



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della
Socializzazione**

Corso di laurea in Scienze e Tecniche Psicologiche

Tesi di laurea

**Sviluppo di una nuova metodologia per lo
studio della cognizione numerica in stadi
precoci di sviluppo di zebrafish**

**Development of a new procedure to investigate numerical
cognition in zebrafish larvae**

Relatore

Prof. Marco Dadda

Laureanda:

Stefania

Lucerna

Matricola:

1230334

Anno Accademico 2021/2022

Indice

I.	Introduzione.....	5
	1.1 Gli animali e la ricerca psicologica.....	5
	1.2 Gli animali e la cognizione numerica.....	6
	1.3 I pesci e la discriminazione numerica.....	7
	1.4 Lo zebrafish e la discriminazione numerica.....	8
II.	Scopo dello studio.....	9
III.	Biologia della specie.....	10
IV.	Materiali e metodi.....	13
	4.1 Soggetti sperimentali.....	13
	4.2 Apparato sperimentale.....	14
	4.3 Procedura e stimoli sperimentali.....	16
	4.4 Analisi dei dati.....	18
V.	Risultati.....	19
VI.	Discussione.....	21

Bibliografia

1. Introduzione

1.1 Gli animali e la ricerca psicologica

Gran parte delle scoperte e dei progressi ottenuti in psicologia sono dovuti alle varie ricerche ed esperimenti sugli animali effettuati nel corso degli ultimi decenni. Tra i più famosi si citano gli esperimenti sul condizionamento di Pavlov, l'esperimento di Martin Seligman sull'Impotenza Appresa, quello della "madre surrogata" di Harlow e quello della Skinner Box. Questi esperimenti sono stati eseguiti con mammiferi come cani, topi e scimmie, ma non sono pochi e meno importanti gli esperimenti eseguiti con i pesci. Alcune ricerche interessanti che dimostrano quanto questi animali siano utili e fondamentali per il progresso nella ricerca psicologica sono ad esempio quella di Alex Jordan e colleghi con il pesce pulitore (*Labroides Dimidiatus*) che dimostra come questa specie sia in grado di riconoscersi allo specchio (Alex L. Jordan et al., 2021), ma anche le molte ricerche effettuate con lo zebrafish (*Danio Rerio*), una specie con un sistema nervoso piuttosto elementare, ma facilmente osservabile attraverso metodi di imaging cerebrale a causa della trasparenza delle larve di questo pesce. Le teorie e le ipotesi che si possono verificare, indagare, approfondire e scoprire attraverso queste ricerche ed esperimenti sono innumerevoli, tra cui la capacità di cognizione numerica di cui questo lavoro si prefigge di discutere.

1.2 Gli animali e la cognizione numerica

Molti studi effettuati su diversi animali hanno portato alla luce il fatto che il giudizio numerico non sia un'abilità esclusivamente umana; infatti, alcuni tipi di abilità numeriche negli animali sono funzionali e spesso fondamentali per la difesa del territorio e dai predatori, per la ricerca alimentare e per attuare strategie sociali efficaci. Ad esempio i branchi di iena (*Crocuta crocuta*) valutano se attaccare o meno i branchi rivali stimandone la numerosità a partire dai loro richiami (Benson-Amram, Heinen, Dryer & Holekamp, 2011). Anche gli scimpanzé attuano un comportamento simile, infatti gli adulti intraprendono uno scontro con i rivali solo se in superiorità numerica di un fattore di proporzione 1,5 (Wilson, Britton & Franks, 2002). Oltre all'osservazione numerica sono stati sviluppati altri paradigmi utilizzati in laboratorio per capire quali strategie di cognizione numerica vengano attuate dai soggetti e in che modo. Una procedura utilizzata è quella del training che si fonda sul paradigma di condizionamento operante, per cui il comportamento dei soggetti viene rinforzato attraverso una ricompensa positiva (solitamente cibo) in corrispondenza di stimoli non naturali; successivamente, in una fase di test, si verifica se i soggetti hanno appreso il criterio di apprendimento. Così come per le iene e gli scimpanzé, più in generale, sembra che gli animali riescano a distinguere più facilmente piccole quantità rispetto alle grandi numerosità e che utilizzino per ciascun gruppo sistemi non verbali diversi.

