferimento nel campo della biologia comportamentale e della neurobiologia, contribuendo al progresso della scienza e fornendo preziose intuizioni sui processi cognitivi in altri vertebrati, inclusi gli esseri umani.

I paragrafi che seguiranno sono dedicati alla descrizione dello studio eseguito su larve di *Danio rerio*, comunemente note con il nome di zebrafish, dell'apparato utilizzato, dell'analisi svolta e dei risultati ottenuti; sarà anche doverosamente presentate le caratteristiche di questa specie che ci permetterà di conoscere i nostri soggetti in modo più approfondito.

## 2. SCOPO

Lo scopo della presente tesi è quello di indagare la cognizione nelle larve di *Danio rerio* e di studiarne le curve di apprendimento individuale e collettivo, unita alla capacità di discriminazione visiva tra stimoli diversi, tramite un paradigma di training estensivo basato sul condizionamento operante.

Lo scopo era altresì di replicare l'esperimento di Santacà et al. andando a modificare la procedura utilizzata al fine di superare i problemi emersi negli studi precedenti. Per fare ciò sono state necessarie due differenti procedure di condizionamento operante, agite sui gruppi o sui singoli soggetti, per tutti e cinque i giorni di esperimento.

Tuttavia, la presenza di queste due fasi distinte (condizionamento collettivo e condizionamento individuale) rappresenta una forte limitazione in termini procedurali in quanto impedisce un'analisi approfondita del processo di apprendimento dei soggetti.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 BIOLOGIA DELLA SPECIE

Per l'esperimento in questione sono state utilizzate larve di zebrafish appartenenti alla famiglia dei pesci d'acqua dolce delle *Cyprinidae* (Nelson et al., 2016), la cui nomenclatura "*Danio rerio*" venne assegnata da Hamilton (Hamilton, 1882); essa deriva dal bengalese "*dhani*" che si traduce con "del campo di riso" (Talwar e Jhingran, 1991) a riprendere uno degli habitat in cui la specie si ritrova a vivere.

Le 44 specie individuate da Fang all'inizio di questo secolo (Fang, 2001) si distribuiscono soprattutto nel sud e sud-est asiatico, con una percentuale elevata in Bangladesh, India, Myanmar, Nepal e Pakistan (Barman, 1991).

Il *Danio rerio* adulto presenta un corpo affusolato nell'esemplare maschio e uno più grande e arrotondato nella femmina. La lunghezza media si aggira intorno ai 4 cm per 0.9 g di peso.

Il dimorfismo sessuale in questa specie si riscontra non solo nelle dimensioni e nella conformazione, ma anche nel colore della livrea; entrambi però presentano il caratteristico motivo striato di cinque linee longitudinali blu oltremare metallizzato che iniziano dall'opercolo e proseguono lungo tutta la lunghezza del corpo, fino alla pinna caudale (Ribas e Piferrer, 2014).



Lo sviluppo del pesce zebra prende inizio quando la femmina depone le uova e il maschio le feconda; nei successivi tre giorni gli embrioni si svilupperanno in uova fino a schiudersi. In questo stato lo sviluppo è molto immaturo e per i seguenti due giorni le larve giacciono sul fondo o galleggiano nell'acqua continuando a svilupparsi. Dal terzo giorno dopo la fecondazione (dpf) al quinto, le larve sono considerati embrioni esterni in via di sviluppo che raggiungeranno la completa

indipendenza a partire dal 6 dpf grazie allo sviluppo del tratto digestivo e della bocca e del sistema visivo, che permette loro di rilevare la luce visibile e ultravioletta (Guggiana-Nilo e Engert, 2016).

Vi sono tuttavia poche informazioni sui processi percettivi e sulle capacità cognitive (come apprendimento e memoria) del *D. rerio* nelle prime settimane di vita.

Nel laboratorio di Psicologia Animale e Comparata dell'Università degli studi di Padova si è cercato di colmare queste lacune in merito alla capacità delle larve di zebrafish di apprendere dalle esperienze tramite due studi sulla memoria di riconoscimento: uno basato sul paradigma dell'assuefazione (Bruzzone et al. 2020), l'altro sul condizionamento operante classico (Santacà et al., 2022).

### 3.2 SOGGETTI SPERIMENTALI

I soggetti di entrambi gli esperimenti sono il risultato di un accoppiamento promiscuo di uno stock di individui outbred eseguito in precedenza, con un rapporto 1:3 per i maschi e 2:3 per le femmine.

