



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

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

**Corso di laurea in Scienze e Tecniche Psicologiche**

**Elaborato finale**

**Ruolo della percezione gerarchica degli stimoli in zebrafish**

**Hierarchical stimulus processing in zebrafish**

***Relatore:***  
**Prof. Marco Dadda**

***Laureando: Matteo Franchin***  
***Matricola: 1151318***

Anno Accademico 2021/2022



## Indice

1. Introduzione	1
1.1 La percezione	1
1.2 I pesci come modello per lo studio della cognizione comparata	1
1.3 Metodi sperimentali per lo studio della cognizione nei pesci	3
1.3.1 Le preferenze spontanee	4
1.3.2 L'addestramento manuale	7
1.3.3 L'addestramento automatico	11
1.4 Addestramento automatico e manuale. Quale più affidabile in zebrafish?	16
1.5 Percezione di stimoli gerarchici nei pesci	18
2. Scopo dell'elaborato	21
3. Materiali e metodi	23
3.1 Biologia della specie	23
3.2 Soggetti sperimentali	24
3.3 Apparato sperimentale	25
3.4 Procedura sperimentale	26
4. Risultati	31
5. Discussione	33
6. Bibliografia	35



# **1.INTRODUZIONE**

## **1.1 La percezione**

La percezione è una successione di eventi che un individuo (umano o non) attua con lo scopo di esplorare lo spazio circostante. Si può definire come il rilevamento di uno stimolo sufficientemente intenso da parte delle vie sensorie nell'etere, gli stimoli attivano la catena di eventi di tali vie nella quale come ultimo termine si ha la realizzazione di una riproduzione mentale di esso.

Nel processo visivo le circostanze necessarie affinché la riproduzione mentale avvenga correttamente comprendono lo stimolo stesso e la radiazione luminosa, con componenti differenti negli oggetti stessi ma con una definizione delle forme di essi e le loro variazioni luminose, tale catena ha inizio con l'attraversamento della radiazione della cornea, il cristallino completa la messa a fuoco e infine la pupilla funge da diaframma; qui il fotogramma viene capovolto, successivamente questo concentra l'immagine sulle cellule retiniche, queste trasducono l'impulso alle zone cerebrali elaborative che lo trasformano in esperienza visiva.

## **1.2 I pesci come modello per lo studio della cognizione comparata**

La cognizione si può definire come i processi cognitivi basilari (come apprendimento, percezione, memoria e attenzione) utilizzati dagli esseri viventi per acquisire informazioni dall'ambiente allo scopo di eseguire un comportamento. Questa descrizione, nonostante sia riduttiva, non presenta la cognizione come una peculiarità umana ma come una caratteristica comune nel mondo animale (Shettleworth, 2001).

Il concetto si origina dalla continuità evolutiva e dalla selezione naturale, entrambe teorie di matrice darwiniana, nella quale tutti gli esseri viventi hanno una serie di antenati comuni, questo consente di vedere gli animali come dotati di processi cognitivi, di una mente e di esperienze soggettive.

I primi studi di ricerca sul comportamento animale sono remoti, tuttavia nei primi anni del 1900 negli Stati Uniti dai pensieri di Charles Darwin, Herbert Spencer, C. Lloyd

Morgan e Ivan P. Pavlov prese piede la “Psicologia Comparata” in cui allo studio per comprendere le varie caratteristiche delle specie si aggiungeva lo studio del comportamento degli animali allo scopo di cercare relazioni e continuità con la sua controparte umana e per ricavare da ciò i processi cognitivi sottostanti ai comportamenti (Boakes, 1984).

I paradigmi comportamentisti prevalsero sulle altre metodologie negli studi di psicologia comparata dagli anni '60, infatti i metodi di controllo delle variabili utilizzati si adattavano bene all'oggetto della ricerca, ma per contro non permisero di condurre prove ed esperimenti con una grande quantità di specie: il focus fu presto su quelle più simili all'uomo per abilità adattive e plasmabilità comportamentale, quali il cane lupo, il ratto, il piccione e i primati (Boakes, 1984).

Negli anni successivi il numero di specie coinvolte in esperimenti volti ad indagare le capacità cognitive venne incrementato. Con il finire del XX secolo etologi e psicologi comparati, a quei tempi concentrati sui primati, si posero le prime domande sulle abilità numeriche degli animali in generale, sul tipo di rappresentazioni mentali che utilizzano e sulle influenze reciproche tra processi cognitivi coinvolti in compiti spaziali e temporali (Agrillo & Bisazza, 2018).

Percorrendo il cammino tracciato da scienze dell'area biomedica e neuroscienze, etologi e psicologi comparati inclusero nelle ricerche pesci e rettili. 15 anni fa è iniziato l'incremento nell'uso dei pesci come modello cognitivo superando gli studi sui mammiferi (Agrillo & Bisazza, 2018).

Il loro utilizzo è giustificato dalla loro posizione nell'albero filogenetico dei vertebrati, infatti tutti i vertebrati condividono con i pesci tratti di genoma che codificano le strutture corporee e cerebrali, questo a causa del fatto che un piccolo pesce (*bony fish*) fosse l'antenato condiviso dei tetrapodi (Bshary & Brown, 2014). In aggiunta godono di un'ampia popolazione nei loro habitat, pesci come *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* sono i vertebrati con più individui a livello planetario, per questo motivo si prestano bene come soggetti sperimentali negli studi comparativi. Sono anche un ottimo indice per individuare i fattori ambientali che hanno effettuato una pressione selettiva durante lo sviluppo cognitivo che per individuare il tipo di relazione tra le loro abilità cognitive

e lo sviluppo di aree cerebrali specifiche (Bshary et al., 2002; Bshary & Brown, 2014).

Altre ragioni per la quale si prediligono i pesci nella ricerca si possono trovare nel fatto che non necessitano di cure parentali fin dalla nascita; nello sviluppo rapido; nell'aspettativa di vita lunga; nell'alto numero di prole e nelle dimensioni ridotte, consentono di impiegarli nelle prove contenendo i costi di sostentamento e manutenzione degli apparati utilizzati (Agrillo & Bisazza, 2018).

Di conseguenza l'impiego di animali come soggetti gioca un ruolo cruciale nella conoscenza della cognizione umana e dei sistemi sottostanti facendo emergere i fattori e le concause di disfunzioni cognitive e i loro rimedi (Kalueff et al., 2014; Kozak et al., 2007).

Con queste premesse, negli ultimi 10 anni gli scienziati hanno definito la maggior parte delle capacità cognitive delle specie ittiche, con un particolare focus sulle specie di *bony fish*. Tra queste possiamo annoverare: la cognizione numerica (Agrillo et al., 2009, 2017; Agrillo & Bisazza, 2018); i processi logici elementari come l'inferenza transitiva (Bshary & Brown, 2014); l'apprendimento e memoria spaziale di stimoli di diversa complessità (Braithwaite, 2006; Kieffer & Colgan, 1992; Lucon-Xiccato & Bisazza, 2017; Newport et al., 2018); la scelta sessuale (Amundsen & Forsgren, 2001; Dugatkin, 1996; Noonan, 1983), l'apprendimento sociale (Brown & Laland, 2003) ed elementi della coscienza (Woodruff, 2017). Vediamo ora come gli uomini di scienza si sono approcciati a questi studi.

### **1.3 Metodi sperimentali per lo studio della cognizione nei pesci**

Etologi e psicologi comparati hanno da sempre implementato varie metodologie negli studi di ricerca su memoria e apprendimento negli animali, questi hanno coinvolto procedure comportamentiste per eludere l'incomunicabilità uomo-animale. La maggior parte di queste sono state standardizzate allo scopo di consentire comparazioni sulle performance interspecie. Possiamo citare il *detour paradigm*, un metodo sperimentale classico in cui mentre un soggetto percorre un corridoio gli si blocca il percorso e viene costretto a trovare una strada alternativa per arrivare al suo obiettivo. Con questo

paradigma sono state indagate parti della cognizione come: l'apprendimento sociale; l'insight; il controllo inibitorio e le mappe mentali (Kabadayi et al., 2018).

L'adattamento di questi paradigmi ai pesci è recente ma i diversi pattern ecologici, interattivi e comportamentali esistenti tra i pesci e gli altri animali hanno dato vita ad un vasto catalogo di possibili modelli d'approccio, che rendono il confronto e la standardizzazione dei progetti e degli studi complessa. Tali complicazioni sono anche intraspecifiche, la creazione di una vasta mole di paradigmi differenti per indagare la stessa capacità cognitiva nella stessa specie ha reso più tortuoso il controllo e la scelta delle stesse variabili delle prove sperimentali.

Pertanto, comprendere e conoscere a fondo i modelli utilizzati nello studio degli animali è essenziale allo scopo di ottenere degli esiti attendibili ed adattare al meglio tali metodi al contesto di ricerca. Nelle ultime ricerche i paradigmi più comuni tra i ricercatori sono: il metodo delle preferenze spontanee, il metodo dell'addestramento manuale e il metodo dell'addestramento automatico.

### **1.3.1 Le preferenze spontanee**

Il metodo delle preferenze spontanee è un paradigma classico impiegato nello studio della cognizione di soggetti nei quali la somministrazione di una prova verbale è impossibile (animali e neonati). Il fattore che rende il suo utilizzo semplice è la mera esposizione di un soggetto non addestrato ad una serie di stimoli controllati e l'osservazione dei suoi comportamenti spontanei allo scopo di studiarne le abilità cognitive. Questi stimoli devono essere salienti per l'individuo, il loro scopo è far esibire le sue risposte innate per cui solitamente si coinvolge del cibo ma in alcuni paradigmi si usano conspecifici se i soggetti sono animali sociali oppure oggetti mai visti prima dall'individuo nelle specie tendenti all'esplorazione.

L'opportunità di modulare sperimentalmente i fattori degli stimoli prima di presentarli ai soggetti è un grande vantaggio dato da questa modalità, successivamente si può constatare come al variare dello stimolo cambi anche la risposta dell'individuo, il tutto senza il bisogno di addestrarlo con nuove associazioni stimolo-risposta.



