



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI PSICOLOGIA DELLO SVILUPPO E DELLA
SOCIALIZZAZIONE**

Corso di Laurea Triennale in

**Scienze psicologiche dello sviluppo, della personalità e delle relazioni
interpersonali**

Tesi di laurea triennale

***Utilizzo del paradigma di matching to sample simultaneo in Poecilia reticulata.
Uno studio sulla discriminazione di forme***

*Shape discrimination can be measured using a simultaneous matching to sample task
(SMTS) in Guppies.*

Relatore: Ch.mo Prof. Marco Dadda

Correlatrice: Ch.ma Dott.ssa Gabriela Gjinaj

Laureando: Martino Spelzini

Matricola: 2012101

Anno accademico 2022/20

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Cognizione umana e animale	1
1.2 Gli animali modello per lo studio della memoria.....	2
1.3 Paradigmi sperimentali utilizzati per studiare la memoria negli animali	5
1.4 Matching to Sample negli animali.....	9
1.5 Matching to Sample nei pesci	13
1.6 Scopo dello studio	16
2. MATERIALI E METODI	19
2.1 Soggetti sperimentali.....	19
2.2 Apparato sperimentale.....	21
2.3 Procedura sperimentale e stimoli utilizzati	23
2.3.1 Le tre fasi dell'esperimento.....	24
2.4 Analisi statistiche	26
3. RISULTATI	29
4. DISCUSSIONE	33
5. BIBLIOGRAFIA	37

1. INTRODUZIONE

1.1. Cognizione umana e animale

La cognizione è la capacità, che abbiamo noi esseri umani, di elaborare e interiorizzare informazioni esterne grazie al tramite della percezione mediata dai sensi, delle nostre esperienze e conoscenze, e della nostra visione soggettiva del mondo, che ci permettono di integrare queste informazioni nel loro insieme per interpretare quello che vediamo; possiamo quindi definire la cognizione come la capacità di convertire dati che arrivano dall'esterno in conoscenza. Cerchiamo ora di capire se e come cambia questa definizione con la nostra attenzione posta al mondo animale.

Il grande salto in avanti, guardando all'evoluzione dell'essere umano, avvenne con l'acquisizione del linguaggio, la selezione di individui che avevano sviluppato un apparato vocale specifico, o modificazioni a livello cerebrale adatte al linguaggio, furono i primi a vivere un cambiamento netto in comparazione alla sfera del mondo animale comunemente concepita (Diamond, 1997). A questo punto, però, sorge spontaneo il comune interrogativo: quanto siamo animali? E quanto gli animali ci assomigliano? Questo è il dibattito sulla continuità/discontinuità dei processi mentali tra le diverse specie, sorto sulla teoria Darwiniana.

L'assunzione è quella che vede gli animali come sistemi cognitivi, dotati quindi di una mente. Qui però, il dibattito si accende ancora di più, dividendosi in modo netto: queste menti, in modo simile al nostro, operano spinte da desideri e credenze, in modo deterministico, o sono meccanismi guidati da semplici processi stimolo-reazione?

In questa sede discuteremo e proveremo a dare una risposta ad una piccola frazione di questo interrogativo, andando ad analizzare in modo sperimentale la cognizione animale, e provando ad osservare fino a che punto possono spingersi delle specifiche capacità cognitive di una piccola specie di pesce, la *Poecilia reticulata*.

1.2 Gli animali modello per lo studio della memoria

La percezione è un'esperienza costante in ogni essere vivente, dalla nascita fino alla morte. Così possiamo chiamare il punto di contatto tra il soggetto e la molteplicità di stimoli sensoriali dall'ambiente circostante. I circuiti neurali sono soggetti a importanti e profonde modificazioni sulla base delle informazioni provenienti da percezione ed esperienze accumulate; ciò significa che, secondo quest'ottica, i processi cognitivi di memoria e apprendimento sono delle forme basilari di adattamento all'ambiente, dei circuiti cerebrali stessi (Bear et al., 2012). Grazie a questi processi, vediamo come l'individuo sia in grado di creare utili collegamenti tra presente e passato e strategie per rispondere ad esperienze già vissute e immagazzinate in memoria.

La principale spinta alla ricerca neurobiologica si basava sulla comprensione delle basi molecolari dei processi cognitivi, da che regione originassero e il loro funzionamento una volta attivate. Lo studio di questi aspetti sull'essere umano, però, è sempre stato frenato da questioni pratiche ed etiche, quindi la scelta di moltissimi studi che virarono verso lo studio più approfondito concentrandosi su diverse specie di animali. La ragione fondamentale che giustifica questa scelta vede una similarità tra l'architettura neuronale umana e quella animale (mammiferi e vertebrati in generale), pur essendo quest'ultima più semplificata; questa vicinanza risulta la medesima anche per quanto riguarda i processi di memoria e apprendimento (Morris, 2001)

Gli studi che utilizzano soggetti animali permettono un'approfondita analisi del funzionamento del substrato neurale e funzionale di una specifica forma mnestica. Superando infatti gli ostacoli etici che bloccano lo studio di questi aspetti negli esseri umani, in passato, sono state osservate le variazioni di performance cognitive e comportamentali negli animali che venivano sottoposti a lesioni su specifiche regioni o alla somministrazione di sostanze farmacologiche. Grazie a queste conoscenze, la possibilità di costruire modelli animali utilissimi nello studio di malattie che colpiscono la tale funzione specifica. Ad esempio, vediamo come nel suo studio, (Morris, 2001),

indaghi la presenza di una forma di memoria episodica negli animali, per implementare la comprensione di malattie degenerative umane come l'Alzheimer.

Passando alle fasi sperimentali vere e proprie, è doveroso sottolineare i vantaggi di uno studio in laboratorio scientifico; nonostante la verifica di un comportamento dell'animale nel suo ambiente naturale garantisca un'elevata attendibilità nelle prestazioni cognitive osservate, il laboratorio scientifico si presta ad un controllo maggiore, fondamentale per la scelta guidata delle condizioni sperimentali e adatto all'estensione della procedura sperimentale ad un numero maggiore di soggetti. In un laboratorio, inoltre, risulta più facile indagare e individuare i singoli processi legati alla risposta comportamentale (apprendimento, memoria, costruzione di mappe spaziali).

Gli aspetti importanti su cui si è basata la ricerca, sono principalmente due: il funzionamento fisiologico e lo studio mirato delle regioni cerebrali legate ai processi di memoria ed apprendimento, in modo da ricercare il funzionamento di processi cognitivi simili, presenti anche nell'uomo (Bear et al.,2012).

Un esempio illuminante è quello dello studio messo in atto da Kandel e Castellucci, che vede come protagonista una lumaca di mare (*Aplysia californica*). Osservando il comportamento di questa specie, a livello morfo-fisiologico, arrivarono alla scoperta del substrato neurofisiologico dell'apprendimento dell'*A. Californica*: il riflesso di retrazione della branchia, attivo in seguito ad un'adeguata stimolazione con uno spruzzo d'acqua, subiva un processo di abituazione se sottoposto ad uno stimolo prolungato. Riconoscendo in questo modo lo stimolo come poco significativo, la reazione veniva annullata, non c'era più questa reazione di difesa: una forma quindi di apprendimento che causa la modificazione di un comportamento istintivo, grazie all'esperienza ripetuta, che si rifletteva a livello sinaptico con una riduzione dell'efficienza comunicativa tra neuroni. In modo opposto, furono in grado di elicitarne una sensibilizzazione grazie a ripetute esposizioni ad uno stimolo nocivo; osservarono qui una forma di apprendimento con aumento della trasmissione sinaptica tra neuroni. Confermarono così che l'apprendimento era originato a livello sinaptico, con modifiche in particolare della risposta incrociata tra neuroni

sensoriali, interneuroni e motoneuroni alla base del circuito del riflesso di retrazione. Nell'apprendimento non associativo (abituazione e sensibilizzazione), la comunicazione tra canali ionici, i recettori e i sistemi di trasduzione intercellulare si modificano grazie ad una maggiore o minore efficienza sinaptica; forme essenziali di apprendimento, quindi, furono decifrate a livello molecolare grazie agli studi su questa lumaca marina: cambiamenti a livello sinaptico sono alla base dei processi cognitivi (Kandel, 1974).

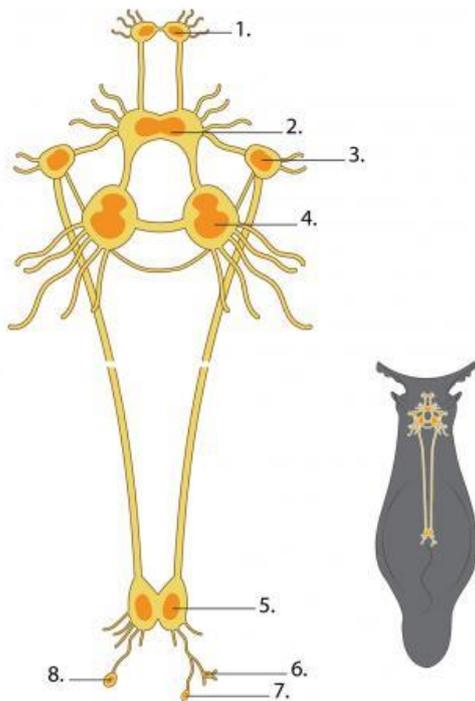


Figura 1. Illustrazione schematica del sistema nervoso dell'*Aplysia*, che mostra le principali raccolte di cellule nervose, che vengono chiamate "gangli". Ogni ganglio contiene circa 2.000 neuroni e l'intero sistema nervoso contiene circa 20.000 neuroni. 1. Ganglio buccale. 2. Ganglio cerebrale. 3. Ganglio pleurico. 4. Ganglio del pedale. 5. Ganglio addominale. 6. Ganglio brachiale. 7. Ganglio osphradial. 8. Ganglio genitale.

