



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale (DPG)

Corso di laurea triennale in

Scienze Psicologiche Cognitive e Psicobiologiche

Tesi di Laurea Triennale

Delayed Matching to Sample per lo studio della cognizione in *Poecilia reticulata*

Delayed Matching to Sample as a tool to investigate cognition in guppies

Relatore

Prof. Marco Dadda

Correlatrice

Dott.ssa Gabriela Gjinaj

Laureanda: Josephyne Cuda

Matricola: 2010991

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1.INTRODUZIONE

1.1 Perché studiare la cognizione animale?.....	1
1.2 Perché usare i pesci come animale modello per la memoria?.....	1
1.3 Matching to sample e Delayed matching to sample.....	2
1.4 Matching to sample e Delayed matching to sample nei pesci.....	2
1.5 Scopo dello studio.....	3

2.MATERIALI E METODI

2.1 Specie.....	3
2.2 Soggetti sperimentali.....	4
2.3 Apparato sperimentale.....	4
2.4 Stimoli sperimentali.....	4
2.5 Procedura sperimentale.....	5
2.5.1 Familiarizzazione.....	5
2.5.2 Training	5
2.5.3 Test.....	5
2.6 Analisi statistiche.....	6
2.7 Risultati.....	7

3. DISCUSSIONE.....	9
---------------------	---

4. BIBLIOGRAFIA.....	9
----------------------	---

1. INTRODUZIONE

1.1 Perché studiare la cognizione animale?

La cognizione è per definizione l'elaborazione adattiva di informazioni esterne (stimoli percepiti attraverso i vari sensi) e interne (sia informazioni apprese in precedenza che istinti naturali) al fine di attuare azioni appropriate alla situazione e all'ambiente [1].

Questa definizione amplia la nostra visione di cosa voglia dire cognizione. Ci permette di riconoscere come animale modello della cognizione umana anche la semplice *Aplysia Californica* lumaca marina studiata da Kandel [2] per il suo sistema nervoso relativamente semplice che ci ha dato prova schiacciante dell'apprendimento sinaptico e del suo funzionamento. Esempio lampante di come studiare un organismo più semplice può portare a scoperte eccezionali. Ma non solo anche lo studio di meccanismi fisiologicamente più complessi come la lateralizzazione emisferica [3] e l'interazione sociale [4] possono giovare dall'uso di animali ectotermi come modello

Vedendo in questo modo il concetto di cognizione abbiamo l'opportunità di aprire la strada a nuovi territori e sfruttare non pochi vantaggi dello studio sugli animali, i più importanti tra questi la praticità: (possiamo avere relativamente facile accesso a una corposa popolazione di topi o di zebrafish piuttosto che di umani, il loro ciclo vitale più veloce ci permette di compiere studi sperimentali che durano tutta una vita, e molto spesso i paradigmi sperimentali a cui sottoponiamo gli animali, anche se accuratamente studiati per essere il più possibile morali, comunque sono eticamente inaccettabili da sottoporre a esseri umani).

Un altro fondamentale vantaggio dello studio sugli animali è una sua conseguenza: la creazione di nuovi paradigmi sperimentali per lo studio della cognizione non verbale (fondamentale non solo per esplorare la mente nell'età dello sviluppo, e a seguito di una lesione, ma anche per investigare al meglio tutti quei processi neurali che non possiamo studiare con l'aiuto del linguaggio).

1.2 Perché usare i pesci come animale modello per la memoria?

Potrebbero sorgere ancora dei dubbi riguardo l'uso di animali così filogeneticamente lontani da noi, le domande sembrano infinite: i pesci sono capaci di imparare? Hanno l'abilità di ricordare? Sono influenzati dall'apprendimento come noi? Ci sono due esperimenti che sarà allora saggio presentare prima di continuare con la nostra ricerca: la prova di cambiamenti plastici a livello cerebrale nella *Poecilia reticulata* a seguito di ambiente arricchito e l'apprendimento di un labirinto sempre nella poecilia.