Una ricerca di Bánszegi e collaboratori (2016) può essere un esempio di impiego del metodo, nella quale sono state messe alla prova le capacità numeriche di 26 razze di gatto domestico. Nelle fasi iniziali i ricercatori hanno esposto gli individui coinvolti nell'esperimento a due diverse quantità discriminabili di cibo, osservarono poi i loro comportamenti e conclusero che i gatti sceglievano l'opzione con la quantità maggiore. Nella fase successiva, con la stessa modalità, veniva modificata la conformazione degli stimoli per controllare che questo parametro fosse il fattore discriminante principale ma i soggetti tendevano a scegliere il quantitativo maggiore di cibo. Come ultima prova, presentavano gli stimoli omettendo il canale d'informazione visivo, dimostrando che questa era la via sensoriale più utilizzata nelle decisioni.

È possibile coinvolgere stimoli differenti: nel *spontaneous object recognition* per mettere alla prova le abilità di memoria degli individui a questi viene posta una scelta tra un oggetto mai visto in precedenza e un oggetto con cui erano già entrati in relazione, basandosi sulla risposta innata a scegliere oggetti mai visti o conosciuti si è in grado di indagare le prestazioni della memoria dei soggetti in esame (Blaser & Heyser, 2015).

Possiamo confermare che questo metodo di indagine è attendibile e molto veloce perché verte sull'utilizzo dei comportamenti spontanei, ne consegue che un addestramento non è necessario.

Questi punti di forza permettono di studiare i pesci in modo ottimale perché vengono a mancare gli errori che potrebbero accadere in una ipotetica fase di addestramento verso una discriminazione non innata (Agrillo & Bisazza, 2014). Per questi motivi questo metodo è stato coinvolto in numerosi studi che avevano come scopo lo studio delle abilità cognitive dei pesci.

Per citare alcuni esperimenti, *Gambusia holbrooki* è stata utilizzata come soggetto in uno studio sulle abilità quantitative facendo uso del suo comportamento anti-predatorio. In un ambiente a lei estraneo tende ad aggregarsi al banco di conspecifici che presentano il maggior numero di individui. Premettendo che è stata sfruttata questa tendenza e che ogni esemplare è stato coinvolto solamente in una prova gli sperimentatori hanno modificato la numerosità dei banchi; la proporzione di esemplari

presenti tra i due stimoli; la dimensione di ogni pesce presente nei banchi e l'attività totale di un banco rispetto all'altro. Applicando questo paradigma i ricercatori hanno provato che *G. holbrooki* ha un sistema non verbale rappresentativo delle quantità (Agrillo & Dadda, 2008); similmente a *Macacus rhesus* (Hauser et al., 2000), ai cani domestici (West & Young, 2002) e ad altre specie animali. Similmente, anche le capacità numeriche di *Pterophyllum scalare* sono state indagate con questo metodo (Gomez-Laplaza & Gerlai, 2011).

In ricerche successive dei soggetti femminili di *Betta splendens*, posti nella porzione centrale di un acquario, venivano esposti a due filmati: il primo riguardava due esemplari maschio conspecifici che attuavano diversi script comportamentali (“amante”, “combattente” e “divisore”) o un secondo filmato di due conspecifici (maschio e femmina) separati. La preferenza di ogni esemplare veniva rilevata in base alla quantità di tempo passata in prossimità di uno dei due stimoli. Questi tipi di stimoli biologici sono stati utilizzati per elicitare la risposta innata di avvicinamento ai consimili per ricercare i parametri alla base della scelta sessuale e la maniera in cui il comportamento degli esemplari del sesso opposto ne condiziona la scelta.

È stato scoperto che i soggetti avevano una preferenza per il comportamento “amante”, dove il maschio aveva dei feedback quasi solamente per la femmina, evitavano anche i maschi con il comportamento “combattente”, questi comportamenti erano diretti ad altri maschi per il rischio di lesioni nella fase di corteggiamento (Dzieweczynski et al., 2014).

In una ricerca recente, è stata utilizzata la risposta innata di *D. rerio*, *Xenotoca eiseni* e *Carassius auratus* per definire la cognizione dell'orientamento. Lo *spontaneous social cued memory task* è stato utilizzato per questo test in cui un pesce veniva inserito in un acquario, in un angolo posto in un barattolo di vetro vi era un suo consimile usato come attrattore sociale; veniva poi coperta la zona in cui si trovava l'esemplare per fargli perdere l'orientamento e veniva anche rimosso il barattolo con l'esemplare. Dopo queste operazioni veniva valutata il comportamento di riorientamento, i ricercatori conclusero che queste tre specie utilizzano il sistema visivo per definire le geometrie ambientali, in certi contesti può utilizzare anche altri sensi (Sovrano et al., 2020).

Il metodo delle preferenze spontanee permette di fare luce su molte abilità cognitive e di risultati affidabili in tempistiche relativamente brevi, l'impiego di un pattern comportamentale innato da la conferma che il soggetto in esame ha utilizzato le vie neurali adibite a quella specifica abilità della cognizione. Questo implica la sua alta validità ecologica (Agrillo & Bisazza, 2014) nonostante ciò possono avere degli aspetti limitanti: il principale è la il carattere finito dei possibili comportamenti e delle risposte innate, questo non permette di fare ricerca su ogni ramo della cognizione; attorno a questi comportamenti possibili gli sperimentatori cercano di costruire le prove e le esperienze creando errori di forzatura o complicando il progetto sperimentale.

L'elusione di questo dilemma si ha con l'adozione dello studio di comportamenti appresi e condizionati, tra i quali il condizionamento operante.

### **1.3.2 L'addestramento manuale**

Il condizionamento operante fu una conseguenza diretta del proseguimento delle ricerche sul comportamentismo di Edward Thorndike. La genesi iniziò con le ricerche di Ivan Pavlov su quella che poi fu battezzata come “teoria del condizionamento classico”, cioè l'associazione di una risposta che l'animale è in grado di produrre (nel caso dei suoi studi la salivazione) ad uno stimolo (una campanella). Tempo dopo, alla fine del diciannovesimo secolo Thorndike, per compensare le carenze sull'apprendimento di comportamenti sconosciuti della teoria di Pavlov, studiò queste capacità nel gatto domestico. Il risultato dello studio condusse alla “legge dell'effetto” in cui una risposta piacevole per il soggetto in seguito ad un suo comportamento ne provoca la ripetizione, al contrario, se un comportamento è succeduto da situazione sgradita andrà verso la sua estinzione (Thorndike, 1898).

Da ciò si evince l'importanza di questa teoria per lo studio delle capacità cognitive degli animali, vale a dire che il possibile apprendimento di comportamenti ha generato due modalità di addestramento in questo tipo di studi quali l'addestramento manuale e l'addestramento automatico.

L'addestramento manuale, cioè la somministrazione di un "premio" ad ogni comportamento eseguito correttamente e desiderato dallo sperimentatore, tra i suoi tratti caratteristici si annovera la legge dell'uso: l'addestramento va ripetuto più e più volte per aumentare la forza dell'associazione ed è anche richiesta la presenza di una persona dall'inizio alla fine di questa fase per presentare gli stimoli. Permette anche l'apprendimento di più comportamenti rispetto ad altri metodi, ne consegue che le ricerche sulla cognizione possono spaziare verso l'uso di stimoli astratti, senza valore per l'animale (nel metodo delle preferenze spontanee sono stati visti solamente stimoli salienti come cibo o stimoli sociali in animali molto sociali) necessarie anche per ridurre o rimuovere le variabili confondenti (impossibili da eludere nel metodo delle preferenze spontanee, ad esempio il movimento e l'odore) (Agrillo & Bisazza, 2014).

Un famoso esperimento che utilizza questa modalità fu svolto per indagare la percezione del colore nelle api, lo sperimentatore segnò ogni ape durante la perlustrazione di un set sperimentale di 32 quadrati con differenze sfumature di colore grigio tranne che per un quadrato di colore blu con del cibo per la verifica dell'uso del colore nella discriminazione e non nell'impiego della luminosità dei tasselli. La fase di test differiva dalla fase di addestramento solo per la mancata presenza del rinforzo zuccherino, ne risultò che quasi tutte le api sceglievano il tassello blu e dimostrando di discriminare il colore (Von Frisch, 1914).

La ricerca appena vista dimostra come l'addestramento manuale combinato anche con uno studio poco complesso è molto utile nell'esplorazione delle abilità cognitive, ne consegue che la sua applicazione negli esperimenti con i pesci come soggetti sia la scelta migliore, come vedremo sono innumerevoli le prove effettuate con questa modalità.

Ad esempio in *goldfish* è stata verificata la costanza percettiva del colore (cioè la percezione dello stesso colore in ambienti luminosi differenti); nell'addestramento i soggetti erano allenati a distinguere 15 stimoli di differenti gradazioni cromatiche su uno sfondo nero in una vasca con luce bianca. I soggetti che riuscivano a superare la fase di addestramento accedevano alla fase di test dove la prova differiva dalla prima per il colore dell'illuminazione (gialla o blu), gli sperimentatori scoprirono che tale costanza era mantenuta solamente a certe gradazioni di saturazione della luce, al di sotto

di questi risultava manchevole (Dörr & Neumeier, 2000).

Le abilità cognitive riguardanti i numeri si sposano bene con questo metodo, queste sono state testate in *P. reticulata* (*guppy*) con un nuovo apparato: una pedana con dei fori contenenti cibo coperte da un dischetto, le *guppy* erano addestrate a muovere questi piccoli coperchi dalla loro sede per arrivare al cibo, i soggetti che non riuscivano a superare l'addestramento erano sostituiti da altri. Nel test, agli opposti della pedana c'erano due serie di dischetti in quantità maggiore di uno su uno dei lati rispetto all'altro, i soggetti superavano il test solo se sceglievano il lato con più dischetti e mangiavano il cibo. Venivano effettuate 12 sessioni giornaliere (120 prove in tutto), se raggiungevano il target del 75% di prove effettuate correttamente per due giorni di fila la prova era considerata superata, nello specifico quattro soggetti riuscivano a distinguere 4 dischetti contro 5 (Bisazza et al., 2014).