1.3 Paradigmi sperimentali utilizzati per studiare la memoria negli animali

L'approccio corretto per affrontare questo tipo di quesiti risiede nell'apertura del nostro punto di vista, che andando a considerare una molteplicità dei funzionamenti mentali, uscendo dalla sfera antropomorfa e dallo specismo, potrebbe comprendere ed esplorare diversi concetti in modo più ampio, complesso e completo. La ricerca, così, ha messo in luce come, capacità mentali, prima considerate appartenere esclusivamente alla specie umana, siano invece presenti in molte e diverse specie animali. Queste conoscenze possono arrivare ad aiutare la comprensione dell'uomo stesso, inteso come animale dotato di processi cognitivi. Moltissimi sono gli studi che vanno ad indagare questi aspetti. Partendo da una specie comunemente ritenuta "intelligente", gli scimpanzè, osserviamo studi rilevanti che, per quanto riguarda la teoria della mente, sono in grado di comprendere finalità, intenzioni e percezione dei loro simili (Michael Tomasello, 2003). Uno studio sui piccioni dimostra come il matching to sample sia molto efficace nel rilevare capacità e flessibilità cognitive; possiamo vedere come i soggetti rappresentino attivamente gli eventi nella loro memoria e allo stesso tempo, a che punto falliscano nel gestire in modo efficace gli stessi. In questo studio, si arrivano a testare capacità metacognitive, ovvero la consapevolezza dei soggetti riguardo aspetti che hanno immagazzinato nella loro memoria (Thomas R Zentall, 2015). Un terzo studio, che verte sull'abilità olfattiva del cane, attesta come quest'ultima raggiunga livelli elevatissimi di accuratezza (efficienza del 90%). Grazie ad un training intensivo, infatti, il compito che i soggetti riescono a completare con successo, consiste nell'accoppiare un campione, un oggetto, all'individuo corrispettivo, ad esempio partendo da una scena del crimine per poi risalire al sospettato (Sophie Marchal, 2016).

Moltissimi studi, a partire dagli anni '20, per concentrarsi sulla ricerca del funzionamento delle regioni cerebrali coinvolte nei processi di memoria e apprendimento, sviluppano diversi tipi di apparati sperimentali. Tra quelli maggiormente efficaci, soprattutto nei roditori, vediamo diversi

tipi di labirinto, come il T-maze, l'Y-maze, il labirinto a bracci radiali e il labirinto acquatico di Morris (Robert S Astur, 2004).

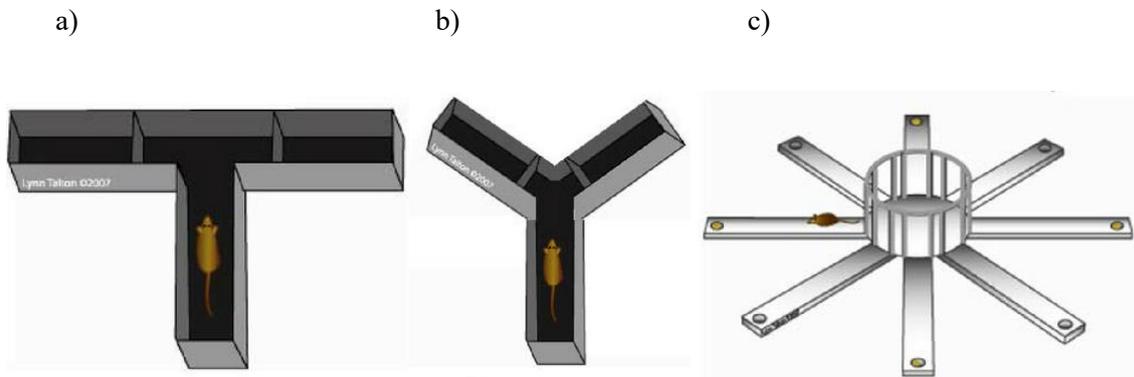


Figura 2. a) T-maze;

b) Y- maze;

c) labirinto a bracci radiali.

Gli studi di Lashley (1929), Olton (1976) e Morris (1984), ci hanno permesso di scoprire il ruolo fondamentale dell'ippocampo, che, a livello funzionale, è fortemente implicato nei processi di memoria funzionale e riconoscimento. Molte ricerche, grazie al paradigma sperimentale dei labirinti, mettono in luce come i soggetti (topi), che mostrano ablazioni selettive nell'area dell'ippocampo, presentino difficoltà nello svolgere correttamente compiti di orientamento in un labirinto, compito che in precedenza riuscivano a svolgere senza nessuna problematica in seguito ad un adeguato addestramento.

Nelle indagini di Olton e Samuelson, nel 1976, troviamo l'utilizzo del paradigma del labirinto, più precisamente la sua variante a 8 bracci radiali. Ad ogni estremità di ciascun braccio, era presente del cibo, che il soggetto però, se posizionato al centro della raggiera, non poteva vedere. Superate circa le 20 prove, il ratto aumentava la propria efficienza spaziale: lo stesso braccio non veniva percorso più di una singola volta, nella stessa sessione, alla ricerca di cibo. Probabilmente in questo tipo di compiti viene implicata anche la memoria di lavoro, utile a mantenere attive informazioni visive o di altra natura durante l'esplorazione dei diversi bracci già percorsi o ancora

da percorrere. Una lesione all'ippocampo, quindi, impediva ai ratti di ricordare quali fossero i bracci già percorsi, portandoli a commettere ripetuti errori. Quando il cibo si trovava solo in alcuni dei bracci, il ratto non lesionato imparava presto a percorrere solo i bracci contenenti cibo; in presenza di una lesione ippocampale invece, ricordavano solo i bracci senza il cibo, ma ripercorrevano più volte quelli dove inizialmente avevano trovato del cibo. La conclusione fu quella che vedeva la lesione ippocampale come causa di netti deficit nella memoria di lavoro e nella memoria spaziale dei ratti (Olton, 1976).

Risultati concordanti possono essere osservati anche negli studi di Richard Morris (1984). Egli ideò il laboratorio acquatico di Morris, dove un ratto veniva posto all'interno di una vasca riempita di acqua e latte, in modo da offuscare la superficie, con la presenza di un'unica piattaforma, posizionata appena al di sotto della superficie e non visibile dal soggetto, utile a quest'ultimo per mettersi in salvo. La scoperta casuale della piattaforma insegnava al ratto a dirigersi direttamente verso quella, nelle successive prove di addestramento. In maniera opposta, in presenza di una lesione bilaterale dell'ippocampo, i ratti non imparavano mai e non ricordavano la posizione della piattaforma nelle prove successive alla prima scoperta (Morris R. , 1984).

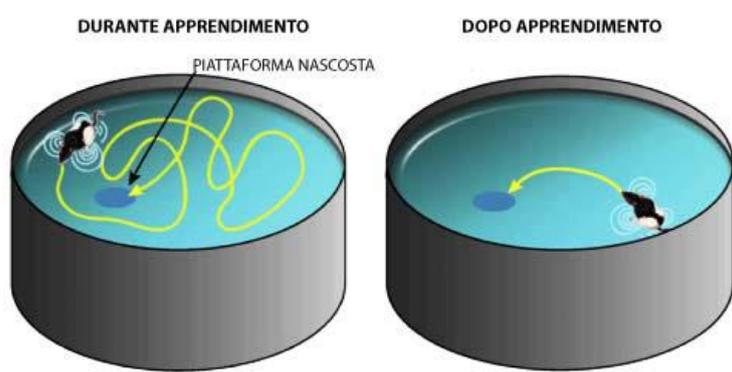


Figura 3. Il labirinto acquatico di Morris.

Fu solo negli anni '70 che, grazie a questi studi su ippocampo e memoria, John O'Keefe scoprì l'esistenza delle cosiddette cellule di luogo, ovvero neuroni ippocampali dei ratti che reagiscono in modo selettivo alla presenza visiva di un determinato luogo e ambiente; ci sono qui delle importanti analogie con i campi recettivi dei neuroni sensoriali, soprattutto i neuroni visivi.

Un altro metodo sperimentale veloce per esplorare la memoria di riconoscimento, la memoria spaziale e la memoria di lavoro negli animali viene chiamato Novel Object Recognition Task (NOR). Questo approccio è estremamente semplice e non richiede un lungo periodo di addestramento come le tecniche di condizionamento. Nel NOR, l'animale viene esposto a un oggetto specifico in modo che familiarizzi con esso, e in una fase successiva viene presentato contemporaneamente a quell'oggetto familiare, un oggetto nuovo. Il presupposto fondamentale dietro questo paradigma è che gli animali mostrino una tendenza innata a esplorare gli oggetti o gli ambienti nuovi e non familiari. Questa propensione viene valutata misurando il tempo dedicato all'esplorazione di un nuovo oggetto o di un nuovo ambiente rispetto al tempo trascorso a esplorare uno già noto.

La preferenza per un oggetto diverso e nuovo mette in luce la presenza, nella memoria del soggetto, di una rappresentazione dell'oggetto familiare (Ennaceur, 2010). In effetti, quanto più l'animale trascorre tempo vicino al nuovo stimolo, tanto più si presume che ricordi sia l'oggetto presentato inizialmente che le sue caratteristiche. Questa prova è stata condotta su diverse specie animali, tra cui ratti (A. Ennaceur, 1988), scimmie (Tu, 2013) e pesci (Tyrone Lucon-Xiccato, 2014). Sono state osservate distinte e pronunciate dissociazioni funzionali a seguito di lesioni nella corteccia entorinale o nell'ippocampo dei topi: le lesioni nella corteccia entorinale a livello peririnale compromettono il riconoscimento visivo di uno stimolo precedentemente sperimentato, ma non influenzano le capacità di memoria spaziale (Liu, 1988). Al contrario, le lesioni nell'ippocampo portano a risultati opposti; questa regione cerebrale risulta coinvolta nel riconoscimento solo quando il compito richiede anche di memorizzare informazioni spaziali

(Machin, 2002), dimostrando che le due regioni hanno compiti e specializzazioni non sovrapponibili (Boyer D. Winters, 2004).