Come è stato già provato nei topi [5] training in un ambiente arricchito porta a cambiamenti morfologici nel cervello sia anatomici che chimici, ma lo stesso avviene nei pesci? Nello studio di Fong e Buechel [6] si osserva proprio questo. Le scienziate hanno sottoposto delle poecilie a due procedure: reversal learning e apprendimento spaziale. Dopo 40 giorni di esperimento entrambi i gruppi in training avevano raggiunto il learning criterion nel reversal learning ($82 \pm 0.8\%$ di performance) e nell'apprendimento spaziale dove i soggetti compivano significativamente meno errori. In seguito ai 40 giorni il cervello dei soggetti è stato rimosso e le diverse aree misurate (da notare che le dimensioni del corpo dei soggetti non erano significativamente diversi tra i gruppi) si è trovato che anche se non c'erano cambiamenti significativi in nessuna area nei gruppi di reversal learning, nei gruppi sottoposti a ambiente arricchito del gruppo spaziale il volume del tetto ottico (che è l'equivalente del collicolo superiore nei mammiferi [7]) era significativamente aumentato.

L'altro esperimento che può gettare luce sull'argomento è quello ideato da Tyrone Lucon-Xiccato e Angelo Bisazza [8]. Gli scienziati hanno sottoposto 32 poecilie femmine e 32 maschi a un labirinto a sei punti di giunzione a t consecutivi, dopo 30 prove nello spazio di 5 giorni i soggetti avevano imparato a navigare il labirinto e superavano l'80% di risposte corrette.

1.3 Matching-to-sample e delayed matching-to-sample

Una procedura estremamente fruttuosa per lo studio della cognizione animale e ormai usata in almeno 25 specie diverse [9] è il matching-to-sample. Questa procedura può essere "simultaneous" o "delayed". In entrambe le procedure vengono mostrati ai soggetti tre stimoli, il principale detto probe, un altro stimolo uguale al probe e infine un terzo stimolo diverso. Nel simultaneous gli stimoli vengono presentati tutti nello stesso momento e invece nel delayed viene presentato primo lo stimolo probe e dopo averlo rimosso e aver fatto passare un p' di tempo, i due secondi stimoli assieme. Con il matching to sample simultaneous si indaga la discriminazione tra stimoli, con il delayed matching-to-sample invece si indaga anche la memoria di lavoro e la sua durata nelle varie specie. Come hanno osservato nel 2015 Lind, Enquist e Ghirlanda con la loro metanalisi su più di 25 specie rivedendo 90 studi, la performance del matching-to-sample simultaneo è simile in tutte le specie tanto che gli scienziati si spingono ad affermare che molte (se non tutte) le specie di animali non umani sono capaci di superare questa procedura, ma è il delayed matching to sample che ci dà risultati interessanti; quando sottoposti a questa procedura infatti non tutti gli animali riescono a superarla con successo anche se il delay è di pochi secondi, ad esempio mentre le scimmie cappuccino possono superare la procedura e riconoscere lo stimolo uguale al probe dopo un delay di ben 4 minuti [10] i ratti non possono se il delay è più di 10 secondi [11]

1.4 Matching to sample e delayed matching-to-sample nei pesci

Negli anni sono stati effettuati un numero di studi sul matching-to-sample nei pesci, grazie ai vari vantaggi che offrono, per citarne qualcuno la rapidità di sviluppo e di riproduzione e la facilità nel controllare i fattori ambientali e creare diverse situazioni sperimentali, ma effettivamente cosa ci dicono questi studi sulla capacità di discriminazione e sulla memoria di lavoro di questi animali?

Partendo dal simultaneous matching-to-sample uno tra i primi studi fu quello di Marjorie Goldman and Sandra Shapiro [12] dove le due scienziate provarono che i pesci rossi (*Carrasius auratus*) possedevano la capacità di discriminare tra due stimoli e superavano la procedura sia in matching-to-sample che in oddity-from-sample, in quest'ultimo i soggetti dovevano selezionare lo stimolo diverso dal probe. In particolare, si è osservato che, dopo un addestramento di 70 giorni, i pesci iniziarono a rispondere correttamente il 50% delle volte, raggiungendo il 75% verso la fine dell'esperimento con alcuni individui che superavano l'85%.

Più avanti nel 2013 un altro studio [13] con soggetti i ciclidi del Malawi utilizzò la procedura del simultaneous matching-to-sample, ma i risultati non furono chiari come ci si potrebbe aspettare, i pesci erano capaci di apprendimento associativo, ma non raggiungevano il criterio di apprendimento per il simultaneous matching-to-sample in 40 sessioni, come previsto. In un lavoro recente, [14] è stato osservato che i pesci pulitori sono in grado di svolgere un compito di matching-to-sample simultaneo (4 su 6 soggetti raggiunsero il criterio di apprendimento).