1.2 I pesci e la discriminazione numerica

A partire dagli anni 2000 c'è stato un considerevole aumento di studi che utilizzano i pesci come modello animale: essi infatti, rispetto ad altre specie, sono molto utili e pratici per condurre esperimenti sulle abilità cognitive in quanto si adattano molto facilmente alla vita in cattività e si riproducono e sviluppano più velocemente rispetto a qualsiasi altro vertebrato. In particolare la capacità di discriminazione numerica nei pesci può essere molto utile nella difesa contro i predatori quando devono scegliere con che gruppo di conspecifici nuotare: la grandezza dello *shoal* di appartenenza è inversamente proporzionale alla probabilità di essere predati. Per capire meglio il meccanismo che sta dietro a questa tendenza a stare in grandi *shoal*, è stato condotto un esperimento che prevede l'utilizzo di adulti femmina di gambusia (*Gambusia affinis*): queste sono in grado di distinguere confronti come 1vs2, 2vs3 e 3vs4, ma falliscono con stimoli di tipo 5vs6, 6vs7 e 7vs8, mentre per le grandi numerosità riescono a discriminare fino a 4vs8 e 4vs10 conspecifici (quindi quando c'è un confronto tra quantità molto diverse) (Agrillo, Dadda, Serena & Bisazza, 2008). In una versione successiva di questo esperimento (Agrillo, Piffer & Bisazza, 2011) si è osservato (sempre utilizzando la gambusia come soggetto) come la velocità nell'apprendere un confronto di tipo 2vs3 sia maggiore se si mettevano a disposizione fonti di informazione di variabili continue e discrete. Degli studi effettuati con una serie di pesci teolostei, tra cui la Goodeide dalla coda rossa (*Xenotoca eiseni*), il pesce angelo (*Pterophyllum scalare*), il pesce combattente (*Betta splendens*), lo zebrafish (*Danio rerio*) e il guppy (*Poecilia reticulata*), hanno dimostrato che queste specie

sono in grado di discriminare confronti di tipo 5vs10 e 6vs12 elementi e che le prime tre riescono a generalizzare la regola anche in un confronto 2vs4 (Agrillo, Miletto, Petrazzini, Tagliapietra & Bisazza, 2012).

1.3 Lo zebrafish e la discriminazione numerica

Lo zebrafish è stato considerato molto spesso negli studi sulle abilità di cognizione numerica nei pesci per vari motivi: il suo genoma è totalmente sequenziato, per cui indagare sull'ontogenesi delle sue abilità numeriche può rivelarsi utile anche per altre ricerche interdisciplinari; inoltre, lo zebrafish è un animale sociale e si è visto come tenda a preferire lo *shoal* più grande, anche se il suo limite arriva ad un confronto di tipo 8vs4 oltre il quale la sua scelta non è più significativa (Seguin & Gerlai, 2017). In altri esperimenti condotti in laboratorio si è osservato come lo zebrafish sia in grado di discriminare confronti fino a 6vs7 item se presente un paradigma di condizionamento operante; la performance rimane costante fino a stimoli di 3vs4 per poi decrescere gradualmente pur rimanendo significativa per l'apprendimento della regola (Bisazza & Santacà, 2022). Esistono molti studi effettuati con soggetti adulti o giovani di zebrafish, ma ancora pochi sono quelli che coinvolgono le larve, ovvero che indagano l'ontogenesi delle capacità di discriminazione numerica in questa specie, per capire se siano innate o acquisite. Da recenti studi si è osservato come larve già a 14dpf (*days post fertilization*) possiedano capacità di discriminazione abbastanza sofisticate, infatti queste abilità sono molto utili soprattutto in giovane età per imparare a riconoscere stimoli biologicamente rilevanti. In un altro esperimento attuato con paradigma di condizionamento operante, si è dimostrato come larve di

zebrafish siano in grado di discriminare colori, orientamento di pattern e forma degli stimoli presentati già a 8dpf (Santacà, Dadda, Dalla Valle, Fontana, Gjinaj & Bisazza, 2022). Quest'ultima scoperta costituisce una valida base da cui partire per investigare le abilità numeriche in larve ancora più giovani.

2. Scopo dello studio

Nel capitolo precedente si è visto come le abilità di cognizione e discriminazione numerica presenti in molti animali siano molto utili per la loro sopravvivenza nei rispettivi habitat naturali, ma anche per la ricerca. Infatti, per l'esperimento descritto in questo lavoro, è stato selezionato come oggetto di studio lo zebrafish proprio perché si è rivelata una specie molto promettente per effettuare un'indagine sulla cognizione numerica nei pesci. Cospicua è la produzione letteraria su studi effettuati con esemplari adulti, tuttavia si sa ancora poco sulla capacità di discriminazione numerica delle larve, ovvero sulla sua ontogenesi. Nell'esperimento che verrà in seguito descritto, si è investigata la capacità di cognizione numerica in larve di *Danio Rerio* a partire da 4dpf attraverso una prima fase di training di gruppo seguita da una fase di test individuale effettuata attraverso un paradigma di condizionamento operante. I soggetti sono stati esposti a due tipi di stimoli che consistevano in confronti numerici diversi: 4vs12 e 6vs12. In particolare questi confronti sono stati considerati tenendo conto delle variabili continue di densità e area complessiva dello stimolo, in modo tale da avere la certezza che le larve apprendessero solo l'informazione numerica e non fossero influenzate da altre variabili (come la grandezza o la posizione degli stimoli).