Restando nel campo delle abilità numeriche, è stata indagata la capacità di distinzione di quantità grandi in esemplari di *P. reticulata* appena nati. Due stimoli composti da insiemi di punti neri diversi per numerosità, area coperta e densità (quantità continue) erano posizionati ai lati opposti di una vasca, quando il soggetto sceglieva lo stimolo più numeroso gli era fornito il rinforzo (cibo) davanti ad esso. Nella prima fase dell'esperimento lo stimolo target aveva i punti che occupavano la maggiore area possibile (numerosità dei punti e quantità continue concordi), nella seconda gli stimoli presentavano solamente una diversa numerosità (quantità continue uguali) infine nella sezione finale gli stimoli avevano solamente informazioni sulle quantità continue. I ricercatori conclusero che nella prima e nella seconda fase gli individui discriminavano correttamente gli insiemi numerici, al contrario nell'ultima prova non ci furono risultati rilevanti (Piffer et al., 2013).

Anche la percezione delle illusioni ottiche nei pesci sono state indagate con questo approccio che è in grado di fornire risultati circa le strutture neuronali adibite a queste abilità e di rispondere a quesiti quali i motivi dell'esistenza delle differenze percettive tra gli esseri viventi.

Per rispondere a queste domande è stata impiegata la *solitaire illusion*, un'illusione ottica di numerosità composta da puntini bianchi e neri, questi ultimi sono disposti in

modo da sembrare in numero maggiore dei primi (la numerosità è la stessa). Sono stati impiegati 23 esemplari adulti di *P. reticulata* e l'apparato era composto da una vasca suddivisa in tre settori tra i quali uno "scompartimento casa", una *starting box* nella sezione centrale e l'ultima area in cui erano esibiti gli stimoli. Nella sessione di addestramento i pesci erano istruiti a distinguere lo stimolo con più punti neri, questi avevano i seguenti contrasti: 11 contro 21, 13 contro 19 e 14 contro 18. Quando il 70% delle prove era corretta per due giorni consecutivi il soggetto veniva considerato competente per questo compito. Finita questa fase iniziava il test: lo stimolo illusorio da 16 punti bianchi e 16 punti neri era presentato in coppia con uno stimolo simile e con lo stesso numero di punti ma questi presentavano una disposizione differente. Se i soggetti erano in grado di percepire l'illusione si sarebbero avvicinati alla *solitaire illusion*, l'esperimento si è concluso con il 61% dei soggetti che ha superato l'addestramento. A livello di gruppo i pesci percepivano l'illusione in modo meno consistente rispetto agli umani e tale percezione era molto diversa tra gli esemplari utilizzati, inoltre erano in grado di distinguere il rapporto "13 contro 19" ma non il rapporto 14 contro 18 (Miletto Petrazzini et al., 2018).

Grazie all'addestramento manuale i limiti degli altri metodi sull'indagine della cognizione dei pesci sono stati bypassati, ad esempio la motivazione assente e le differenze tra gli individui costituiscono un limite non indifferente nel metodo delle tendenze spontanee mentre nell'addestramento manuale, se un soggetto non effettua una scelta in un compito probabilmente perché questa non trova riscontro nelle sue capacità cognitive o perché lo stimolo non rappresenta l'opportunità di ottenere la ricompensa (Agrillo & Bisazza, 2014). La comparazione interspecie tra studi con stessi obiettivi e apparati è possibile grazie al Fatto che non è necessario che lo stesso stimolo utilizzato debba essere obbligatoriamente saliente per la specie in esame (Agrillo & Bisazza, 2014).

Per contro l'addestramento manuale non è esente da dei limiti specifici, la fase di addestramento può diventare impegnativa: le sessioni spesso sono svolte quotidianamente, può anche richiedere tempi lunghi ed è sempre necessaria la presenza di una persona per effettuare le prove dall'inizio alla fine. La necessità della presenza di almeno uno sperimentatore aumenta il rischio di errori umani nelle fasi di training e di

valutazione dei risultati di ogni soggetto a causa dell'eccessiva interpretazione soggettiva del comportamento dei soggetti in esame.

Per ovviare tali limiti si fa uso dell'addestramento automatico, che utilizza i medesimi comportamenti della controparte manuale ma senza l'ausilio di una figura umana nelle fasi più critiche degli esperimenti.

### **1.3.3 L'addestramento automatico**

L'addestramento automatico e quello manuale si basano entrambi sul condizionamento operante, tuttavia, il primo supera i limiti del secondo mediante l'utilizzo di apparecchi automatici.

Tale procedura nasce nel 1938 quando Skinner, per la sua tesi di dottorato, ispirandosi al lavoro di Thorndike, creò la cosiddetta Skinner Box: una struttura a gabbia utilizzabile per il condizionamento operante che si basa su alcuni elementi cruciali quali: la *discriminanda* (stimolo), l'*operandum* (risposta) e il *feeder* (uno strumento che somministra il rinforzo). Con *operandum* si intende una leva da premere (quando si utilizzano come soggetto, ad esempio, i topi) oppure un pulsante da beccare (nel caso, ad esempio, dei piccioni), il cui scopo è misurare la topografia della risposta emessa e il livello utile affinché l'azione diventi una risposta operante (Manabe et al., 2017).

Per i suoi primi esperimenti Skinner utilizzò soprattutto ratti e piccioni: i soggetti, in uno stato di denutrizione, venivano inseriti dentro la gabbia e quando casualmente interagivano con l'*operandum*, ricevevano un rinforzo che, producendo un effetto benefico, portava i soggetti a ripetere l'azione. Tale stratagemma rendeva possibile effettuare un numero maggiore di prove, in quanto si trattava di un ambiente controllato dov'era possibile misurare velocemente la capacità di apprendimento degli animali selezionati. Era, inoltre, possibile aumentare la complessità della procedura addestrando il soggetto a scegliere uno stimolo di interesse tra vari stimoli presentati (*discriminanda*). La scelta veniva compiuta interagendo con l'*operandum* associato allo stimolo *target*, e a ciò seguiva la presentazione della ricompensa (cibo).

Tale procedura, permettendo l'indagine di processi cognitivi più complessi mediante l'utilizzo di stimoli astratti, è stata utilizzata per studiare i più svariati ambiti della cognizione. Un esempio di tali applicazioni è lo studio sulla capacità rappresentare mentalmente delle quantità numeriche su una scala ordinale di due esemplari di *Macaco rhesus* di Brannon e Terrace (1998).

Gli animali sono stati addestrati a mettere in ordine crescente quattro immagini in cui erano rappresentati dall'uno ai quattro elementi. Sono stati utilizzati quattro gruppi di stimoli contenenti ognuno 4 immagini che variavano per forma, colore e grandezza, di modo che i soggetti si basassero solo le informazioni numeriche al fine dello svolgimento della prova. Gli stimoli venivano presentati contemporaneamente agli angoli di un monitor *touch-screen* e il soggetto doveva toccarli in ordine crescente: gli errori portavano alla conclusione del tentativo mentre le prove eseguite correttamente producevano una breve risposta visiva e uditiva, seguita da un rinforzo alimentare, in modo da impostare un apprendimento per prove ed errori.

Per portare a termine la procedura l'intervento dello sperimentatore non era basilare ed il soggetto portava a termine un gran numero di prove autonomamente, guidato dai ritmi del computer. Una volta che i soggetti erano abili nell'ordinare la prima serie (1-2-3-4), veniva effettuata una prova senza ricompensa utilizzando una serie non familiare (5-6-7-8). L'accuratezza nello svolgimento di entrambe le prove era significativa.

Data l'efficienza dimostrata dall'addestramento automatico molti ricercatori l'hanno utilizzato per sviluppare sistemi utili a rilevare risposte comportamentali che non necessitassero un'interazione con un *operandum*, come la vocalizzazione e la locomozione (Manabe et al., 2017). Manabe e colleghi (1992), ad esempio, hanno modellato il comportamento di tre piccioni adulti utilizzando una *Skinner box* la quale rinforzava il soggetto ogni volta che questo beccava un bersaglio o quando compiva una rotazione su se stesso. Al fine di stimolare il primo comportamento, sul muro era stato posizionato un pulsante rotondo, che poteva presentare una luce rossa o verde e che, se beccato, faceva aprire per tre secondi, sotto il bottone stesso, uno scompartimento contenente il cibo. Per l'addestramento alla rotazione, ai piccioni veniva fatta indossare un'imbragatura con due palline da *ping-pong* (rispettivamente sul collo e sulla coda) mediante il cui baricentro un sistema di tracciamento video calcolava l'orientazione dei



piccioni. I movimenti rotatori su se stessi di circa  $\pm 180^\circ$  venivano considerati come una rotazione. Inoltre, era presente una differenza comportamentale negativa per le risposte di beccatura e di rotazione.

Più recentemente, Reinagel (2013) è riuscito ad addestrare, mediante la *Skinner box*, sei ratti a discriminare la direzione del movimento di una trama composta da 100 punti che apparivano in posizioni casuale su un monitor. L'inizio di ogni prova coincideva con il momento in cui il soggetto leccava il sensore centrale, provocando la comparsa della trama sullo schermo: per ricevere la ricompensa (acqua) il soggetto doveva leccare il sensore verso lo stimolo con più punti in movimento, quando sbagliava riceveva una penalità (pausa). Secondo i risultati, ai ratti bastavano pochi secondi per discriminare gli stimoli e l'accuratezza nello svolgimento delle prove semplici era positivamente correlata ai tempi di reazione di ciascun soggetto, mentre nelle prove in cui i punti si muovevano in maniera maggiormente incoerente i tempi di reazione si allungavano.

Gli esempi appena citati dimostrano l'impatto dell'addestramento automatico in varie specie, arrivando al punto di soppiantare le procedure di addestramento manuale. La chiave di volta si ha con l'introduzione dell'addestramento automatico nei pesci, nonostante l'interesse per la cognizione di questi animali si sia destato solo negli ultimi anni, con i primi tentativi di mettere a punto una *Skinner box* adatta a loro, soprattutto per gli esemplari di piccole dimensioni (Agrillo & Bisazza, 2018) e che tenesse conto delle peculiarità della loro locomozione e degli specifici modi in cui interagiscono con l'ambiente, in modo da non falsare l'esperimento.