In seguito alla fecondazione e alla deposizione delle uova, esse sono state raccolte e trasferite in capsule di Petri, 50 uova cadauna, in una soluzione di acqua di pesce e blu di metilene fino al 4 dpf.

A causa del fenomeno noto con il nome di neofobia, descrivibile come timore delle novità (Treccani), c'era il rischio che le larve potessero avere delle reazioni di paura verso i nuovi stimoli, che avrebbero portato ad evitare gli stimoli usati per la discriminazione.

Sebbene questa reazione sia evolutivamente benefica per questa specie, in quanto impedisce a questi organismi, immaturi e indifesi in questa fase di vita, di essere predate, nel contesto sperimentale sono in realtà un fattore limitante in quanto ritardano o impediscono l'apprendimento. Per questo motivo, a 4 dpf e fino a 7 dpf, i soggetti sono stati spostati in una nuova piastra di Petri a cui sono stati aggiunti 10 mattoncini LEGO, differenziati per forma e colore, al fine di ridurre notevolmente la paura delle novità per mezzo dell'arricchimento ambientale, come fatto da Gatto et al. nel proprio studio nel periodo da 4 a 6 dpf, dimostrando che l'esposizione

all'ambiente abitativo arricchito di nuovi stimoli riduce i comportamenti ansiosi (Gatto et al., 2022); di conseguenza, una volta testati, si è osservato che i soggetti hanno dedicato più tempo all'esplorazione di un nuovo oggetto.

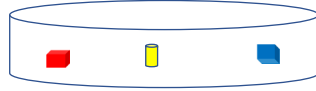


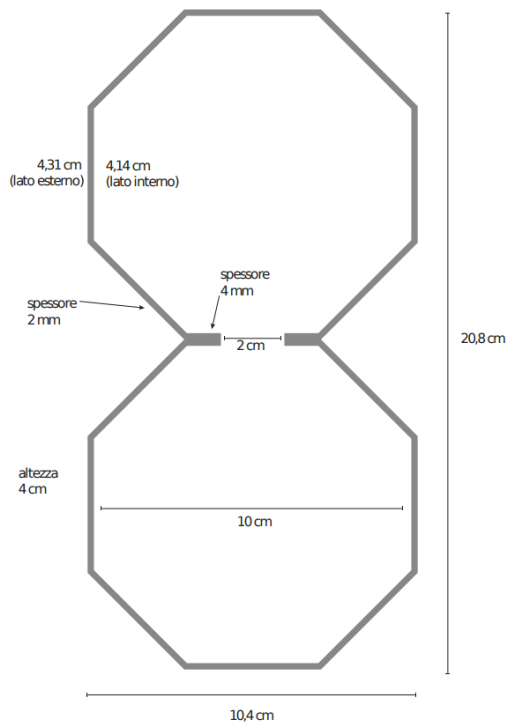
Figura A: Piastra Petri con mattoncini Lego di diverse forme e colori

Successivamente, a partire dal 8 dpf al 12 dpf i soggetti sono stati trasferiti negli apparati sperimentali dove hanno trascorso 5 giorni di addestramento, esposti a 10h di buio e 14h di luce in una stanza alla temperatura di 29°C.

Per evitare che la morte e la conseguente contaminazione di un campione potesse inficiare l'intero esperimento, sono state predisposte altre Petri con altrettanti soggetti di riserva a fini sperimentali.

Non è stato possibile suddividere i soggetti sulla base del genere in quanto essi sviluppano i caratteri sessuali intorno alla 11-12 settimana dopo la fecondazione.

### 3.3 APPARATI SPERIMENTALI

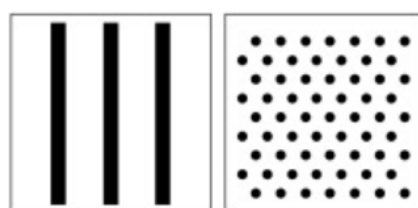


#### Esperimento 1: Formazione collettiva

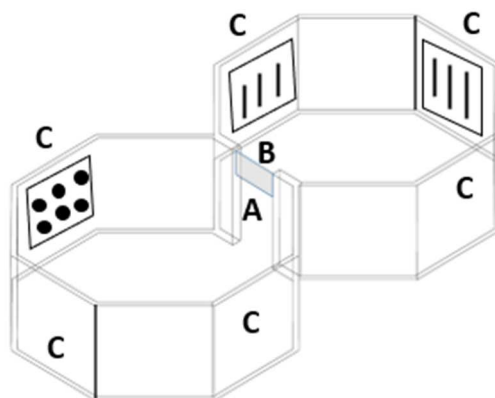
In questo esperimento l'apparato utilizzato è costituito di due ottagoni uniti tra di loro e separati da una costrizione all'altezza della giunzione; la costrizione poi era sovrastata da una barriera che permetteva il passaggio delle larve da un ottagono all'altro, ma impediva al cibo usato come rinforzo di spostarsi tra i due scompartimenti a causa della tensione superficiale dell'acqua, su cui esso galleggia. L'intero apparato è stato stampato in 3D, in materiale bianco PLA.

