

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI PSICOLOGIA GENERALE

**Corso di Laurea in
SCIENZE PSICOLOGICHE COGNITIVE E PSICOBIOLOGICHE**

**"Studio delle abilità di apprendimento di odori nell'ape
mellifera (*Apis mellifera*) tramite una procedura di
condizionamento classico olfattivo"**

**"An investigation of honey bees (*Apis mellifera*) odor learning abilities
using an olfactory classical conditioning paradigm"**

Relatrice: Prof.ssa Maria Elena Miletto Petrazzini

Correlatrice esterna: Dott.ssa Maria Bortot

**Laureando: Filippo Signoretto
Matricola: 2013360**

Anno accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Tecniche di condizionamento olfattivo.....	4
1.2 Capacità olfattive nelle api mellifere.....	5
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA.....	7
3. MATERIALI E METODI.....	8
3.1 La specie.....	8
3.1.1 Le antenne.....	9
3.2 Esperimento.....	10
3.2.1 I soggetti sperimentali.....	10
3.2.2 Apparato e stimoli.....	11
3.2.3 Paradigma sperimentale PER.....	13
3.2.4 Procedura sperimentale.....	13
3.3 Analisi statistiche.....	15
4. RISULTATI.....	16
5. CONCLUSIONI.....	19
5.1 Futuri studi: il ruolo dell'apprendimento olfattivo sul movimento antennale spontaneo delle api.....	20
6. BIBLIOGRAFIA.....	22

1. INTRODUZIONE

La scienza comparata da sempre cerca di comprendere i meccanismi biologici di funzionamento degli organismi con l'obiettivo non solo di comprenderne l'importanza adattativa, ma anche di delineare il loro percorso evolutivo.

Questo tipo di ricerca si concentra non solo su organismi vertebrati, ma anche su diverse specie di invertebrati. Oltre ad una profonda curiosità scientifica sul loro funzionamento e adattamento all'ambiente, utilizzare come modello una specie di piccole dimensioni come questi ultimi, permette di avere a disposizione un maggior numero di soggetti in laboratorio e costi ridotti nel mantenimento e la cura degli stessi, oltre che di limitate o assenti limitazioni etiche (Smith et al., 2011).

Tra gli invertebrati troviamo gli insetti, ad oggi il gruppo animale più eterogeneo presente sul nostro pianeta. Gli insetti, infatti, costituiscono quasi i tre quarti di tutte le specie animali finora descritte (Chapman, 1998). Gli insetti, nonostante la loro vita breve, hanno bisogno di essere equipaggiati con meccanismi cognitivi complessi (e.g., mantenere in memoria alcune informazioni importanti per un certo periodo di tempo, apprendere regolarità ambientali, buone capacità di categorizzazione, ecc) per poter fare scelte adattative e massimizzare le loro probabilità di sopravvivenza e riproduzione. Dal punto di vista scientifico, lo studio degli insetti è di grande interesse dal momento che tutte queste abilità sono supportate da un numero relativamente esiguo di neuroni (e.g., il cervello delle api ha appena 960 000 neuroni in 1 mm³ di cervello; Menzel, 2012).

Tra gli insetti, l'ape mellifera (*Apis mellifera*) è una tra le specie più conosciute, il cui studio ha aperto la strada alla ricerca dei meccanismi di memoria, apprendimento e cognizione degli insetti. Lo studio delle loro abilità cognitive si è inizialmente sviluppato a partire da osservazioni del loro comportamento naturale (Turner, 1910; von Frisch, 1914), per poi passare alla standardizzazione di precisi protocolli sperimentali sviluppati in campo (Avarguès-Weber & Giurfa, 2014) e in laboratorio (Matsumoto et al., 2012). Il loro ricco repertorio comportamentale, supportato da un sistema nervoso sperimentalmente accessibile e la possibilità di sottoporle a controllati protocolli di addestramento e test, sono alcune tra le ragioni che hanno incoraggiato l'utilizzo delle api per studiare la complessità cognitiva (Menzel & Giurfa, 2006).

1.1 Tecniche di condizionamento olfattivo

Il condizionamento classico fu introdotto in letteratura per la prima volta dal medico e fisiologo Ivan Pavlov (1849-1936). Egli notò che alla presentazione del cibo, il soggetto sperimentale (in questo caso, un cane) iniziava a salivare, avendo così una risposta incondizionata (e.g., la salivazione) ad uno stimolo incondizionato (e.g., il cibo). Scopri successivamente che uno stimolo neutro (e.g., la campanella), che inizialmente non suscitava nel cane alcuna risposta, se presentato in precedenza al cibo, ripetutamente e in stretta concomitanza con esso, causava la salivazione spontanea del cane ancora prima di aver presentato il cibo. L'animale mostrava così una risposta condizionata (e.g., la salivazione) al solo suono della campanella, che da stimolo neutro diventava stimolo condizionato (Pavlov, 1927).

Un altro tipo di condizionamento, definito operante, venne successivamente scoperto e descritto dallo psicologo B. Frederic Skinner (1904-1990), sulla base degli iniziali postulati sull'apprendimento formulati dallo psicologo statunitense Edward L. Thorndike (1874-1949). Secondo il condizionamento operante, un animale impara ad aumentare la frequenza di un comportamento che risulta adattivo rispetto ai propri bisogni (e.g., premere una leva che fornisce cibo o ferma l'erogazione di una scarica elettrica). Allo stesso modo, l'animale può invece imparare a ridurre drasticamente la frequenza di un comportamento se questo ha delle conseguenze negative (e.g., se premere la leva provoca una scossa o priva di un piacere il soggetto, allora questo smetterà di premerla). Quando la frequenza di un dato comportamento aumenta, si parla di *rinforzo*, quando invece si ha una diminuzione stiamo inferendo una *punizione* al soggetto (Skinner, 1965).

La maggior parte degli esperimenti olfattivi in letteratura si basa su paradigmi sperimentali di condizionamento classico e operante largamente studiati in letteratura. È possibile addestrare formiche *M. sabuleti* a scegliere un determinato stimolo tramite condizionamento classico. In questo caso, lo stimolo condizionato (visivo: triangolo verde; olfattivo: odore di cipolla) veniva presentato qualche minuto prima, appena prima, o in contemporanea allo stimolo incondizionato (i.e., soluzione zuccherina) (Cammaerts, 2004). Anche i crostacei forniscono un esempio di plasticità e apprendimento dipendenti dall'esperienza (Krasne & Glanzman, 1995), tra cui diverse varietà di apprendimento chemosensoriale. Questi includono assuefazione, condizionamento classico e operante, avversione e apprendimento associativo (Abramson et al., 1988; Daniel & Derby, 1988; Fine-Levy et al., 1988; Wight et al., 1990; Derby, 2000; Shuranova et al., 2005).

In questa tesi, è stato utilizzato un paradigma di condizionamento classico nell'ape mellifera, particolarmente affermato e standardizzato in ambito scientifico. Nello specifico, si tratta del condizionamento della risposta di estrazione della ligula (i.e., *Proboscis Extension Response*, PER; Takeda, 1961). Questo paradigma prevede la presentazione di uno stimolo (e.g., odore, Giurfa & Sandoz, 2012; stimolazione tattile, Giurfa & Malun, 2004 2004; luce colorata, Avarguès-Weber & Mota, 2016) ad api immobilizzate che devono imparare ad associare tale stimolazione con una ricompensa che elicitava una spontanea estrazione della ligula. Quando tale associazione viene appresa, le api mostrano spontaneamente il comportamento di estrazione della ligula in seguito alla presentazione dello stimolo (Takeda, 1961). Questa tecnica ha permesso lo studio e la scoperta delle abilità di apprendimento e discriminazione olfattiva delle api, sia dal punto di vista comportamentale (Paoli & Galizia, 2021) ma anche dal punto di vista anatomico (Galizia & Szyszka, 2008; Paoli and Galizia, 2021), funzionale (Galizia and Szyszka, 2008) e di basi biologiche (Villar et al., 2020).