Manabe e colleghi (2013) hanno sviluppato una procedura di addestramento manuale, tramite condizionamento operante, per *zebrafish* che consisteva in una vasca di polietilene (10 x 9 x 13.5 cm). Per la procedura venivano usati due sensori in fibra ottica: il primo, di 2 mm di diametro, collegato ad un led a tre colori, era funzionale alla presentazione degli stimoli colorati; mentre il secondo serviva a misurare la risposta del soggetto. La ricompensa consisteva in piccole quantità di cibo (uova di *Artemia salina*), rilasciate grazie a un piccolo *feeder* di ottone inserito di fianco al sensore, entrambi posizionati a 5 mm sotto la superficie dell'acqua. La procedura di addestramento iniziava con una fase utile a far familiarizzare il soggetto con il *feeder*, successivamente, il led veniva acceso con una luce rossa dalla durata di 8 secondi durante i quali, se il

soggetto avvicinava il led, avveniva il rilascio della ricompensa. La luce rossa si spegneva e il led emetteva 5 *flash* di luce bianca. Nel caso in cui il soggetto non si avvicinasse entro 8 secondi dall'accensione del led rosso la luce si spegneva e il rinforzo veniva espulso automaticamente. Quotidianamente vengono effettuate tra le 40 e le 80 prove per soggetto e i risultati dimostrano che i pesci imparano ad avvicinarsi al led rosso per ricevere il cibo. In un altro studio Manabe e colleghi (2013b), utilizzando un apparecchio simile, sono riusciti ad addestrare *zebrafish* ad avvicinarsi all'obiettivo basandosi su vari criteri, dimostrando che è possibile addestrare in modo automatico i pesci, che questi sono sensibili alle conseguenze spaziali del loro comportamento e che è possibile sfruttare questo meccanismo per studiarne vari aspetti cognitivi. A titolo esemplificativo citiamo il lavoro di Gatto e colleghi (2020) i quali si sono avvalsi dell'addestramento automatico per testare dei soggetti adulti di *P. reticulata* in compiti di discriminazione di piccole quantità numeriche. A tal fine, una videocamera con dei sensori veniva posta 12 cm sotto la vasca di plastica semitrasparente, in modo da tracciare il comportamento dei soggetti durante le prove, mentre un monitor *LCD* proiettava gli stimoli attraverso due finestre di 6×5 cm: la scelta di avvicinarsi ad uno stimolo piuttosto che all'altro veniva registrata tramite la videocamera. Gli stimoli, presentati a due a due, contenevano un numero variabile di rettangoli (3 contro 5 e 3 contro 4) in tre situazioni di diversa congruenza tra l'informazione numerica e l'area occupata dai rettangoli nello stimolo. Ogni soggetto veniva testato 500 volte e i risultati hanno dimostrato che i pesci si dirigevano verso la numerosità rinforzata un numero significativo di volte (rispetto al caso), confermando che la *Skinner box* poteva essere utilizzata anche con i pesci, nonostante l'accuratezza fosse molto inferiore rispetto a risultati ottenuti sulla stessa specie mediante strumenti più "ecologici" (Bisazza et al., 2014). Gatto e colleghi (2021) hanno pubblicato uno studio volto ad approfondire i dubbi rispetto all'affidabilità della *Skinner box*, sorti una volta appurata la bassa efficacia di questo strumento nell'addestramento dei pesci. Gli autori hanno utilizzato delle femmine adulte di *guppies* effettuando confronti tra metodi e condizioni diverse. Inizialmente, il confronto è stato fatto tra addestramento manuale e automatico, mediante compiti di discriminazione numerica a difficoltà crescente, in modo da verificare la presenza di eventuali differenze. Il metodo di addestramento automatico era uguale a quello utilizzato nell'articolo di Gatto e colleghi (2020). Successivamente, è

stato modificato l'apparato automatico aumentano la lunghezza del corridoio e implementando una barriera trasparente prima dell'area di scelta, in modo da impedire che i soggetti si affrettassero sugli stimoli e avessero così un maggior tempo di decisione. Nella terza parte è stato nuovamente modificato l'apparato automatico originale, riformando la collocazione degli stimoli e rimuovendo tutti i divisori interni per aumentare la visibilità degli stimoli. Nella quarta parte, è stata costruita una *Skinner box* nell'acquario in cui i soggetti vivevano, in modo da evitare di trasferirli in una nuova struttura, e così da controllare se lo stress causato dallo spostamento potesse inficiare i risultati dei test. In conclusione, nella quinta parte, ipotizzando che le procedure automatiche potessero aumentare eccessivamente il carico cognitivo dei soggetti a causa di una serie di abilità che devono mettere in pratica in concomitanza al compito principale (come il modo di avvicinare lo stimolo per ricevere la ricompensa, o quello di nuotare tra i settori della vasca e il tornare indietro finita una prova), è stato permesso ai soggetti di familiarizzare con l'apparato automatico tramite compiti più semplici di discriminazione di colori, forme e dimensioni, prima della prova numerica. I risultati di questo studio hanno confermato che le prestazioni emesse in seguito all'addestramento automatico sono peggiori rispetto a quelle emesse in seguito all'addestramento manuale, ma nei *guppies* questa regressione riguarda solo le discriminazioni numeriche. Si è inoltre notato come, l'espandere il tempo di scelta e l'aumento della visibilità degli stimoli, non abbia avuto effetto sulle prestazioni, mentre l'evitare di cambiare la vasca e la riduzione del carico cognitivo, miglioravano leggermente la performance; tuttavia, i risultati non erano abbastanza significativi per essere paragonati a quella dell'addestramento manuale.

In conclusione, la minor affidabilità dei risultati ottenuti con la *Skinner box* è dovuta ad una serie di fattori che agiscono sinergicamente, sebbene non sia chiaro quali essi siano. Un'ulteriore possibile spiegazione potrebbe essere la maggior salienza di uno stimolo introdotto nella vasca, rispetto a quello presentato su un monitor, considerando che l'importanza della salienza degli stimoli è stata evidenziata anche in altre specie, come, ad esempio, nelle scimmie Cappuccino (Truppa et al., 2015), e che essa potrebbe essere correlata con gli ancora peggiori risultati avuti in un'altra serie di esperimenti con lo *zebrafish*.

#### **1.4 Addestramento automatico e manuale. Quale più affidabile in zebrafish?**

*Zebrafish* è un pesce tipico dei climi tropicali, è da tempo impiegato nella biomedicina principalmente per la sua relazione filogenetica con i mammiferi, ma anche per la sua grandezza ridotta, l'aspettativa di vita e i costi contenuti del suo sostentamento (Kalueff et al., 2014). La sua partecipazione a branche scientifiche e ricerche molto diverse fra loro si spiega con la somiglianza morfologica e neurochimica del suo sistema nervoso ai mammiferi, anche se è strutturalmente meno complesso. Il fattore strutturale appena citato rende *zebrafish* un punto di riferimento ottimale per la ricerca sulle psicopatologie (disturbo da stress post-traumatico, disturbo depressivo, disturbi dello spettro autistico e schizofrenia) e le neuro degenerazioni (morbo di Parkinson e Alzheimer) (Kalueff et al, 2014; Meshalkina et al., 2017).

Negli ultimi tempi *zebrafish* si è rivelato un modello perfetto per la ricerca sulle capacità cognitive: essendo un organismo semplice e, a differenza di numerosi mammiferi utilizzati in ricerca, privo di schemi cognitivi articolati è un'ottima via per effettuare studi sulla cognizione (Meshalkina et al, 2017). Eppure la creazione di paradigmi e metodi per indagare la sua cognizione è più tortuosa in confronto alla creazione di metodi d'indagine che si appellano alle scienze genetiche più complesse, per questi motivi nonostante la conoscenza dell'effettiva presenza di schemi cognitivi simili a mammiferi e uccelli una buona parte di questi aspettano di essere confermati (Gatto, Lucon-Xiccato, et al., 2020).

Come si può evincere dagli studi di ricerca è stato fatto largo uso di paradigmi semplici per studiare le funzioni cognitive basilari come l'orientamento nello spazio (Colwill et al., 2005) e la distinzione dei colori (Aoki et al., 2015); Mueller & Neuhaus, 2012; Parker et al., 2012) mentre ricerche su distinzioni visive più complesse (come sulla forma) devono ancora essere effettuate (Gatto, Lucon-Xiccato, et al., 2020).

In tempi recenti un gruppo di ricerca ha indagato la cognizione dell'apprendimento in *zebrafish* utilizzando il medesimo paradigma di uno studio compiuto in precedenza su

*P. reticulata* che possiede schemi cognitivi simili a *zebrafish* (Gatto, Lucon-Xiccato, et al., 2020; Lucon-Xiccato et al., 2019).

La variante della *Skinner box* impiegata era ispirata da studi volti ad addestrare piccoli esemplari ittici (Manabe et al., 2013a), una vasca sperimentale misurante 16 x 12 x 10 cm di plastica translucida aveva a 12 cm sotto il fondale una videocamera che ne registrava il comportamento.

La vasca era divisa in una zona d'osservazione, un corridoio a "V" e una zona di scelta degli stimoli su uno schermo a cristalli liquidi, un *feeder* era interposto tra gli stimoli, ad ogni scelta corretta un motore azionava il meccanismo e venivano espulse alcune uova di *Artemia salina*.

Quando questa procedura è stata applicata a *P. reticulata* gli stimoli impiegati avevano la stessa forma circolare ma presentavano una colorazione differente (rosso vs. giallo); altri due stimoli con lo stesso colore (nero) e forme diverse (cerchio vs. triangolo); con *zebrafish* invece gli stimoli erano "rosso vs. verde" per la distinzione del colore e "cerchio vs. triangolo" per la forma, negli studi il numero di rinforzi era di 80 a sessione e queste duravano sempre meno di un'ora.

