



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione - DPSS

**Corso di Laurea Triennale in Scienze psicologiche dello sviluppo, della
personalità e delle relazioni interpersonali**

Elaborato finale

**Apprendimento discriminativo in larve di zebrafish.
Uno studio sulla percezione cromatica.**

Discriminative learning in zebrafish larvae

Relatore:

Prof. Marco Dadda

Correlatrice:

Gabriela Gjinaj

***Laureando:* Raffaele De Martin**

**Matricola: 1191215
Anno Accademico 2022/2023**

Indice

1. Introduzione

1.1 Cognizione nei pesci

1.2 Zebrafish nella ricerca

1.2.1 Capacità di discriminazione in zebrafish

1.2.2 Discriminazione in larve di zebrafish

2. Biologia della specie

3. Materiali e metodi

3.1 Soggetti sperimentali

3.2 Apparato sperimentale

3.3 Procedura e stimoli sperimentali

4. Risultati

5. Discussione

6. Bibliografia

1. Introduzione

Lo studio della maturazione cerebrale e dello sviluppo delle abilità cognitive è fondamentale per comprendere il funzionamento del sistema nervoso. La maggior parte della ricerca a riguardo è stata svolta sull'uomo, specie caratterizzata da un'estrema forma di altricialità. Infatti, alla nascita, i bambini sono molto vulnerabili e presentano capacità cognitive ancora rudimentali. Normalmente, migliorano attraverso lo sviluppo, come esemplificato dai dati raccolti da Cantrell e Smith (2013) riguardo le abilità numeriche di neonati e bambini di diverse età, dimostrando come la capacità di distinguere fra quantità numeriche diventa più raffinata con la crescita, passando, ad esempio, da discriminare fra 8 e 16 a 6 mesi a discriminare fra 8 e 12 a 10 mesi. Similmente accade per le abilità di discriminazione cromatica: la visione a colori compare nei neonati fra il primo e il terzo mese di vita, e già all'interno di questo periodo si osserva un miglioramento di questa abilità (Brown, 1990).

Non molto si sa riguardo lo sviluppo cognitivo di altre specie. L'altricialità caratterizza la maggior parte degli animali mammiferi e degli uccelli, ma nonostante ciò si sono studiate in dettaglio le funzioni cognitive di alcune specie precoci, che già presentano, cioè, un certo livello di maturità alla nascita. Una di queste è il pollo domestico (*Gallus gallus domesticus*), i cui pulcini posseggono già abilità sensoriali e motorie sviluppate. Infatti, sono capaci di distinguere fra conspecifici e potenziali predatori e da questi conspecifici (oltre al care-giver) sono in grado di apprendere comportamenti, come, ad esempio, evitare oggetti non commestibili e sono già capaci di distinguere fra colori diversi (Daisley et al., 2011).

1.1 Cognizione nei pesci

Recentemente è cresciuto l'interesse per la cognizione dei pesci teleostei; questi contano per più del 50% dei vertebrati, con circa 30,000 specie, adattati a vivere in ogni tipo di ambiente

acquatico (Ravi e Venkatesh, 2018). La ricerca ha mostrato come i teleosti posseggano abilità cognitive complesse, come la capacità di riconoscere i conspecifici e imparare da loro a risolvere problemi anche attraverso la cooperazione (Brown et al. 2011; Bshary e Brown, 2014). Gli studi sui pesci teleosti si sono concentrati su un numero limitato di specie, tra cui quella forse più utilizzata è il guppy (*Poecilia reticulata*). I guppy sono estremamente precoci alla nascita, appaiono come adulti in miniatura ed esibiscono un numero di comportamenti compressi, quali nuotare in modo coordinato, controllo dei predatori, distinguere fra gruppi sociali in base alla loro numerosità, mostrando una preferenza per quelli più grandi, ma questa loro abilità è limitata in quanto non sembrano capaci di discriminare fra banchi che superano i 4 membri. Inoltre, sono capaci di riconoscere i conspecifici, distinguere tra oggetti familiari e non e possono imparare ad associare oggetti a ricompense in cibo (Bisazza et al., 2010; Evans e Magurran, 2000; Miletto Petrazzini et al., 2012; Piffer et al., 2013).

1.2 Zebrafish nella ricerca

1.2.1 Capacità di discriminazione in zebrafish

Un'altra specie che sta acquistando sempre più valore come modello di studio è lo zebrafish (*Danio rerio*); non solo per la comprensione di funzioni cerebrali, ma anche in altre discipline, in particolare la biomedica, dove l'uso di questa specie risulta molto vantaggioso in quanto presenta alta omologia fisiologica e genetica con i mammiferi, oltre che fertilizzazione esterna, sviluppo rapido, trasparenza dell'embrione e della larva, facilità nella manipolazione genetica e convenienza in termini di costi e spazio; limiti del modello includono genoma duplice, impossibilità di ottenere ceppi inincrociati come nei topi da

laboratorio e la presenza di aree cerebrali non sviluppate quanto nei mammiferi e di difficile mappatura (Stewart et al., 2014).

Nonostante la sua crescente popolarità nella ricerca, però, si conosce poco sulle abilità cognitive dello zebrafish. In particolare, non si sa ancora quale siano le vere capacità di questa specie per quanto riguarda le abilità di apprendimento e compiti di discriminazione visiva, in quanto le informazioni a riguardo sono incomplete o contrastanti. Gli zebrafish sembrano avere limitate abilità a distinguere fra diverse forme geometriche: tramite una serie di esperimenti, Gatto et al. (2020) hanno osservato le capacità di zebrafish nel discriminare fra due colori (rosso e verde) e due forme geometriche (cerchio o triangolo). Dai risultati emerge che hanno un'ottima capacità nella discriminazione cromatica, ma insoddisfacente per le forme geometriche. Questo risultato è in forte contrasto con le abilità di altre specie come il guppy, che, ad esempio, ha mostrato ottime capacità a distinguere sia fra colori che fra forme diverse, con una percentuale di accuratezza del 90% e dell'80% rispettivamente, secondo lo studio svolto da Lucon-Xiccato et al. (2019). Infatti gli zebrafish sembrano possedere capacità di discriminazione tra forme e quantità peggiori di altre specie di teleosti: in uno studio di Agrillo et al. (2012), 5 specie di teleosti, fra cui appunto lo zebrafish, sono state testate secondo le loro capacità di discriminazione numerica, presentandole con vari rapporti di quantità piccole e grandi; dai risultati si nota come le capacità degli zebrafish sono peggiori delle altre specie utilizzate e ciò è ipotizzato essere dovuto a minori abilità di apprendimento visivo. Altri studi a volte però affermano il contrario, mostrando lo zebrafish come capace quanto o anche superiore ad altre specie: in un altro studio su 5 specie di teleosti, Santacà et al. (2020) hanno osservato la capacità di queste specie ad apprendere a discriminare fra due figure caratterizzate da congruenza, o incongruenza, tra informazione globale e locale; nei risultati,