Il setting è stato poi riempito con la stessa soluzione usata nelle piastre Petri (acqua di pesce e blu di metilene) in un rapporto 1:2 per consentire un'analisi video migliore in quanto la soluzione risulta più trasparente.

Per quanto concerne gli stimoli, consistevano in pezzi di carta plastificata di forma rettangolare. Essi presentano una matrice in nero e un motivo bianco. Una matrice era caratterizzata da tre barre verticali (strisce), l'altra da 63 pallini (punti) equidistanti.



Infine, tre coppie di ogni stimolo sono state posizionate su tre facce di ogni ottagono. A questo punto vengono posizionate le videocamere sopra gli apparati per registrare le diverse fasi dell'esperimento.



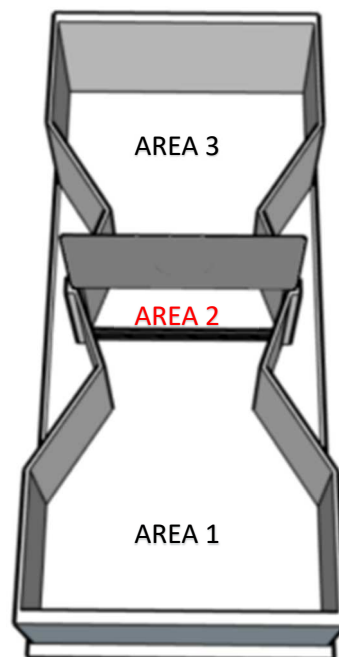
*Figura B: Disposizione degli stimoli*

Un punto di forza e innovazione di tale apparte risiede nella staticità degli stimoli: lo studio di Santacà et al. prevedeva la rimozione e introduzione degli stimoli per più volte al giorno, rappresentando un fattore di potenziale stress per i soggetti, oltreché di conseguenza una limitazione dell'esperimento. Si è quindi pensato di progettare una variante che prevedesse l'utilizzo di stimoli residenti, sempre nel serbatoio fatta eccezione per alcuni secondi al giorno, quando erano invertiti.

## Esperimento 2: Formazione individuale

Anche l'apparato sperimentale per la formazione individuale è stato stampato in 3D in materiale bianco PLA, ma con una forma a clessidra. Come in precedenza, anche in questo caso era presente una barriera sul lato superiore della costrizione che permetteva il passaggio delle larve, ma non quello del cibo usato come rinforzo. La soluzione usata in questo setting è la stessa dell'esperimento precedente. Gli stimoli utilizzati sono gli stessi della formazione collettiva, ma sono stati posizionati solo sulle due estremità opposte della clessidra. Anche in questo caso, ci si è avvalsi degli stimoli residenti.

La suddetta vasca era divisa in tre aree: le due alle estremità (Area 1 e Area 3) dove venivano inseriti gli stimoli, uno rinforzato e l'altro non rinforzato, e una zona centrale di non scelta (Area 2). Le videocamere sono state posizionate sopra l'apparato.



### 3.4 PROCEDURA SPERIMENTALE

#### Esperimento 1: Formazione collettiva

Il giorno antecedente all'inizio dell'addestramento, quaranta larve al 7 dpf sono state spostate da una piastra Petri con mattoncini LEGO ai quattro apparati sperimentali ottagonali, per mezzo di una pipetta.

Per i successivi cinque giorni (da 8 dpf a 12 dpf) i soggetti hanno ricevuto due prove di condizionamento operante al giorno: una al mattino (8:00) e una al pomeriggio (16:00), per un complessivo di 10 prove rinforzate.

Per ogni prova eseguita, il cibo è stato somministrato accanto agli stimoli da rinforzare al termine del condizionamento e 20 minuti più tardi, per permettere il rinforzo anche delle larve che potrebbero raggiungere lo stimolo corretto in tempi più dilatati. Nella metà delle prove, i soggetti sono stati rinforzati sui punti e l'altra metà sulle strisce.