*P. reticulata* ha mostrato risultati migliori: i colori erano distinti nel 90% dei casi e le forme nell'80%, *zebrafish* è comunque riuscito a discriminare i colori con un'accuratezza del 70% ma nessun soggetto ha appreso la discriminazione tra le forme o esibito miglioramenti con il progredire del test.

Da questi risultati inattesi sono sorte numerose domande, con uno studio successivo sono stati sottolineati gli elementi critici alla base dei risultati ottenuti: la conoscenza dell'ambiente impiegato per il test, la rilevanza degli stimoli e il grado di comprensione del modo in cui funziona la *Skinner box* (Gatto et al., 2021), nella ricerca precedente i risultati furono frutto dell'uso di un addestramento di tipo automatico e non a impedimenti di tipo cognitivo (Lucon-Xiccato et al., 2019) perché in studi antecedenti a questo, su *guppies* erano stati ottenuti risultati preferibili con l'applicazione di metodologie differenti (Lucon-Xiccato & Bisazza, 2014); contrariamente a ciò questo non si può dire per *zebrafish* perché studi sulle abilità discriminatorie di questo pesce devono ancora essere effettuate con la modalità manuale.

Concludendo, questo vuoto conoscitivo sulle abilità cognitive ottenute con l'addestramento manuale di *zebrafish*, necessita di essere colmato con questo esperimento.

### **1.5 Percezione di stimoli gerarchici nei pesci**

Uno stimolo gerarchico si definisce come un aggregato di piccole unità locali che strutturano un'immagine globale di dimensioni maggiori (Sovrano et al., 2010).

Il cognitivista David Navon, con gli studi condotti nel 1977, ha confermato come, in una rappresentazione, la percezione globale precorre l'analisi delle unità locali, questo è stato dimostrato mediante una serie di esperimenti dove inizialmente demolisce parzialmente l'ipotesi percettiva della Gestalt, in cui vengono assimilate tutte le informazioni presenti nella scena. Nella prova sperimentale i soggetti vengono esposti a stimoli gerarchici composti dalle lettere S, H e un rettangolo a loro volta costituiti da unità più minute; il ricercatore nota che il gruppo sperimentale adibito alla risposta verso gli stimoli globali ha tempi di risposta più brevi del gruppo incentrato sulle unità locali a causa della mancata interferenza delle prime verso le seconde.

Nonostante questo tutti gli altri componenti del regno animale si distinguono privilegiando differentemente queste due fasi, il cebo dai cornetti (Spinozzi et al., 2003) propende a percepire la parte di tipologia local mostrando contemporaneamente una cecità quasi completa verso gli stimoli di tipo global. Mediante un periodo di training, in cui ogni primate acquisiva esperienza nella distinzione degli stimoli, nella quale le figure erano organizzate in due sequenze con otto rappresentazioni con unità locali di compattezza diversa, le scimmie erano rinforzate positivamente quando indicavano le immagini con composizioni globali e locali congruenti, quando veniva svolta la prova sperimentale i soggetti privilegiavano l'impostazione locale.

Cavoto e Cook nel 2001 con l'ausilio di esemplari di colombo hanno ottenuto esiti analoghi, tali animali raggiungevano la visione globale mediante gli stimoli locali iniziali.

Similmente nel 2010 Truppa e collaboratori hanno testato lo stimolo che ha la precedenza nei pesci *X. eiseni*, in cui compito era distinguere una croce e una circonferenza (costruzioni globali) composta da unità locali dello stesso genere (stimolo coerente), invertendole nelle prove successive (stimolo incoerente).

Truppa ha poi indagato tali competenze con altre prove simili condizionando la compattezza e la grandezza delle strutture percettive, allo scopo di individuare in che modo possono modificare la percezione delle configurazioni gerarchiche.

Dalle rilevazioni lo studioso ha inferito che la specie esaminata favorisce la configurazione globale e discrimina gli stimoli indipendentemente dai parametri variati in precedenza, conseguentemente possiamo affermare che il favorire la globalità dello stimolo non è una caratteristica peculiare umana ma allo stesso tempo le strategie di codifica utilizzate potrebbero essere differenti e causate dall'adattamento ambientale.





## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro era quello di chiarire il ruolo della metodologia adottata nel tentativo di chiarire le differenze in termini di performance rilevate negli stessi compiti cognitivi tra *P. reticulata* e *zebrafish*. Un primo studio ha in realtà già messo in evidenza che adottando una procedura di addestramento manuale (simile ad un training estensivo) *zebrafish* adulti raggiungono delle performance simili a quelle documentate i *guppies* quando ai soggetti è richiesto di imparare una discriminazione basta sul colore o sulla forma. Nel presente lavoro ho sottoposto questi stessi soggetti ad una terza discriminazione che verteva sull'analisi dell'informazione globale-locale. Questo terzo tipo di compito era necessario per isolare quale stile percettivo venisse seguito dai soggetti in modo da capire se, di fronte a stimoli numerici astratti, componenti locali o componenti globali dello stimolo avessero maggior peso nella decisione.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Biologia della specie

Per questo esperimento sono stati utilizzati individui adulti femmine della specie *D. rerio* (Hamilton, 1882) della famiglia *Cyprinidae* (Nelson et al., 2016) noti comunemente come zebrafish. Si può trovare nella zona temperata dell'Asia del sud (Bangladesh, India e Nepal) in acqua dolce superficiale, poco mossa o ferma come acque sorgenti o i bacini per la risicoltura (Spence et al., 2008).

*Zebrafish* vive in modo ottimale nell'intervallo di temperatura tra i 22 e i 30°C ma essendo euritermo resiste a differenze di temperatura notevoli (da 6,5 a 38.5°C) tipiche della zona tropicale. Può anche vivere agevolmente in un ambiente con un pH tra il 7 e l'8 ma può sopportare intervalli più rigidi (5,5-9 pH) (Ribas & Piferrer, 2014).

Mediamente è lungo circa 4 cm per 0,9 g, il dimorfismo sessuale negli adulti si basa su differenze nella conformazione e nelle dimensioni, inoltre maschi e femmine presentano differenti colorazioni. Gli esemplari maschi sono gialli e fusiformi, al contrario, gli individui di sesso femminile hanno una morfologia più tozza e una papilla genitale adiacente alla zona anale. Hanno delle striature longitudinali blu, iniziano dall'opercolo e scorrono fino alla pinna caudale (Ribas & Piferrer, 2014) (figura 1).



Figura 1, Zebrafish maschio (sopra) e femmina (sotto),

fonte: maschio <http://denigma.de/gallery>  
femmina: <http://kidskunst.info/41/05178-female-zebra-danio.htm>

*D. rerio* si nutre principalmente di insetti acquatici e plancton ma è confermato il suo comportamento alimentare onnivoro, nel contesto laboratoriale era nutrito con cibo secco a scaglie e i crostacei *A. salina* (Spence et al., 2008).

Gli esemplari di sesso femminile depongono centinaia di uova (di diametro 0,7 mm ogni 48-72 h) esternamente, questo ne permette l'osservazione e il maneggiamento. La schiusa avviene tra le 48 e le 72 ore dopo l'inseminazione (Kimmel et al., 1995).

Il ciclo di vita di zebrafish inizia con un uovo non fertilizzato che inseminato si sviluppa in embrione, larva, giovane e adulto. Si inizia a contarne l'età dal momento dell'inseminazione (dpf – *days post-fertilization*); nelle larve (3-29 giorni dpf) già dal terzo giorno gli organi interni avanzano nel loro sviluppo mentre a 6-7 dpf si muovono e nutrono indipendentemente (D'Costa & Shepherd, 2009). Sempre dal sesto e il settimo giorno si presentano comportamenti indici di abilità cognitive quali abitudine, sensibilizzazione e condizionamento classico (Aizenberg & Schuman, 2011) (Anderson et al., 2015).

Tra il 3°-4° mese dpf maturano sessualmente, si nota come gli individui femmina scelgano i soggetti maschi di stazza più grande. Possono vivere fino a quattro anni.

*Zebrafish* si conferma una specie sociale che si muove in banchi formati spontaneamente, c'è una differenza nella scelta del banco: i maschi si uniscono in banchi dove è presente un maggior numero di esemplari femminili indipendentemente dal numero complessivo di individui mentre le femmine si uniscono a banchi più grandi ignorando la quota di maschi o di femmine in esso (Spence et al., 2008).

### **3.2 Soggetti sperimentali**

Nel presente studio sono stati osservati 12 *zebrafish* femmina. I soggetti precedentemente sono stati allevati nel laboratorio di Psicologia Animale e Comparata dell'Università degli Studi di Padova. Nel periodo precedente alla prova, i soggetti hanno alloggiato in vasche comuni con il fondo ghiaioso, flora acquatica e un impianto

di depurazione biochimico. Il nutrimento era fornito due volte al giorno con nauplii di *Artemia salina* e mangime secco a scaglie (*Aqua Tropical*, Isola Vicentina, Italy). Le vasche erano mantenute ad una temperatura di  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dopo la prova gli esemplari vennero posti in vasche di scorta e allevati.

### 3.3 Apparato sperimentale

L'apparato, utilizzato sia durante il training che durante il test, era composto da un complesso di 12 vasche misuranti 32 cm in altezza, 20 cm, in larghezza e 50 cm in lunghezza. Le 12 vasche erano rivestite all'esterno con Poliplak® verde al fine di isolare completamente i soggetti da interferenze esterne (figura 2).

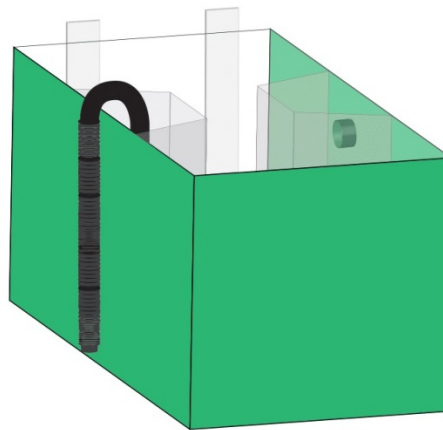


Figura 2, vasca utilizzata nell'esperimento

All'interno di ciascuna delle 12 vasche erano presenti due strutture a base trapezoidale in PVC trasparente che svolgevano la funzione di dividere virtualmente la vasca in due settori (frontale/posteriore) e di vedere ogni stimolo con la stessa angolazione dal centro dell'acquario. Erano anche presenti una serie di specchi in modo da ridurre lo stress da isolamento sociale.