3. Biologia della specie

Il “Danio Rerio” (Hamilton, 1882), noto con il nome più comune di “Zebrafish”, è un tipo di pesce appartenente alla categoria dei teolostei d’acqua dolce e facente parte della famiglia dei Cyprinidae. La sua presenza è stata riscontrata nei fiumi Gange e



Figura 1: Femmina (in alto) e maschio (in basso) di zebrafish

Brahmaputra, nella parte nord orientale dell’India, ma anche in Bangladesh e in Nepal. Tuttavia alcune ricerche fanno pensare che sia diffuso in tutto il subcontinente indiano (Spence, Gerlach, Lawrence e Smith, 2008). In alcuni studi si è osservato come preferisca vivere in acque limpide e relativamente tiepide, come tratti di fiume a corso lento e pozze d’acqua poco mobili e profonde come le risaie (McClure, McIntyre e McCune, 2006). Questa specie è di taglia piccola e fusiforme, solitamente non supera i 40 mm di lunghezza, ed è caratterizzata dalla presenza di 5 o 7 strisce orizzontali di colore blu che vanno dall’opercolo alla pinna caudale, motivo per cui vengono comunemente chiamati zebrafish (Barman, 1991). È una specie onnivora e la sua dieta consiste principalmente di zooplancton e insetti acquatici e terrestri, ma alcune ricerche sull’analisi del contenuto dello stomaco di questi pesci (McClure et al., 2006) hanno rilevato la presenza di fitoplancton, alghe, spore e uova di invertebrati, aracnidi, sabbia e fango. Questo sta a dimostrare che, sebbene il loro sostentamento principale derivi dai plancton, si nutrano non solo nei vari livelli della

colonna d'acqua, ma anche in zone vicine alla superficie e al fondale. Lo zebrafish presenta un lieve dimorfismo sessuale (fig. 1) che consente di distinguere gli

esemplari maschi dalle femmine: il maschio ha una forma più affusolata e una pinna anale (fig. 2) più grande, mentre la femmina ha colori meno accesi e una

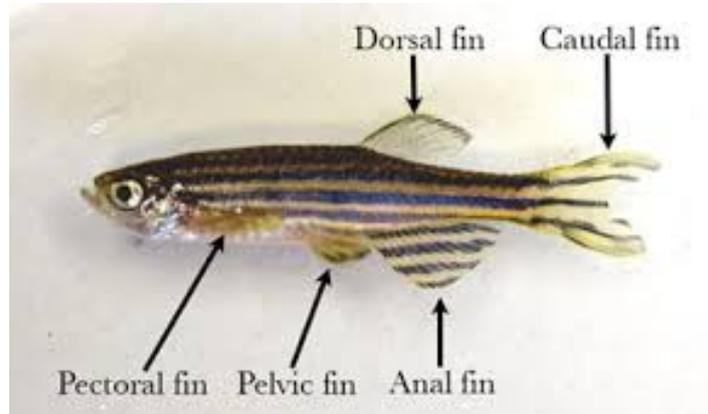


Figura 2: Nomenclatura delle pinne dello zebrafish

forma più arrotondata,

soprattutto durante il periodo riproduttivo e quando depone le uova (Laale, 1977; Spence et al., 2008). Le gonadi si sviluppano come ovaie sia nei maschi sia nelle femmine, infatti non è possibile decretare il sesso degli esemplari più giovani (se non tramite dissezione) prima di 5 o 7 settimane dopo la schiusa, periodo nel quale avviene la differenziazione sessuale (Maack & Segner, 2003). Il ciclo riproduttivo avviene durante il periodo dei monsoni (da giugno ad agosto) che rendono le acque adatte per temperatura e disponibilità di cibo; durante questo periodo, lo zebrafish è in grado di riprodursi frequentemente, ma a intervalli irregolari (Spence et al., 2008). Alcune ricerche sostengono che la fase di riproduzione sia influenzata dall'esposizione alla luce (solare o artificiale), cosa che porta a pensare che questa specie sia fotosensibile; infatti, i maschi che competono per l'appropriazione di un sito di deposizione diventano più aggressivi dopo un'ora di esposizione alla luce, anche se si tranquillizzano una volta terminato il momento riproduttivo (Laale, 1977). Il rilascio dello sperma e la deposizione delle uova si ripetono più volte durante il