Ci si è serviti di due procedure leggermente diverse denominate come "sotto-procedura A" e "sotto-procedura B" in cui gli stimoli sono rispettivamente residenti e introdotti. Ogni sottogruppo è stato poi ulteriormente suddiviso in due gruppi, per un totale complessivo di quattro gruppi: A1, A2 e B1, B2.

Nello specifico, nella prima procedura gli stimoli erano sempre presenti nell'apparato sperimentale dal 8 dpf a 12 dpf, fatta eccezione per il processo di pulizia durante il quale venivano rimossi e successivamente subito reinseriti, al fine di impedire solo l'associazione tra stimoli e rinforzo. Il gruppo A1 (rinforzato sui punti) e A2 (rinforzato sulle strisce) ha eseguito questa procedura.

Nella sotto-procedura B invece gli stimoli erano presenti all'interno dell'apparato durante la fase notturna della prima notte successiva al trasferimento delle larve a 7 dpf nell'apparato sperimentale, e venivano rimossi mezz'ora dopo la conclusione della prima prova. Dopodiché, per i cinque giorni sperimentali previsti, gli stimoli sono stati reinseriti mezz'ora prima dell'inizio del training e rimossi mezz'ora dopo la sua conclusione. Il gruppo B1 (rinforzato sui punti) e B2 (rinforzato sulle strisce) ha eseguito questa procedura.

Per tutti i gruppi sperimentali sopracitati, la ricompensa è stata somministrata accanto allo stimolo corretto, collocato su tre diversi punti dell'esagono, di cui è stata cambiata la posizione tra le prove mattutine e quelle pomeridiane.

Per questa tesi si terranno in considerazione quattro repliche, due della sotto-procedura A e due della sotto-procedura B in quanto complete.

### Esperimento 2: Formazione individuale

Il giorno antecedente all'inizio dell'addestramento, larve al 7 dpf sono state spostate individualmente da una piastra Petri con mattoncini LEGO all'apparato sperimentale a forma di clessidra, per mezzo di una pipetta. Sono stati trasferiti in totale 30 soggetti in 30 apparati diversi, una larva per clessidra.

Per i successivi cinque giorni (da 8 dpf a 12 dpf) i soggetti hanno ricevuto due prove di condizionamento operante al giorno, come nella formazione collettiva. In ogni prova i soggetti hanno ricevuto un premio alimentare accanto agli stimoli da rinforzare, tuttavia, in questo caso, è stato somministrato un solo e unico rinforzo per una durata di 30 minuti: i soggetti sono stati controllati ogni cinque minuti singolarmente e solo quelli in prossimità dello stimolo corretto (rinforzato) hanno ricevuto la ricompensa.

La posizione dei due stimoli è stata invertita tra le prove mattutine e pomeridiane. Durante questa fase, alcuni soggetti sono stati scartati a causa delle cattive condizioni.

## 3.5 ANALISI VIDEO

### Esperimento 1:

Le prestazioni dei soggetti sono state analizzate tramite registrazioni video riprodotte sullo schermo di un computer. Per analizzare l'output comportamentale di interesse è stato considerato solo il tempo trascorso dalle larve nella sezione con gli stimoli da rinforzare, ovvero in trenta minuti precedenti il primo rinforzo.

L'apparato è stato considerato come diviso in due settori, separati dalla restrizione tra i due ottagoni. Le larve presenti in ciascuna delle due sezioni sono state manualmente contate ogni trenta secondi. Infine si è andato a calcolare un indice di preferenza  $\frac{R}{R+R_0}$  con  $R$  numero di larve nel settore con stimoli rinforzati e  $R_0$  numero di larve nel settore con stimoli a rinforzo zero (non rinforzati).

#### Esperimento 2:

La procedura utilizzata per l'analisi delle prestazioni dei soggetti è la medesima dell'esperimento precedente rispetto alle tempistiche. Tuttavia, in questo caso, ci si è serviti del software BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) dell'Università di Torino per analizzare le registrazioni video e individuare il tempo trascorso nel settore rinforzato e quello nel settore non rinforzato. BORIS calcolava il tempo trascorso in ogni sezione dell'apparato sulla base di una suddivisione virtuale in tre settori: A1 e A3 settori di scelta con stimolo rinforzato e non rinforzato e A2 settore centrale di non scelta.

Escludendo i secondi spesi nel settore A2, si è calcolato l'indice di preferenza secondo l'equazione  $\frac{R}{R+R_0}$ . Infine, i dati sono stati analizzati attraverso il software di pacchetti statistici IBM SPSS (Statistical Package for Social Science).