Infine, in un recente studio di Bloch e Froc [15] sul delayed matching-to-sample è stato osservato che zebrafish adulti sono in grado di scegliere correttamente uno stimolo anche con un delay dalla presentazione del probe di 3-4 secondi.

1.5 Scopo dello studio

L'esperimento esposto in questo lavoro utilizza il delayed match-to-sample per studiare se i guppy (*Poecilia reticulata*) presentano l'abilità di memoria di lavoro come ne abbiamo parlato prima

2 MATERIALI E METODI

2.1 Specie

I soggetti che utilizzati per questo studio sono guppy (*Poecilia reticulata*) sono pesci nativi del Sud America specificatamente del Venezuela, Guyana e Brasile settentrionale, ma oggi diffusi nella maggior parte dei corsi d'acqua tropicali e subtropicali, capaci di sopportare vari gradi di salinità e temperature tra i 18 e i 28 gradi [16]. Tipicamente in natura si nutrono di larve di insetti acquatici, alghe bentoniche e piccoli invertebrati [17].

La specie presenta profondo dimorfismo sessuale, le femmine misurano in media di soli 4,5 cm e può arrivare a 6 cm di lunghezza; mentre il maschio non supera i 3,5 cm. Per quanto riguarda la colorazione (Fig 1): le femmine sono tendenti al grigio e al giallo, mentre i maschi presentano una ricca e varia selezione di colori nelle pinne caudale e dorsale dovuta alla costante selezione sessuale da parte delle femmine sempre alla ricerca di pattern nuovi e rari, favorendo in particolare disegni arancioni (che dimostrano una dieta ricca di beta-carotenoidi e quindi una maggiore abilità nel foraggiare) e blu (che sono cospicui nel loro habitat e quindi dimostrano una migliore capacità nel fuggire ai predatori) [18]



Fig.1 Maschio (sopra) e femmina (sotto) di Poecilia

Il sistema d'accoppiamento nei guppy è poliandrico ovvero le femmine si riproducono con diversi maschi [19] anche se possono conservare lo sperma di un maschio per svariato tempo, questo perché i maschi usano un corteggiamento assiduo ovvero cercano di riprodursi con più femmine senza una selezione, mentre quest'ultime (dato il loro alto costo riproduttivo) cercano di riprodursi con un solo maschio alla volta

La specie è ovovivipara, le femmine dopo quattro o sei settimane dalla fecondazione danno alla luce un numero variabile di avannotti (più la femmina è grande, maggiore sarà il numero di avannotti). I piccoli nascono già indipendenti, tendono a formare banchi per sfuggire al meglio ai predatori e la maturità sessuale viene raggiunta nelle femmine tra le 10-20 settimane e nei maschi a 7

2.2 Soggetti sperimentali

Per questo esperimento sono stati utilizzati 5 soggetti naive.

Prima dell'esperimento tutti i soggetti sono stati mantenuti negli acquari di stabulazione del laboratorio insieme al resto degli esemplari, le vasche sono predisposte per la sopravvivenza e la riproduzione dei guppy con un volume di 450 litri e una temperatura costantemente mantenuta a 26 ± 0,2° C condizione a cui sappiamo che le pecilie prosperano. Le vasche sono illuminate da lampade a fluorescenza (58 watt) ad accensione programmata (dalle 7:30 alle 19:30) e la sanità dell'acqua è garantita da un filtraggio biologico e meccanico. Le vasche sono arricchite da un fondo di ghiaio di 2 cm in cui alloggiavano varie piante acquatiche e muschio verde al fine di simulare il più accuratamente possibile l'ambiente naturale dell'animale. I pesci vengono nutriti due volte al giorno, al mattino con mangime secco a scaglie (GVG) e al pomeriggio con naupli di *Artemia salina*.

2.3 Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale consisteva in una vasca rettangolare in vetro di 20x30x50 cm (Fig. 2) rivestita all'esterno interamente di polioplak verde con lo scopo di evitare interferenze provenienti dall'esterno. Ogni vasca è stata riempita con 28 litri, costantemente mantenuta a 26 ± 0,2° C. Nel fondo sono stati cosparsi circa 2 cm di ghiaio per acquari. L'illuminazione era garantita da lampade neon (30w) sistemate in corrispondenza del centro della vasca. Al di sopra delle lampade sono state posizionate delle camere digitali per registrare il comportamento dei soggetti.