periodo di riproduzione e le femmine rilasciano dalle 5 alle 20 uova per volta in intervalli di 1-2 giorni, fino ad arrivare a un massimo di circa 700 uova (Spence et al., 2008). Le uova di zebrafish hanno un diametro di circa 0,7 mm e solitamente vengono semplicemente depositate sul substrato, senza che esso sia preparato o protetto dai genitori, inoltre non c'è nessun tipo di cura parentale (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann & Schilling, 1995; Spence et al., 2008). Una volta espulse le uova e venute a contatto con l'acqua inizia lo sviluppo embrionale che, se è presente il seme maschile, porta le uova a diventare trasparenti, altrimenti lo sviluppo si arresta alle prime fasi di divisione cellulare e le uova diventano più bianche (Lee, Webb & Miller, 1999). A 36 ore dalla fecondazione cominciano a svilupparsi gli organi principali fino alla schiusa che avviene tra i 2 e i 3 giorni dopo la fecondazione. L'età delle larve si conta in DPF ovvero "Days Post Fertilization" quindi dal momento della loro fecondazione, non della schiusa (Kimmel et al., 1995). Una volta uscite dalle uova, le larve misurano circa 3 mm e si presentano come semitrasparenti, cosa che le rende particolarmente adatte per essere osservate e usate a livello sperimentale (Kimmel et al., 1995). Già tra il terzo e il quarto giorno dopo la fecondazione sono in grado di nuotare grazie al rigonfiamento della vescica natatoria. A 5dpf riescono anche a muovere la mascella, le pinne pettorali, gli occhi e possono mettere in atto comportamenti di ricerca del cibo ed evitamento dei predatori (Kimmel et al., 1995; Spence et al., 2008). Dopo quattro settimane la larve entrano nello stadio giovanile, uno "stadio intersessuale" durante il quale si sviluppano per tutti le ovaie, con seguente differenziazione nei due sessi dopo 5/7 settimane (Maack & Segner, 2003). La maturità sessuale avviene circa al terzo mese, ma, invece che dipendere dall'età, è più legata al raggiungimento di

specifiche dimensioni (24,9 mm per le femmine e 23,1 mm per i maschi) (Laale, 1977). La maturità sessuale segna la fine del loro sviluppo e il raggiungimento dell'età adulta (fig 3).

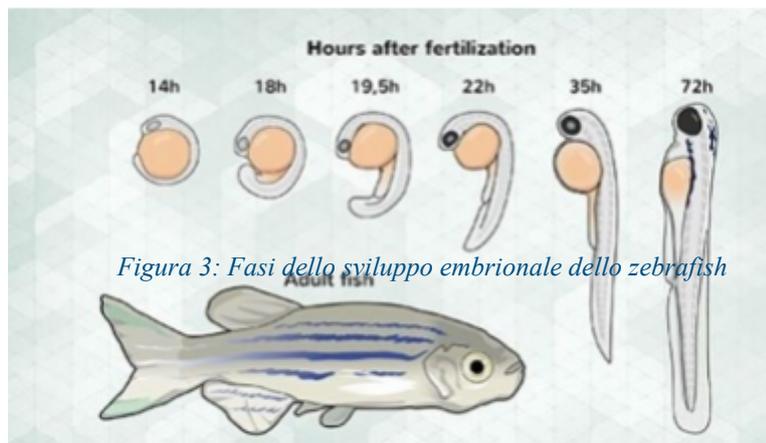


Figura 3: Fasi dello sviluppo embrionale dello zebrafish

4. Materiali e metodi

4.1 Soggetti sperimentali

I soggetti utilizzati per lo svolgimento di questo esperimento sono larve di zebrafish a 4dpf (ovvero larve in vita da quattro giorni dopo la fecondazione). Ogni soggetto è stato prelevato e allevato all'interno del laboratorio del Dipartimento di Psicologia Generale di Padova, dove si

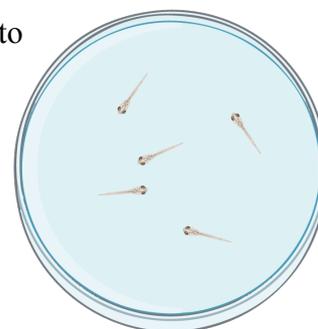


Figura 4: Prototipo di capsule petri con larve e soluzione Fish Water

sono svolti anche gli esperimenti. Questi hanno avuto luogo all'interno della stessa stanza in cui venivano

allevati i soggetti, che doveva essere mantenuta a una temperatura di $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e illuminata seguendo un ciclo luce-buio di 14-10 ore. Prima di prendere parte all'esperimento, le uova venivano conservate all'interno di capsule petri (fig. 4) riempite con una soluzione di Fish Water 1x (0.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM

Na₂HPO₄*H₂O, 1.5 gr Instant Ocean, 1 L H₂O deionizzata) e blu di metilene (0.0016gr/l), con una densità media di 50 uova per petri e distinte in ogni capsula in base al giorno in cui venivano raccolte. Una volta raggiunti i 4dpf, le larve sopravvissute venivano prelevate tramite pipette pasteur per iniziare l'esperimento vero e proprio (che durava 5 giorni) e venivano messe all'interno delle apposite vaschette. Durante lo svolgimento dell'esperimento venivano nutrite due volte al giorno con del cibo commerciale in polvere (la dimensione delle particelle era di 0,75 mm) e lasciate riposare durante la notte. Al termine dell'esperimento venivano messe in vaschette contenenti la stessa soluzione sopracitata e successivamente spostate in acquari più grandi.