1.2 Capacità olfattive nelle api mellifere

Gli odori permeano diverse fasi della vita delle api e della loro colonia, guidando i comportamenti di accoppiamento, i rapporti sociali all'interno dell'alveare, oltre che la navigazione, orientamento e foraggiamento (Paoli & Galizia, 2021). Proprio per l'importanza che sostanze odorose (e.g., feromoni, profumi floreali) hanno per le api, queste devono essere equipaggiate con un sistema olfattivo efficiente e capace di precisa discriminazione olfattiva. Laska e colleghi (1999) hanno addestrato api foraggiatrici ad associare uno specifico odore ad una ricompensa zuccherina, testando successivamente l'abilità delle api di riconoscere l'odore familiare da odori nuovi. I risultati hanno dimostrato come le api riuscissero a distinguere efficacemente il 97% delle 1848 coppie di odori testati (Laska et al., 1999). Lo stesso risultato è stato confermato da uno studio successivo in cui api foraggiatrici testate tramite paradigma PER, hanno discriminato il 95% delle 1816 paia di odori testate (Sandoz, 2011). Il sistema olfattivo di questo insetto si è rivelato anche pronto a rispondere spontaneamente a certe miscele di odori e apprendere alcuni odori specifici velocemente (Riffell, 2011).

Tra i diversi neuropili (i.e., regioni cerebrali specifiche), i lobi antennali (AL) rappresentano il primo centro di codifica dell'informazione olfattiva. Questi sono composti da circa 160 000 glomeruli (i.e., agglomerati di neuroni) la cui attivazione è odore-dipendente (Joerges et al.,

1997) e specie-specifica (i.e., tutti i soggetti appartenenti alla stessa specie mostrano la stessa attivazione cerebrale se sottoposti al medesimo odore) (Giurfa, 2003). Inoltre, l'apprendimento associativo di un dato odore ad una ricompensa può modificare la forza del pattern di attivazione per l'odore rinforzato, dimostrando plasticità cerebrale (Faber et al., 1999).

Le api mellifere (*Apis mellifera*) sono in grado di apprendere tramite associazione grazie al semplice condizionamento classico, o condizionamento pavloviano (Manning & Dawkins, 1998). Tale apprendimento viene poi amplificato da una capacità dell'ape mellifera di immagazzinare tale informazione odorosa, e saper preferire un odore rispetto ad un altro se questo viene maggiormente elicitato durante la fase critica per lo sviluppo delle capacità olfattive (Sandoz et al., 2000). Studi sulle soglie odorose dell'ape mellifera, hanno evidenziato una grande capacità nell'ape di discriminare tra concentrazioni differenti di odori puri. All'aumentare della concentrazione dell'odore corrisponde una maggior capacità di discriminazione dell'ape (Wright & Smith, 2004). Differenze nella concentrazione di odore durante la fase di addestramento di un gruppo sperimentale influenza la generalizzazione di discriminazione dello stesso odore in fase test (Bhagavan & Smith, 1997). Le api inoltre sanno discriminare tra miscele di odori molto simili tra loro, come per esempio il limonene dal linalolo (odore agrumatico il primo, floreale agrumatico il secondo) (Getz & Smith, 1987). Tuttavia si è visto come, per altri odori simili tra loro, le api non riescano a discriminarli in maniera precisa (Getz & Smith, 1987).

Le api non sono solo capaci di apprendimento olfattivo elementare (i.e., apprendimento che implica la "semplice" associazione tra due stimoli; ne è un esempio l'apprendimento Pavloviano; Giurfa, 2003), ma è stata dimostrata anche la loro capacità di mettere in atto un apprendimento olfattivo non-elementare (Giurfa, 2003). Il primo tipo di apprendimento, definito elementare, comprende la capacità delle api di risolvere compiti di condizionamento assoluto (i.e., l'odore A è associato alla ricompensa), differenziale (i.e., l'odore A, ma non l'odore B, è associato alla ricompensa) e di discriminazione delle caratteristiche dello stimolo (i.e., il composto AB è associato alla ricompensa, mentre il solo odore B non lo è; in questo caso, nonostante l'odore B sia uno stimolo ambiguo e rinforzato solo nel 50% dei casi, la semplice associazione dell'odore A con la ricompensa permette la soluzione del compito) (Giurfa, 2003). L'apprendimento non-elementare comporta un'implementazione di strategie cognitive più complesse rispetto ad una semplice associazione stimolo-rinforzo. Ne sono un esempio l'apprendimento definito *negative patterning* (i.e., l'odore A e l'odore B sono associati alla ricompensa, ma non il composto AB) (Giurfa, 2003). Le api inoltre si sono

rivelate in grado di risolvere un compito di condizionamento olfattivo specifico per antenna (i.e., *side-specific olfactory conditioning*). I soggetti sono stati condizionati a rispondere a due odori A e B, in maniera diversa a seconda della stimolazione antennale da parte dei due odori. In particolare, quando gli odori venivano presentati ad un'antenna (e.g., destra), l'ape doveva rispondere all'odore A ma non all'odore B. Diversamente, quando gli odori venivano presentati all'altra antenna (i.e., sinistra), l'ape doveva rispondere all'odore B ma non all'odore A. I risultati hanno dimostrato un' eccellente capacità delle api di risolvere questo compito caratterizzato da apprendimento non-elementare. Le api infatti imparavano a rispondere e ad inibire quella stessa risposta a seconda dell'antenna sottoposta a stimolazione (Sandoz & Menzel, 2001; ma vedere anche Giurfa, 2003).

2. GLI OBIETTIVI DELLA RICERCA

L'obiettivo di questo esperimento era quello di studiare la capacità delle api foraggiatrici di memorizzare e discriminare diversi odori, utilizzando il condizionamento olfattivo della risposta di estensione della ligula (*Proboscis Extension Response*, PER; Takeda, 1961).

A tale scopo sono state raccolte giornalmente delle api bottinatrici che sono state addestrate a creare un'associazione odore-ricompensa. Nello specifico, il compito prevedeva l'apprendimento di un determinato odore che doveva poi essere ricordato, riconosciuto e discriminato rispetto ad un nuovo odore. Questo studio ha permesso la valutazione della capacità di discriminazione olfattiva e di memoria delle api di una data associazione odore-ricompensa. L'esperimento condotto ha avuto anche l'obiettivo secondario quello di consolidare quanto appreso in letteratura sull'apprendimento olfattivo delle api, con lo scopo ultimo di testare l'apparato sperimentale per una successiva ricerca.

3. MATERIALI E METODI

3.1 La specie

Regno: Animalia

Phylum: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordine: Hymenoptera

Famiglia: Apidae

Specie: *Apis mellifera*



Immagine da Focus.it

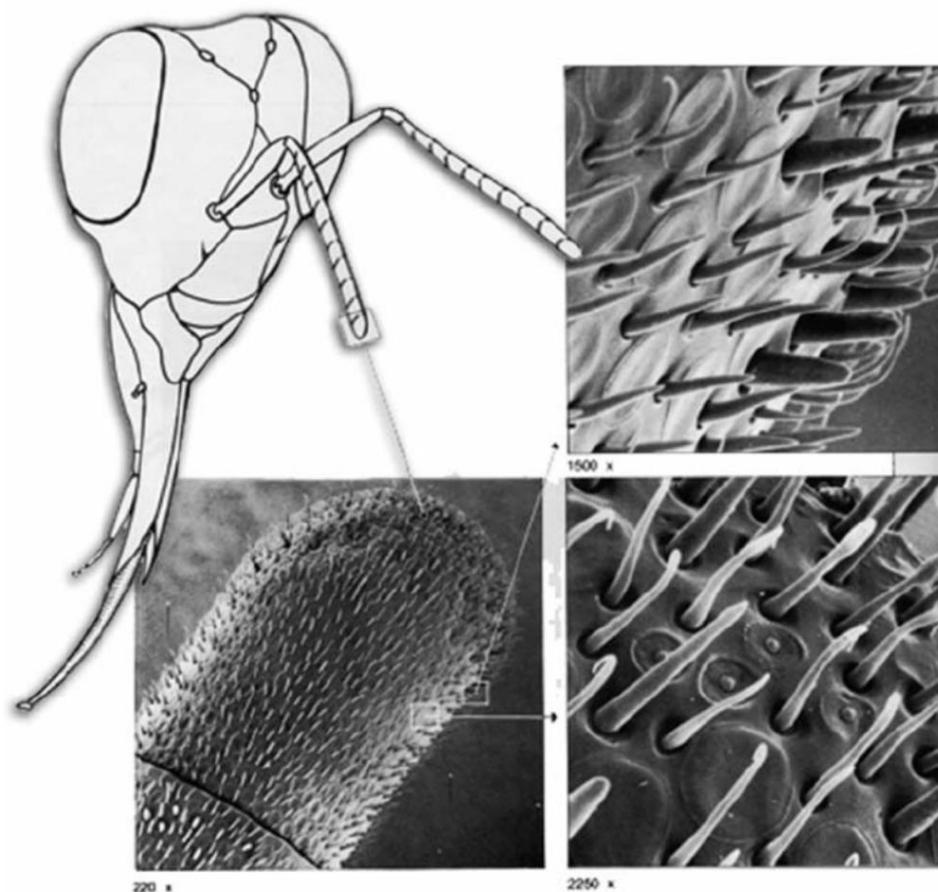
L'*Apis mellifera* è un insetto eusociale, che vive in colonie formate da decine di migliaia di individui. In Italia, le due sottospecie di ape mellifera più diffuse sono l'*Apis mellifera ligustica* di colorazione giallo-dorata, e l'*Apis mellifera carnica* che proviene dalle regioni balcaniche settentrionali e dalle regioni austriache, di colorazione grigiastra e capace di resistere anche a più basse temperature e malattie (Contessi & Celli, 1990).