## 4. RISULTATI

### Esperimento 1: Formazione collettiva

Un'analisi complessiva dei 10 studi non ha evidenziato una differenza significativa tra il numero di larve nei compartimenti con stimoli rinforzati e il numero di larve in quello complementare (test T di un campione:  $t(3)=0,720$ ,  $p=0,523$ ). La forza delle conclusioni è tuttavia limitata dal problema tecnico descritto nei paragrafi precedenti. È emersa una differenza significativa tra i primi cinque giorni di studio e gli ultimi cinque (test t accoppiato  $t(38)=-2.349$ ,  $p=0.024$ ), indicativi di una preferenza, in termini di tempo trascorso, dei secondi rispetto ai primi.

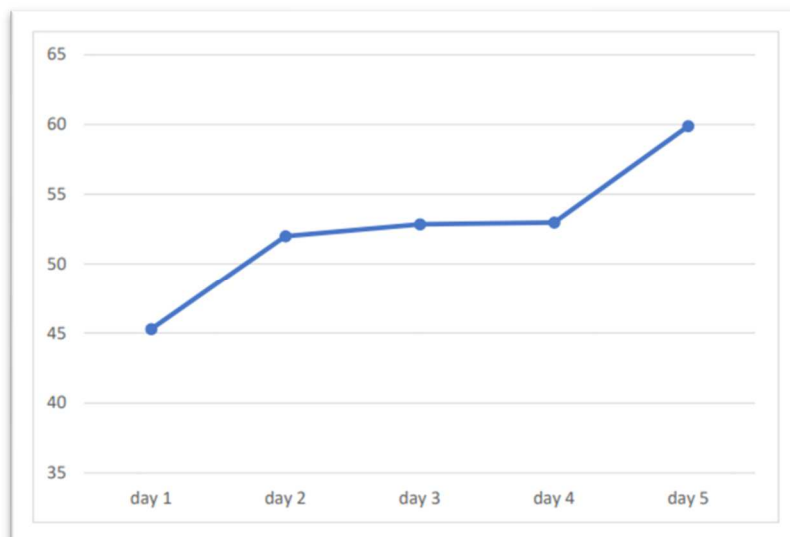


Figura C: Tempo trascorso nel settore rinforzato in 10 trials (5 giorni di osservazione)

I risultati delle *sotto-procedure* intesi come fattori tra soggetti, uniti ai 5 *giorni* di osservazione intesi come fattori interni ai soggetti, non sono statisticamente significativi né singolarmente (*giorni* ( $F(4,8)=1,496$ ,  $p=0,290$ ) e *sotto-procedura* ( $F(1,2)=0,029$ ,  $p=0,881$ )) né complessivamente ( $F(1,2)=6,364$ ,  $p=0,128$ ).

Un'analisi separata su ciascuno dei 10 studi ha riportato una preferenza statisticamente significativa per il settore rinforzato solo nella sessione pomeridiana del quinto giorno, con un tempo di permanenza di .62 nel compartimento rinforzato ( $SD = 0,071$ ,  $t(3)=3,458$ ,  $p=0,041$ ).

## Esperimento 2: Formazione individuale

Nel 33.8% delle osservazioni, il soggetto non è mai passato da un compartimento all'altro; questa percentuale non è stata presa in considerazione per l'analisi dei dati in quanto soggetti con scarsa mobilità che molto probabilmente non avevano imparato a muoversi tra gli scompartimenti.

La Figura D mostra le prestazioni nei 10 trials quando:

- tutti i soggetti erano considerati
- solo i soggetti con 40% di studi non inattivi
- solo i soggetti con 70% di studi non inattivi