4.2 Apparato sperimentale

Per questo esperimento sono stati utilizzati due tipi di apparati: uno per la prima fase svolta in gruppo e un altro per la fase individuale. Entrambi sono stati creati con una stampante 3D utilizzando acido polilattico (PLA) bianco.

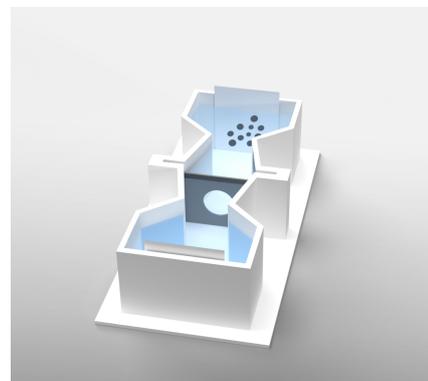


Figura 5: Apparato strumentale per la fase di gruppo (vaschetta a clessidra)

Il primo strumento consisteva in una vaschetta a forma di clessidra dalle dimensioni di 11,5 x 4 x 4.5 cm, con la parte centrale più stretta a formare un corridoio attraverso il quale le larve potevano passare da un lato all'altro (fig. 5). Nel mezzo veniva inserito un piccolo pannello di PLA grigio che divideva la vaschetta in due settori speculari, dotato di un foro grande circa 1,4 cm all'interno del quale le larve potevano

agevolmente passare (il secondo giorno di esperimento veniva sostituito da un pannello con un foro di 1,2 cm).



Figura 6: Apparato sperimentale per la fase individuale (vaschetta rettangolare)

Il secondo apparato consisteva in una vaschetta a forma rettangolare dalle dimensioni di 7 x 4 x 4 cm anch'essa divisa a metà in due settori tramite un pannello simile a quello usato per il primo strumento, dotato di un foro centrale di 1 cm (fig. 6). Ogni vaschetta veniva riempita con Fish Water 1x fino ad un'altezza di 3,5 cm (in modo che la superficie dell'acqua superasse l'altezza del foro di passaggio). Durante l'esperimento le vaschette venivano

messe all'interno di un box (mancante della parete superiore) dalle dimensioni di 60 x 27 x 40 cm, illuminato dall'alto da due lampade a LED da 0,72 W, posizionate a 27 cm dalla base in modo tale che potessero illuminare le vaschette in modo uniforme (fig. 7). L'intero esperimento veniva registrato tramite due telecamere posizionate sopra il box così da inquadrare dall'alto il box con dentro gli apparati. Ogni telecamera era in grado di riprendere un gruppo da 4 vaschette a clessidra e uno da 6 vaschette rettangolari per volta

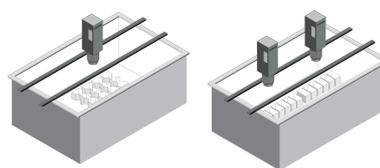


Figura 7: Disposizione delle telecamere e degli apparati nei box

4.3 Procedura e stimoli sperimentali

Gli stimoli utilizzati consistevano in cartoncini plastificati, grandi abbastanza da poter essere inseriti ai lati opposti delle vaschette. In ogni cartoncino erano presenti dei pallini neri ben visibili di diverse numerosità, disposizione e grandezza. In questo esperimento le condizioni sperimentali erano due: una con confronti numerici 4vs12 e un'altra con confronto 6vs12. In ogni condizione sperimentale venivano usate coppie di cartoncini, quindi nella prima condizione in ogni vaschetta veniva inserito da una parte lo stimolo con 4 pallini neri e dall'altra quello con 12, mentre nella seconda condizione da una parte lo stimolo aveva 6 pallini e dall'altra 12. Il numero degli stimoli a cui erano sottoposti i soggetti in un esperimento rimaneva uguale per tutti, mentre cambiavano grandezza e disposizione dei pallini neri per ciascun soggetto, in modo da non avere effetti di apprendimento legati a fattori percettivi, ma esclusivamente numerici. Per questo esperimento sono state realizzate 24 coppie di stimoli per ciascuna condizione, in modo da poter controllare variabili continue come l'area, la densità e contemporaneamente assicurarsi che l'apprendimento avvenisse solo per discriminazione numerica.