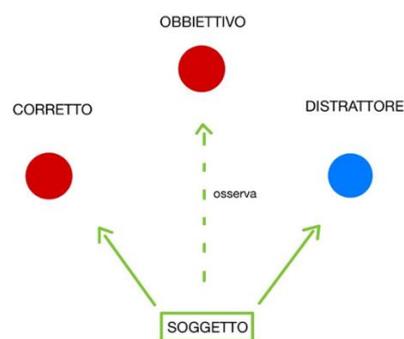
La ricerca neurobiologica sulla memoria ha fatto ampio uso di primati non umani per studiare i correlati neurologici dell'amnesia umana, grazie alle notevoli somiglianze con il nostro cervello. Partendo da evidenze cliniche che indicavano il lobo temporale come una regione chiave per la formazione delle memorie dichiarative negli esseri umani, le regioni temporali dei macachi sono state lesionate dopo che gli animali avevano imparato a eseguire il compito del Delayed non-Matching to Sample (Mishkin e Appenzeller, 1987). In pratica, dopo un periodo di tempo ("delay"), alle scimmie venivano presentati due stimoli e dovevano scegliere l'oggetto diverso rispetto a quello mostrato loro prima della pausa tra una presentazione e l'altra. Le scimmie sane riuscivano a eseguire il compito con un'accuratezza del 90% anche con un ritardo di dieci minuti. Al contrario, le scimmie con lesioni bilaterali nelle regioni temporali mostravano gravi deficit nell'esecuzione del compito: solo quando il ritardo era di pochi secondi, riuscivano a completare il compito correttamente, evidenziando un tipo di amnesia anterograda che implicava l'incapacità di formare nuove memorie dichiarative. La percezione e la memorizzazione della procedura rimanevano intatte, suggerendo che tali lesioni non compromettessero la memoria procedurale ma solo quella di riconoscimento. Successivamente, gli studiosi lesionarono selettivamente l'amigdala, ma non l'ippocampo, nel cervello dei macachi, dimostrando che non si verificavano danni alla memoria di riconoscimento. Questi risultati rivelarono che l'amigdala e l'ippocampo non intervenivano in ugual misura nei sistemi di memoria dichiarativa e non dichiarativa.

1.4 Matching to Sample negli animali

Una delle procedure più utilizzate, presentata in parte anche nel paragrafo precedente, è il cosiddetto matching to sample (MTS). Questo paradigma permette lo studio di abilità nella memoria di lavoro e nel riconoscimento negli animali, basandosi su un addestramento alla

discriminazione. Questo compito prevede la presenza di uno stimolo principale, chiamato stimolo "obbiettivo", circondato da due stimoli, di solito posti lateralmente. Uno dei due stimoli laterali è identico a quello centrale, rappresentando la scelta corretta, mentre l'altro è un distrattore. La posizione centrale favorisce la visibilità del target "obbiettivo" per influenzare così la scelta successiva tra lo stimolo corretto e il distrattore. Una scelta corretta viene ricompensata, spesso con un premio alimentare, utilizzando un meccanismo di condizionamento classico per indurre risultati positivi nelle prove successive. Ci sono delle varianti, che, a seconda del disegno sperimentale scelto, sono caratterizzate da compiti differenti: l'animale viene ricompensato se sceglie lo stimolo appaiato nel caso del MTS, al contrario guadagna una ricompensa quando sceglie lo stimolo non appaiato, nel caso del Non-MTS. Una variante più complessa è il Delayed-Matching to Sample (DMTS) o il Delayed non-Matching to Sample (DNMTS), in cui viene introdotto un intervallo temporale (molto variabile), tra la presentazione dello stimolo target e la comparsa degli altri due stimoli tra cui scegliere.

a)



b)

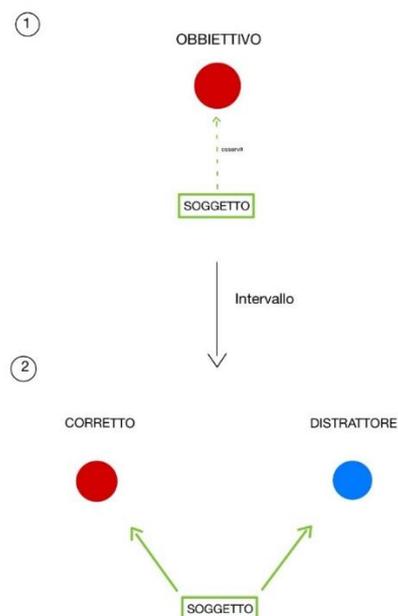


Figura 4. a) Matching to sample simultaneo (SMTS), b) delayed matching to sample (DMTS).

Skinner (1950), considerato il padre del condizionamento operante, fu il primo a ipotizzare che gli animali potessero memorizzare una sequenza complessa di risposte discriminative (Matching to Sample) attraverso l'uso di rinforzi intermittenti. Nei suoi primi studi, egli utilizzò piccioni (*Columba livia*) all'interno di scatole ("box"). Questi piccioni dovevano beccare una luce posizionata al centro di uno dei lati della scatola (stimolo target), che accendeva altre due luci di diversa luminosità in due settori separati della scatola, di cui una aveva la stessa luminosità della luce iniziale. Successivamente, se il piccione avesse beccato la luce corrispondente allo stimolo target, entrambe le luci si sarebbero spente e si riaccendeva la luce centrale. Dopo un breve periodo di tempo, se il soggetto avesse fatto la scelta corretta, sarebbe stato ricompensato con cibo. Questa procedura è stata successivamente utilizzata per studiare la memoria di lavoro in diverse specie, inclusi insetti, delfini, uccelli, scimmie e roditori. Questo paradigma offre diversi vantaggi, come la valutazione delle abilità concettuali e simboliche o la misurazione dello span di memoria a breve termine. Attraverso l'uso di questo paradigma, è possibile confrontare le differenze nella memoria di lavoro tra specie diverse e determinare se gli animali possiedono la capacità di mantenere in memoria eventi arbitrari.

Il ricercatore D'Amato (D'Amato & O'Neil, 1971), ha condotto uno studio per valutare la memoria a breve termine nelle scimmie, nello specifico utilizzando scimmie cappuccine (*Cebus apella*) addestrate nel compito di DMTS (Delayed Matching to Sample). I soggetti entravano in una stanza in cui veniva proiettato uno stimolo target visibile per un determinato periodo di tempo. Successivamente, durante la fase di "mantenimento" o "ritardo", comparivano gli stimoli appaiato e non appaiato, tra cui il soggetto doveva fare una scelta. Si è osservato che quando il periodo di mantenimento veniva svolto in condizioni di oscurità, le prestazioni miglioravano significativamente. Con un ritardo di 120 secondi e in condizioni di illuminazione normale della

stanza, le prestazioni di tutti i soggetti non superavano il livello casuale (50%), ma miglioravano in modo significativo se i 120 secondi venivano trascorsi in condizioni di oscurità, riducendo la percentuale di errori a una media del 36% (D'Amato e O'Neil, 1971). Uno studio simile condotto da Grant e Roberts nel 1976, su piccioni, ha rilevato che la performance nel compito di DMTS diminuiva proporzionalmente all'intensità della fonte luminosa durante il periodo di mantenimento. Sono stati condotti numerosi studi che hanno utilizzato il DMTS nei piccioni, evidenziando un'eccellente capacità di memoria di lavoro e a breve termine in questa specie (Roberts & Grant, 1976; Skov Rackette et al., 2006). Ad esempio, Cumming e Berryman (1965) hanno addestrato tre piccioni nel compito di Matching to Sample simultaneo. Dopo un periodo iniziale di prestazioni non buone, entro 9 sessioni ogni soggetto è stato in grado di raggiungere almeno il 90% di accuratezza, fino a raggiungere il 100% in alcuni casi (Berryman R., 1965).

Nel 2005, Zhang e colleghi, condussero un esperimento sull'abilità di memoria di lavoro delle api (*Apis mellifera*) utilizzando il paradigma del matching to sample. Le api venivano inserite in un tunnel dove potevano osservare uno stimolo target. Una volta superato questo stimolo, le api avrebbero raggiunto un'area successiva del tunnel dove sarebbero state poste di fronte ad una scelta, tra una serie di stimoli differenti. Durante l'esperimento, le api venivano rinforzate con una soluzione di zucchero solo quando si dirigevano verso lo stimolo identico a quello target. I risultati mostrarono che all'aumentare dell'intervallo di tempo tra lo stimolo target e la scelta, l'accuratezza delle api diminuiva seguendo una curva di decadimento esponenziale. Le api mantenevano buoni livelli di performance fino a un ritardo di 5 secondi, ma oltre i 8.68 ± 0.06 secondi il loro comportamento diventava casuale nella scelta degli stimoli. Questi insetti dimostrarono una buona capacità di memoria di lavoro e plasticità, in quanto, dopo aver imparato a utilizzare lo stimolo target per fare la scelta corretta, riuscirono successivamente a generalizzare tale apprendimento ad un nuovo set di stimoli visivi (Aung Si, 2005).

1.5 Matching to Sample nei pesci

Aperto invece il ventaglio di studi che raccoglie diverse specie di pesci, troviamo molti di questi sfruttare il paradigma MTS.

