



Dipartimento di Psicologia Generale

Laurea triennale in Scienze Cognitive Biologiche e Psicobiologiche

Elaborato finale

**Sviluppo di un nuovo metodo per il condizionamento operante in larve
di zebrafish (Danio rerio)**

Relatore: Dott.ssa Maria Elena Miletto Petrazzini

Co-relatore: Prof. Angelo Bisazza

Laureando: Davide Bassi

Matricola: 2011008

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABSTRACT.....	3
1-INTRODUZIONE.....	4
• 1.1- Lo sviluppo precoce negli zebrafish.....	5
• 1.2- Le capacità cognitive negli stadi precoci dello sviluppo	5
• 1.3- Scopo della ricerca.....	9
2-LO STUDIO SCIENTIFICO.....	10
• 2.1- Metodi e Materiali	10
-2.1.1- Soggetti.....	10
-2.1.2- Apparato sperimentale.....	11
• 2.2- Procedura	13
• 2.3- Analisi delle registrazioni video.....	15
3-RISULTATI.....	16
• 3.1- Analisi dati.....	16
• 3.2- Discussione.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	20

ABSTRACT

Lo scopo di questa ricerca è quello di indagare le capacità di apprendimento associativo negli zebrafish (*Danio rerio*) durante le prime fasi del loro sviluppo, data la loro importanza come animali modello in neurobiologia. Partendo dall'analisi delle procedure di condizionamento operante utilizzate in lavori precedenti, da Santacà e collaboratori (2022) e Falsitta (2023), l'obiettivo di questo studio è stato cercare di sviluppare una nuova metodologia per il condizionamento operante nelle larve di zebrafish, che permettesse di superare le limitazioni e problematiche emersi dagli esperimenti precedenti.

Un gruppo di trentadue larve è stato sottoposto a dodici trial sperimentali con una procedura di apprendimento tramite rinforzo positivo, esponendoli solamente allo stimolo che desideravamo rinforzare. I risultati dell'esperimento dimostrano che nonostante i soggetti dimostrino apprendimento, la mia procedura è meno efficace di quelle messe a punto dagli studi precedenti, anche se si è rivelata in grado di superare alcune delle loro limitazioni.

I-INTRODUZIONE

Nello studio e nella ricerca sulla cognizione umana, si è storicamente spesso fatto riferimento a modelli elaborati su animali, solitamente vertebrati. Sebbene per diversi decenni i protagonisti degli esperimenti su cui sono stati costruiti questi modelli sono stati prevalentemente primati, roditori ed alcune specie di uccelli, in tempi recenti nuove specie di vertebrati sono state identificate come più appropriate per scopi sperimentali, tra cui quella considerata per questa ricerca, ossia lo Zebrafish (*Danio rerio*). Il loro ampio utilizzo come organismo modello è da attribuirsi alle loro peculiarità biologiche. Gli zebrafish sono infatti caratterizzati da un basso costo di allevamento e mantenimento per via della loro taglia ridotta, che, sommata ad una alta fertilità da parte delle femmine (possono depositare fino a 300 uova al giorno) e brevi tempi di schiusa delle uova (da 2 a 3 giorni) li rende soggetti sperimentali ideali per i laboratori di psicologia cognitiva ed altre svariate discipline. Dimostrano inoltre un notevole grado di sovrapposizione al genoma umano, come illustrato dal database ZFIN dell'Università dell'Oregon (<https://zfin.org/>), che fa degli zebrafish un organismo con molta letteratura a riguardo in campo genetico e neuroscientifico, al pari di specie come i moscerini da frutta (*Drosophila melanogaster*) e i topi (*Mus musculus*), che vantano simili progetti di catalogazione del genoma.

Lo studio dello sviluppo e della maturazione del sistema nervoso dei vertebrati è molto importante per capirne il funzionamento, ma a differenza di altri aspetti della neurobiologia, nel quale il ruolo dei modelli animali è fondamentale, pressoché tutto quello che sappiamo su questo argomento è frutto di ricerca svolta su esseri umani. Nella specie umana, alla nascita si possono già osservare capacità quali l'apprendimento, la memoria e le capacità discriminative, sebbene in forma rudimentale, le quali vengono poi affinate durante lo sviluppo, per l'effetto sia di processi fisiologici, quali ad esempio la progressiva mielinizzazione, che per l'interazione con l'ambiente sia fisico che sociale. Gli esseri umani alla nascita nascono ad uno stato di estrema immaturità del sistema nervoso e sono completamente dipendenti dai genitori per la loro sopravvivenza. Questo sembra legato al fatto che lo sviluppo intrauterino è più breve di quanto sarebbe necessario per completare lo sviluppo del sistema nervoso, a causa di vincoli fisiologici determinati da restrizioni meccaniche del canale del parto dovute alla locomozione bipede ed evolutive dovute alla grande dimensione del cranio umano (Haeusler et al., 2021). Questa condizione è in realtà molto simile a quella di molti mammiferi e uccelli che sono in larga parte caratterizzati dalla presenza di cure parentali, i quali nascono in uno stato di elevata immaturità del sistema nervoso. Tuttavia, proprio per la difficoltà di separare i neonati dai genitori da cui dipendono, tutti i dati comparativi sullo sviluppo provengono da quelle poche specie di mammiferi e uccelli, come ad esempio il pulcino del