a differenza dello studio prima citato, lo zebrafish non si è distinto come il peggiore, ma dimostra di avere abilità simili alle altre specie.

Una maggiore sicurezza nelle abilità cognitive dello zebrafish sta nel gran numero di dati dimostranti ottime capacità di discriminazione cromatica. Gatto et al. (2020) e Miletto Petrazzini et al. (2020), per esempio, hanno entrambi osservato l'abilità di zebrafish di distinguere fra due colori attraverso condizionamento operante, dove il raggiungimento dell'area contenente lo stimolo "corretto" da parte del soggetto veniva ricompensata con cibo, con ottenimento di ottimi risultati da entrambi gli studi.

1.2.2 Discriminazione in larve di zebrafish

Come accennato precedentemente, uno dei vantaggi dello zebrafish come modello di studio è la trasparenza dell'embrione, che permette di seguirne l'ontogenesi e l'attività neurale via varie tecniche *in vivo* (Agrillo e Bisazza, 2018), per questo vi è molto interesse nello studiare la specie in questo stadio di sviluppo. Nonostante il sistema nervoso non sia ancora completamente sviluppato, le larve di zebrafish mostrano di possedere già un livello di discriminazione visiva. Barker e Baier (2015) hanno studiato l'attività neurale in larve di zebrafish quando esposti a stimoli in movimento di diverse dimensioni; in genere è stato osservato come le larve tendevano ad evitare gli stimoli grandi e ad avvicinarsi a quelli piccoli, comportamenti che appaiono come movimenti rispettivamente atti a catturare prede e a evitare predatori. Gatto et al. (2021) tramite un paradigma di preferenza spontanea hanno osservato il comportamento di larve di zebrafish in una serie di quattro esperimenti in cui i soggetti venivano esposti a diverse coppie di stimoli visivi: colore (rosso o verde), forma (cerchio o triangolo), orientamento (linea orizzontale o verticale), numero (3 o 2 linee verticali); in ognuno di questi esperimenti le

larve hanno mostrato preferenza di uno stimolo sull'altro, nuotando vicino ad esso. Capacità di discriminazione visiva cromatica è stata anche confermata dagli studi di Park et al. (2016) e Oliveira et al. (2015), in entrambi dei quali le larve di zebrafish erano poste all'interno di apparati in cui venivano presentate con quattro stimoli di colore diverso, e, liberi di muoversi al loro interno, osservate nei loro movimenti; in entrambi gli studi le larve hanno mostrato preferenza per il colore blu. Questi risultati indicano che le larve sono dotate di capacità cognitive innate, che permettono la sopravvivenza in autonomia. La discriminazione visiva è influenzata dall'esperienza, come notato da Gatto et al. (2021), che comparando il comportamento di larve di zebrafish poste in un ambiente arricchito con larve in un ambiente povero, hanno notato come la preferenza per uno stimolo era esibita dalle prime, mentre le seconde mostravano maggiore fobia per gli stimoli nuovi.

Nello studio qui presente si va a studiare tramite un paradigma di condizionamento classico l'abilità delle larve di zebrafish di distinguere fra stimoli cromatici.

2. Biologia della Specie

Danio rerio (Hamilton, 1822), è un teleosta d'acqua dolce membro della famiglia dei Cyprinidae, riferito comunemente come *zebrafish* per via del suo motivo striato.

Ha dimensioni ridotte, che possono variare dai 9.0mm ai 38.0mm, corpo fusiforme e due paia di barbigli; le caratteristiche strisce corrono orizzontalmente dall'opercolo alla pinna caudale formando un motivo alternato blu e argento (Barman, 1991; Spence, Gerlach, Lawrence, Smith, 2008). È presente un lieve dimorfismo sessuale: anche se risulta difficile distinguere

tra i sessi, il profilo del corpo della femmina durante la gravidanza è più rotondo, sufficientemente diverso dal maschio da permettere l'identificazione; la femmina, inoltre, possiede delle papille genitali ben distinte e la pinna anale è più grande nel maschio (Laale, 1977).



Figura 1 - Esemplici adulti di *Danio rerio* femmina (sopra) e maschio (sotto)

In natura, la sua presenza è stata confermata in India (Spence, Gerlach, Lawrence, Smith, 2008), in particolare lo si può trovare nei bacini fluviali del Gange e del Brahmaputra nel nord-est India, in Bangladesh e in Nepal. Preferisce vivere in acque poco profonde, limpide con visibilità fino a 30cm di profondità, spesso in zone non ombreggiate con vegetazione acquatica e substrato limoso (McClure, McIntyre, McCune, 2006). Predilige inoltre acque ferme a fiumi e si possono comunemente trovare in stagni, spesso vicino alle risaie (Spence, Gerlach, Lawrence, Smith, 2008). L'associazione con le piantagioni di riso è in parte spiegata dall'utilizzo di fertilizzanti che promuovono la proliferazione di zooplancton, prevalenti nella dieta dello zebrafish (Spence *et al.*, 2007).

Zebrafish sono onnivori, ma si nutrono principalmente di zooplancton e di insetti. Analisi dei contenuti dell'intestino ha mostrato inoltre la presenza di fitoplancton, insetti terrestri, aracnidi, alghe e materiale inorganico, il ciò indica che consumano il plancton nella colonna d'acqua, ma anche il cibo che trovano a livello del substrato e vicino la superficie (Spence *et al.*, 2007).