Internamente, nei lati lunghi della vasca, sono state inserite due strutture trapezoidali di plexiglass trasparente (8,5 x 28 cm) con un passaggio al centro di 4,5 x 8 cm. Nelle pareti corte della vasca sono state inserite due piastre bianche coperte da una rete verde (14 x 12 cm). In particolare, sono state posizionate sopra lo strato di ghiaia immediatamente sotto a dove venivano posizionate le bacchette con gli stimoli, la funzione delle piastre è quella di delimitare l'area di scelta degli stimoli.

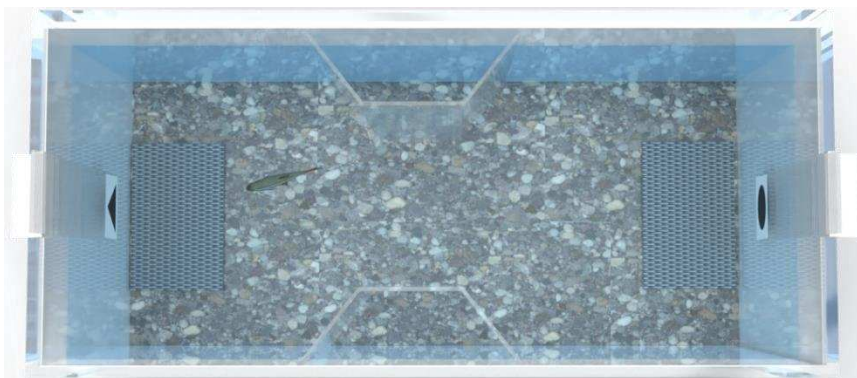


FIG 2: Apparato sperimentale

2.4 Stimoli sperimentali

Sono stati utilizzati in totale 12 stimoli tutti figure geometriche complesse e presentati sotto forma di tessere plastificate (5,5 x 5,5 cm; Fig. 3).

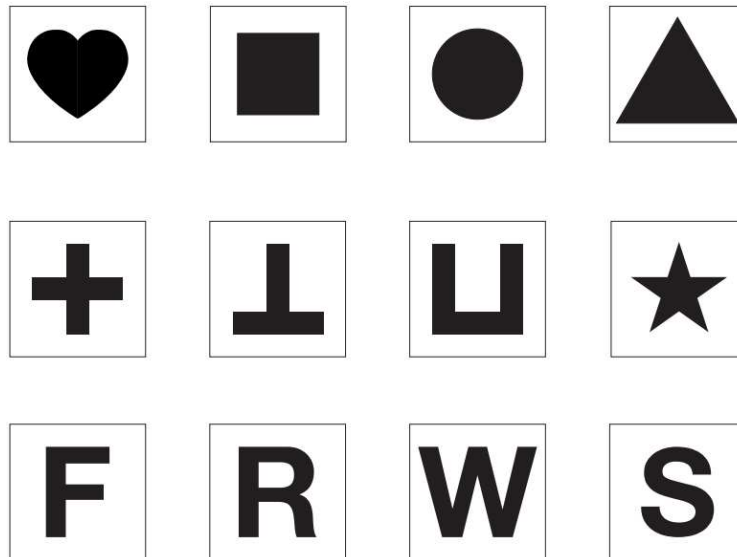


Fig. 3: Stimoli sperimentali

Gli stimoli venivano presentati attraverso l'ausilio di una bacchetta di plexiglass (33 x 5 cm). In particolare, venivano inseriti all'interno di una tasca di acetato trasparente posizionato all'estremità della bacchetta. Mentre il probe veniva presentato su una bacchetta che differiva solamente per il materiale utilizzato (poliplak verde).

2.5 Procedura sperimentale

2.5.1 Familiarizzazione:

Della durata di due giorni, consiste nella fase iniziale avente la finalità di abituare i soggetti al nuovo ambiente. Ogni soggetto veniva inserito singolarmente in ciascuna delle vasche sperimentali.

2.5.2 Training

Dopo questa prima fase, ha inizio l'esperimento, articolato in due diverse fasi che venivano ripetute 3 volte. In particolare, c'è una prima fase di training (7 giorni) seguita da una fase di test (2 giorni). Alla fine di tutto l'esperimento, si ha un totale di 21 giorni di training e 6 giorni di test.