All'interno della colonia si trovano due tipi di caste femminili: l'ape operaia, sterile e di dimensioni ridotte (circa 12-13 mm), e l'ape regina, unica femmina fertile della colonia, che presenta l'apparato riproduttore e ha dimensioni maggiori (circa 18-20 mm). Sono presenti anche i maschi, detti fuchi, con dimensioni tra i 15-17 mm (Contessi & Celli, 1990). Le api operaie hanno ali più lunghe, un apparato per la raccolta del polline e un pungiglione dentato per permettere la difesa della colonia. Hanno una vita media di 35-40 giorni e i compiti sociali vengono determinati dall'età di sviluppo (Contessi & Celli, 1990). La regina è provvista di un apparato riproduttore dotato di 150-180 ovarioli e di una spermateca che rendono l'addome visibilmente più voluminoso. È l'unica femmina in grado di riprodursi nella colonia, accoppiandosi con i fuchi e deponendo le uova fecondate (Contessi & Celli, 1990). I fuchi, i maschi della colonia, hanno il compito di accoppiarsi con la regina durante il "volo nuziale". A tale proposito hanno occhi più grandi (~9000 ommatidi), utili per localizzare la regina, e

l'organo riproduttore al posto del pungiglione. In caso di scarsità di cibo e con l'avvicinarsi dell'inverno vengono allontanati dall'alveare e lasciati morire (Contessi & Celli, 1990).

3.1.1 Le antenne

L'ape presenta due antenne orientabili fissate allo scalpo, in grado di rilevare numerosissimi odori (Fig. 1). Esse partono da un articolo basale lungo e robusto, posto sullo scapo, che si articola in un flagello. Tale flagello è caratterizzato da 11 segmenti (12 nel fuco), riccamente provvisti di recettori (~60.000) tattili, olfattivi, gustativi, termici (precisi all'unità dell' $\frac{1}{4}$ di grado) e in grado di rilevare l'umidità (Contessi & Celli, 1990). Degli 11 segmenti (o flagelli), gli ultimi 8 hanno funzione principalmente olfattiva, oltre che tattile (Frisch, 2014). Secondo lo stesso von Frisch le api hanno quindi la capacità di percepire la forma degli oggetti sfruttando i sensilla tattili e olfattivi in stretta concomitanza (Frisch, 2014). Le antenne possiedono anche dei meccanorecettori che permettono la percezione dei campi elettrostatici e le loro variazioni (Menzel & Eckoldt, 2017).



(Fig. 1) Ingrandimento al microscopio elettronico a scansione dell'ultimo antennumero di un'ape operaia. In ingrandimento si possono osservare le migliaia di sensilla utili a processare le sensazioni percettive a diversi stimoli (tattili, odorosi, termici...) (Immagini adattate da "L'Ape insetto prodigio" di Renzo Barbattini).

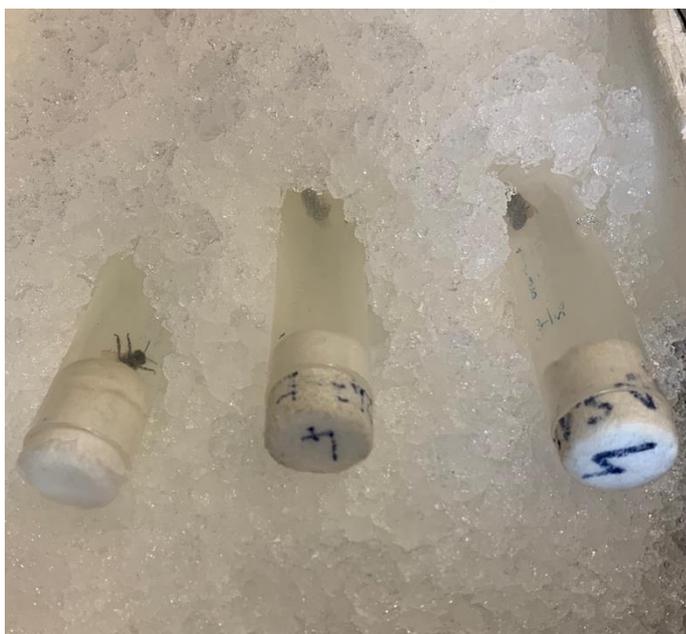
3.2 Esperimento

L'esperimento è stato condotto presso i Laboratori di Cognizione Animale e Neuroscienze (Animal Cognition and Neuroscience, ACN) del Centro Interdipartimentale Mente/Cervello (CIMeC) con sede a Rovereto (TN) nei mesi di maggio – settembre 2022.

3.2.1 I soggetti sperimentali

Sono state addestrate in totale 60 api foragiatrici (*Apis mellifera*) assegnate randomicamente a due gruppi sperimentali. Il primo gruppo (N= 29) era addestrato a formare un'associazione tra la ricompensa zuccherina e l'odore 3-Esanolo. Il secondo gruppo (N=31) era addestrato a formare un'associazione tra la ricompensa zuccherina e l'odore Benzaldeide. Le api provenivano da due alveari situati nell'apiario sperimentale universitario, e venivano raccolte presso un alimentatore contenente una soluzione zuccherina al 10% (p/p). In alcuni casi, le api venivano raccolte all'ingresso dell'arnia, tramite riconoscimento della presenza di polline stoccato sul terzo paio di zampe posteriori.

Le api foragiatrici venivano raccolte ogni mattina con l'utilizzo di un contenitore trasparente munito di tappo. Le api venivano quindi portate in laboratorio, anestetizzate all'interno dei contenitori tramite immersione nel ghiaccio per 3-5 minuti, fino alla completa immobilizzazione dell'insetto (Fig. 4). Successivamente venivano montate in strutture di



metallo con l'utilizzo di nastro isolante (IsoTape - tesa®). Questo permetteva il solo movimento della testa, delle antenne e dell'apparato boccale (Fig. 5). Per non danneggiare in alcun modo le ali, queste venivano bloccate con della plastica rigida apposta sul retro della struttura in metallo.

(Fig. 4) Api raccolte e immerse nel ghiaccio per essere addormentate prima della montatura.

(Fig. 5) Soggetti montati, pronti per la sperimentazione.



Una volta immobilizzate, un'ora prima dell'inizio della fase di addestramento, le api venivano alimentate con 3 μ l di soluzione zuccherina al 30% (p/p), e riposte in una scatola di polistirolo, in cui veniva garantita l'umidità ambientale

tramite applicazione di un panno umido sul fondo. I soggetti sperimentali venivano selezionati seguendo specifici criteri, tra cui la presenza di movimento antennale spontaneo e del riflesso di estrazione della ligula a seguito di stimolazione antennale con soluzione zuccherina. Le api che presentavano scarso movimento antennale, assenza di riflesso di estrazione della ligula, montaggio difettoso o in caso di morte, venivano escluse a priori dall'esperimento. Al fine di non testare nuovamente api già state soggette a procedura sperimentale, prima di essere liberati, tutti i soggetti venivano marcati sul torace con marcatori atossici (UNIPOSCA) e rilasciati.

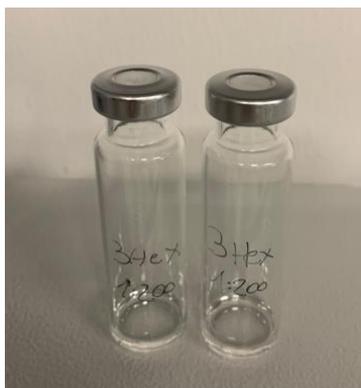
3.2.2 Apparato e stimoli

In questo esperimento, sono stati utilizzati gli odori 3-esanolo e benzaldeide diluiti in olio minerale (Fig. 6) ad una concentrazione pari a 1:200 (5 μ l odore / 1000 μ l olio minerale). Gli odori venivano preparati giornalmente (Fig. 7).