La riproduzione in natura di zebrafish coincide circa con l'inizio della stagione dei monsoni, in laboratorio è frequente tutto l'anno (Spence *et al.*, 2006; Spence *et al.*, 2007). È una specie

ovipara, la femmina è capace di deporre ogni 2-3 giorni e la covata può contenere anche centinaia di uova (Spence *et al.*, 2007). Le uova raggiungono i 0.7mm di diametro quando fertilizzate e sono trasparenti; vengono deposte direttamente sul substrato, senza che questo venga preparato e non ricevono cure genitoriali (Spence *et al.*, 2007). Le uova cominciano a schiudersi tra le 48 e le 72 ore dopo la fertilizzazione (hpf, hours post-fertilization) a 28.5°C (Kimmel *et al.*, 1995). Le larve appena nate misurano attorno ai 3.0mm e sono anch'esse trasparenti (Kimmel *et al.*, 1995); cominciano a nuotare a 120hpf e il loro tratto digestivo completa il suo sviluppo a 140hpf, permettendo a loro di cibarsi (Santacà *et al.*, 2022). Molto più tardi, a tre settimane di età, compaiono capacità e comportamenti sociali complessi (Dreosti *et al.*, 2015).

3. Materiali e metodi

3.1 Soggetti sperimentali

In questo esperimento sono state coinvolte un totale di 48 larve di *Danio rerio*.

I soggetti provengono da uova fecondate da adulti *Wild Type* allevati in laboratorio. Le uova, raccolte giornalmente, vengono poste in capsule Petri (50 uova per capsula) e immerse in una soluzione di *fish water* (0.5 mM NaH₂PO₄*H₂O, 0.5 mM Na₂HPO₄*H₂O, 1.5 gr Instant Ocean, 1 L H₂O deionizzata) e blu di metilene (0.0016gr/l). Le uova schiudono e le larve rimangono nelle capsule fino a 5dpf (*days post fertilization*); il sesto giorno vengono selezionate casualmente circa 120 larve (30 per gruppo sperimentale). Sempre a partire dal sesto giorno, le larve vengono nutrite con cibo in polvere (un misto di GEMMA Micro 75) due volte al giorno.

la raccolta delle uova ed esperimento avvengono tutte in una stanza apposita nel Laboratorio di Psicologia Comparata del dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova, mantenuta a circa $28.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed esposta a un ciclo giorno-notte di 14 ore di luce seguite da 10 ore di buio, per ricreare l'habitat naturale.

3.2 Apparato Sperimentale

L'esperimento è diviso in due fasi, con due apparati differenti: una fase di gruppo ed una fase individuale.

Nella fase di gruppo le larve sono poste in vaschette di dimensioni 12 x 4.8 x 4cm (Figura 2), con un restringimento centrale, dove è possibile inserire un separatore di plastica grigio con un foro di 1.8cm, permettendo sempre alle larve di passare da una metà all'altra.

Nella fase individuale le larve sono spostate e inserite singolarmente in vaschette rettangolari di dimensioni ridotte (7 x 4 x 4cm, Figura 3) anch'esse divisibili tramite un pannello, similmente alla fase precedente, con un foro di 1.4cm.

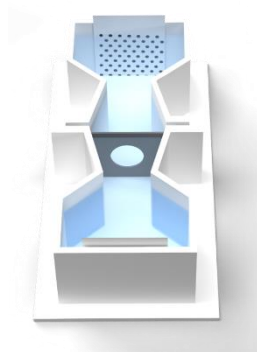


Figura 2 - Apparato per la fase di gruppo

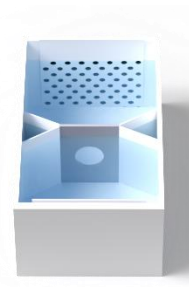


Figura 3 - Apparato per la fase individuale

Le vaschette sono state realizzate attraverso stampante 3D con materiale PLA bianco; vengono riempite con soluzione di *fish water* fino ad un'altezza di circa 3.5cm. Gli apparati

vengono inseriti in contenitori di dimensioni 60 x 27 x 40cm (Figura 4) al di sopra dei quali vengono posizionate delle telecamere utili per la ripresa del esperimento. Inoltre, i contenitori sono illuminati omogeneamente da due lampade a LED da 0.72W ciascuna, posizionate ad un'altezza di 27cm dalla base.

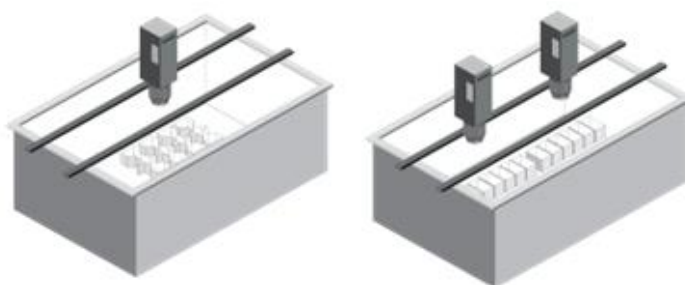


Figura 4 – Disposizione delle telecamere sull'apparato

3.3 Procedura e stimoli sperimentali

Nell'esperimento sono stati utilizzati stimoli visivi in forma di tessere di carta bianca plastificata, su cui è stampato un quadrato di colore rosso o verde (rosso: RGB: 255, 0, 0; verde: RGB: 0, 255), di dimensioni tali da poter essere inserito alle estremità corte delle vaschette in cui si trovano le larve (4.8 x 3.8cm, Fig. 5). A ogni soggetto è stata presentata la stessa coppia di stimoli.