Il primo esperimento in cui si è testata la capacità di discriminazione visiva nei pesci è stato condotto nel 1926 (Schaller, 1926). In questo esperimento, i pesci Sanguinerola (*Phoxinus phoxinu*) sono stati addestrati a distinguere forme geometriche e colori diversi, dimostrando la loro abilità in questo compito. Dopo ciò, molti altri esperimenti simili sono stati condotti da diversi ricercatori. Tuttavia, solo di recente si sono cominciate a studiare le abilità cognitive complesse dei pesci. Fino ad ora, pochi studi hanno utilizzato il "Matching to Sample" (MTS) riportando risultati contrastanti e utilizzando procedure diverse.

Uno degli studi pionieristici nell'utilizzo di MTS simultaneo, sui pesci rossi, è stato condotto da Goldman e Shapiro. Utilizzando una camera di discriminazione appositamente progettata per i pesci (Bitterman, 1959), hanno addestrato questi ultimi a colpire uno stimolo bersaglio che, attivando un circuito elettrico, azionava un distributore di cibo (condizionamento operante ripreso da Cumming e Barryman, 1965). Gli stimoli utilizzati erano luci di diversi colori (rosso, verde e blu). L'obiettivo era quello di valutare se i pesci, come altre specie animali, dimostrassero la capacità di acquisire compiti di discriminazione visiva di livello superiore. Dopo un periodo di addestramento di 70 giorni, la maggior parte dei pesci rossi ha raggiunto un livello di accuratezza del 75%, mentre alcuni individui hanno raggiunto addirittura l'85%, sia per il compito di MTS che per quello di non-MTS. Alcuni soggetti hanno mostrato un'accuratezza del 70% già prima della quarantesima sessione, dimostrando una rapida apprendimento (Marjorie Goldman, 1979).

Tuttavia, ci sono state alcune limitazioni e problematiche con questo metodo. Ad esempio, la sequenza di presentazione degli stimoli era ripetuta solo in due varianti, il che non garantiva che i pesci avessero effettivamente appreso la regola generale del compito, ma piuttosto una semplice

discriminazione in sequenza. Inoltre, il metodo si è dimostrato piuttosto lento e non adatto per i pesci di piccole dimensioni, limitando così la sua applicabilità solo ad alcune specie di pesci.

Successivamente, Gierszewski e colleghi (2012) hanno condotto uno studio sulle abilità cognitive dei pesci ciclidi del Malawi utilizzando il compito di MTS simultaneo. In questo caso, hanno utilizzato stimoli visivi di forme geometriche bidimensionali di colore nero su sfondo grigio, invece di stimoli colorati come nel precedente esperimento. Hanno voluto verificare se i pesci fossero in grado di svolgere con successo il compito di MTS utilizzando stimoli che erano stati precedentemente utilizzati con successo su altre specie animali, ma mai sui pesci. L'apparato sperimentale era composto da una vasca suddivisa in due parti da una parete con una porta a ghigliottina per consentire il passaggio tra i due compartimenti. Nella fase sperimentale, il compartimento anteriore dell'apparato era dedicato all'esperimento. La parete frontale di questo compartimento era fatta di plexiglass semi-trasparente in modo che il pesce potesse vedere gli stimoli proiettati attraverso un proiettore LCD all'interno delle due aree di scelta. Lo stimolo target veniva mostrato al centro rispetto agli altri due stimoli, tra cui il pesce doveva scegliere. I pesci hanno dimostrato una rapida capacità di apprendimento associativo, ad esempio, riconoscendo che l'apparizione di uno stimolo porta a una ricompensa. Tuttavia, non sono riusciti ad imparare come eseguire con successo il compito di MTS simultaneo entro un limite massimo di 40 sessioni, che venivano svolte due volte al giorno con un totale di 20 prove giornaliere (10 prove per sessione). Questo metodo si è rivelato inefficace nel testare abilità cognitive complesse nei pesci. È possibile che l'intervento umano abbia causato interferenze nelle performance dei pesci (Stefanie Gierszewski, 2013).

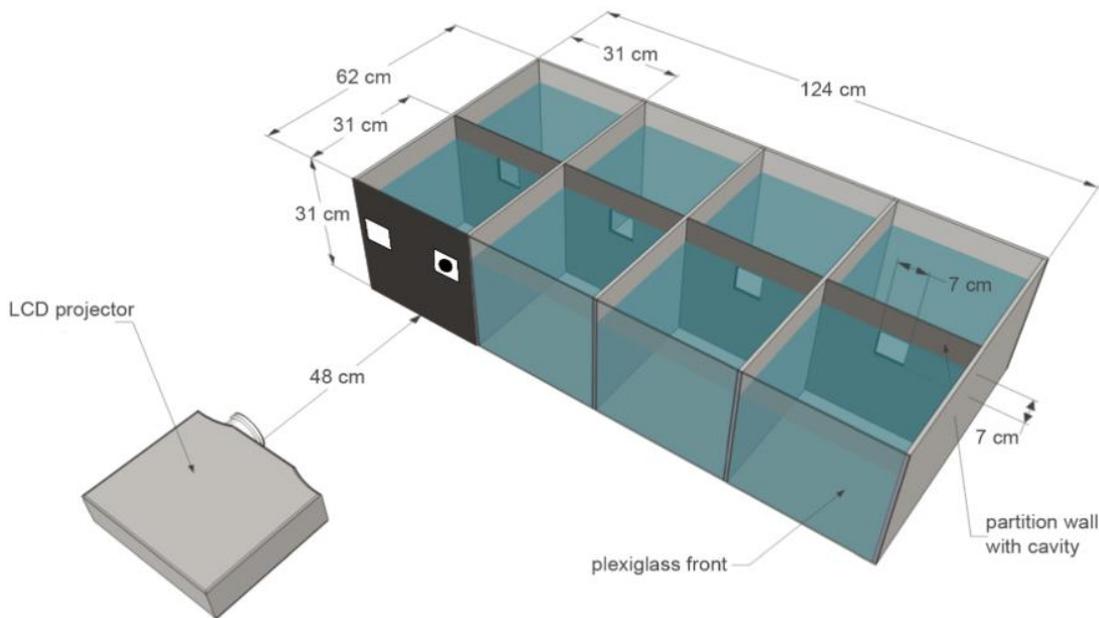


Figura 5. Apparato sperimentale utilizzato da Gierszewski e colleghi (2012).

Un altro studio vede come esemplari adulti di zebrafish performino nei compiti di MTS, inizialmente nella forma di matching to sample simultaneo e successivamente in prove di delayed matching to sample (DMTS): in entrambi i casi i soggetti raggiungono il criterio necessario per dichiarare la presenza di abilità cognitive, anche se, allo stesso tempo, vengono sottolineate nello studio, difficoltà per quanto riguarda la flessibilità e attenzione cognitiva. Secondo i ricercatori che hanno attuato questo esperimento infatti, la working memory, molto probabilmente è una caratteristica presente e utilizzata dai soggetti, ma la loro evoluzione ha portato ad una memoria di questo tipo che non ha il supporto dei neuroni dopaminergici mesencefalici, (Solal Blocha, 2019). Anche lo studio presentato da Me´lisande Aellen et al., pubblicato nel 2022, riporta dati che mettono in luce come i soggetti, in questo caso esemplari di *labroides dimidiatus*, arrivino solo ad un certo livello di prestazione cognitiva; la specie, considerata globalmente, non raggiunge criteri rilevanti, nonostante alcuni tra gli individui lo facciano (Me´lisande Aellen, 2022).

Avvicinandoci al nostro studio, osserviamo una ricerca che vede come soggetti proprio esemplari di entrambi i sessi di *P. reticulata*, performino nel paradigma di matching to sample simultaneo

(SMTS). Il presupposto di base ipotizza una capacità discriminativa presente e utilizzata da questi pesci già in natura, che viene sollecitata in laboratorio tramite condizionamento operante. Nello studio citato, si nota come questa capacità funzioni in modo efficiente con stimoli colore (in questo caso i colori rosso e giallo), meno bene invece di fronte a stimoli forma (triangolo e cerchio), (Tyrone Lucon-Xiccato, 2018).

In conclusione, si può affermare che attualmente non esistano metodi robusti ed affidabili per studiare l'MTS nei pesci.

1.6 Scopo dello studio

Possiamo quindi notare, come le contraddizioni tra i diversi studi, siano molte. Grazie alla letteratura però, sappiamo come questo tipo di compito possa chiarificare diverse abilità cognitive e di memoria dei pesci, e come la discriminazione dei colori favorisca il fitness, il benessere e la riproduzione in *P. reticulata*; nonostante ciò, i risultati che attualmente possediamo sono ancora contraddittori.

Nel seguente studio, vogliamo indagare come variano le curve di apprendimento in soggetti di sesso femminile di questa specie, tramite l'attuazione del paradigma di matching to sample simultaneo.

Nonostante la ricerca scientifica stia confidando molto sui piccoli pesci come modello animale, attualmente, gli strumenti per la valutazione comportamentale e cognitiva dei pesci non sono generalmente adeguati, soprattutto per quanto riguarda i metodi utilizzati nello studio dell'apprendimento discriminativo o delle abilità cognitive complesse come la memoria.

Le prestazioni cognitive di corvi, pulcini e api, a confronto con quelle dei pesci, sono pressoché paragonabili, ma rispetto a quelle di primati, ratti e piccioni non si ritrova la stessa

accuratezza, probabilmente a causa delle metodologie utilizzate (Gatto *et al.*, 2017). Il rischio è che l'impiego dei pesci come modello animale sia limitato, con la conseguente impossibilità di aumentare le nostre conoscenze circa le basi molecolari e genetiche delle funzioni cognitive complesse della memoria.