pollo domestico, che nascono ad uno stadio di sviluppo avanzato del sistema nervoso e sono già in grado di relazionarsi in modo in larga parte autonomo con il mondo esterno. La stessa cosa si osserva nei pesci, dove l'unica specie nella quale è stato studiato lo sviluppo cognitivo è il Guppy, (*Poecilia reticulata*), i cui neonati sono miniature degli adulti e sono completamente autosufficienti alla nascita. In questa specie, che è vivipara, lo sviluppo del sistema nervoso alla nascita è già molto avanzato e i neonati hanno un repertorio comportamentale e cognitivo molto simile a quello degli adulti (Evans 2000, Miletto Petrazzini 2012). Pertanto, vi è al momento nella letteratura scientifica una quasi completa mancanza di dati relativi a specie animali caratterizzate da immaturità del sistema nervoso alla nascita e che abbiano pertanto traiettorie dello sviluppo cognitivo che si possano confrontare con quelle della nostra specie. Un candidato ideale per questo tipo di ricerche è lo Zebrafish, (*Danio rerio*), nel quale il tempo che intercorre tra la fertilizzazione e la nascita è straordinariamente breve, tre giorni, contro le due-tre settimane della maggior parte delle altre specie di pesci.

1.1-Lo sviluppo precoce nello zebrafish

Come in altre molte specie di pesci, l'embrione dello zebrafish inizia a svilupparsi nell'uovo dopo che questo è stato deposto dalla femmina e fertilizzato dal maschio. L'embrione rimane nell'uovo per tre giorni dopo l'avvenuta fertilizzazione (d'ora in avanti mi riferirò a questa unità di tempo come *dpf*, Days Post Fertilization, attenendomi alla letteratura). A 3 dpf gli zebrafish escono dalle uova ancora ad uno stato immaturo, e vengono considerate embrioni a sviluppo esterno fino ai 5 dpf. In questa fase le larve hanno già la forma di un pesce, ma non mangiano perché il loro apparato digerente non è ancora sviluppato. In questo periodo la larva cresce ma deriva nutrimenti dal sacco del tuorlo dell'uovo. Dopo i 5dpf le larve cominciano la loro vita indipendente e possiedono un sistema visivo già paragonabile a quello di zebrafish adulti (Guggiana-Nilo e Engert, 2016, Rinner et al., 2005, Tappeiner et al., 2012). A 6dpf esse possono già seguire i movimenti delle piccole prede di cui si nutrono e possono già catturarle.

1.2- Le capacità cognitive negli stadi precoci dello sviluppo

L'investigazione dello sviluppo delle facoltà cognitive e sensoriali negli zebrafish fino a due settimane di vita è di grande interesse nella comunità scientifica. Infatti, grazie ad alcune caratteristiche uniche tra i vertebrati, negli ultimi anni per via del loro utilizzo è divenuto sempre più frequente come specie modello in studi di neurobiologia. Tra i vantaggi occorre ricordare, il breve ciclo di vita e la grande prolificità, l'alto grado di omologia del suo DNA con quello

dell'uomo, la facilità con cui si possono eseguire manipolazioni genetiche nell'embrione, e altre di specifico interesse per la neurobiologia, quali la totale trasparenza della larva nei primi giorni di vita che ha reso possibile la messa a punto di sistemi di brain imaging in vivo e il numero relativamente ridotto di neuroni che ha permesso in tempi recenti la mappatura completa delle cellule che compongono l'encefalo (Gerlai 2022, Bashirzade et.al., 2022). Tuttavia, un importante limite alla ricerca neurobiologica e comportamentale è rappresentato dal fatto che mentre per l'adulto di zebrafish esistono procedure già consolidate per indagare le capacità cognitive come apprendimento, memoria, abilità spaziali e capacità numeriche, mancano strumenti analoghi per le forme larvali.