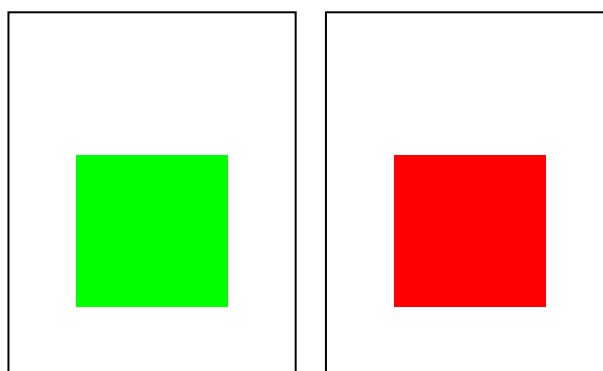


Figura 5 – Stimoli cromatici utilizzati

L'esperimento comincia a 6dpf, quando le larve vengono prelevate dalle capsule petri e introdotte in gruppi di 30 nelle vaschette a clessidra. Qui spenderanno 2 giorni per familiarizzare con il nuovo ambiente. A 7dpf viene aggiunto il pannello grigio forato, stabilendo le due metà della clessidra.

A 8dpf vengono introdotti gli stimoli e comincia il training di gruppo, della durata di 2 giorni. Metà dei soggetti sono rinforzati sempre su uno stimolo (Rosso), metà sull'altro (Verde). Ogni giorno sono eseguiti due trial, uno la mattina, l'altro il pomeriggio.

A 11dpf le larve sono selezionate casualmente ed inserite singolarmente nelle vaschette rettangolari per la fase di training individuale, della durata di 5 giorni. Come nella fase di gruppo, la vaschetta è divisa in due metà dal pannello forato, le larve sono sottoposte a due trial al giorno e metà di esse ricevono il rinforzo sempre su uno stimolo.

La procedura di training è simile in entrambe le fasi: gli stimoli vengono inseriti sulle estremità delle vaschette e il rinforzo, in forma di cibo, viene somministrato 60 minuti dopo nel settore interessato. Dopo che altri 60 minuti sono passati, gli stimoli sono rimossi, e i soggetti vengono spostati in nuove vaschette pulite, in quanto è importante che non vi siano tracce di cibo rimaste che potrebbero influenzare il comportamento delle larve. Dopo circa 4 ore ha inizio il secondo trial, inserendo gli stimoli in posizione inversa rispetto al primo; la somministrazione del rinforzo e la rimozione degli stimoli avvengono sempre a intervalli di 60 minuti. La procedura termina quando gli stimoli sono tolti alla fine del secondo trial.

Le telecamere poste verticalmente rispetto agli apparati registrano i movimenti delle larve durante il periodo che va dall'inserimento degli stimoli alla somministrazione del rinforzo.

4. Risultati

4.1 Analisi statistiche

Al fine di verificare se le larve hanno appreso ad associare lo stimolo al rinforzo alimentare, per ciascun soggetto sono state analizzate le registrazioni delle 5 giornate di training (che corrisponde ad un totale di 10 trials della durata di 60 minuti ciascuno). Per ciascun trial è stato rilevato il numero di passaggi avvenuti tra i due settori e il tempo trascorso nei due settori. In questo modo è stato possibile ottenere un indice che è stato calcolato dividendo il tempo trascorso nel settore in cui era inserito lo stimolo rinforzato con il tempo complessivo del trial.

Per verificare se c'è stato un apprendimento complessivo è stato condotto un t-test a campione unico a livello di gruppo. Inoltre, è stato fatto un t-test a campione unico separatamente per il gruppo rinforzato sullo stimolo verde e sullo stimolo rosso.

Per valutare se la performance dei soggetti è influenzata da variabili come il passare dei giorni di training, lo stimolo rinforzato (rosso oppure verde) e la sessione (mattina o pomeriggio) è stato creato un modello lineare misto (LMM, funzione 'lmer' del pacchetto R 'lme4').

In particolare, il giorno, lo stimolo e la sessione sono stati considerati fattori fissi, mentre il codice identificativo di ciascun soggetto è stato considerato come fattore random. In presenza di un effetto significativo è stato condotto un test post hoc di Tukey (funzione 'emmeans' del pacchetto di R 'emmeans').

Le analisi sono state condotte utilizzando il programma statistico RStudio, versione 4.2.2, (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.rproject.org>).

4.2 Risultati colori

Il campione finale consiste di 16 larve, 6 rinforzate sullo stimolo rosso e 10 sullo stimolo verde. Complessivamente si osserva che le larve compiono in media 3.91 ± 4.95 (media \pm SD) passaggi nelle 5 giornate di training. Inoltre, la proporzione di tempo trascorsa nel settore con lo stimolo corretto è di 0.54 ± 0.33 (media \pm SD) e non risulta essere statisticamente significativa (t -test a campione unico, $t_{15} = 1.6356$, $p = 0.123$).