Sempre allo scopo di diminuire lo stress da isolamento, le vasche erano rifornite, tramite un sistema di pompe attive, con acqua proveniente da una vasca contenente individui adulti della stessa specie. Il ricambio d'acqua era continuo e mediante ciò si trasportavano nelle vasche gli ormoni necessari per garantire le migliori condizioni di mantenimento (figura 3).

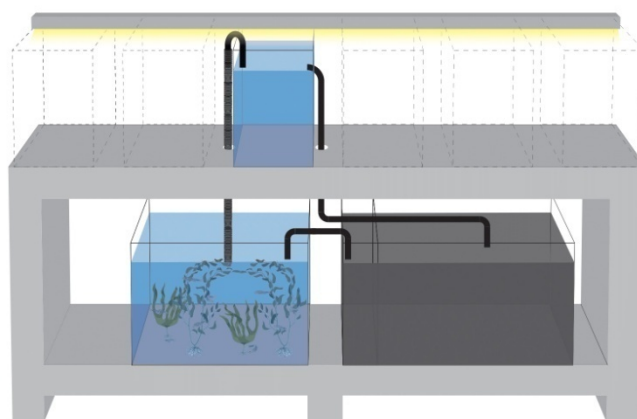


Figura 3, apparato sperimentale completo con il sistema di pompaggio evidenziato

Gli acquari avevano al loro interno 28 cm d'acqua a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  stabili, 2 cm circa di ghiaio; l'illuminazione consisteva in un neon da 30 W posto al centro delle vasche dipendeva da un sistema a tempo, veniva acceso alle ore 7:30 e spento alle 19:30.

### 3.4 Procedura sperimentale

Lo stimolo era stampato in bianco e nero su un cartoncino quadrato di 3 cm di lato poi plastificato e inserito nel supporto di un asta in PVC trasparente di 33 x 3,5 cm con un ulteriore supporto nella parte posteriore per ancorarlo al lato superiore della vasca e permettere al soggetto una visione ottimale dello stimolo (figura 4).

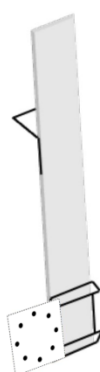


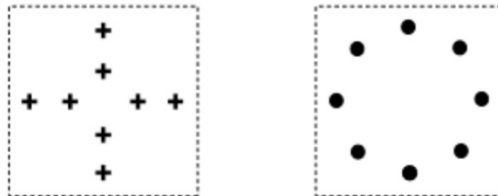
Figura 4, bacchetta in PVC con esempio di stimolo

Nella fase di training gli stimoli si dividevano in “croce” e “cerchio” presenti in modalità “sparsa” (8 componenti) e “densa” (16 componenti). Lo stimolo circolare aveva 2,3 cm di diametro ed era formato da cerchi di 0,2 cm; la croce di lato 2,5 cm era

composta da croci più piccole di 0,3 cm di lato.

Le condizioni sperimentali della fase di training erano due, differivano per le due modalità (sparsa vs. densa):

a)



b)

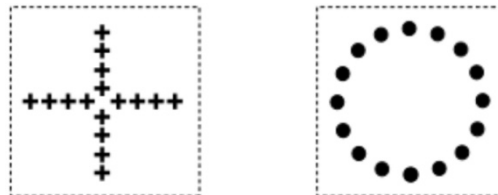
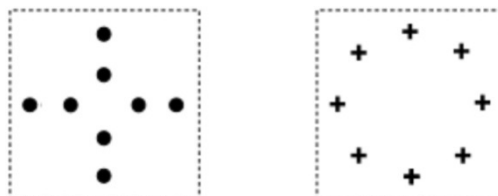


Figura 5: a) Condizione di training 1: Croce sparsa vs. cerchio sparso; b) Condizione di training 2: Croce densa vs. cerchio denso

Nella fase di test le informazioni globali e locali date dagli stimoli andavano in contrasto a causa degli stimoli incoerenti (croce composta da cerchi o cerchio composto da croci), anche qui la densità degli stimoli variava.

a)



b)

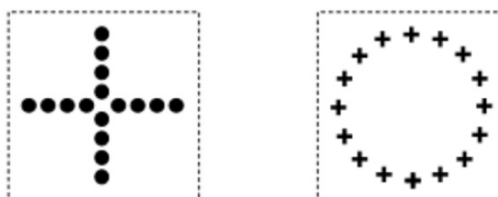


Figura 6: a) Condizione di test 1: Cerchio sparso vs. croce sparsa – incoerenti; b) Condizione di test 2: Cerchio denso vs. croce densa – incoerenti

La procedura è stata liberamente ispirata da studi riguardanti gli inganni visivi in *P. reticulata* (Lucon-Xiccato et al., 2019; Santacà & Agrillo, 2020), i periodi erano tre: familiarizzazione, training e test, in quest'ultimo, la prestazione dei soggetti era valutata in un solo periodo di 14 giorni, nella quale erano esposti agli stimoli da distinguere.

Lo spostamento dei soggetti nelle vasche in cui avveniva la prova avveniva quattro giorni prima dell'inizio della stessa, qui potevano familiarizzare con l'acquario per 48 ore. Dopo si entrava nel periodo di training, per due giorni si abituavano i soggetti alla presenza e all'avvicinamento della bacchetta predisposta per presentare gli stimoli ma con un cartoncino plastificato quadrato bianco di lato 3 cm, veniva presentata solo una bacchetta alternando i lati corti delle vasche tra le prove.

In questi due giorni le prove furono sei durante il primo giorno, ripetute ogni quarto d'ora e dilazionate da una pausa di 90 minuti dopo la terza prova; il secondo giorno furono effettuate 12 prove con le stesse modalità ma l'intervallo di 90 minuti era dopo la sesta prova. Lo scopo di questa fase era avvicinare i soggetti all'asta quando questa veniva immersa, per ottenere questo comportamento davanti ad essa veniva iniettata con l'ausilio di una pipetta Pasteur del cibo (*Artemia salina*) in quantità tale da non saturare i soggetti e poter proseguire le prove fino alla fine.

Dopo si passava al periodo di test, i soggetti svolgevano 12 prove totali con un intervallo di un quarto d'ora tra una prova e l'altra con una pausa di 90 minuti tra la sesta e la settima prova (figura 9).

Dei 12 soggetti 6 di questi furono testati per lo stimolo "croce" di cui 3 in modalità "sparsa" e i restanti in modalità "densa"; i restanti 6 per lo stimolo "cerchio" con gli stessi sottogruppi: 3 per la modalità "sparsa" e 3 in modalità "densa".



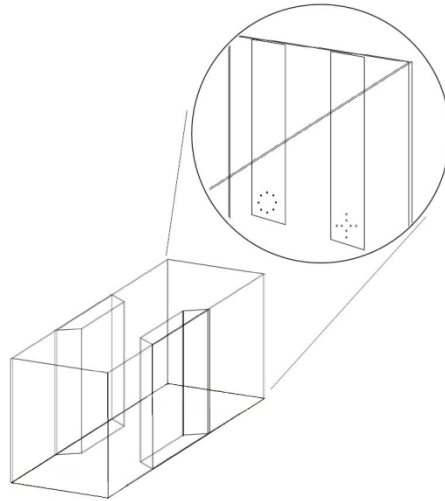


Figura 7, modalità di presentazione degli stimoli al soggetto

Come nella fase di training, una volta che il soggetto si avvicinava allo stimolo corretto per rinforzare il comportamento gli si somministrava solo del cibo vivo (*A. salina*, durante la fase di test venivano nutriti solo in questo momento) con una pipetta Pasteur e lo stimolo errato veniva eliminato. Per eludere l'influenza dello sperimentatore sul soggetto il cibo veniva fornito solamente dopo la scelta corretta dell'individuo, per distinguere le scelte dei soggetti è stato optato per l'avvicinamento del soggetto allo stimolo per meno di una lunghezza del suo corpo. Se il soggetto effettuava una scelta errata il cibo non veniva erogato e le bacchette con gli stimoli venivano rimosse.

Nella fase di test l'ordine di presentazione degli stimoli era pseudo-casuale bilanciando la posizione dello stimolo corretto (destra o sinistra) e la posizione frontale o posteriore per ogni soggetto; evitando di presentare consecutivamente più di due volte uno stimolo nella stessa posizione.

Per ogni giornata veniva calcolato un indice che corrispondeva alla performance di ogni soggetto, il risultato di questo calcolo era compreso tra 0 e 1, in questo continuum, un risultato vicino allo 0 era indice di una scelta dello stimolo errato, al contrario un risultato tendente all'1 indicava una scelta corretta, la formula utilizzata è stata:

$$\frac{\text{Scelta stimolo corretto}}{\text{Scelta stimolo corretto} + \text{Scelta stimolo errato}}$$



## 4. RISULTATI

Considerando tutti i giorni di test i soggetti hanno mostrato una preferenza statisticamente significativa per la configurazione globale ( $t(10)=3.80$ ,  $p=0.003$ ) scegliendo infatti per il 55.7 ± 0.5% delle volte lo stimolo globale (croce formata da cerchi o cerchio formato da croci). Questa preferenza è presente già a partire dal primo giorno di osservazione ( $t(10)=3.52$ ,  $p=0.006$ ).

È stata condotta un'analisi della varianza mettendo a fattore lo stimolo rinforzato nella fase di addestramento (croce o cerchio) e la configurazione (densa o sparsa) per indagare se questi fattori influenzassero la scelta dei soggetti (figura 8). I risultati indicano che il tipo di stimolo non ha influenzato la scelta ( $F(1,11)=0.026$ ,  $p=0.875$ ) mentre i soggetti hanno scelto più frequentemente la configurazione globale nella condizione sparsa ( $F(1,11)=7.193$ ,  $p=0.031$ ). L'interazione stimolo x configurazione invece non è risultata statisticamente significativa ( $F(1,11)=0.799$ ,  $p=0.401$ ).