La procedura sperimentale è basata su un paradigma di condizionamento operante il cui rinforzo è costituito da una ricompensa in cibo. L'esperimento completo durava 6 giorni ed era suddiviso in varie fasi:

- FASE DI ABITUAZIONE, che iniziava la mattina e nella quale le larve a 4dpf venivano inserite nelle vasche a clessidra (già divise dal pannello forato di 1,4 cm) a gruppi di 30 soggetti ciascuna, senza inserire gli stimoli; il giorno successivo (a

- 5dpf) il pannello con foro da 1,4 cm veniva sostituito con uno di 1,2 cm facendo iniziare la fase successiva;
- FASE DI ADDESTRAMENTO (TRAINING) DI GRUPPO, che iniziava alle ore 9:00 del secondo giorno (5dpf) nel momento in cui venivano inseriti gli stimoli (4vs12 oppure 6vs12) e si faceva partire la registrazione delle telecamere che sarebbe durata 1h30m; allo scadere del tempo, alle 10:30, un gruppo veniva rinforzato (tramite la somministrazione del cibo nel lato della vaschetta contenente lo stimolo che si desiderava rinforzare) sullo stimolo minore (4 o 6), mentre un altro gruppo veniva rinforzato sul maggiore (12); dopo aver dato il rinforzo venivano spente le telecamere e lasciato il cibo per 1h30m; alle 12:00 venivano quindi tolti gli stimoli, pulite le vasche e inseriti altri stimoli, invertendo la posizione precedente (ad esempio, in una condizione 4vs12, se prima da un lato era stato messo il 4 ora si mette il 12 e viceversa) in modo tale che il rinforzo non venisse associato ad un settore specifico della vaschetta; dopo 1h30m si accendevano le telecamere (alle 13:30) e veniva registrata la sessione pomeridiana della giornata, al termine della quale veniva dato il rinforzo come nella sessione della mattina e spente le telecamere; alle 16:30 venivano, infine, rimossi tutti gli stimoli e pulite le vaschette;
 - FASE DI TEST (TRAINING) INDIVIDUALE, che durava dal terzo al sesto giorno di esperimento (quindi dai 6 ai 9dpf) nel quale ogni larva veniva prelevata e inserita in una vaschetta individuale rettangolare; lo svolgimento e le tempistiche sono identiche a quelle della fase di addestramento di gruppo e venivano ripetute ogni giorno alla stessa ora.

Alla fine di ogni giornata si avevano due registrazioni da 90 minuti ciascuna, una della mattina e una del pomeriggio, per un totale di 10 video che comprendevano il tempo trascorso dalle larve nelle vaschette con gli stimoli prima di ricevere il rinforzo. La variabile dipendente considerata è il tempo che ciascun soggetto passava all'interno del settore "giusto" con lo stimolo rinforzato, tenendo in considerazione il fatto che ogni soggetto, per essere considerato valido per l'esperimento, doveva effettuare almeno 10 passaggi da un settore all'altro in ogni giornata.

4.4 Analisi dei dati

Ogni trial sperimentale è stato videoregistrato e successivamente analizzato per ricavare il tempo trascorso dai soggetti nei due compartimenti dell'apparato. Attraverso l'analisi delle registrazioni è stato inoltre possibile ottenere il numero dei passaggi che ciascun soggetto attuava tra i due settori. I soggetti hanno svolto un totale di 10 trials: 2 durante la fase di gruppo e 8 durante la fase individuale.

Sono state testate 46 larve: 23 larve per il confronto numerico 4vs12 (di cui 12 rinforzate sulla numerosità 4 e 11 sulla numerosità 12); e 23 larve per il confronto 6vs12 (di cui 11 rinforzate sulla numerosità 6 e 12 sulla numerosità 12).

Le analisi statistiche sono state fatte utilizzando il software statistico SPSS.

Risultati

Durante i 4 giorni di osservazione sperimentale i soggetti si sono mossi in media 24.64 ± 30.3 volte (Media \pm Deviazione Standard) tra i due settori delle vasche. La proporzione di tempo che le larve hanno trascorso in prossimità dello stimolo rinforzato indipendentemente dal confronto (4vs12 o 6vs12) e dalla numerosità (maggiore o minore) rinforzata non è risultata statisticamente significativa ($47.02 \pm 14.37\%$, test t a campione unico, $t_{45} = 1.406$, $p = 0.166$). Quando si passa ad analizzare ciascuno dei quattro giorni di osservazione il test t rivela che solamente il giorno 4 è presente una preferenza marginalmente significativa nel sostare maggiormente nella porzione di apparato in corrispondenza dello stimolo non rinforzato ($43.15 \pm 23.60\%$, test t a campione unico, $t_{45} = 1.968$, $p = 0.055$). Un quadro simile si ottiene confrontando tra loro i due gruppi; non emergono differenze statisticamente significative considerando tutti e 4 i giorni (test t a campioni indipendenti, $t_{44} = 0.688$, $p = 0.495$) e i 4 giorni separatamente (tutti i valori $p > 0.527$, Figura 8).