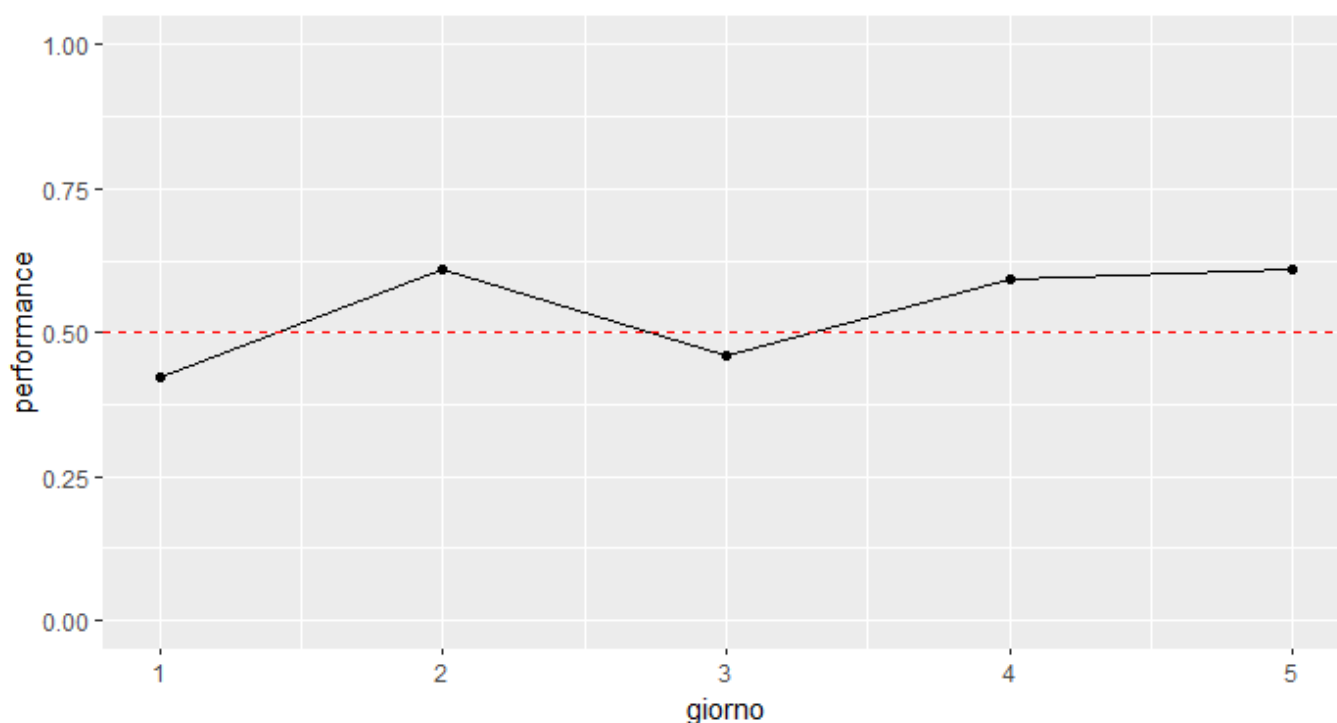


Figura 6 – Andamento medio della performance dei soggetti

Considerando separatamente i due gruppi in base allo stimolo rinforzato, si osserva che le larve rinforzate sullo stimolo rosso compiono in media 2.85 ± 4.05 (media \pm SD) passaggi e la proporzione di tempo trascorsa nel settore con lo stimolo rosso è di 0.63 ± 0.32 (media \pm SD) che risulta essere statisticamente significativa (t -test a campione unico, $t_5 = 4.5695$, $p < 0.01$). Per quanto riguarda il gruppo di soggetti rinforzati sullo stimolo verde si osserva che, in media, compiono 4.45 ± 5.35 (media \pm SD) passaggi e la proporzione di tempo trascorsa

nel settore rinforzato è di 0.48 ± 0.32 (media \pm SD) che non risulta essere statisticamente significativa (t -test a campione unico, $t_9 = -0.7811$, $p = 0.455$).

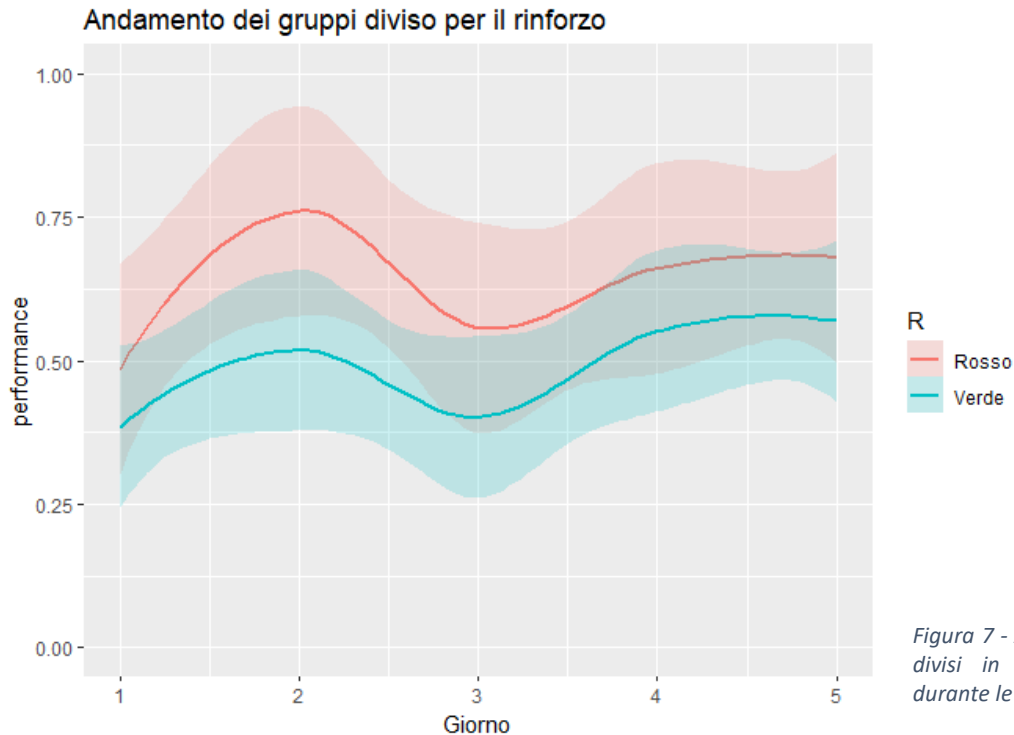


Figura 7 - Andamento dei soggetti divisi in funzione del rinforzo durante le 5 giornate di training

Il modello lineare misto ha evidenziato un effetto significativo della variabile giornate di training ($F_{1,156} = 4.4252$, $p = 0.037$), del rinforzo ($F_{1,156} = 8.3802$, $p = 0.004$) e della sessione ($F_{1,156} = 11.7914$, $p < 0.001$). Confrontando il gruppo rinforzato sul rosso con il gruppo rinforzato sul verde emerge che la media del gruppo rinforzato sul rosso è significativamente più alta ($t_{14} = 2.895$, $p = 0.012$). In altre parole, i soggetti rinforzati sul rosso mostrano di aver appreso meglio il compito che trascorrono circa il 63% del tempo in prossimità del settore rinforzato, mentre i soggetti rinforzati sul verde vi trascorrevano solamente circa il 49%. Confrontando la sessione del mattino e quella del pomeriggio, emerge che tutti i soggetti trascorrono in media più tempo in prossimità dello stimolo corretto nella sessione del mattino rispetto a quella pomeridiana ($t_{142} = 3.434$, $p < 0.001$). I soggetti trascorrono circa il $64\% \pm$

27% (percentuale media \pm SD) del tempo in prossimità del settore rinforzato durante le prove svolte la mattina, e solo il 47% \pm 35% (percentuale media \pm SD) del tempo nella sessione pomeridiana.