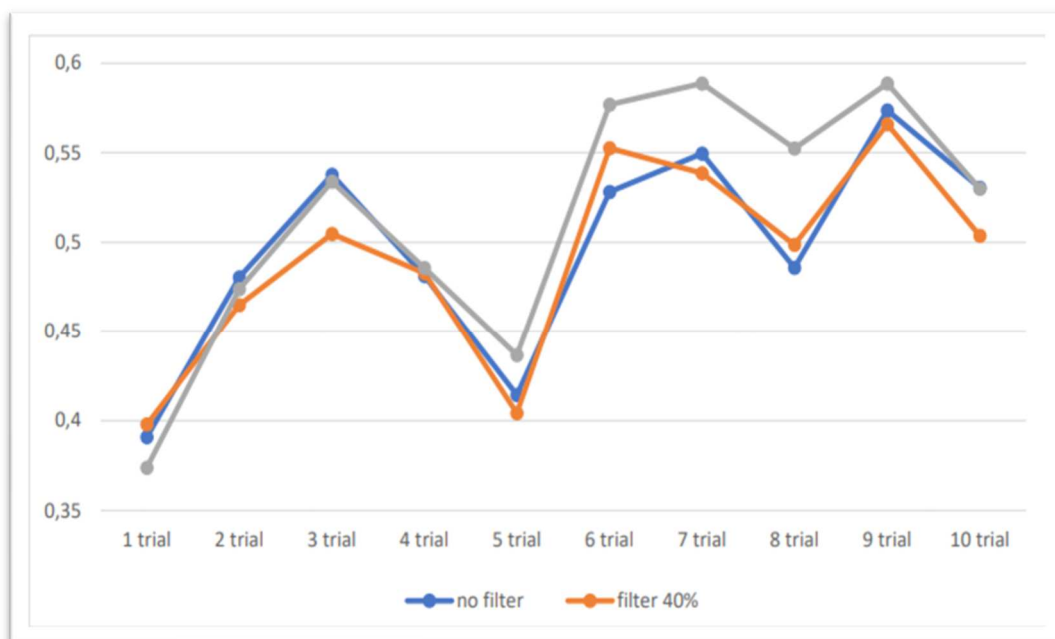


Figura D: Performance in 10 trials con tutti i soggetti considerati (blu), soggetti non inattivi al 40% (arancione), soggetti non inattivi al 70% (grigio)

La Figura E mostra invece la media delle prestazioni sulla base delle diverse percentuali di attività, nella prima parte dell'addestramento (prove da 1 a 5) e nella seconda parte (prove da 6 a 10).

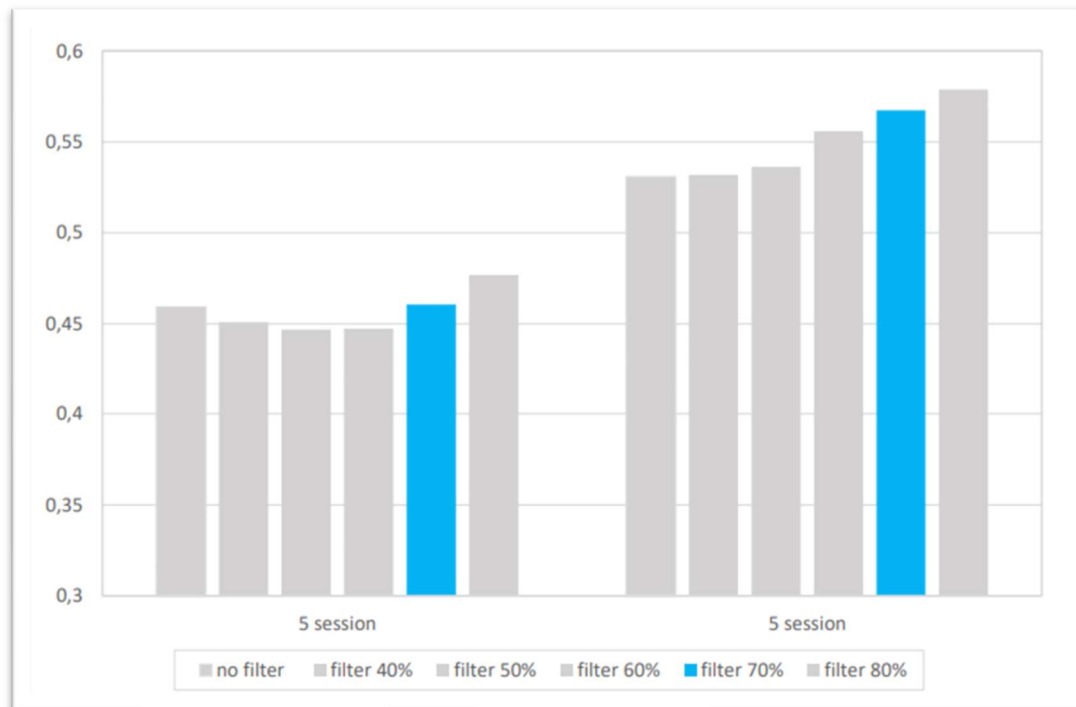


Figura E: Tempo speso nei settori rinforzati nelle prime cinque sessioni (sinistra) e nelle ultime cinque (destra) sulla base delle diverse percentuali di attività (40% - 50% - 60% - 70% - 80%).