Recentemente la memoria di lavoro e di riconoscimento in *Poecilia reticulata* è stata indagata attraverso il compito del Matching to Sample (Delayed e Simulaneous) utilizzando una procedura standardizzata, adatta ai piccoli pesci di laboratorio, che prevedeva un apparato di addestramento automatizzato. I risultati ottenuti però sono in apparente contraddizione con quanto riportato in letteratura sulle capacità di memoria in *P. reticulata*. È quindi altamente plausibile che la metodologia impiegata abbia influenzato la performance nel compito dei soggetti. Lo scopo di questo lavoro è di misurare una baseline nelle capacità di apprendimento discriminativo in *Poecilia* adottando una procedura di training estensivo simile a quella che è stata utilizzata in diversi studi riguardanti la cognizione numerica. Il compito prevede quindi che i soggetti debbano mantenere una iniziale traccia di memoria che consenta loro di accoppiare il probe allo stimolo target; in altre parole, rappresenta il primissimo stadio di formazione di una traccia mnestica.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Soggetti sperimentali

I protagonisti di questo esperimento, condotto presso il Laboratorio di Psicologia Animale Comparata del Dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova, sono esemplari di *Poecilia reticulata*, comunemente chiamati "guppy", una specie di pesce proveniente dall'America centro meridionale, che successivamente è stata diffusa artificialmente in altre zone del mondo, compresa l'Italia. L'habitat che questa specie occupa in natura, è caratterizzato da acque a diversi gradi di salinità, a patto che la temperatura oscilli tra i 18° e i 28° gradi centigradi, spaziando tra laghi, stagni, canali, fiumi, zone di sorgente e foce. Grazie a questa flessibilità, le poecilie riescono ad adattarsi a diversi ambienti (Chervinski, 1984), nonostante un'apparente fragilità strutturale, e ci permettono così, uno studio in laboratorio, mantenendole in uno stato di benessere e salute. Anche la dieta è altamente adattiva, essendo onnivora, privilegiando in natura, pasti a base di larve di insetti, piccoli invertebrati, ma anche certe tipologie di vegetali (Dussault, 1981). Osservando questi pesci, la prima cosa che risalta all'occhio, è la grande differenza fisica a livello sessuale: i maschi presentano lunghe pinne caudali, spesso colorate in diversi modi, sempre sgargianti, a macchie o striate; le femmine invece, presentano colorazioni molto più neutre, che passano dal grigio al marrone chiaro. Questa differenza, ovviamente, trova una spiegazione a livello sociale e riproduttivo. I maschi che possiedono code più grandi e sgargianti sono quelli più forti e in salute, e saranno quelli che gli esemplari femmina sceglieranno più facilmente, così da garantire una miglior condizione e dei geni migliori alla loro prole. Gli esemplari femmina sono più grandi fisicamente rispetto ai maschi, raggiungendo i 4,5 centimetri di lunghezza. Le pinne dalla forma più ampia guidano un corpo più tozzo e arrotondato. L'accoppiamento si svolge in modo diretto, con fecondazione interna, che permette dopo un singolo episodio, fino a tre covate. Quando la femmina è incinta, appare nella zona anale una macchia di colore più scuro, detta "macchia gravidica". Gli avannotti, trattandosi di una specie ovovivipara, nascono già schiusi

dalle uova, a seguito di una gestazione che varia dalle 4 alle 6 settimane. Spesso gli adulti mangiano la loro prole, non riconoscendoli, ed è per questo che spesso risulta necessario, come nel nostro caso, separare i piccoli dal gruppo di adulti. Solo dal terzo, quarto mese, la maturità sessuale viene raggiunta.



Figura 6. Esemplari di *Poecilia reticulata*, con evidenti differenze cromatiche tra esemplari di sesso maschile e di sesso femminile.

Per la nostra procedura sperimentale, abbiamo scelto dieci soggetti di sesso femminile. Questi sono stati mantenuti in acquari di stabulazione da circa 450 litri d'acqua, cui temperatura era costante di $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Presenti in ogni vasca delle lampade a fluorescenza (58W), posizionate con illuminazione che arrivasse dall'alto e con fotoperiodo: 7:30-19:30. In uno dei lati dell'acquario era presente un filtro biologico e meccanico che garantiva una corretta salubrità dell'acqua, a ricircolo continuo. Per arricchire maggiormente l'ambiente vitale dei soggetti, viene posizionata

e curata una folta vegetazione composta da alghe e muschio verde, con il fondo coperto da uno strato di ghiaio per acquari di circa 2 cm. Questi dettagli risultano fondamentali nel garantire il benessere dei soggetti, partendo dalla vita sociale e arrivando al momento della riproduzione; la sensibilità e la salute stanno alla base di soggetti che andranno a rispondere in modo corretto agli esperimenti, riuscendo così a simulare un comportamento naturale. Gli esemplari venivano nutriti due volte al giorno: la mattina intorno alle ore 9:00 con mangime secco in scaglie (GVG) e il pomeriggio intorno alle ore 16:00 con nauplii di *Artemia salina*.

L'esperimento è stato condotto presso il Laboratorio di Psicologia Animale Comparata del Dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova.

2.2 Apparato sperimentale

Le poecilie scelte per l'esperimento vengono suddivise in vasche differenti dalle precedenti. In questo caso ogni soggetto si trova da solo in una vasca di vetro, rettangolare, che misura 20x32x50 cm. Anche in questo caso, la temperatura viene mantenuta tra i 26 e i 28 gradi centigradi e l'illuminazione proveniente dalla sommità delle vasche, viene emessa da una lampada al neon (30w), con un timer per il ritmo circadiano che si regolava automaticamente ad orari prestabiliti (7:30 – 19:30). In modo da favorire il benessere e fitness del soggetto (è necessario ridurre al massimo lo stress, per un buon esito dell'esperimento), vengono posizionati 2 cm di ghiaia sul fondo, e degli specchi (5x28 cm) lungo i lati della vasca, che aiutano a simulare una situazione di socialità favorevole alla tranquillità del soggetto e diminuendo lo stress da isolamento sociale (Miletto Petrazzini, 2012). L'esemplare di poecilia scelto per l'esperimento rimane nella stessa vasca, che viene regolarmente pulita e mantenuta in condizioni ottimali, per tutte le fasi che precedono le prove vere e proprie; infatti, prima del cosiddetto training, sono messe in atto una fase di familiarizzazione e successivamente una di pre-training.

Tra le caratteristiche strutturali della vasca, fondamentali per l'esito dell'esperimento, vediamo la presenza di pannelli, posti esternamente, di poliplack verde. Questo dettaglio, permetterà al soggetto di sentirsi maggiormente a suo agio, e impedirà allo stesso di distrarsi a causa di fattori esterni come la presenza dello sperimentatore o eventuali movimenti esterni. Al centro della vasca, lungo i due lati lunghi del rettangolo che forma il nostro habitat sperimentale, troviamo rispettivamente due strutture trapezoidali semi trasparenti, integrate con gli specchi sopra citati e con due pompe (aspirazione, passaggio per il filtro e rilascio), presenti in ogni vasca per il ricircolo dell'acqua. Queste strutture permettono una divisione a metà della vasca, impedendo al soggetto di vedere completamente il lato opposto rispetto a quello dove si trova. Le pareti corte, adibite all'inserimento dei tre stimoli, vengono coperte da due pannelli bianchi in pvc, che presentano al centro una struttura semicilindrica, di plastica trasparente, che si sviluppa in verticale.

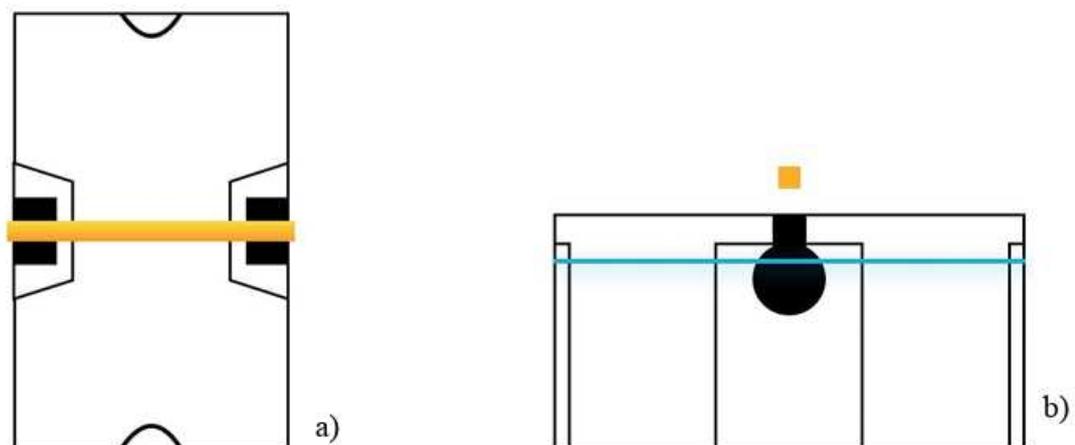


Figura 7. Rappresentazione grafica dell'apparato sperimentale; a) dall'alto, b) laterale.

2.3 Procedura sperimentale e stimoli utilizzati

Lo stimolo viene inserito nella vasca grazie all'utilizzo di tre bacchette trasparenti (33x3,5 cm), in plexiglass, poste in posizione parallela tra loro e collegate da un altro pezzo in plexiglass, che le unisce perpendicolarmente rispetto alla loro impostazione verticale. L'utilizzo nelle vasche è facilitato da supporti in polioplack bianco (6x3,5 cm), presenti nella parte posteriore delle bacchette laterali, che agiranno da appoggio sul bordo superiore della vasca. All'estremità di ciascuna bacchetta, troviamo il supporto per lo stimolo, un piccolo foglio di acetato, piegato in modo da contenere gli stimoli e non farli scivolare via una volta inseriti in acqua. Gli stimoli veri e propri, che la poecilia andrà a puntare, sono dei quadrati di carta 3x3 cm, plastificati e predisposti ad un utilizzo intercambiabile. L'esperimento prevede tre forme differenti: quadrato, cerchio e triangolo; queste andranno combinate in modo omogeneo durante tutta la durata delle prove. Nella bacchetta centrale, posizionata leggermente più in alto rispetto alle altre due, andrà posizionato lo stimolo target, quello che il soggetto noterà per primo, mentre ai lati, in modo alternato, saranno presenti lo stimolo corretto (uguale al target), e il distrattore nel lato opposto.