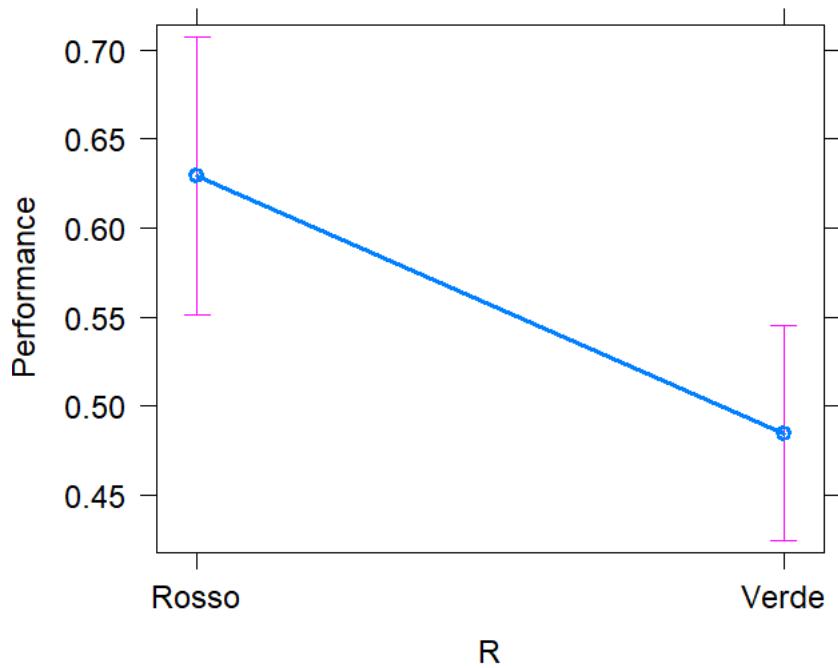


Figura 8 - Effetto della variabile stimolo

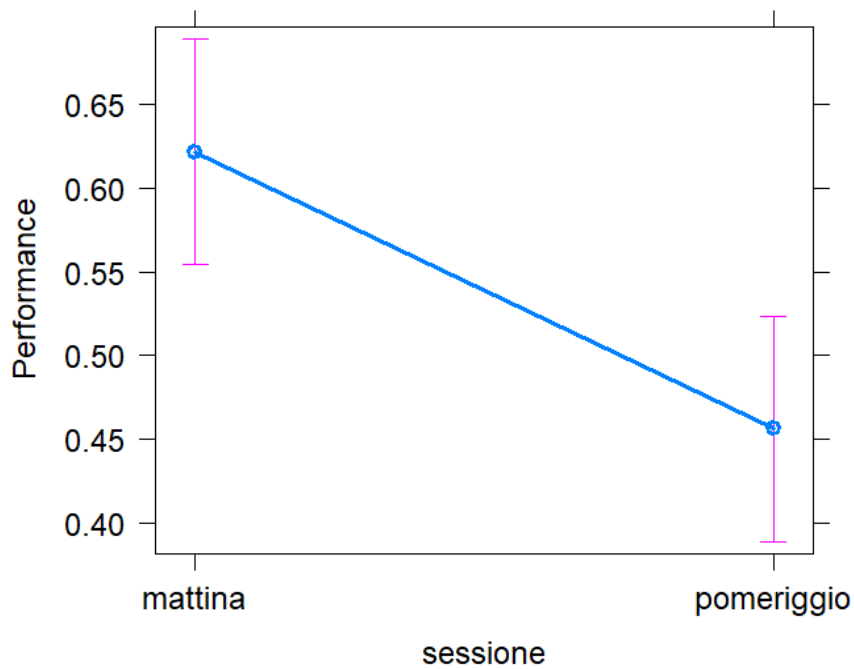


Figura 9 - Effetto della variabile sessione

5. Discussione

Gli studi sulle capacità cognitive in fasi precoci dello sviluppo in zebrafish assumono sempre più rilevanza in virtù del fatto che il pattern comportamentale di questa specie è da un lato relativamente ancora poco conosciuto e dall'altro tutto quello che riusciamo a scoprire sulle loro capacità cognitive è utile a discipline anche distanti dalla psicologia che usano zebrafish come modello di studio.

Nel contesto del comportamento e dell'apprendimento degli animali, l'apprendimento discriminativo si riferisce alla capacità degli animali di distinguere tra diversi stimoli o segnali e rispondere in modo selettivo in base alla presenza o all'assenza di tali segnali. È un aspetto fondamentale della cognizione animale e svolge un ruolo cruciale nella loro sopravvivenza e adattamento.

Gli animali possiedono la capacità di apprendere associazioni tra stimoli specifici e determinati risultati o comportamenti. L'apprendimento discriminativo implica la formazione di associazioni tra un particolare stimolo o segnale e una risposta o un risultato specifico. Ciò consente agli animali di distinguere tra stimoli rilevanti e irrilevanti nel loro ambiente e rispondere di conseguenza. Un classico esempio di apprendimento discriminativo negli animali è il condizionamento pavloviano o classico. In questo tipo di apprendimento, un animale impara ad associare uno stimolo neutro (come un suono o una luce) con uno stimolo significativo (come il cibo) che suscita una risposta naturale (come la salivazione). Nel tempo, l'animale impara a discriminare tra diversi stimoli e risponde in modo selettivo in base alla presenza o all'assenza di tali stimoli. Ad esempio, un cane può essere addestrato a salivare solo quando viene presentato un suono specifico, ignorando altri suoni simili.