Si può osservare come esista una correlazione non parametrica di Knedall Tau=1,  $p < 0.01$  tra il livello di filtraggio e le prestazioni nella seconda parte dell'addestramento, ma non nella prima parte dell'allenamento (Tau=0.33,  $p < 0.348$ ); ciò significa che rimuovere i soggetti inattivi dall'analisi produce una migliore prestazione di apprendimento alla fine dell'esperimento. Possiamo quindi affermare che le prestazioni del campione aumentano con l'aumentare della selettività; tuttavia esiste un compromesso tra selettività e dimensione del campione che permette l'inclusione dei soggetti che hanno avuto almeno il 70% di studi non inattivi. In conclusione quindi i soggetti inclusi nell'esperimento sono ventuno e quelli esclusi sono diciotto.

Un'analisi complessiva dei 10 studi non ha evidenziato una preferenza statisticamente significativa per il settore con stimoli rinforzati (test T a un campione,  $t(20)=0,574$ ,

$p=0,572$ ). Lo scenario non cambia se si analizzano separatamente le due sottoprocedure A e B (rispettivamente,  $t(12)=1.429$ ,  $p=0.179$  e  $t(7)=-0,691$ ,  $p=0,512$ ).

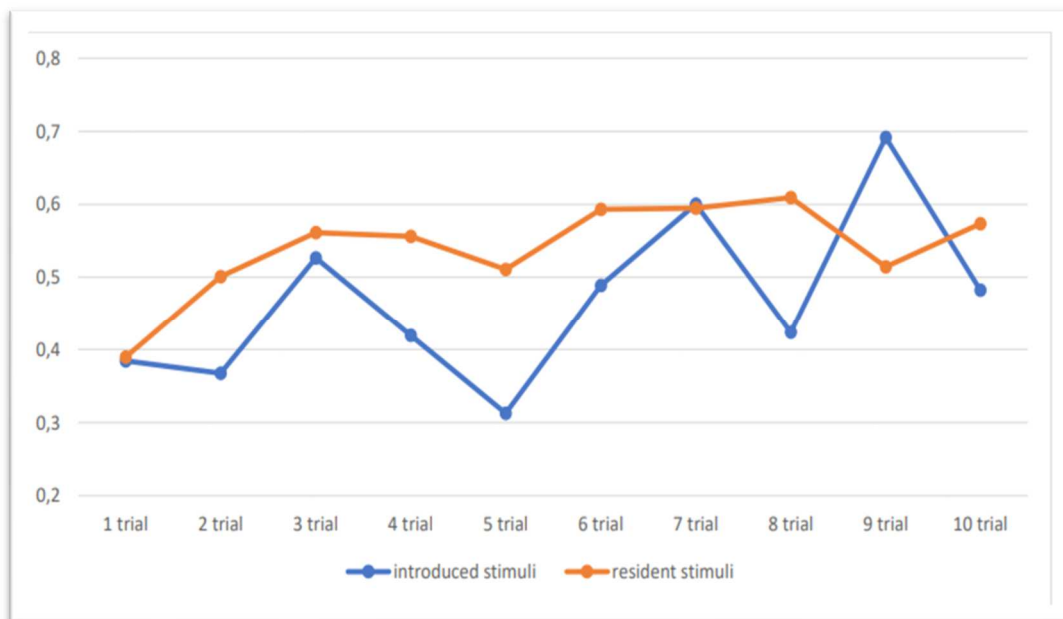


Figura F: Tempo trascorso nei settori rinforzati nei cinque giorni di osservazione a seconda delle sub-procedure: stimoli residenti (arancione) o stimoli introdotti (blu)

Solo nella prima sessione i soggetti hanno mostrato una preferenza significativa per il settore non rinforzato (un campione t-test,  $t(20)=-2.241$ ,  $p=0.037$ ,  $p$  sempre maggiore di 0.122 nelle restanti sessioni). Tuttavia, è emersa una differenza significativa tra i primi 5 e gli ultimi 5 studi (test t accoppiato  $t(20)=-2.840$ ,  $p=0.010$ ) indicando che negli ultimi 5 studi i soggetti hanno trascorso più tempo nel settore rinforzato rispetto alle prime 5 prove. Complessivamente nelle ultime 5 prove c'è una preferenza per il settore rinforzato ( $T(20)=2,415$ ,  $p=0,025$ ). Questa preferenza non è significativa quando viene analizzato l'intero set di dati ( $T(38)=1.293$ ,  $p=0.204$ ).