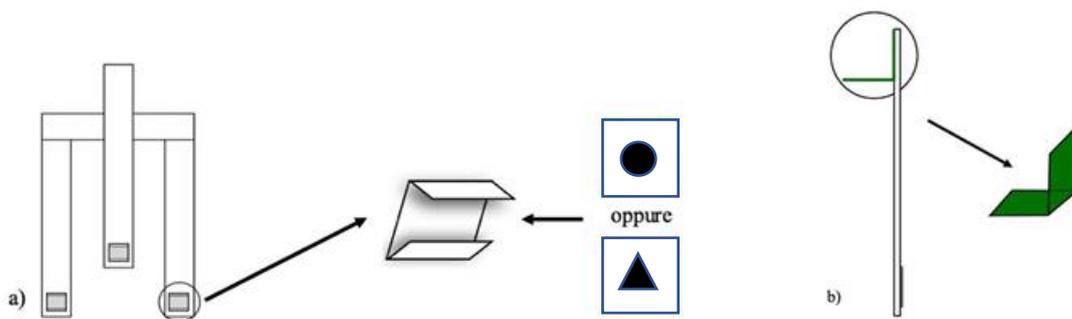


Figura 8. Rappresentazione grafica dello stimolo sperimentale: a) Visione frontale; b) Visione laterale. Nelle parti ingrandite è possibile osservare in dettaglio l'alloggio per lo stimolo (figura a)) e il sostegno che permette la stabilizzazione dell'intera struttura (figura b)).

2.3.1 Le tre fasi dell'esperimento

L'esperimento si svolgerà in tre momenti consecutivi, che consentiranno al soggetto di ambientarsi nel nuovo spazio vitale e solo successivamente di essere sottoposto alle prove, tramite un passaggio intermedio di avvicinamento all'interazione con l'apparato sperimentale e la presenza più ravvicinata dello sperimentatore stesso. Chiamiamo queste tre fasi familiarizzazione, pre-training e training.

- Familiarizzazione

Il soggetto di poecilia reticulata si ritrova in una nuova vasca, e questa situazione può spesso risultare stressante o difficile da assimilare velocemente. È necessario quindi consentire una metabolizzazione corretta del nuovo setting: tre giorni saranno dedicati all'ambientazione in questo nuovo spazio. Durante questo periodo il pesce non sarà soggetto a nessuno stimolo, ma riceverà il cibo due volte al giorno, come avveniva nella vasca precedentemente occupata insieme agli altri esemplari.

- Pre-training

Durante questa fase vediamo le prime interazioni con l'apparato sperimentale e lo sperimentatore che lo manovra. Lo strumento in plexiglass viene inserito con molta cautela, lentamente, nella sua posizione standard all'interno della vasca; è privo di stimoli. Queste prove, che precedono il training, permetteranno allo sperimentatore di osservare il soggetto, annotandone il comportamento secondo una differenziazione che indica curiosità (positivo) o segni di stress e paura (negativo). I secondi si possono accettare per un determinato numero di tentativi, superato il quale, il soggetto può essere cambiato, non essendo adatto agli scopi dell'esperimento. La sessione di pre-training, così come il periodo di familiarizzazione, ha una durata di tre giorni. Il primo giorno, ciascun esemplare verrà sottoposto a otto prove, divise a metà tra la mattina e il pomeriggio. Tra una prova e la successiva passeranno quindici minuti, mentre tra le prove della mattina e quelle del pomeriggio la pausa durerà circa novanta minuti. Il secondo e il terzo giorno le prove

aumenteranno ad un totale di dodici, divise sempre a metà nell'arco della giornata. Nelle sessioni di pre-training, viene per la prima volta messa in atto una modalità di condizionamento classico, attua a guadagnare in minima parte, una modalità di risposta automatica e quindi di apprendimento, che faciliterà il successivo training. I soggetti infatti verranno ricompensati con una piccola quantità di nauplii di artemia, emessi tramite pipetta Pasteur, ogni qual volta si avvicineranno alla struttura (preferibilmente ai due lati di questa, dove successivamente verranno posizionati stimolo obiettivo e stimolo distrattore).

- Training

Se il soggetto è ritenuto valido, può avere inizio per questo la fase di training. La modalità è identica a quella del pre-training, ma comporta l'aggiunta degli stimoli. Le tre tessere plastificate contenenti le forme verranno inserite nel loro alloggio all'interno dell'apparato, ad ogni prova, con un'omogenea randomizzazione delle posizioni che varia per tutto il corso dell'esperimento. La durata complessiva di questa fase è di venti giorni, con dodici prove al giorno divise a metà: sei la mattina, sei il pomeriggio, con intervalli di quindici minuti tra una prova e l'altra e di novanta tra le prove mattutine e quelle pomeridiane. La presentazione della bacchetta in plexiglass all'interno della vasca, stavolta con gli stimoli, metterà alla prova il soggetto in una scelta vera e propria. Al centro lo stimolo target viene individuato per primo, grazie anche all'intervento dello sperimentatore, che cercherà di attirare il soggetto nel lato della vasca privo di stimoli, così che la struttura appositamente preparata (strutture semitrasparenti al centro che limitano la visuale alla fascia centrale) possa agire su quello che il soggetto può vedere da quella posizione. Dopo che lo stimolo avrà ingaggiato l'attenzione della poecilia, questa si avvicinerà, entrando nella metà della vasca dov'è presente la bacchetta, e riuscendo così a vedere anche gli stimoli ai lati. Infine, qui, in base al condizionamento e alle capacità mnemoniche e percettive, la scelta giusta dovrà ricadere sulla forma uguale a quella presente al centro (target). In caso di successo, una piccola ricompensa di nauplii di artemia verrà concessa al soggetto tramite pipetta Pasteur; se invece la scelta sarà quella sbagliata, la poecilia non avrà ricompense.



Figura 9. Rappresentazione grafica tridimensionale dell'apparato sperimentale con gli stimoli inseriti ad una delle due estremità.

2.4 Analisi statistiche

Al fine di verificare la capacità di apprendimento nell'associare lo stimolo corretto e lo stimolo "probe" è stata calcolata una variabile dipendente "proporzione di risposte corrette" sul totale delle prove svolte durante le 20 giornate di training di tutti i 10 soggetti attraverso un t-test a campione unico. Oltre all'apprendimento di gruppo, è stato condotto un test binomiale per la performance di ciascuno dei soggetti, utilizzando il numero di prove corretto sul totale di prove, al fine di verificare l'apprendimento individuale.

Per indagare l'influenza di variabili come: giornata di training, stimolo target della prova e posizione dello stimolo corretto (frontale/posteriore oppure sinistra/destra) è stato creato un modello lineare generalizzato ad effetti misti con distribuzione binomiale (GLMM, funzione 'glmer' del pacchetto R 'lme4'). In particolare, le variabili elencate sono state considerate come fattori fissi, mentre il codice di ciascun soggetto è stata inserito come fattore random.

Attraverso la funzione ‘Anova’ del pacchetto R ‘car’ è stato poi valutato l’effetto di ciascuno dei parametri del modello.

Le analisi sono state condotte con il programma statistico RStudio (versione 4.3.0) (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.rproject.org>).

3. RISULTATI

Andando a considerare complessivamente i 10 soggetti durante le 20 giornate di training, emerge che la performance media di risposte corrette è di 0.581 ± 0.493 (media \pm SD). I dati sono normalmente distribuiti ($W=0.95997$, $p\text{-value}=0.786$) e risultano essere statisticamente significativi (t-test a campione unico, $t_9 = 6.1732$, $p < 0.001$).