L'apprendimento discriminativo non è limitato al condizionamento classico. Gli animali esibiscono anche un apprendimento discriminativo in vari altri contesti, come il condizionamento operante, dove imparano ad associare i loro comportamenti a conseguenze specifiche (ricompense o punizioni). Ad esempio, un topo può imparare a premere una leva per ricevere una ricompensa alimentare ignorando altri stimoli o azioni irrilevanti. Molti animali dimostrano abilità impressionanti nell'apprendimento discriminativo, inclusi uccelli, mammiferi e persino invertebrati. Possono discriminare tra diversi segnali sensoriali, come colori, forme, suoni o odori, e imparare a rispondere in modo diverso in base a questi segnali. Questo tipo di apprendimento consente agli animali di adattare il proprio comportamento alle mutevoli condizioni ambientali, trovare cibo, evitare i predatori e navigare nell'ambiente circostante.

Nel complesso, l'apprendimento discriminativo negli animali è un aspetto fondamentale delle loro capacità cognitive, consentendo loro di operare distinzioni precise e di rispondere in modo adattivo al loro ambiente sulla base di segnali o stimoli specifici.

L'apprendimento discriminativo è stato studiato anche in zebrafish allo scopo di far maggiormente luce sulle loro capacità cognitive e sui processi di apprendimento. Un paradigma comune utilizzato per studiare l'apprendimento discriminativo in zebrafish è il *conditioned place preference* (CPP). In questo compito, il soggetto viene posto in una vasca con due compartimenti distinti che hanno caratteristiche visive differenti. Ogni compartimento è associato a uno specifico stimolo o condizione, come la presenza di cibo o la somministrazione di un farmaco.

Attraverso esposizioni ripetute, il soggetto può imparare ad associare un compartimento a uno stimolo gratificante e preferenzialmente trascorrere più tempo in quel compartimento. Ciò indica che hanno discriminato con successo tra i due compartimenti e hanno imparato ad associare uno specifico segnale o contesto a un risultato positivo.

L'apprendimento in zebrafish è stato studiato anche utilizzando paradigmi di condizionamento operante. Ad esempio, i ricercatori hanno addestrato i soggetti ad associare un particolare segnale visivo a una ricompensa alimentare, mentre un diverso segnale visivo è associato a nessuna ricompensa. Attraverso l'addestramento e il rinforzo, il soggetto può imparare a discriminare tra questi segnali ed esibire una risposta selettiva, come avvicinarsi al segnale premiato evitando il segnale non ricompensato. Gli studi hanno anche studiato i meccanismi neurali alla base dell'apprendimento discriminativo. I ricercatori hanno identificato regioni e circuiti cerebrali coinvolti nell'elaborazione e nell'integrazione delle informazioni sensoriali, nonché aree associate all'apprendimento e alla formazione della memoria.

Zebrafish offre diversi vantaggi per lo studio dell'apprendimento discriminativo, tra cui le dimensioni ridotte, il rapido sviluppo e gli embrioni trasparenti, che consentono una precisa manipolazione e osservazione dell'attività neurale. La loro trattabilità genetica consente inoltre ai ricercatori di studiare i ruoli di specifici geni o popolazioni neuronali nell'apprendimento e nel comportamento. Nel complesso, l'apprendimento discriminativo in zebrafish fornisce approfondimenti sulle capacità cognitive e sui processi neurali alla base dell'apprendimento associativo e del processo decisionale. Contribuisce alla nostra comprensione dei meccanismi fondamentali dell'apprendimento e del comportamento nelle diverse specie.

L'apprendimento in larve di zebrafish è un'affascinante area di ricerca che esplora le capacità cognitive e la plasticità comportamentale di questi pesci allo stadio iniziale. Le larve mostrano varie forme di apprendimento e formazione della memoria, nonostante il loro sistema nervoso relativamente semplice in questa fase di sviluppo. Ancora una volta un paradigma importante utilizzato per studiare l'apprendimento nelle larve di zebrafish è il condizionamento classico di uno stimolo avversivo. Ad esempio, i ricercatori hanno condizionato le larve ad associare un particolare segnale sensoriale, come una luce o una vibrazione, a uno stimolo avverso, come una lieve scossa elettrica o l'esposizione a una sostanza chimica nociva. Attraverso ripetuti accoppiamenti del segnale e dello stimolo avversivo, le larve possono imparare a riconoscere e rispondere al segnale mostrando comportamenti difensivi, come una maggiore velocità di nuoto o il congelamento.

Un'altra forma di apprendimento studiata nelle larve è l'assuefazione. L'assuefazione si riferisce al processo mediante il quale un organismo riduce la sua risposta a uno stimolo ripetuto e non minaccioso. I ricercatori hanno osservato l'assuefazione nelle larve in varie modalità sensoriali, inclusi stimoli visivi, uditivi e tattili. Ad esempio, le larve esposte a ripetuti impulsi di luce o a un tocco gentile diminuiscono gradualmente la loro risposta nel tempo, indicando l'assuefazione.

Inoltre, è stato dimostrato che le larve di zebrafish mostrano un apprendimento sociale, dove possono imparare osservando il comportamento dei conspecifici. Ad esempio, le larve possono imparare ad associarsi preferenzialmente a un gruppo di conspecifici che mostrano un comportamento o una risposta specifici. Questa forma di apprendimento evidenzia le dinamiche sociali e l'influenza dei segnali sociali sul comportamento delle larve di zebrafish.

Gli studi hanno anche indagato i meccanismi neurali alla base dell'apprendimento nelle larve. L'uso di indicatori di calcio geneticamente codificati consente ai ricercatori di monitorare e manipolare l'attività neuronale in specifiche regioni del cervello coinvolte nell'apprendimento e nella formazione della memoria. Prendendo di mira e manipolando specifici circuiti neurali, i ricercatori possono esplorare i ruoli di diverse aree del cervello nell'apprendimento delle larve di zebrafish.