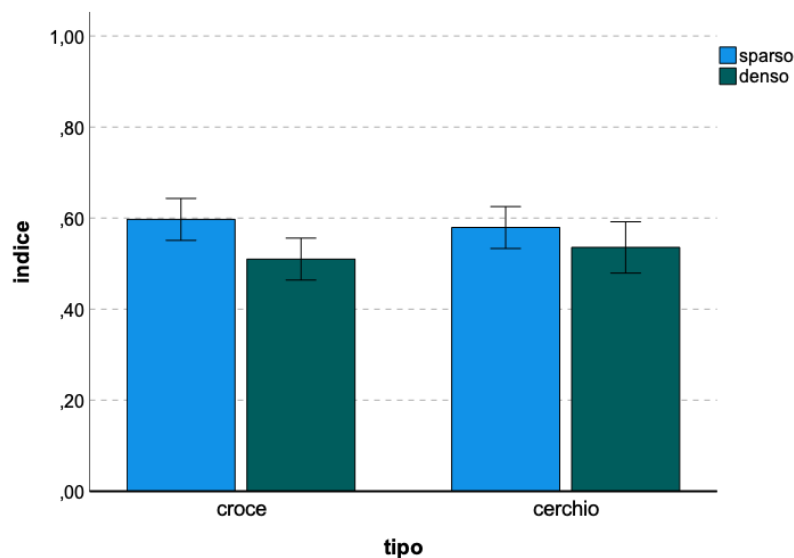


Figura 8, grafico sugli indici di varianza tra lo stimolo rinforzato nell'addestramento e la configurazione

È stata condotta anche un'analisi della varianza a misure ripetute per verificare se il comportamento dei soggetti variasse con il progredire dei giorni di test. Anche in questo

caso sono stati messi a fattore il tipo di stimolo e la configurazione (figura 9). L'analisi non ha messo in evidenza alcun effetto statisticamente significativo dei fattori principali e delle interazioni di primo e secondo grado indicando quindi che il comportamento dei soggetti non varia in modo significativo con il trascorrere dei giorni.

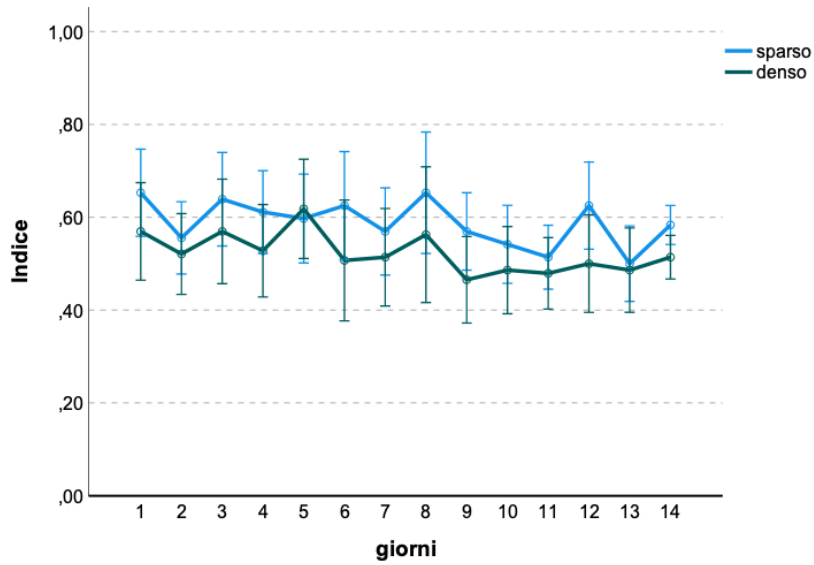


Figura 9, grafico sugli indici di varianza a misure ripetute

## 5. DISCUSSIONE

Lo scopo di questo lavoro era quello di indagare quali differenze possono sussistere nella performance cognitiva tra adulti di *P. reticulata* e *zebrafish* che siano legate alla metodologia utilizzata. Come descritto nell'introduzione, *guppies* ha mostrato di arrivare in pochi giorni ad un livello di apprendimento significativo quando ai soggetti è richiesto di imparare a distinguere in base al colore e alla forma. Allo stesso modo sono sufficienti pochi giorni di addestramento per permettere ai soggetti di questa specie di imparare una serie di discriminazioni numeriche.

Recentemente il sempre maggior impiego di *zebrafish* nel campo della cognizione comparata ha reso particolarmente urgente l'adozione di tecniche comportamentali per misurare le loro performance cognitive. In quest'ottica sono stati condotti diversi studi volti ad indagare se fosse possibile/consigliabile sviluppare tecniche semiautomatiche con le quali bypassare i costi associati al training estensivo (numero limitato a 12 prove al giorno per un intervallo standard di 14 giorni). Le tecniche di osservazione semiautomatiche sono ormai di riferimento in organismi modello quali primati ed uccelli ma non conoscono ancora un largo impiego nei pesci. I dati presenti in letteratura indicano però una discreta efficacia di questi metodi per cui era lecito attendersi che anche in *zebrafish* risultati simili fossero plausibili. Contrariamente a questa previsione *zebrafish* ha mediamente mostrato una curva di apprendimento significativamente inferiore a *guppy* osservati nelle medesime condizioni. Allo scopo di chiarire se queste differenze fossero effettivamente legata alla specie o al rispettivo adattamento alle tecniche utilizzate, individui adulti di *zebrafish* sono stati osservati tramite training estensivo manuale nella stessa serie di compiti ai quali precedentemente erano stati sottoposti adulti di *guppy*. I risultati raccolti prima del presente studio hanno messo in evidenza come anche *zebrafish* testato con una metodologia manuale apprenda sia basandosi sull'informazione cromatica che basandosi sulla forma ma con tempistiche più dilatate rispetto a *guppies* e con una performance media collettiva che oscilla sul 55% di risposte corrette (rispetto al 62-63% registrato in *guppies*). Questi primi risultati seppur incoraggianti non spiegherebbero comunque la differenza in

performance quando ai soggetti è richiesta una discriminazione basata sulla quantità. In questo caso, infatti, *zebrafish* non raggiunge le performance documentate in *zebrafish*.

Una possibile spiegazione alternativa alla metodologia utilizzata che potrebbe spiegare questa differenza tra le due specie fa riferimento allo stile percettivo adottato con riferimento particolare al ruolo della gerarchia globale/locale nell'analisi di stimoli visivi. Studi già condotti hanno messo in evidenza una preferenza per il globale che non dipende dalla dimensione o densità degli stimoli in continuità con quanto trovato nella nostra specie. Lo stile percettivo adottato potrebbe fornire indicazioni utili su come *zebrafish* analizza lo stimolo numerico e capire, quindi, se possa far maggior affidamento ad una informazione locale (i.e. i punti che compongono lo stimolo) o su una globale (i.e. la forma complessiva sottesa dallo stimolo).

I risultati ottenuti in questo studio mettono in evidenza una preferenza per la configurazione globale che anche in questo caso non viene influenzata dal tipo di stimolo utilizzato (croce o cerchio) e dalla configurazione (sparsa o densa). La preferenza per il globale si manifesta sin dal primo giorno di test e rimane pressoché stabile per tutti i rimanenti giorni di osservazione.

È difficile stabilire se e quanto questa preferenza possa spiegare le differenti performance tra *guppies* e *zebrafish* di fronte a compiti di discriminazione numerica. È però importante notare come in un recente studio condotto su *guppies* proprio utilizzando stimoli gerarchici non sia emersa la stessa tendenza verso il globale. Detto questo la preferenza per il globale potrebbe anche solo essere un effetto secondario dello stile di nuoto adottato dalle due specie; *guppies* è solito nuotare in modo controllato e senza grandi accelerazioni, cosa che consente ai pesci di questa specie di osservare mediamente per diversi secondi uno stimolo prima di operare una scelta. D'altro canto *zebrafish* mostra un nuoto molto più nervoso e sostenuto rendendolo meno adatto a questo tipo di osservazione comportamentale. In altre parole *zebrafish* può più facilmente trovarsi di fronte ad una scelta già operata ancor prima di aver analizzato le caratteristiche locali dello stimolo.

Al netto di queste considerazioni è però necessario sottolineare come questo studio fornisce ulteriori strumenti per confrontare criticamente le prestazioni di *zebrafish* in

compiti cognitivi allo scopo di individuare il miglior set up sperimentale nel quale condurre osservazioni comportamentali su questa specie.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Agrillo, C., & Bisazza, A. (2014). Spontaneous versus trained numerical abilities. A comparison between the two main tools to study numerical competence in non-human animals. *Journal of Neuroscience Methods*, *234*, 82–91.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.027>

Agrillo, C., & Bisazza, A. (2018). Understanding the origin of number sense: A review of fish studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1740), 20160511.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0511>

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.

<https://doi.org/10.1007/s10071-008-0140-9>

Agrillo, C., Dadda, M., Serena, G., & Bisazza, A. (2009). Use of Number by Fish. *PLOS ONE*, *4*(3), e4786.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004786>

Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M. E., & Bisazza, A. (2017). Numerical abilities in fish: A methodological review. *Behavioural Processes*, *141*, 161–171.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.02.001>

Aizenberg, M., & Schuman, E. M. (2011). Cerebellar-dependent learning in larval zebrafish. *Journal of Neuroscience*, *31*(24), 8708–8712.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6565-10.2011>

Amundsen, T., & Forsgren, E. (2001). Male mate choice selects for female coloration in a fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(23), 13155–13160.

<https://doi.org/10.1073/pnas.211439298>

Aoki, R., Tsuboi, T., & Okamoto, H. (2015). Y-maze avoidance: An automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neuroscience Research*, *91*, 69–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.012>

Atkinson - Hilgard - S. Nolen-Hoeksema, B.L. Fredrickson, G.R. Loftus, C. Lunz (2011), *Introduzione alla psicologia 15° edizione*, Piccin, Padova. Pagine 114-122

Bánszegi, O., Urrutia, A., Szenczi, P., & Hudson, R. (2016). More or less: Spontaneous quantity discrimination in the domestic cat. *Animal Cognition*, *19*(5), 879–888.  
<https://doi.org/10.1007/s10071-016-0985-2>

Bisazza, A., Agrillo, C., & Lucon-Xiccato, T. (2014). Extensive training extends numerical abilities of guppies. *Animal Cognition*, *17*(6), 1413–1419.  
<https://doi.org/10.1007/s10071-014-0759-7>

Blaser, R., & Heyser, C. (2015). Spontaneous object recognition: A promising approach to the comparative study of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00183>

Boakes, R. (1984). *From Darwin to Behaviourism: Psychology and the Minds of Animals*. CUP Archive.