## 5. DISCUSSIONE

Solo metà delle prove inizialmente previste sono state completate a causa dei problemi tecnici del primo esperimento. In aggiunta, la morte di alcuni soggetti ha impedito di raggiungere la dimensione del campione target previsto per il secondo esperimento. Questi fattori hanno notevolmente limitato la portata delle conclusioni che possono essere tratte dall'analisi dei risultati degli esperimenti.

In entrambi gli esperimenti, ci sono segnali che i soggetti hanno progressivamente associato la ricompensa al rinforzo, aumentando la preferenza per lo stimolo corretto. Nella formazione collettiva questo è indicato da una differenza significativa tra i primi cinque giorni di studio e i successivi cinque, nella formazione individuale invece dalla presenza di una preferenza significativa per lo stimolo rinforzato nell'ultima prova dell'allenamento.

Tuttavia, si trattano di miglioramenti esigui e la preferenza per il settore rinforzato risulta essere di poco più superiore al 50%, risultati distanti dalle prestazioni osservate in un esperimento precedente condotto da Santacà (Santacà et al., 2022).

Le spiegazioni possibili correlabili a suddetti risultati possono essere molteplici: in primis la dimensione ridotta del campione, in secondo luogo il passaggio tra i due compartimenti in entrambi i tipi di esperimento.

Negli studi precedenti (Santacà et al., 2022) una delle limitazioni più incisive nella procedura di condizionamento era proprio legata a questo punto e ha portato all'eliminazione dall'analisi finale di un consistente numero di soggetti sperimentali per il fatto che non dimostravano di aver imparato a passare regolarmente da un settore all'altro dell'apparato. Uno degli scopi di questo lavoro era proprio quello di risolvere tale problematica, sostituendo la barriera con un foro del diametro di 1 cm dei casi precedenti con una barra posta sulla superficie dell'acqua con un foro più ampio, che facilitasse i passaggi da una zona all'altra. Tuttavia, le larve nuotano sotto la superficie dell'acqua ed è probabile che la suddetta barra, introdotta per impedire il flusso di cibo, abbia bloccato parzialmente anche il passaggio delle larve, risultando quindi essere inefficace. Allo stesso tempo, la presenza di una grande apertura può aver permesso la diffusione dell'odore del cibo o anche di particelle di cibo stesso dal compartimento rinforzato a quello non rinforzato, andando ad agire

come ricompensa per entrambi gli stimoli e interferendo sul condizionamento operante.

Per verificare l'attendibilità delle ipotesi sopracitate sarà necessario condurre esperimenti futuri in cui si modifichi il passaggio delle larve tra i compartimenti, limitando così la diffusione del cibo o del suo odore tra gli scomparti.

Una possibile alternativa potrebbe essere quella di servirsi come rinforzo di prede vive che fanno parte della dieta naturale delle larve di questa specie, come il paramecio e i rotiferi, dotate di scarsa mobilità che consentirebbe di eliminare totalmente la presenza di una barriera.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Santacà, M., Dadda, M., Valle, L. D., Fontana, C., Gjinaj, G., & Bisazza, A. (2022). *Learning and visual discrimination in newly hatched zebrafish*, iScience.

Wolman, M. A. & Granato M. (2012). *Behavioral genetics in larval zebrafish: Learning from the young*. Development Neurobiology.

Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

Spence et al (2008). *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio*, Biological Reviews 83.

Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). *The zebrafish (Danio rerio) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research*. Reviews in Aquaculture

Guggiana-Nilo, D., & Engert, F. (2016). *Properties of the Visible Light Phototaxis and UV Avoidance Behaviors in the Larval Zebrafish*. Frontiers in Behavioral Neuroscience

Bruzzone, M., Gatto, E., Xiccato, T. L., Valle, L. D., Fontana, C., Meneghetti, G., & Bisazza, A. (2020). *Measuring recognition memory in zebrafish larvae: issues and limitations*. PeerJ

Vocabolario Treccani, Neofobia <https://www.treccani.it/vocabolario/neofobia/>

Gatto, E., Dadda, M., Bruzzone, M., Chiarello, E., De Russi, G., Maschio, M. D., Bisazza, A., & Lucon-Xiccato, T. (2022). *Environmental enrichment decreases anxiety-like behavior in zebrafish larvae*. Developmental Psychobiology

Falsitta, Nerissa. *Development of an innovative operant conditioning procedure to investigate cognitive abilities in Zebrafish larvae (Danio rerio)*, Bachelor's Degree Course in Psychological Science, Final Dissertation, University of Padua.