Nello studio attuale abbiamo cercato di studiare l'apprendimento discriminativo in larve di zebrafish utilizzando una semplice discriminazione basata sul colore. In letteratura non erano presenti chiare indicazioni che indicassero una preferenza spontanea per i due colori (rosso e verde) utilizzati nella fase di addestramento per cui i soggetti sono stati esposti ad una fase collettiva seguita da una individuale nella quale veniva rinforzato il settore posto in corrispondenza con il colore verde o rosso per capire poi se col progredire dei giorni i soggetti associassero il premio alimentare al colore rinforzato. I risultati mostrano che tendenzialmente i soggetti mostrano di adattare il loro comportamento associando cibo a colore e per poi sostare maggiormente nel settore precedentemente associato al cibo, anche se non in modo statisticamente significativo. L'apprendimento però è statisticamente più forte quando l'associazione avviene tra il colore rosso e il cibo rispetto al colore verde. Altro dato interessante è che la performance dei soggetti era significativamente migliore la mattina rispetto al pomeriggio. Entrambi questi fattori possono essere spiegati in svariati modi. Da un lato la preferenza maggiore verso il rosso potrebbe essere indicativa di una preferenza spontanea facilitata durante l'addestramento ma anche essere invece associata al colore del cibo somministrato alle larve durante le fasi di addestramento collettivo e individuale. Comunemente il cibo secco con cui vengono alimentate le larve ha una tonalità molto più vicina al rosso rispetto al verde ed è bene ricordare che dalla schiusa fino all'ultimo giorno

di osservazione le larve erano mantenute in condizione di impoverimento ambientale (con la sola eccezione della presenza di conspecifici) per cui l'unico stimolo, oltre al colore, al quale venivano esposte era proprio il cibo. La migliore performance registrata alla mattina potrebbe anch'essa essere legata al cibo in quanto la quantità rilasciata alla mattina potrebbe aver soddisfatto più del previsto il fabbisogno energetico quotidiano delle larve; in altre parole è possibile che si sia registrato un deciso calo motivazionale che spingeva le larve a sostare maggiormente nel settore rinforzato in quanto già sazie.

Nel complesso, lo studio dell'apprendimento nelle larve di zebrafish fornisce preziose informazioni sullo sviluppo iniziale delle capacità cognitive e possibilmente sulla plasticità comportamentale. Comprendere i meccanismi molecolari, cellulari e neurali alla base dell'apprendimento nelle larve può far luce sui principi più ampi dell'apprendimento e della memoria tra le specie e può avere implicazioni per l'apprendimento umano e i disturbi dello sviluppo neurologico.

6. Bibliografia

Agrillo, C., Miletto Petrazzini, M.E., Tagliapietra, C., Bisazza, A. (2012). Inter-specific differences in numerical abilities among teleost fish. *Frontiers in Psychology*, 3, 483. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00483>.

Agrillo, C., Bisazza, A. (2018). Understanding the origin of number sense: a review of fish studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 373, 20160511. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0511>.

Barker, A.J., Baier, H. (2015). Sensorimotor decision making in the zebrafish tectum. *Current Biology*, 25(21), 2804-2814. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.055>.

Barman, R.P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces: Cyprinidae). *Record of the Zoological Survey of India, Occasional Paper*, 137.

Bisazza, A., Piffer, L., Serena, G., e Agrillo, C. (2010). Ontogeny of numerical abilities in fish. *PLoS One*, 5(11): e15516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015516>.

Brown, A.M. (1990). Development of visual sensitivity to light and color vision in human infants: a critical review. *Vision Research*, 30(8), 1159-1188. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(90\)90173-I](https://doi.org/10.1016/0042-6989(90)90173-I).

Brown, C., Laland, K., Krause, J. (2011). Fish Cognition and Behaviour, Vol. 21. *John Wiley & Sons*, New York.

Bshary, R., Brown, C. (2014). Fish Cognition. *Current Biology*, 24(19), R947-R950. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.043>.

Cantrell, L., e Smith, L.B. (2013). Open questions and a proposal: a critical review of the evidence on infant numerical abilities. *Cognition*, 128(3), 331-352. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2013.04.008>.

Daisley, J.N., Rosa Salva, O., Regolin, L., e Vallortigara, G. (2011). Social cognition and learning mechanisms: experimental evidence in domestic chicks. *Interaction Studies*, 12(2), 208-232. <https://doi.org/10.1075/is.12.2.02dai>.

Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A.R., Wilson, S.W. (2015). Development of social behavior in young zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00039>.

Evans, J.P., and Magurran, A.E. (2000). Multiple benefits of multiple mating guppies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10074-10076. <https://doi.org/10.1073/pnas.180207297>.

Gatto, E., Bruzzone, M., Lucon-Xiccato, T. (2021). Innate visual discrimination abilities of zebrafish larvae. *Behavioural processes*, 193, 104534. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104534>.

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>.

Hamilton, F. (1822). An account of the fishes in the river Ganges and its branches. Edinburg and London, viii + 405.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>.

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>.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x>.

Miletto Petrazzini, M.E., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M., e Bisazza, A. (2012). Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behavioural Brain Research*, 223(2), 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.044>.

Miletto Petrazzini, M.E., Pecunioso, A., Dadda, M., Agrillo, C. (2020). Does brain lateralization affect the performance in binary choice tasks? A study in the animal model *Danio rerio*. *Symmetry*, 12(8), 1294. <https://doi.org/10.3390/sym12081294>.

Oliveira, J., Silveira, M., Chacon, D., Luchiari, A. (2015). The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. *Zebrafish*, 12(2), 166-173. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1019>.

Park J.S., Ryu, J.H., Choi T.I., Bae, Y.K., Lee, H.J., Kim, C.H. (2016). Innate color preference of zebrafish and its use in behavioral analyses. *Molecules and Cells*, 39, 750-755. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0173>.

Piffer, L., Miletto Petrazzini, M.E., Agrillo, C. (2013). Large number discrimination in newborn fish. *PLoS One*, 8(4): e62466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062466>.

Ravi, V., Venkatesh, B. (2018). The divergent genomes of teleosts. *Annual Review of Animal Biosciences*, 6, 47-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014821>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104283>.

Santacà, M., Miletto Petrazzini, M.E., Dadda, M., Agrillo, C. (2020). Forest before the trees in the aquatic world: global and local processing in teleost fish. *PeerJ*, 8: e9871. <https://doi.org/10.7717/peerj.9871>.

Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F., Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. 71(1), 304-309. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x>.

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>.

Spence, R., Smith, C. (2006). Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology*, 17(5), 779-783. <https://doi.org/10.1093/beheco/arl016>.

Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., Kalueff, A.V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, 37(5), 264-278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>.