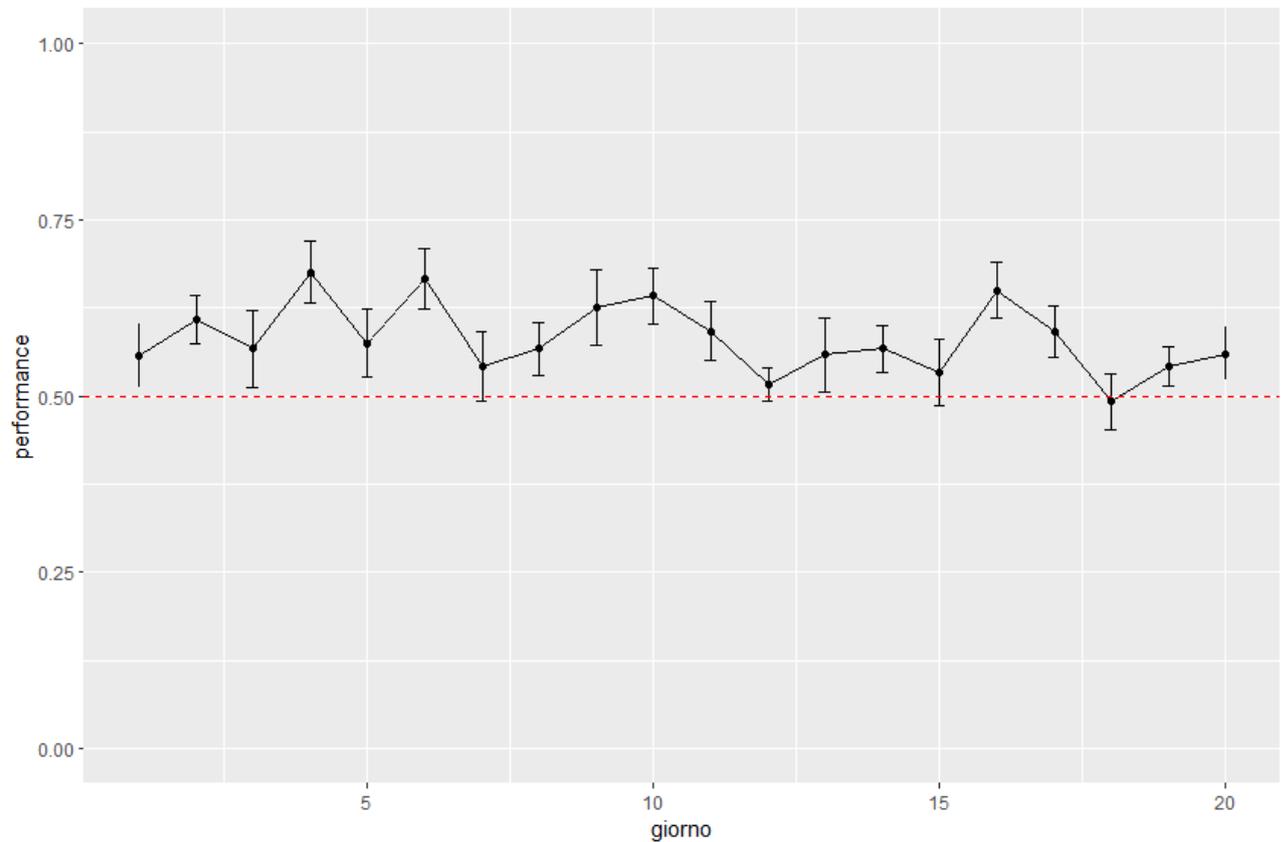


Figura 10. I risultati ottenuti dai soggetti nell'arco totale delle prove.

Per quanto riguarda la performance complessiva delle 20 giornate a livello del singolo soggetto, emerge che di 10 soggetti, 5 soggetti scelgono lo stimolo corretto in modo statisticamente significativo (figura 11a).

Soggetto	Media \pm SD	Risposte corrette/Totale prove	P value
S11	0.58 \pm 0.49	140/240	0.012*
S12	0.56 \pm 0.50	135/240	0.061
S14	0.53 \pm 0.50	125/240	0.561
S16	0.63 \pm 0.48	152/240	<0.01*
S18	0.61 \pm 0.49	147/240	<0.01*
S2	0.54 \pm 0.50	125/232	0.264
S3	0.56 \pm 0.50	125/223	0.081
S5	0.60 \pm 0.49	145/240	0.002*
S7	0.65 \pm 0.48	155/240	<0.01*
S8	0.55 \pm 0.50	132/240	0.138

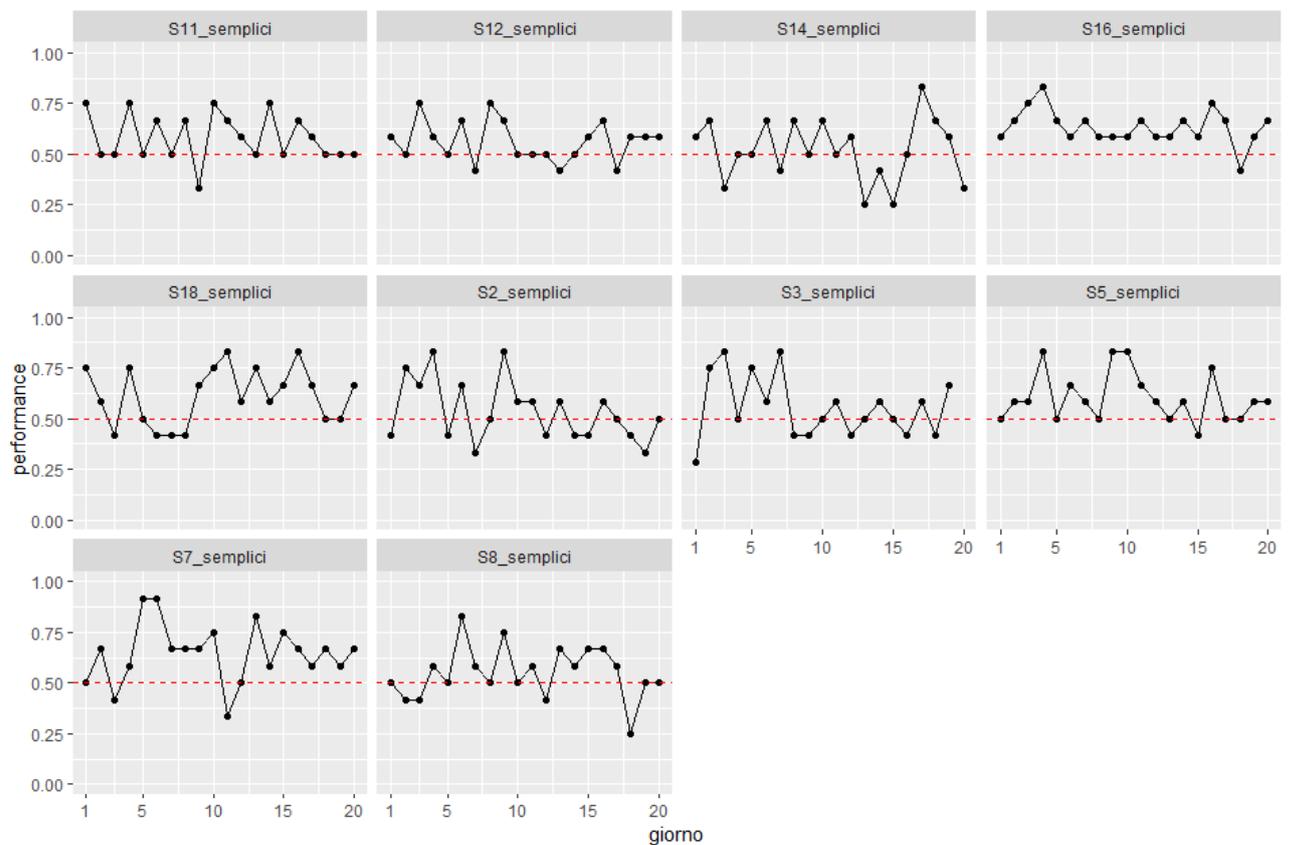


Figura 11. a) Tabella relativa alla performance individuale di ciascun soggetto, media \pm deviazione standard, totale di risposte corrette sulle prove totali, p value calcolato con un test binomiale con livello di significatività a 0.05. b) Grafici individuali relativi all'andamento durante le 20 giornate di osservazione).

Un'analisi a misure ripetute non ha evidenziato un effetto significativo dovuto allo scorrere dei giorni ($\chi^2_{1} = 2.8779$, $p = 0.0898$), né alla posizione destra oppure sinistra dello stimolo corretto ($\chi^2_{1} = 0.9830$, $p = 0.3215$) né alla posizione frontale oppure posteriore dello stimolo corretto ($\chi^2_{1} = 0.0139$, $p = 0.9060$). Andando a considerare la variabile "stimolo", risulta esserci un effetto significativo ($\chi^2_{1} = 16.1083$, $p < 0.01$). In altre parole, da un lato si osserva che la prestazione dei soggetti tende a peggiorare con il trascorrere dei giorni ma non in modo significativo e che, indipendentemente da questo, mostrano di operare la discriminazione con maggior accuratezza quando lo stimolo rinforzato è il cerchio (62% di risposte corrette) rispetto al triangolo (54%).

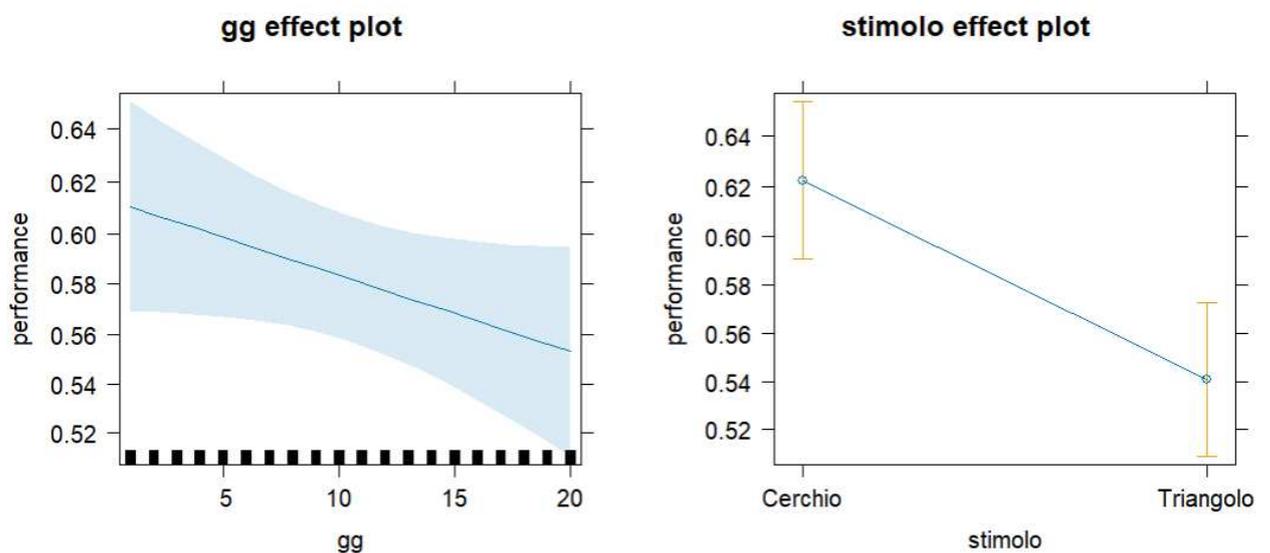


Figura 12. a) Grafico relativo all'andamento temporale della prestazione dei soggetti nei 20 giorni di osservazione. b) performance discriminativa dei soggetti quando lo stimolo rinforzato era il cerchio o il triangolo.