Nei giorni di training venivano effettuate in totale 4 prove con una pausa di almeno 90 minuti tra di esse. In ciascuna prova le bacchette con lo stimolo probe venivano simultaneamente abbassate nella vasca sulle pareti corte e lasciate per un minuto (fase di esposizione). Successivamente, subito dopo aver rimosso le bacchette con il probe, venivano inserite due bacchette di plexiglas dove erano inseriti una coppia di stimoli diversi tra loro, ma di cui uno uguale al probe. In prossimità dello stimolo uguale al probe, veniva rilasciato il rinforzo alimentare, costituito da una piccola quantità di Artemia salina. Queste ultime bacchette venivano lasciate nella vasca per 7 minuti prima di essere rimosse.

2.5.3 Test

Durante le giornate di test si effettuavano tre prove di addestramento e due prove di test. Le prove di test erano del tutto simili alle prove di addestramento, ma differivano per la presenza del rinforzo. In

particolare, durante le prove di test, dopo aver inserito le bacchette di plexiglass contenenti gli stimoli differenti, non veniva rilasciato alcun rinforzo in prossimità dello stimolo uguale al probe.

Le prove di test sono state alternate alle prove di training al fine di evitare l'estinzione dell'apprendimento. Infatti, la giornata iniziava con una prova di addestramento, una seconda prova di test, una terza prova di addestramento, una quarta prova di test ed infine una quinta prova di addestramento

Tutte le prove di test venivano registrate al fine di analizzare il comportamento dei soggetti.

2.6 Analisi statistiche

Per le analisi statistiche, è stato utilizzato il programma statistico RStudio, versione 4.3.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.rproject.org>). Al fine di avere una misura di tempo nelle due aree di scelta, sono state analizzate le registrazioni durante le prove di test attraverso il programma Ciclic Timer (Ver. 1.3). In particolare, la variabile dipendente utilizzata è la proporzione di tempo trascorso vicino allo stimolo simile al probe. Per calcolarlo, è stato diviso il tempo nell'area corretta con la somma tra il tempo nell'area corretta ed il tempo nell'area sbagliata.

Per verificare la presenza di un apprendimento, è stato condotto un t-test a campione unico e per valutare se variabili come il passare dei minuti e i tre cicli (della fase di training e di test) hanno influito sulla performance, è stato creato un modello (LMM, funzione 'lmer' del pacchetto R 'lme4') dove è stato inserito come fattore random l'ID del soggetto, mentre minuti e cicli sono stati inseriti come fattori fissi.

Il campione finale è costituito da 5 soggetti, di questi, un soggetto non ha completato le ultime due giornate di test; quindi, i dati di quest'ultimo saranno basati su 8 prove di test su un totale di 12.

2.7 Risultati

Andando a considerare la percentuale di tempo spesa nelle due aree di scelta durante le giornate di test, globalmente i soggetti trascorrono il $49,79\% \pm 1,59$ (media \pm sd) di tempo nell'area con lo stimolo corretto. In media, la performance dei soggetti risulta essere normalmente distribuita (test di Shapiro-Wilk, $W=0.851$, $p\text{-value}=0.198$) e non risulta essere differente dal caso (t-test a campione unico, $t_4 = -0.30029$, $p = 0.779$; Fig. 4).

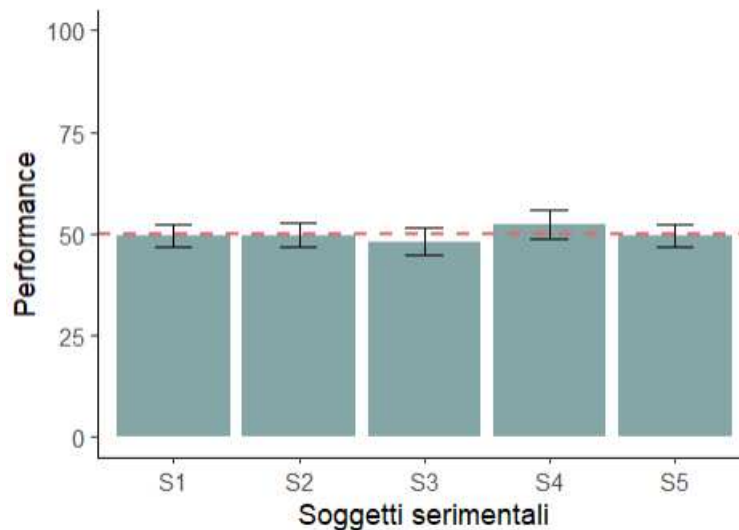


Fig. 4 Performance dei soggetti

Inoltre, dai dati emerge esserci un effetto significativo dei cicli ($F_{2,388} = 4.8734$, $p = 0.008$), ma non un effetto del passare dei minuti entro ciascuna prova test ($F_{1,388} = 0.7355$, $p = 0.391$; Fig. 5).