Braithwaite, V. A. (2006). Cognitive ability in fish. *Fish physiology*, *24*, 1.  
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)24001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(05)24001-3)

Brannon, E. M., & Terrace, H. S. (1998). Ordering of the Numerosities 1 to 9 by Monkeys. *Science*, *282*(5389), 746–749.  
<https://doi.org/10.1126/science.282.5389.746>



Brown, C., & Laland, K. N. (2003). Social learning in fishes: A review. *Fish and fisheries*, 4(3), 280–288.

<https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00122.x>

Bshary, R., & Brown, C. (2014). Fish cognition. *Current Biology*, 24(19), R947–R950.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.043>

Bshary, R., Wickler, W., & Fricke, H. (2002). Fish cognition: A primate's eye view.

*Animal Cognition*, 5(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1007/s10071-001-0116-5>

Cavoto, K. K., & Cook, R. G. (2001). Cognitive precedence for local information in hierarchical stimulus processing by pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27(1), 3–16.

<https://doi.org/10.1037/0097-7403.27.1.3>

Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, 70(1), 19–31.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.03.001>

D'Costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169–177.

<https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0562>

David Navon, Forest before trees: The precedence of global features in visual perception, *Cognitive Psychology*, Volume 9, Issue 3, 1977, Pages 353-383, ISSN 0010-0285, [https://doi.org/10.1016/0010-0285\(77\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0010-0285(77)90012-3).

Dörr, S., & Neumeyer, C. (2000). Color constancy in goldfish: The limits. *Journal of Comparative Physiology A*, 186(9), 885–896.

<https://doi.org/10.1007/s003590000141>

Dugatkin, L. A. (1996). Copying and mate choice. *Social learning in animals: The roots of culture*, 85–105.

<https://doi.org/10.1016/B978-012273965-1/50006-6>

Dzieweczynski, T. L., Russell, A. M., Forrette, L. M., & Mannion, K. L. (2014). Male behavioral type affects female preference in Siamese fighting fish. *Behavioral Ecology*, 25(1), 136–141.

<https://doi.org/10.1093/beheco/art095>

Gatto, E., Lucon-Xiccato, T., Bisazza, A., Manabe, K., & Dadda, M. (2020). The devil is in the detail: Zebrafish learn to discriminate visual stimuli only if salient. *Behavioural Processes*, 179, 104215.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104215>

Gatto, E., Santacà, M., Verza, I., Dadda, M., & Bisazza, A. (2021). Automated Operant Conditioning Devices for Fish. Do They Work? *Animals*, 11(5), 1397.

<https://doi.org/10.3390/ani11051397>

Gatto, E., Testolin, A., Bisazza, A., Zorzi, M., & Lucon-Xiccato, T. (2020). Poor numerical performance of guppies tested in a Skinner box. *Scientific reports*, 10(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73851-1>

Gómez-Laplaza, L. M., & Gerlai, R. (2011). Spontaneous discrimination of small quantities: Shoaling preferences in angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Animal Cognition*, 14(4), 565–574. <https://doi.org/10.1007/s10071-011-0392-7>

Hauser, M. D., Carey, S., & Hauser, L. B. (2000). Spontaneous number representation in semi-free-ranging rhesus monkeys. *Proceedings of the Royal Society of London*.

*Series B: Biological Sciences*, 267(1445), 829–833.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1078>

Kabadayi, C., Bobrowicz, K., & Osvath, M. (2018). The detour paradigm in animal cognition. *Animal Cognition*, 21(1), 21–35.

<https://doi.org/10.1007/s10071-017-1152-0>

Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 63–75.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>

Kieffer, J. D., & Colgan, P. W. (1992). The role of learning in fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2(2), 125–143.

<https://doi.org/10.1007/BF00042881>

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.

<https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Kozak, R., Martinez, V., Young, D., Brown, H., Bruno, J. P., & Sarter, M. (2007). Toward a Neuro-Cognitive Animal Model of the Cognitive Symptoms of Schizophrenia: Disruption of Cortical Cholinergic Neurotransmission Following Repeated Amphetamine Exposure in Attentional Task-Performing, but Not Non-Performing, Rats. *Neuropsychopharmacology*, 32(10), 2074–2086.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301352>

Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2014). Discrimination reversal learning reveals greater female behavioural flexibility in guppies. *Biology Letters*, 10(6), 20140206.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0206>

Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2017). Complex maze learning by fish. *Animal Behaviour*, *125*, 69–75.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.12.022>

Lucon-Xiccato, T., Manabe, K., & Bisazza, A. (2019). Guppies learn faster to discriminate between red and yellow than between two shapes. *Ethology*, *125*(2), 82–91.

<https://doi.org/10.1111/eth.12829>

Lucon-Xiccato, T., Santacà, M., Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., & Dadda, M. (2019). Guppies, *Poecilia reticulata*, perceive a reversed Delboeuf illusion. *Animal Cognition*, *22*(3), 291–303.

<https://doi.org/10.1007/s10071-019-01237-6>

Manabe, K. (2017). The Skinner box evolving to detect movement and vocalization. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, *43*(2), 192–211.

<https://doi.org/10.5514/rmac.v43.i2.62313>

Manabe, K., Dooling, R. J., & Takaku, S. (2013a). An automated device for appetitive conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, *10*(4), 518–523.

<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0776>

Manabe, K., Dooling, R. J., & Takaku, S. (2013b). Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, *98*, 106–111.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2013.05.013>

Manabe, K., Kuwata, S., Kurashige, N., Chino, K., & Ogawa, T. (1992). Time allocations of various activities under multiple schedules in pigeons. *Behavioural Processes*, *26*(2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(92\)90007-Z](https://doi.org/10.1016/0376-6357(92)90007-Z)

Meshalkina, D. A., Kizlyk, M. N., Kysil, E. V., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., Barcellos, L. J., Song, C., & Kalueff, A. V. (2017). Understanding zebrafish

cognition. *Behavioural processes*, 141, 229–241.

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.11.020>

Miletto Petrazzini, M. E., Parrish, A. E., Beran, M. J., & Agrillo, C. (2018). Exploring the solitaire illusion in guppies (*Poecilia reticulata*). *Journal of Comparative Psychology*, 132(1), 48–57. <https://doi.org/10.1037/com0000092>

Mueller, K. P., & Neuhauss, S. C. F. (2012). Automated visual choice discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Integrative Neuroscience*.

<https://doi.org/10.1142/S0219635212500057>

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

<http://dx.doi.org/10.1002/9781119174844>

Newport, C., Wallis, G., & Siebeck, U. E. (2018). Object recognition in fish: Accurate discrimination across novel views of an unfamiliar object category (human faces). *Animal Behaviour*, 145, 39–49.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.09.002>

Noonan, K. C. (1983). Female mate choice in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Animal Behaviour*, 31(4), 1005–1010.

[https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(83\)80005-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(83)80005-0)

Parker, M. O., Gaviria, J., Haigh, A., Millington, M. E., Brown, V. J., Combe, F. J., & Brennan, C. H. (2012). Discrimination reversal and attentional sets in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 232(1), 264–268.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.035>

Piffer, L., Petrazzini, M. E. M., & Agrillo, C. (2013). Large Number Discrimination in Newborn Fish. *PLOS ONE*, 8(4), e62466.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062466>

Reinagel, P. (2013). Speed and Accuracy of Visual Motion Discrimination by Rats. *PLOS ONE*, 8(6), e68505.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068505>

Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 6(4), 209–240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>

Santacà, M., & Agrillo, C. (2020). Perception of the Müller–Lyer illusion in guppies. *Current Zoology*, 66(2), 205–213.

<https://doi.org/10.1093/cz/zoz041>

Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour*, 61(2), 277–286.

<https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1606>

Sovrano, V. A., Baratti, G., Potrich, D., & Bertolucci, C. (2020). The geometry as an eyed fish feels it in spontaneous and rewarded spatial reorientation tasks. *Scientific Reports*, 10(1), 8020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64690-1>

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

<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

Spinuzzi, G., De Lillo, C., & Truppa, V. (2003). Global and local processing of hierarchical visual stimuli in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Journal of Comparative Psychology*, 117(1), 15–23.

<https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.15>

Thorndike, E. L. (1898). Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals. *The Psychological Review: Monograph Supplements*, 2(4), i.

<https://doi.org/10.1037/h0092987>

Truppa, V., Carducci, P., Trapanese, C., & Hanus, D. (2015). Does presentation format influence visual size discrimination in tufted capuchin monkeys (*Sapajus spp.*)? *PloS one*, *10*(4), e0126001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126001>

Truppa, V., Sovrano, V. A., Spinozzi, G., & Bisazza, A. (2010). Processing of visual hierarchical stimuli by fish (*Xenotoca eiseni*). *Behavioural Brain Research*, *207*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.039>

Von Frisch, K. (1914). *Der farbensinn und formensinn der biene* (Vol. 1). Fischer.

<https://doi.org/10.5962/bhl.title.11736>

Vallortigara, G., Chiandetti, C., Rugani, R., Sovrano, V. A., & Regolin, L. (2010). Animal cognition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, *1*(6), 882-893.

<https://doi.org/10.1002/wcs.75>

West, R. E., & Young, R. J. (2002). Do domestic dogs show any evidence of being able to count? *Animal Cognition*, *5*(3), 183–186.

<https://doi.org/10.1007/s10071-002-0140-0>

Woodruff, M. L. (2017). Consciousness in teleosts: There is something it feels like to be a fish. *Animal Sentience*, *2*(13).

<https://doi.org/10.51291/2377-7478.1198>