L'erogazione degli odori veniva controllata tramite un olfattometro computerizzato (Fig. 8), che, tramite Arduino, regolava l'apertura o la chiusura di apposite valvole. Il tipo, la durata e la sequenza della stimolazione venivano impostati dallo sperimentatore tramite uno script MatLab creato *ad hoc* (MATLAB R2019a, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Il sistema era inoltre provvisto di aspiratore, al fine di evitare la contaminazione odorosa e la saturazione dell'ambiente.

L'apparato permetteva il controllo simultaneo di un totale di sei valvole. Ai fini sperimentali, solo tre valvole sono state impiegate in questo specifico studio. Ogni presentazione odorosa aveva una durata totale di ~56 secondi. Questa prevedeva una prima fase di abituação al flusso d'aria (25 secondi), seguita dall'erogazione dell'odore con durata pari a 4 secondi. La stimolazione terminava con successivi 27 secondi di flusso d'aria costante. La stimolazione odorosa veniva presentata in associazione con una goccia di soluzione zuccherina (50% p/p) presentata tramite l'utilizzo di uno stuzzicadenti, come indicato dalla letteratura precedente (Giurfa & Sandoz, 2012). Il rinforzo veniva somministrato 3 secondi dopo l'onset

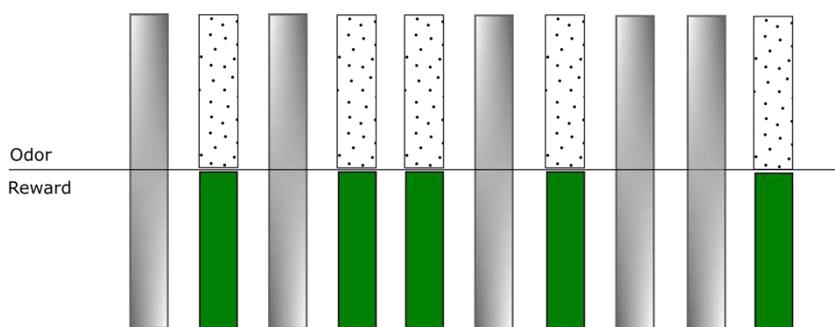
dell'odore, e tramite stimolazione di entrambe le antenne con uno stuzzicadenti imbevuto in soluzione zuccherina al 50% (p/p). La durata totale del rinforzo era di 3 secondi (1 secondo in associazione con l'odore e 2 secondi con flusso di aria) (Fig. 10). Precedenti studi hanno indicato questa durata di stimolazione come ottimale (Matsumoto et al., 2012). Segnali acustici impostati tramite programma MatLab segnalavano l'inizio e la fine del trial, e inizio e fine della somministrazione del rinforzo.



(Fig. 6) Benzaldeide: purezza p.a., $\geq 99.0\%$ (GC); 3-Esanolo $\geq 97\%$; Olio Minerale, alta purezza, olio liquido.
(Fig. 7) Boccette preparate in laboratorio in rapporto 1:200 (odore-olio minerale), pronte per essere assemblate nell'apparato sperimentale.



(Fig. 8) Apparato sperimentale composto da: computer; alimentatore di corrente; valvole di apertura dell'aria; regolatore di pressione dell'aria; Arduino per il controllo delle valvole tramite il programma *MatLab*, batteria degli odori, tubo di aspirazione, pedana sperimentale per il posizionamento dei soggetti.



(Fig. 9) Schema di sequenza di presentazione degli stimoli odorosi. In grigio la presentazione di aria; in bianco con puntini l'erogazione dell'odore; in verde la somministrazione della ricompensa.

3.2.3 Paradigma sperimentale PER

E' stato utilizzato il paradigma sperimentale di condizionamento PER (i.e. *Proboscis Extension Response*; Takeda, 1961), largamente utilizzato per studiare la capacità di apprendimento e memoria olfattiva delle api mellifere (Giurfa & Sandoz, 2012).

Questo paradigma sperimentale si basa sul processo di condizionamento classico o pavloviano. Secondo questo paradigma, un'associazione temporalmente contingente di uno stimolo neutro (e.g., odore) e di uno stimolo incondizionato (e.g., cibo), causa una futura risposta condizionata allo stimolo neutro (successivamente rinominato stimolo condizionato) (Pavlov, 1927).

Nel PER lo stimolo incondizionato è rappresentato dalla soluzione zuccherina (50% p/p) che provoca nell'ape una risposta incondizionata di estrazione della ligula. L'odore rappresenta lo stimolo neutro che, presentato ripetutamente in associazione con la ricompensa, diventa stimolo condizionato. Una volta creata l'associazione, il solo odore suscita la risposta condizionata di estrazione della ligula.

Le api mellifere sono un modello solido tra gli insetti per la loro capacità di apprendimento e memoria tramite condizionamento PER (Giurfa & Sandoz, 2012). L'apprendimento così indotto è descritto come veloce, ad alta precisione e duraturo (Giurfa & Sandoz, 2012).

3.2.4 Procedura sperimentale

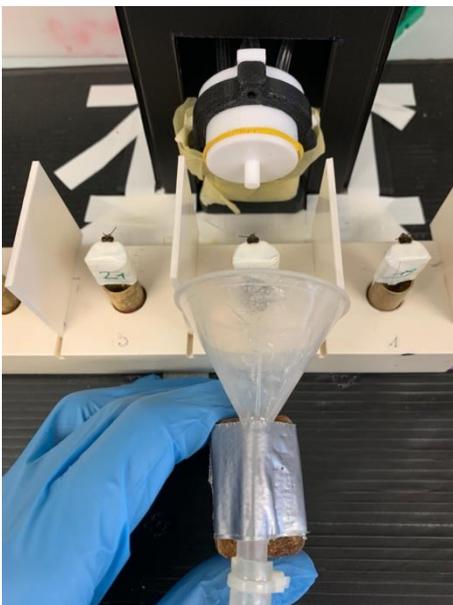
3.2.4.1 Fase addestramento.

Dieci api venivano selezionate secondo criteri sopra citati (vedi par. 3.2.1), e numerate in ordine progressivo per permetterne la distinzione. Venivano quindi poste in una struttura composta da dieci postazioni, separate tra loro da divisori in plastica bianca opaca, per evitare che i soggetti potessero osservare i comportamenti delle api adiacenti. I separatori servivano inoltre a limitare la dispersione del flusso d'aria, che veniva così convogliato verso l'ape e successivamente verso l'aspiratore.

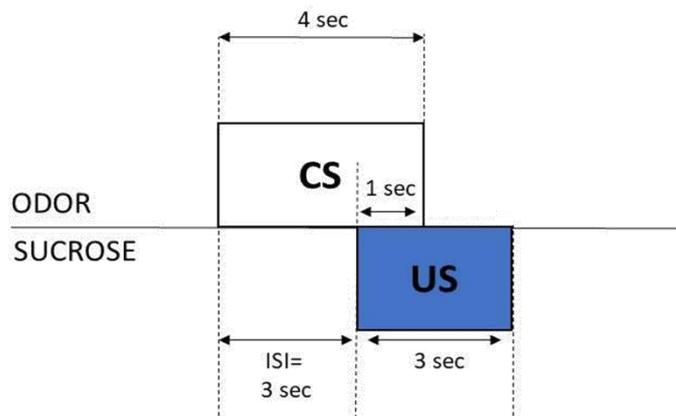
L'addestramento era formato da 10 prove di addestramento della durata di circa 56 secondi. L'intervallo inter-trial (i.e., *inter-trial interval*, ITI) era di circa 10 minuti (Matsumoto et al., 2012). Le prove di addestramento venivano somministrate seguendo lo schema riportato nella Fig. 9 (vedi par. 3.2.2). La presentazione dell'odore avveniva in sole 5 prove, mentre nelle restanti 5 i soggetti venivano sottoposti ad un flusso d'aria avente le stesse modalità di presentazione dello stimolo olfattivo. La variabile dipendente considerata in fase di analisi

statistica era la risposta di estrazione della ligula in seguito alla presentazione dell'odore e prima della presentazione del rinforzo (i.e., 1 = risposta positiva di estrazione della ligula in seguito alla presentazione dell'odore, prima della ricompensa; 0 = risposta nulla di mancata estrazione della ligula in seguito alla presentazione dell'odore e prima della ricompensa). Durante la fase di addestramento, sono stati adottati dei criteri per determinare l'esclusione dei soggetti dall'esperimento. In particolare, api che presentavano risposta positiva al primo trial odoroso o non presentavano il riflesso di estrazione della ligula a seguito di stimolazione antennale sono state scartate ed escluse dalla fase di test.

a)



b)



(Fig. 10) a) Somministrazione di un trial in cui possiamo osservare il soggetto sulla pedana posto davanti al flusso d'aria. Dietro il soggetto un aspiratore convogliava i flussi odorosi per evitarne la dispersione; b) Tempi di somministrazione della ricompensa in concomitanza con lo stimolo odoroso.