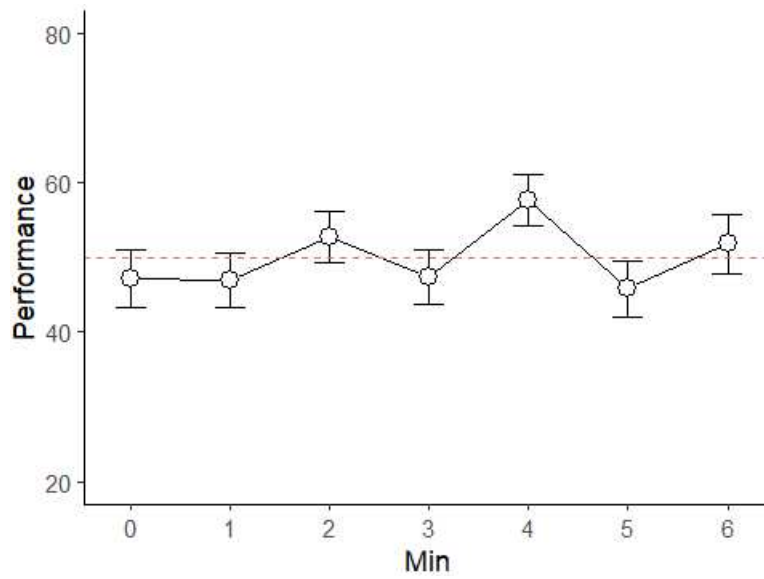


Fig. 5: Effetto dei minuti sulla performance

Più nel dettaglio, conducendo un test post hoc di Tukey, si osserva che andando a confrontare il primo ciclo con il secondo, ed il primo ciclo con il terzo ed ultimo ciclo, vi è una differenza significativa (in entrambi i casi $p < 0.022$). Questo risultato ci indica come i cicli successivi al primo, influiscono negativamente sulla performance dei soggetti.

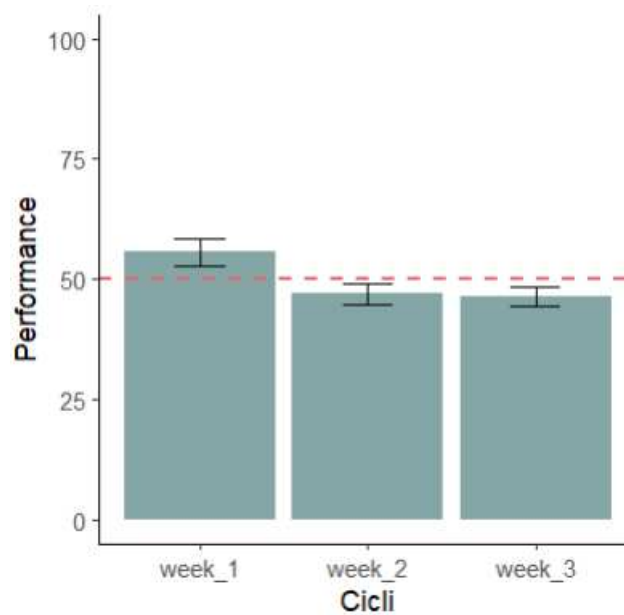


Fig. 6 : Effetto dei cicli sulla performance

3. Discussione

Il Delayed Matching to sample è largamente usato come procedura per lo studio della cognizione animale e della memoria di lavoro, che negli ultimi anni si sta facendo largo anche nello studio dei teleostei, con, come abbiamo visto in precedenza, buoni risultati.