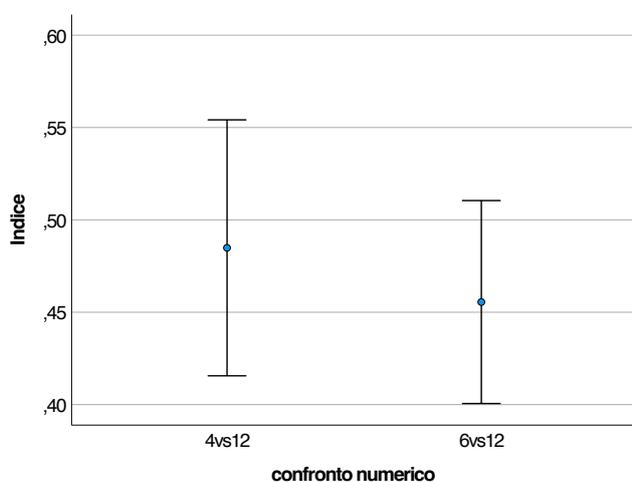


Figura 8: grafico relativo all'indice rispettivamente per i soggetti esposti al 4vs12 ed al 6vs12. Media e deviazione standard sono riportate

Allo scopo di verificare se ci fosse un effetto del trascorrere dei giorni è stata condotta un'analisi della varianza a misure ripetute in cui la variabile within subjects erano i quattro giorni di osservazione (giorni) mentre le variabili between subjects erano il confronto numerico e il rinforzo sulla numerosità maggiore o minore. L'analisi non evidenzia alcun effetto significativo della variabile giorni ($F(3,126)=1.165$, $p=0.326$), della variabile confronto numerico ($F(1,42)=0.362$, $p=0.550$) e della variabile rinforzo ($F(2,42)=1.405$, $p=0.257$, Figura 9). Nessuna delle interazioni di primo e secondo grado è risultata significativa indicando, quindi, che il comportamento dei soggetti non varia con il trascorrere dei giorni, che non è influenzato dal confronto numerico né dalla numerosità rinforzata.

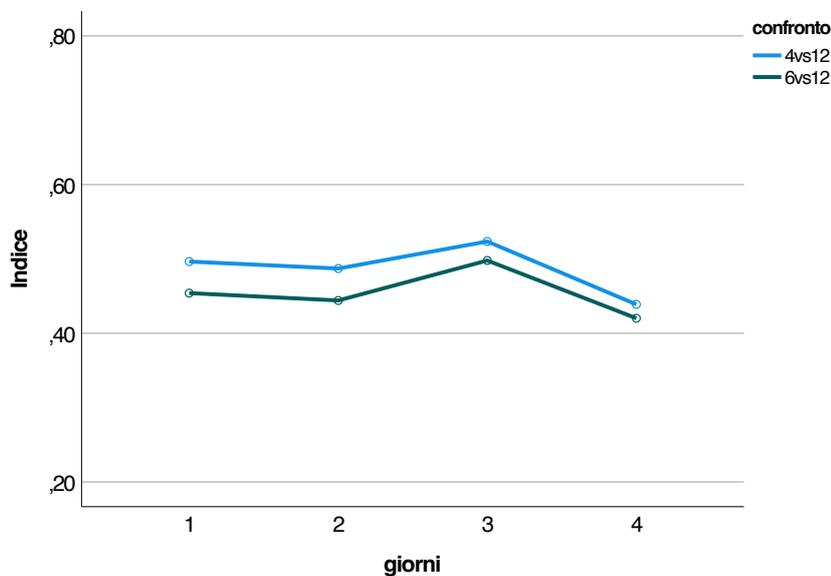


Figura 9: grafico relativo all'andamento durante i 4 giorni di osservazione rispettivamente per i soggetti esposti al 4vs12 ed al 6vs12.

Discussione

Lo scopo del presente lavoro era quello di valutare l'onset della discriminazione numerica in larve di zebrafish. L'assunto di base è che da osservazioni precedenti larve immerse nella procedura sperimentale a 6dpf mostrano di apprendere in pochi giorni i confronti numerici proposti. Dal punto di vista dello sviluppo non esistono ragioni che rendano strutturalmente più competenti le larve di 6dpf rispetto a larve con un'età inferiore. In particolare per quanto riguarda la motilità e lo sviluppo degli occhi già a 4dpf le larve potrebbero essere in grado di svolgere lo stesso compito rispetto a larve di 6dpf. Una differenza di 2 giorni rispetto ad organismi così giovani rappresenta uno scarto di grandi dimensioni e permetterebbe di operare diverse considerazioni sui fattori di maturazione coinvolti nello sviluppo della cognizione numerica. Oltre a questo è importante notare come ad età precoci come i 4dpf la pigmentazione delle larve è pressoché nulla e questo permetterebbe l'adozione di specifiche tecniche di immagini in vivo che consentano di osservare il funzionamento del cervello di zebrafish durante l'esecuzione dei compiti come quelli descritti in questa tesi.