3.2.4.2 Fase test

Questa fase si articolava in due test: il *Memory* test aveva inizio un'ora dopo la fine dell'addestramento, e il *Recall* test che veniva effettuato la mattina del giorno successivo all'addestramento (~ 18 ore dopo). Questi test avevamo come obiettivo quello di studiare la capacità di formazione di memoria olfattiva a relativamente breve o lungo termine. Ciascun test prevedeva la presentazione di due stimoli: l'odore appreso durante la fase di addestramento (i.e., 3-esanolo, primo gruppo; benzaldeide, secondo gruppo) e un odore nuovo (i.e., benzaldeide, primo gruppo; 3-esanolo, secondo gruppo). L'ordine di presentazione degli odori è stato controbilanciato tra soggetti e tra test per escludere un possibile effetto presentazione. La variabile dipendente considerata in fase di analisi era la risposta di estrazione della ligula a seguito della presentazione dell'odore. Durante questa fase, non veniva fornita alcuna ricompensa. Al termine di ciascuna fase di test, veniva

controllato il riflesso di PER attraverso la stimolazione antennale con soluzione zuccherina. Se il riflesso non veniva osservato, l'ape veniva scartata dalla successiva analisi.

3.3 Analisi statistiche

Nella fase di apprendimento, è stata calcolata l'accuratezza (i.e., la proporzione dei soggetti che hanno risposto correttamente sul totale dei soggetti testati) per tutti i trial di addestramento. La risposta era una variabile binaria, categorizzata come 1 a risposta presente e 0 a risposta assente.

Per confrontare le curve di apprendimento dei due gruppi, è stata utilizzata una Analisi della Varianza (two-factors analysis of variance, ANOVA) per misure ripetute. Questo tipo di analisi per variabili binarie è possibile se vengono rispettati due criteri: almeno 40 gradi di libertà del termine di errore e disegno sperimentale bilanciato in cui il numero di osservazioni per ogni combinazione di trattamenti è lo stesso (i.e., equal cell frequencies) (Matsumoto et al., 2012).

La performance di accuratezza di ciascun gruppo è stata analizzata separatamente con un Cochran's Q Test, un test non parametrico utilizzato per l'analisi di misure ripetute a variabile binaria (1/0 nel caso del paradigma PER) (Matsumoto et al., 2012).

Nella fase di test, è stata calcolata la proporzione di risposta (i.e., numero di api che hanno risposto sul totale dei soggetti testati) all'odore condizionato presentato durante l'addestramento e ad un odore nuovo. La differenza tra la proporzione di risposta all'odore appreso e a quello non familiare di ciascun gruppo è stata analizzata con un McNemar test, applicabile per test di campioni appaiati a variabile binomiale (1/0 nel caso del paradigma PER) (Matsumoto et al., 2012).

In tutte le analisi l' α -value è stato fissato a 0.05. Tutte le analisi sono state condotte con R Studio (versione R, 4.1.3).

4. RISULTATI

Due gruppi indipendenti di api sono stati addestrati ad associare due diversi odori a un rinforzo positivo: 3-esanolo (primo gruppo, N=29) e benzaldeide (secondo gruppo, N=31).

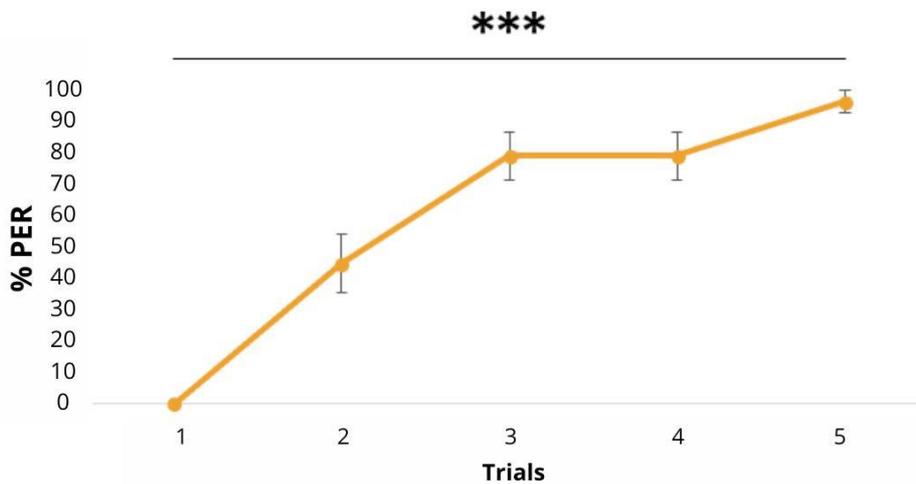
Durante la fase di acquisizione, l'analisi della varianza ha evidenziato una differenza significativa nella proporzione di risposta dei due gruppi testati (ANOVA, fattore gruppo: $F_{(1, 290)} = 4.685$, $p\text{-value} = 0.031$). L'accuratezza di risposta è aumentata durante l'addestramento (ANOVA, fattore trial: $F_{(4, 290)} = 75.901$, $p\text{-value} < 0.001$), mentre il fattore di interazione ha evidenziato una differenza significativa nel pattern di risposta di apprendimento dei due gruppi (ANOVA fattore gruppo x trial: $F_{(4, 290)} = 3.408$, $p\text{-value} = 0.0096$). Le api addestrate ad associare il 3-esanolo alla ricompensa zuccherina, hanno dimostrato un incremento significativo della risposta all'odore nel corso dell'addestramento (Cochran's Q Test: $Q_{(4)} = 69.06$, $p\text{-value} < 0.001$). In particolare, si è osservata una differenza significativa nella risposta all'odore tra il primo e l'ultimo trial (Wilcoxon sign test: primo vs. quinto trial: $p\text{-value} < 0.001$) e tra il secondo e l'ultimo trial (Wilcoxon sign test: secondo vs. quinto trial: $p\text{-value} < 0.001$) (Fig. 11a). Similmente, anche le api addestrate ad associare l'odore benzaldeide alla ricompensa zuccherina hanno dimostrato un incremento significativo della risposta all'odore durante l'addestramento (Cochran's Q Test: $Q_{(4)} = 75.63$, $p\text{-value} < 0.001$). In particolare, si è osservata una differenza significativa nella risposta all'odore tra il primo e l'ultimo trial di addestramento (Wilcoxon sign test: primo vs. quinto trial: $p\text{-value} < 0.001$) (Fig. 12a).

Durante la fase di test, i due gruppi hanno mostrato un andamento di risposta simile. Al *Memory* test, effettuato 1 ora dopo la fase di addestramento, le api addestrate ad imparare l'associazione tra 3-esanolo e ricompensa zuccherina, hanno risposto significativamente di più all'odore familiare (i.e., 3-esanolo) rispetto ad un odore nuovo (i.e., benzaldeide) (McNemar test: $\chi^2 = 13.067$, $p\text{-value} < 0.001$) (Fig. 11b). Allo stesso modo, le api addestrate ad associare l'odore benzaldeide durante l'addestramento, al *Memory* test hanno risposto significativamente di più all'odore di addestramento (i.e., benzaldeide) rispetto all'odore nuovo (i.e., 3-esanolo) (McNemar test: $\chi^2 = 17.391$, $p\text{-value} < 0.001$) (Fig. 12b).