Nella *Poecilia reticulata* in particolare questo è il primo esperimento che utilizza questo metodo d'indagine per studiare la memoria di lavoro e comprendere se questa specie ha la capacità di non solo ricordare la differenza tra due stimoli per un breve periodo di tempo, ma anche di utilizzare questa conoscenza in un compito a scelta

Questo esperimento fa inoltre parte di un progetto più ampio, che mira a testare la performance di apprendimento della *Poecilia reticulata* per stimoli che differiscono per una sola caratteristica oppure per diverse caratteristiche. Un esperimento precedente a questo ha avuto successo nel testare la memoria di lavoro per i colori nei guppies, mentre in questo esperimento si è testata con forme geometriche

Con le analisi delle prove dei giorni di test in questo esperimento si è potuto riscontrare che i soggetti non passano la maggior parte del tempo vicino allo stimolo corretto e anzi la performance peggiora significativamente con l'avanzare delle giornate

Grazie a questi risultati abbiamo ora una visione più chiara dell'abilità di memoria di lavoro della *Poecilia reticulata*, possiamo andare avanti nello studio di questo animale e dei teleostei in generale e con il tempo arricchire la nostra conoscenza riguardo le abilità degli animali privi di corteccia cerebrale.

4. Bibliografia

- [1] Shettleworth Sarah J. (2000). Modularity and the evolution of cognition. *The Evolution of Cognition*. MIT Press; Cambridge. pp. 43–60
- [2] Kandel, V. F. (1974). A Quantal Analysis of the Synaptic Depression Underlying Habituation of the Gill-Withdrawal Reflex in *Aplysia*. PNAS.
- [3] Vallortigara, L.J Rogers, A Bisazza. (1999). Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization. Volume 30, Issue 2, pp 164-175
- [4] Milinski Manfred. (1987). TIT FOR TAT in sticklebacks and the evolution of cooperation. *Nature* 325, pp. 433–435
- [5] Diamond, M. C., Krech, D., & Rosenzweig, M. R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 123(1), 111-119.
- [6] Fong, S., Buechel, S. D., Boussard, A., Kotrschal, A., & Kolm, N. (2019). Plastic changes in brain morphology in relation to learning and environmental enrichment in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Journal of Experimental Biology*, 222(10), jeb200402.
- [7] Zaichikova, A. A., Damjanović, I., Maximov, P. V., Aliper, A. T., & Maximova, E. M. (2021). Neurons in the optic tectum of fish: Electrical activity and selection of appropriate stimulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 51, 993-1001.

- [8] Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2017). Complex maze learning by fish. *Animal Behaviour*, 125, 69-75.
- [9] Lind, J., Enquist, M., & Ghirlanda, S. (2015). Animal memory: A review of delayed matching-to-sample data. *Behavioural processes*, 117, 52-58.
- [10] D'Amato, M. R., & Worsham, R. W. (1972). Delayed matching in the capuchin monkey with brief sample durations. *Learning and Motivation*, 3(3), 304-312.
- [11] Medin, D., Roberts, W., & Davis, R. (2014). *Processes of Animal Memory (PLE: Memory)*. Psychology Press.
- [12] Goldman, M., & Shapiro, S. (1979). MATCHING-TO-SAMPLE AND ODDITY-FROM-SAMPLE IN GOLDFISH 1. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 31(2), 259-266.
- [13] Gierszewski, S., Bleckmann, H., & Schluessel, V. (2013). Cognitive abilities in Malawi cichlids (*Pseudotropheus* sp.): matching-to-sample and image/mirror-image discriminations. *PLoS One*, 8(2), e57363.
- [14] Aellen, M., Siebeck, U. E., & Bshary, R. (2022). Cleaner wrasse *Labroides dimidiatus* perform above chance in a “matching-to-sample” experiment. *PLoS one*, 17(1), e0262351
- [15] Bloch, S., Froc, C., Pontiggia, A., & Yamamoto, K. (2019). Existence of working memory in teleosts: Establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. *Behavioural brain research*, 370, 111924.
- [16] Chervinski, J. (1984). Salinity tolerance of young catfish, *Clarias lazera* (Burchell). *Journal of fish biology*, 25(2), 147-149.
- [17] Dussault, G. V., & Kramer, D. L. (1981). Food and feeding behavior of the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 59(4), 684-701.
- [18] Kottler, V. A., Koch, I., Flötenmeyer, M., Hashimoto, H., Weigel, D., & Dreyer, C. (2014). Multiple pigment cell types contribute to the black, blue, and orange ornaments of male guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS one*, 9(1), e85647.
- [19] Barbosa, M., & Magurran, A. E. (2011). Evidence of female-promoted polyandry in Trinidadian guppies. *Environmental biology of fishes*, 90, 95-102.