I risultati riportati qui, però, non sono molto incoraggianti in quanto nei confronti operati non è mai emersa una preferenza significativa per la quantità rinforzata in apparente contraddizione con quanto emerso in esperimenti molto simili condotti su soggetti selezionati a 6dpf. I soggetti, in altre parole, non mostrano di aver appreso il compito e questo si conferma sia se si va ad osservare il comportamento lungo i 4 giorni di osservazione sperimentale, sia se ci si concentra singolarmente su ciascuno

dei 4 giorni. Da un lato non possiamo escludere che siano effettivamente i 2 giorni di differenza tra i soggetti 4 e 6dpf alla base della differenza nella performance. Dall'altro però, come accennato in precedenza, la letteratura sembra abbastanza concorde nel sottolineare come dal punto di vista comportamentale i soggetti di 4dpf siano perfettamente utilizzabili. Vale la pena considerare altri aspetti differenti tra i due studi; nel presente, ad esempio, la fase di training collettivo è stata ridotta a due giorni rispetto ai 4 degli esperimenti precedenti, così come i giorni di test sono passati da 5 a 4. Naturalmente questo è stato fatto nel tentativo di giungere prima ad osservare l'apprendimento nelle larve, ma a questo punto sarebbe opportuno ridurre separatamente le due durate per capire se una delle due impatta maggiormente su zebrafish.

Un altro aspetto che è necessario considerare è quello dei confronti operati. I dati in letteratura hanno suggerito l'adozione di due confronti numerici che nella stessa specie vengono svolti con successo. Al di là di questo però, alla luce di quanto emerso, varrebbe la pena osservare soggetti a 4dpf in confronti (specie con piccoli numeri) in cui gli elementi fisicamente presenti siano numericamente ridotti.

Si tratta a tutti gli effetti di un primo tentativo di indagare tramite una procedura agile, dai costi molto bassi e tecnicamente spendibile, lo sviluppo della cognizione numerica in larve di zebrafish. Seppur poco indicativi, i dati raccolti confermano che, strutturalmente parlando, soggetti di soli 4dpf possono svolgere il compito.

Bibliografia

Barman, R. P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. Records of the Zoological Survey of India, Occasional Paper, 137: 1-91.

Kohda M, Sogawa S, Jordan AL, Kubo N, Awata S, Satoh S, et al. (2022). Further evidence for the capacity of mirror self-recognition in cleaner fish and the significance of ecologically relevant marks. *PLoS Biol* 20(2).

Benson-Amram, S., Heinen, V. K., Dryer, S. L., & Holekamp, K. E. (2011). Numerical assessment and individual call discrimination by wild spotted hyaenas, *Crocuta crocuta*. *Animal Behaviour*, 82(4), 743-752.

Wilson, M. L., Britton, N. F., & Franks, N. R. (2002). Chimpanzees and the mathematics of battle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1496), 1107-1112

Petrazzini, M. E. M. (2014). Trained quantity abilities in horses (*Equus caballus*): A preliminary investigation. *Behavioral Sciences*, 4(3), 213-225.

Agrillo, C., Dadda, M., Serena, G., & Bisazza, A. (2008). Do fish count? Spontaneous discrimination of quantity in female mosquitofish. *Animal cognition*, 11(3), 495-503.

Agrillo, C., Piffer, L., & Bisazza, A. (2011). Number versus continuous quantity in numerosity judgments by fish. *Cognition*, 119(2), 281-287.

Agrillo, Miletto, Petrazzini, Tagliapietra & Bisazza, (2012). Inter-specific differences in numerical abilities among teleost fish. *Frontiers in Psychology*.

Seguin, D., & Gerlai, R. (2017). Zebrafish prefer larger to smaller shoals: analysis of quantity estimation in a genetically tractable model organism. *Animal cognition*, 20(5), 813-821.

Santacà, M., Dadda, M., Dalla Valle, L., Fontana, C., Gjinaj, G., & Bisazza, A. (2022). Learning and visual discrimination in newly hatched zebrafish. *Iscience*, 25(5), 104283.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34.

McClure, M. M., McIntyre, P. B., & McCune, A. R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 69(2), 553-570.

Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121-173.

Maack, G., & Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 895-906.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.

Lee, K. W., Webb, S. E., & Miller, A. L. (1999). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Developmental Biology*, 214(1), 168-180.