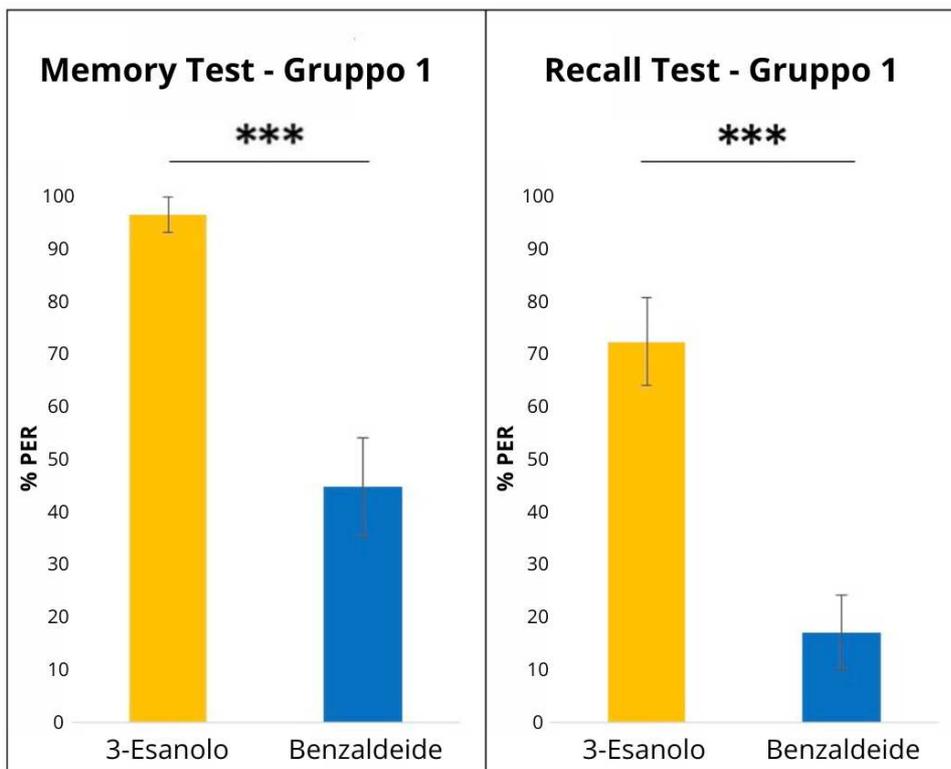
Quando è stata valutata la loro capacità di ritenzione e memoria a lungo termine al *Recall* test, effettuato circa 18 ore dopo la fase di addestramento, tutte le api hanno mostrato una risposta maggiore all'odore familiare, e quindi appreso (i.e., 3-esanolo, primo gruppo; benzaldeide, secondo gruppo), rispetto all'odore nuovo e non familiare (i.e., benzaldeide,

primo gruppo; 3-esanolo, secondo gruppo) (primo gruppo: McNemar test: $\chi^2 = 11.25$, p -value < 0.001; secondo gruppo: McNemar test: $\chi^2 = 22.042$, p -value < 0.001) (Fig. 11/12b).

Curva di apprendimento Gruppo 1

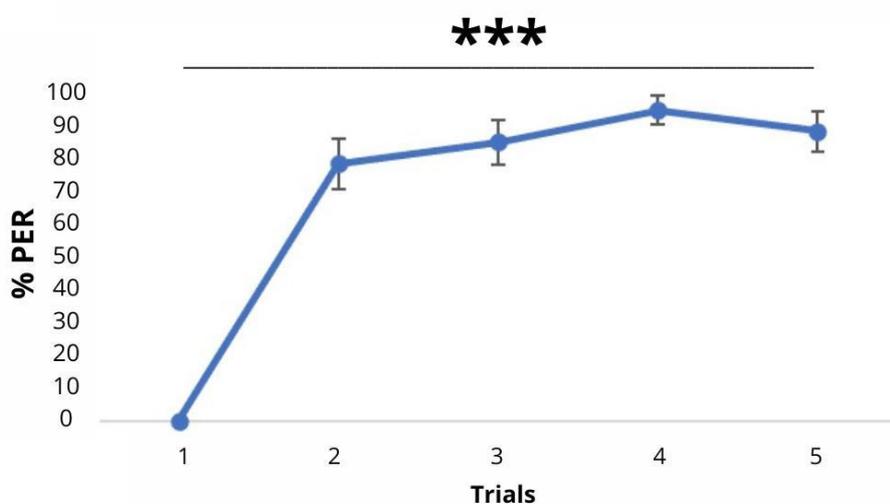


(Fig. 11a) Curva di apprendimento durante la fase di addestramento del Gruppo 1.

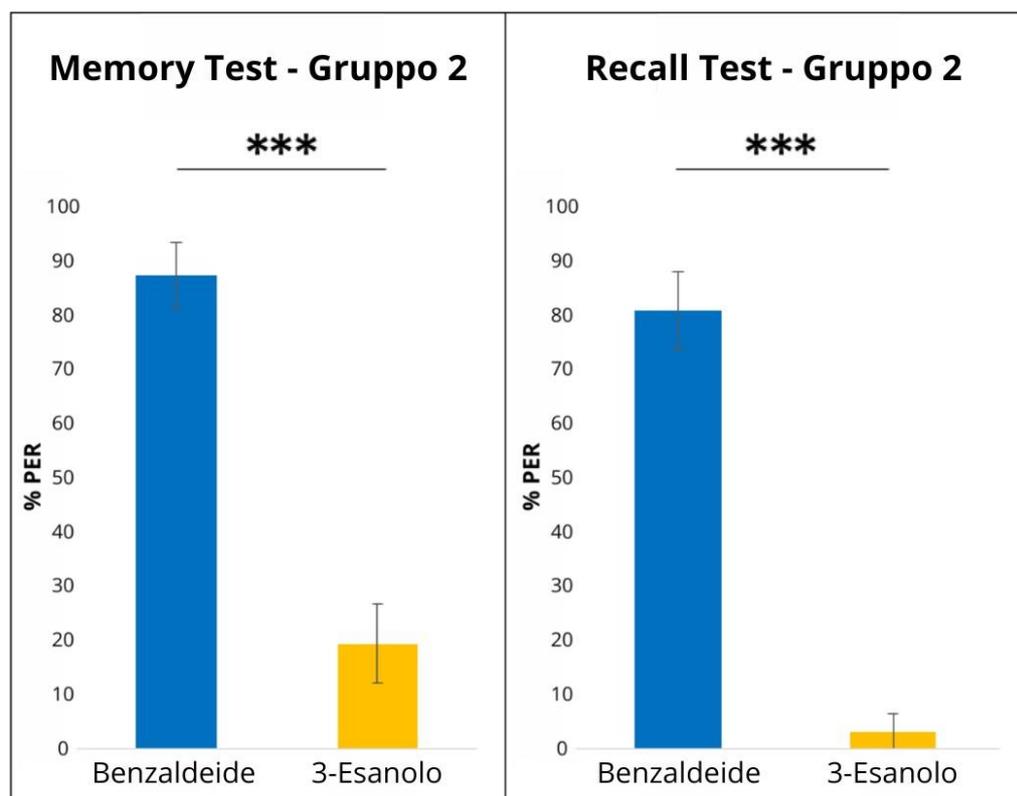


(Fig. 11b) Risposte in fase test del Gruppo 1.

Curva di apprendimento Gruppo 2



(Fig. 12a) Curva di apprendimento durante la fase di addestramento del Gruppo 2.



(Fig. 12b) Risposte in fase test del Gruppo 2.

5. CONCLUSIONI

L'ape (*Apis mellifera*) si è dimostrata un insetto con elevate capacità di apprendimento (Menzel & Giurfa, 2001). Le api infatti sono in grado di apprendere e riconoscere differenti stimoli, sia olfattivi che visivi, dimostrando impressionanti abilità cognitive (Menzel, 1999; Giurfa, 2007). Diversi studi hanno dimostrato una particolare abilità nelle api di apprendere, discriminare e memorizzare stimoli olfattivi (Guerrieri et al., 2005; Reinhard et al., 2010).

L'obiettivo dello studio riportato in questa tesi era quello di investigare l'abilità delle api di imparare, memorizzare e riconoscere un particolare stimolo odoroso. I risultati ottenuti hanno confermato i dati presenti in letteratura, circa l'abilità delle api di apprendere, memorizzare e discriminare tra i due odori selezionati in questo studio: 3-esanolo e benzaldeide (Menzel, 1999; Matsumoto et al., 2012). I nostri risultati hanno dimostrato che, indipendentemente dall'odore utilizzato durante la fase di addestramento, le api sono state in grado di apprendere e mantenere in memoria una data associazione odore-ricompensa. Durante la fase di test (i.e., *Memory* e *Recall* test), i soggetti hanno dimostrato una persistente memoria selettiva per l'odore familiare, confermando l'abilità delle api di discriminare tra tracce odorose differenti (Paoli & Galizia, 2021). Questa selettività nella risposta di estrazione della ligula a seguito di condizionamento odoroso è supportata da una risposta selettiva a livello di attivazione dei glomeruli (i.e., cluster di neuroni) nei lobi antennali (Paoli et al., 2021; Joerges et al., 1997).