4. DISCUSSIONE

Il matching to sample è un paradigma ampiamente utilizzato nella ricerca sugli animali per valutare le prestazioni della memoria. Implica la presentazione di un animale con uno stimolo campione e la richiesta di selezionare uno stimolo corrispondente da una serie di stimoli alternativi.

In questo compito, l'animale viene tipicamente addestrato a fare una scelta basata sull'identità o su qualche altra caratteristica dello stimolo del campione. Ad esempio, una variante comune dell'attività è il matching to sample delayed (DMTS). Nel DMTS, all'animale viene prima mostrato uno stimolo campione, che viene poi rimosso dopo un periodo di ritardo. Dopo il ritardo, all'animale viene presentata una scelta di stimoli, uno dei quali corrisponde al campione. Il compito dell'animale è selezionare lo stimolo corrispondente per ottenere una ricompensa.

Le prestazioni degli animali possono fornire informazioni sulle loro capacità di memoria. Ad esempio, la loro accuratezza e velocità nella scelta dello stimolo corrispondente possono indicare la forza e la persistenza della loro memoria per lo stimolo campione. Inoltre, i ricercatori possono manipolare vari parametri dell'attività per esaminare diversi aspetti della memoria, come la memoria di lavoro, la memoria a lungo termine o la memoria di riconoscimento.

I fattori che possono influenzare le prestazioni della memoria nei compiti di abbinamento al campione includono la difficoltà del compito, la durata del periodo di ritardo, la natura degli stimoli (ad esempio, visivi, uditivi) e le specie e le differenze individuali nelle capacità cognitive. Varie manipolazioni neurobiologiche e neurochimiche possono anche essere utilizzate per studiare i meccanismi neurali alla base delle prestazioni della memoria negli animali.

Nel complesso, le attività di abbinamento al campione forniscono uno strumento prezioso per studiare i processi di memoria negli animali, consentendo ai ricercatori di valutare la loro capacità di ricordare e riconoscere gli stimoli, nonché di studiare le basi neurali della formazione e del recupero della memoria.

Lo studio delle performance di memoria nei pesci è ormai di lunga data ed ha abbracciato svariati paradigmi che vanno dall'esplorazione di labirinti, all'orientamento spaziale fino alla memoria di riconoscimento. Di fronte ad una notevole mole di informazioni sulle prestazioni di memoria i cui risultati sono largamente influenzati dalle caratteristiche specie-specifiche sono molto più contrastanti i risultati di compiti di accoppiamento al campione. In particolare, è molto ambiguo il quadro attuale sulle prestazioni in compiti ritardati e sull'effettivo tempo trascorso osservando lo stimolo prima di operare una scelta. Un importante fattore limitante in questi studi è il rinforzo alimentare; nei pesci, infatti, alcuni nutrienti sono naturalmente presenti in acqua e l'efficacia del rinforzo alimentare quando erogato in risposta ad una scelta corretta è meno marcato che in altre specie animali. Inoltre, il cibo rilasciato tende a diffondersi maggiormente in acqua, anche in base ai movimenti del soggetto stesso per cui la vicinanza spaziale tra lo stimolo rinforzato e il cibo viene a mancare.

Un tentativo di rendere più attendibili i risultati di un compito MTS nei pesci è sfruttare un training estensivo che riesca a sopperire il forzatamente limitato numero di prove che si possono svolgere quotidianamente aumentando i giorni di test senza ridurre la motivazione dei soggetti. In questo contesto l'utilizzo di una discriminazione semplice basata sulla forma rappresenta uno dei tasselli iniziali per misurare la capacità di apprendimento in *P. reticulata* in questo genere di compiti. Infatti, lo studio presentato in questa tesi si colloca all'interno di uno studio complessivo che oltre alle forme ha utilizzato un compito di discriminazione cromatica per ottenere una baseline della performance in compiti di MTS in questa specie. I risultati raccolti sono incoraggianti in quanto dimostrano che nell'arco dei 20 giorni di addestramento i soggetti hanno appreso ad associare il probe con lo stimolo da approssimare per ottenere il rinforzo. L'apprendimento pare avvenire in tempi brevi dato che già il primo giorno a livello collettivo si osserva una scelta non casuale dello stimolo. Questa considerazione è confermata dal fatto che la prestazione dei soggetti non varia significativamente con il trascorrere dei giorni. Meno chiara è l'interpretazione del risultato che mostra una preferenza per lo stimolo "cerchio" rispetto al "triangolo" quando il primo è lo stimolo

da accoppiare. Detto in altri termini il compito di matching sembra risultare più semplice per i soggetti quando devo accoppiare due cerchi piuttosto che due triangoli. La questione non è semplice in quanto da un lato i dati in letteratura indicano una timida preferenza spontanea per il triangolo rispetto al cerchio ed è ulteriormente “aggravata” dal fatto che convenzionalmente la forma circolare è più ecologicamente paragonabile a quella di un occhio, ad esempio, di un predatore. A onor del vero la somiglianza dello stimolo cerchio con un occhio potrebbe aver in realtà favorito i soggetti che possono aver utilizzato lo stimolo come rinforzo sociale e non come cue aversivo.

La prestazione dei soggetti è confermata anche dall’analisi dei dati individuali che indicano come 5 soggetti su 10 hanno imparato la discriminazione. Si tratta di un risultato in linea con quanto osservato per compiti diversi che utilizzavano però una metodologia di training estensivo largamente paragonabile a quella utilizzata in questo studio.

Concludendo, queste evidenze, assieme ai dati provenienti dallo stesso test condotto su discriminazione cromatica e da un terzo test che utilizzava una gamma estesa di forme, forniscono uno strumento utile per misurare in primis la capacità di accoppiare al campione nei guppies e in secondo luogo una indispensabile base di partenza per progettare il matching to sample delayed.

5. BIBLIOGRAFIA

- A. Ennaceur, J. D. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Elsevier*, 47-59.
- Aung Si, S.-W. Z. (2005). Effects of caffeine on olfactory and visual learning in the honey bee (*Apis mellifera*). *Elsevier*, 664-672.
- Berryman R., C. W. (1965). Acquisition of delayed matching in the pigeon. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 6-101.
- Bitterman, N. L. (1959). Improved Apparatus for the Study of Learning in Fish. *The American Journal of Psychology*, 616-620 .
- Boyer D. Winters, S. E. (2004). Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. *Journal of Neuroscience*, 5901-5908.
- Chervinski, J. (1984). Salinity tolerance of young catfish, *Clarias lazera* (Burchell). *Journal of fish biology*, 147-149.
- Diamond, J. (1997). *Armi, acciaio e malattie. Breve storia degli ultimi tredicimila anni*. Einaudi.
- Dussault, G. V. (1981). Food and feeding behavior of the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 684-701.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Elsevier*, 244-254.
- Kandel, V. F. (1974). A Quantal Analysis of the Synaptic Depression Underlying Habituation of the Gill-Withdrawal Reflex in *Aplysia*. *PNAS*.
- Liu, P. &. (1988). Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris Water Maze. *Behavioral Neuroscience*, 304-315.
- Machin, P. V. (2002). Neurotoxic lesions of the rat perirhinal cortex fail to disrupt the acquisition of performance of tests of allocentric spatial memory. *Behavioral Neuroscience*, 232-240.
- Marjorie Goldman, S. S. (1979). Matching-to-sample and Oddity-from-sample in Goldfish. *JOURNAL OF THE EXPERIMENTAL ANALYSIS OF BEHAVIOR*, 8.
- Me´lissande Aellen, U. E. (2022). Cleaner wrasse *Labroides dimidiatus* perform above chance in "matching to sample" experiment. *Plos one*, 13.
- Michael Tomasello, J. C. (2003). Chimpanzees understand psychological states - the question is which ones and to what extent. *Elsevier*, 4.

- Miletto Petrazzini, M. E. (2012). Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 443–449.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Elsevier*, 47-60.
- Morris, R. G. (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *The royal society*.
- Olton, D. S. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*.
- Robert S Astur, J. T. (2004). Sex differences and correlations in a virtual Morris water task, a virtual radial arm maze, and mental rotation. *Elsevier*.
- Schaller, A. (1926). Sinnesphysiologische und psychologische Untersuchungen an Wasserkäfern und Fischen. *Physiologie*, 370–464.
- Solal Blocha, C. F. (2019). Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. *Elsevier*, 13.
- Sophie Marchal, O. B. (2016). Rigorous Training of Dogs Leads to High Accuracy in Human Scent Matching-To-Sample Performance. *Plos one*, 13.
- Stefanie Gierszewski, H. B. (2013). Cognitive Abilities in Malawi Cichlids (*Pseudotropheus* sp.): Matching-to-Sample and Image/Mirror-Image Discriminations. *PLOS ONE*.
- Thomas R Zentall, A. P. (2015). Delayed matching-to-sample: A tool to assess memory and other cognitive processes in pigeons. *Elsevier*.
- Tu, H.-W. &. (2013). One-trial memory and habit contribute independently to matching-to-sample performance in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of Comparative Psychology*, 319–328.
- Tyrone Lucon-Xiccato, K. M. (2018). Guppies learn faster to discriminate between red and yellow than between two shapes. *Wiley, ethology*, 10.
- Tyrone Lucon-Xiccato, M. D. (2014). Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Elsevier*, 1-4.