Durante la fase di addestramento, le api sottoposte a condizionamento con l'odore benzaldeide hanno mostrato una percentuale di risposta significativamente maggiore rispetto alle api condizionate con l'odore 3-esanolo. Questo risultato potrebbe essere causato da una diversa valenza caratterizzante i due odori. La benzaldeide è infatti considerato un composto largamente presente in natura, filogeneticamente antico e prodotto da un gran numero di piante (Pokajewicz et al., 2024). Inoltre, è stato osservato come la benzaldeide elicit una risposta spontanea nelle api, in virtù di una sua valenza appetitiva, indipendentemente dalla stagione e dall'età delle api testate (Mas et al., 2020).

Il paradigma sperimentale riportato in questa tesi si basa sul condizionamento olfattivo della risposta di estrazione della ligula proposto da Takeda (1961) e successivamente standardizzato da Bitterman et al. (1983). In un recente studio metodologico di Matsumoto e colleghi (2011), sono stati puntualmente descritti tutti gli step procedurali del paradigma di condizionamento olfattivo PER nell'ape mellifera. Ciò ha reso possibile una chiara e dettagliata descrizione del metodo scientifico, permettendo poi anche una continua replicazione dei dati ottenuti (Matsumoto et al., 2012). Questa standardizzazione riportata

ha offerto una base solida sulla quale impostare l'intero esperimento riportato in questa tesi. Il secondo obiettivo di questo studio era quello di testare l'apparato sperimentale in vista di studi successivi riguardante il movimento antennale spontaneo e dell'eventuale associazione con meccanismi di apprendimento e memorizzazione olfattiva. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare e standardizzare l'iter sperimentale di addestramento e test presso i laboratori ACN (CIMeC, Università di Trento).

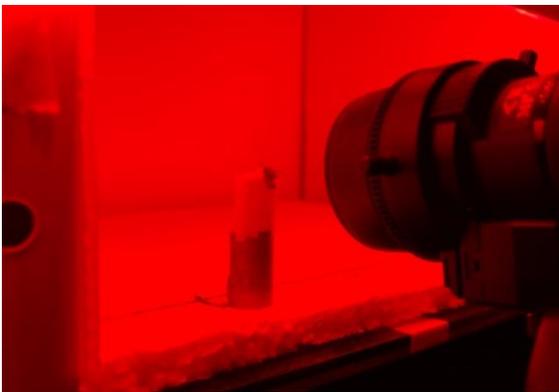
5.1 Futuri studi: il ruolo dell'apprendimento olfattivo sul movimento antennale spontaneo delle api

Il lavoro presentato in questa tesi aveva, come uno degli obiettivi, quello di testare l'apparato sperimentale per permettere il successivo avvento di uno studio riguardante l'esistenza di una possibile associazione tra il sonno (determinato dal movimento antennale spontaneo) e la formazione di memoria olfattiva nelle api. Questo tipo di associazione sarebbe stata indagata tramite l'utilizzo del condizionamento olfattivo della risposta di estensione della ligula (PER) e l'analisi del movimento antennale spontaneo durante la notte. Inoltre, questo studio avrebbe indagato la possibile esistenza di lateralizzazione antennale a seguito di apprendimento olfattivo. Le antenne, infatti, possono essere un segnale indicativo per lo studio della formazione della memoria. Nel 2008, Rogers e Vallortigara hanno dimostrato che la frequenza di risposta ad un odore appreso, misurata attraverso stimolazione dell'antenna, presentava uno spostamento dall'antenna destra alla sinistra dopo 6 ore (Fig. 14). Questo studio ha quindi suggerito una diversa attivazione cerebrale, connessa alla responsività antennale, indicante la formazione di memoria. In questo caso, la formazione di memoria a breve termine sarebbe connessa ad una maggiore responsività dell'antenna destra, mentre la formazione di memoria a lungo termine sarebbe connessa ad una maggiore responsività dell'antenna sinistra (Rogers & Vallortigara, 2008).

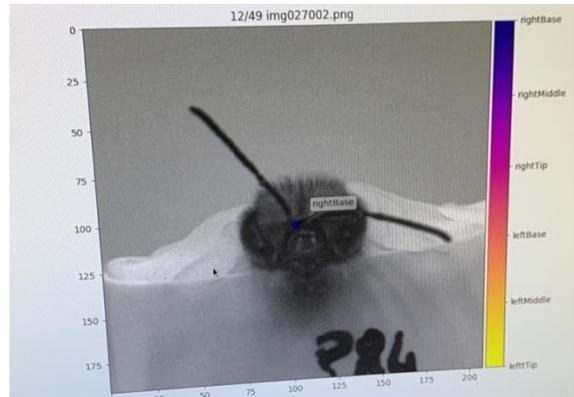
In questo scenario, l'esperimento successivo alla standardizzazione descritta in questa tesi, ha previsto lo studio del movimento antennale spontaneo successivo all'apprendimento tramite condizionamento. Sono stati utilizzati tre gruppi sperimentali. Il primo gruppo (i.e., *paired group*) è stato sottoposto ad una fase di addestramento per formare l'associazione odore-ricompensa; il secondo gruppo (i.e., *unpaired group*) era formato da api presentate con la stessa quantità di odore e ricompensa ma non in maniera contingente: l'ammontare della stimolazione era perciò la stessa del primo gruppo, ma l'associazione odore-ricompensa non veniva formata. Il terzo gruppo di controllo veniva invece solo sottoposto

ad un flusso d'aria. In seguito, il movimento antennale spontaneo delle api è stato registrato in condizioni di buio (i.e., luce rossa, non percepita dalle api) per le 6 ore successive l'addestramento (Fig. 13a), e analizzato tramite il programma DeepLabCut (Mathis et al., 2018) (Fig. 13b). La ricerca, attualmente in corso, avrà come scopo quello di capire se il movimento antennale possa essere indicativo di processi di formazione di memoria, avvalorando le osservazioni di Rogers e Vallortigara, indicanti uno spostamento nel livello di responsività delle antenne a seguito di un maggiore consolidamento mnemonico. In aggiunta, il movimento antennale verrà utilizzato come proxy per valutare il sonno delle api ed eventuali differenze dovuto ad un apprendimento olfattivo antecedente.

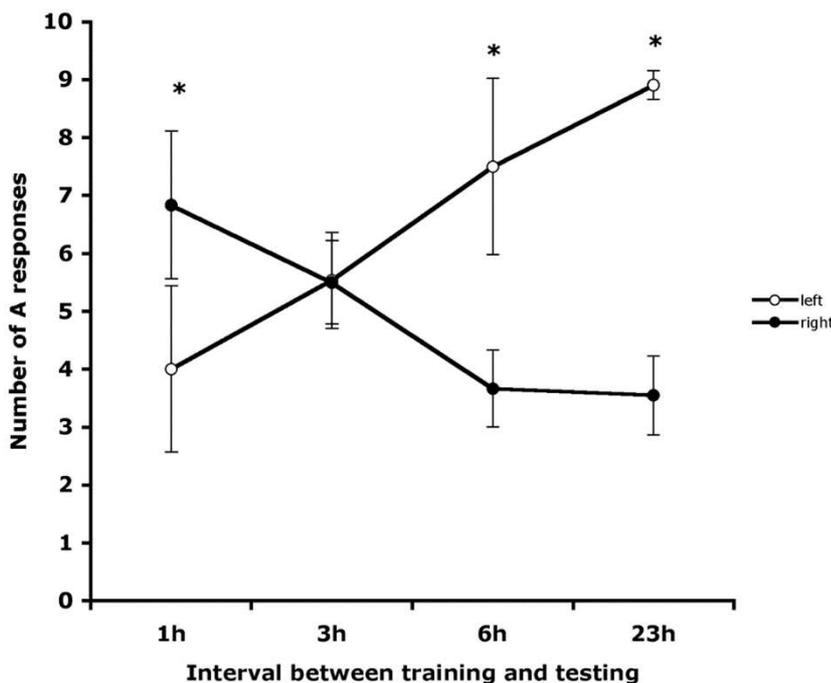
a)



b)



(Fig. 13 a-b) a) Ripresa del movimento antennale per le 6 ore successive la fase di addestramento. b) Registrazione in fase di lavorazione tramite programma DeepLabCut.



(Fig. 14): Il grafico illustra quanto scoperto da Rogers e Vallortigara nel 2008 riguardo la lateralizzazione di processi di memoria in *apis mellifera*. Fino a 1-2 ore dopo l'addestramento, l'ape risponde l'odore principalmente grazie all'utilizzo dell'antenna destra. Entro 6 ore dall'addestramento invece si ha uno spostamento all'antenna sinistra che risulta più responsiva.

6. BIBLIOGRAFIA

- articolo** Abramson, C. I., Armstrong, P. M., Feinman, R. A., & Feinman, R. D. (1988). Signaled Avoidance in the Eye Withdrawal Reflex of the Green Crab. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 50(3), 483–492. <https://doi.org/10.1901/jeab.1988.50-483>
- articolo** Avarguès-Weber, A., & Mota, T. (2016). Advances and limitations of visual conditioning protocols in harnessed bees. *Journal of Physiology-Paris*, 110(3, Part A), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.12.006>
- articolo** Bhagavan, S., & Smith, B. H. (1997). Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity. *Physiology & Behavior*, 61(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00357-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00357-5)
- articolo** Cammaerts, M.-C. (2004). Classical conditioning, temporal learning and spatial learning in the ant *Myrmica sabuleti*. *Biologia*, 59.
- libro** Chapman, R. F. (1998). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.
- libro** Contessi, A., & Celli, G. (1990). Le api: biologia, allevamento, prodotti. Edagricole.
- articolo** Daniel, P. C., & Derby, C. D. (1988). Behavioral olfactory discrimination of mixtures in the spiny lobster (*Panulirus argus*) based on a habituation paradigm. *Chemical Senses*, 13(3), 385–395. <https://doi.org/10.1093/chemse/13.3.385>
- articolo** Derby, C. D. (2000). Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures. *Physiology & Behavior*, 69(1), 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00202-X)
- articolo** Faber, T., Joerges, J., & Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience*, 2(1), 74–78. <https://doi.org/10.1038/4576>
- articolo** Fine-Levy, J. B., Girardot, M.-N., Derby, C. D., & Daniel, P. C. (1988). Differential associative conditioning and olfactory discrimination in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Behavioral and Neural Biology*, 49(3), 315–331. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(88\)90322-6](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(88)90322-6)
- libro** Frisch, K. von. (2014). *Bees: Their Vision, Chemical Senses, and Language*. Cornell University Press.
- articolo** Galizia, C. G., & Szyszka, P. (2008). Olfactory coding in the insect brain: Molecular receptive ranges, spatial and temporal coding. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00661.x>

- articolo** Getz, W. M., & Smith, K. B. (1987). Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A*, 160(2), 239–245. <https://doi.org/10.1007/BF00609729>
- articolo** Giurfa, M. (2003). Cognitive neuroethology: Dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(6), 726–735. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.10.015>
- articolo** Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(8), 801–824. <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0235-9>
- articolo** Giurfa, M., & Malun, D. (2004). Associative Mechanosensory Conditioning of the Proboscis Extension Reflex in Honeybees. *Learning & Memory*, 11(3), 294–302. <https://doi.org/10.1101/lm.63604>
- articolo** Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, 19(2), 54–66. <https://doi.org/10.1101/lm.024711.111>
- articolo** Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C., & Giurfa, M. (2005). Perceptual and Neural Olfactory Similarity in Honeybees. *PLOS Biology*, 3(4), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030060>
- articolo** Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G., & Menzel, R. (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387(6630), 285–288. <https://doi.org/10.1038/387285a0>
- articolo** Krasne, F. B., & Glanzman, D. L. (1995). What We Can Learn from Invertebrate Learning. *Annual Review of Psychology*, 46(1), 585–624. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.46.020195.003101>
- articolo** Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., & Menzel, R. (1999). Olfactory Discrimination Ability and Odor Structure–Activity Relationships in Honeybees. *Chemical Senses*, 24(4), 429–438. <https://doi.org/10.1093/chemse/24.4.429>
- libro** Manning, A., & Dawkins, M. S. (1998). *An Introduction to Animal Behaviour*. Cambridge University Press.
- articolo** Mas, F., Horner, R. M., Brierley, S., Butler, R. C., & Suckling, D. M. (2020). Selection of key floral scent compounds from fruit and vegetable crops by honey bees depends on sensory capacity and experience. *Journal of Insect Physiology*, 121, 104002. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.104002>
- articolo** Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., &

- Bethge, M. (2018). DeepLabCut: Markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1281–1290.
- articolo** Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C., & Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.08.018>
- libro** Menzel & Eckoldt (2017). *L'intelligenza delle api*, Raffaello Cortina Editore.
- articolo** Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185(4), 323–340. <https://doi.org/10.1007/s003590050392>
- articolo** Menzel, R., & Giurfa, M. (2001). Cognitive architecture of a mini-brain: The honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(2), 62–71. [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01601-6](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01601-6)
- articolo** Paoli, M., & Galizia, G. C. (2021). Olfactory coding in honeybees. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 35–58. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03385-5>
- libro** Pavlov, I. P. (1927). *Les réflexes conditionnels: Étude objective de l'activité nerveuse supérieure des animaux*. F. Alcan.
- articolo** Pokajewicz, K., Lamaka, D., Hudz, N., Adamchuk, L., & Wieczorek, P. P. (2024). Volatile profile of bee bread. *Scientific Reports*, 14(1), 6870. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57159-y>
- articolo** Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M. V., & Claudianos, C. (2010). Honeybees Learn Odour Mixtures via a Selection of Key Odorants. *PLOS ONE*, 5(2), e9110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009110>
- articolo** Riffell, J. A. (2011). The Neuroecology of a Pollinator's Buffet: Olfactory Preferences and Learning in Insect Pollinators. *Integrative and Comparative Biology*, 51(5), 781–793. <https://doi.org/10.1093/icb/icr094>
- articolo** Sandoz, J. C., Laloi, D., Odoux, J. F., & Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Animal Behaviour*, 59(5), 1025–1034. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1395>
- articolo** Sandoz, J.-C. (2011). Behavioral and Neurophysiological Study of Olfactory Perception and Learning in Honeybees. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 14474. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00098>
- articolo** Sandoz, J.-C., & Menzel, R. (2001). Side-Specificity of Olfactory Learning in the Honeybee: Generalization between Odors and Sides. *Learning & Memory*, 8(5), 286–294. <https://doi.org/10.1101/lm.41401>

- articolo** Shuranova, Z., Burmistrov, Y., & Abramson, C. I. (2005). Habituation to a Novel Environment in the Crayfish *Procambarus Cubensis*. *Journal of Crustacean Biology*, 25(3), 488–494. <https://doi.org/10.1651/C-2556>
- libro** Skinner, B. F. (1965). *Science And Human Behavior*. Simon and Schuster.
- articolo** Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3), 168–179. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90060-9)
- articolo** Villar, M. E., Marchal, P., Viola, H., & Giurfa, M. (2020). Redefining Single-Trial Memories in the Honeybee. *Cell Reports*, 30(8), 2603-2613.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.086>
- articolo** Wight, K., Francis, L., & Eldridge, D. (1990). Food Aversion Learning by the Hermit Crab *Pagurus granosimanus*. *The Biological Bulletin*, 178(3), 205–209. <https://doi.org/10.2307/1541820>
- articolo** Wright, G. A., & Smith, B. H. (2004). Different Thresholds for Detection and Discrimination of Odors in the Honey bee (*Apis mellifera*). *Chemical Senses*, 29(2), 127–135. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh016>

Un ringraziamento particolare

Alla Prof.ssa *Maria Elena Miletto Petrazzini* per avermi proposto e seguito con grande disponibilità durante il tirocinio e il conseguimento della laurea.

A *Maria Bortot* per tutta la fiducia dimostrata, il lavoro svolto insieme e l'aiuto nella stesura dell'elaborato. Faccio tesoro delle esperienze in laboratorio e dei preziosi consigli ricevuti.

Al Prof. *Giorgio Vallortigara* per la supervisione agli esperimenti.

A *Bastien Lemaire* per gli insegnamenti ricevuti.

A tutti gli amici di Rovereto, Mirko, Davide, Davide e Anastasia.

Ringrazio inoltre

Martina per essere sempre stata al mio fianco.

Andrea e Jacopo per il prezioso supporto e l'amicizia che ci lega.

I miei ragazzi SCOUT che riempiono la mia vita.

I miei genitori per il grande supporto e per aver sempre creduto in me.

I miei fratelli, Carlo, Sara e Rasheem Pietro, perché non si stancano mai di sopportarmi.