Sebbene forme semplici di apprendimento siano state dimostrate in zebrafish già da pochi giorni dopo la schiusa delle uova (Yang et al., 2019), sappiamo ancora molto poco riguardo alla loro capacità di discriminare tra stimoli nelle loro prime settimane di vita. Recentemente, due studi condotti dall'Università di Padova hanno tentato di colmare questa lacuna presente nella letteratura, sviluppando nuove metodologie per un efficace condizionamento operante tramite rinforzo positivo, con l'obiettivo di testare se zebrafish nati da una settimana erano già in grado di associare una ricompensa in cibo ad un pattern visivo.

Il primo tra questi, (Santacà et al., 2022), prevedeva per la procedura di training un apparato a due compartimenti, nel quale un totale di dodici larve veniva addestrato a discriminare tra due pattern visivi posizionati ai lati opposti dei compartimenti, tramite il rilascio di cibo in prossimità di uno dei due stimoli. Il training era svolto dagli 8 ai 12 dpf: in gruppo per due giorni, con lo scopo di minimizzare l'isolamento sociale, e i restanti tre giorni i soggetti hanno partecipato al training individualmente. Per evitare che il cibo, o l'odore del cibo, finisse nel compartimento con il pattern visivo che non si voleva rinforzato, a dividere le due aree è stata inserita una struttura "a clessidra", con un foro dal diametro di 1cm sotto il pelo dell'acqua, che i soggetti avrebbero dovuto attraversare per spostarsi tra i due compartimenti (**Figura 1.1**).

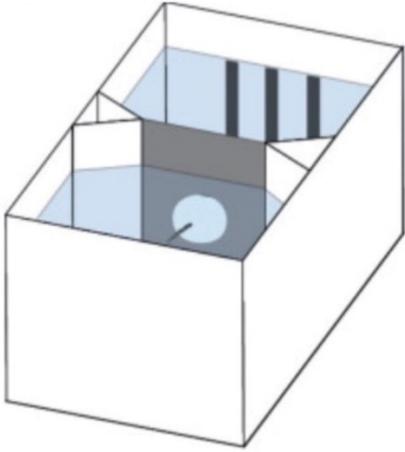


Figura 1.1: Apparato a clessidra utilizzato per il training individuale nella ricerca di Santacà e collaboratori (2022)

Questo esperimento ha evidenziato che le larve di zebrafish possono discriminare tra stimoli che differiscono per il colore o per la forma con prestazioni non molto dissimili da quelle mostrate dagli adulti della loro specie e, anche se con minor accuratezza, tra stimoli identici che differiscono solo per l'orientamento spaziale. Questa procedura mostrava tuttavia diverse limitazioni. La prima, più importante, era relativa al fatto che quasi il 50% dei soggetti che arrivavano alla fine del training si dovevano scartare perché non apprendevano a passare tra i compartimenti. Un secondo limite è che un training composto da una fase in gruppo e una individuale non permetteva in modo chiaro di valutare il contributo relativo di queste due fasi di addestramento. Nello stesso studio si è tuttavia evidenziato che questa fase iniziale di gruppo è necessaria in quanto singole larve esposte per la prima volta ad un oggetto mai visto prima mostrano una estrema neofobia, la quale poteva interferire con il condizionamento appetitivo.

Un successivo studio (Falsitta 2023), si è proposto di superare la problematica delle larve che non attraversavano il foro dell'apparato a clessidra un numero abbastanza alto volte da risultare significativo, utilizzando dei passaggi tra compartimenti di dimensioni nettamente superiori. Sono stati fatti due esperimenti, uno nel quale le larve sono state addestrate individualmente per tutta la durata dell'esperimento e uno nel quale le larve sono state addestrate collettivamente per lo stesso periodo. L'esperimento di addestramento collettivo utilizzava un apparato costituito da due compartimenti ottagonali con un lato condiviso che li univa (**Figura 1.2**). In questo apparato venivano introdotte 40 larve alla volta. Per ovviare lo spostamento del cibo da un compartimento all'altro, il foro sommerso del precedente esperimento è stato sostituito da una semplice barriera posizionata al livello della superficie dell'acqua, immersa solamente per un paio di millimetri

nell'acqua. Questa avrebbe dovuto essere sufficiente ad evitare che il cibo si spostasse tra compartimenti per effetto della tensione superficiale della vasca (senza tuttavia bloccare il passaggio delle larve), e la grande distanza tra le aree contenenti gli stimoli sufficiente a minimizzare il passaggio dell'odore del cibo dall'area rinforzata a quella non rinforzata. Lo stesso tipo di divisorio è stato usato anche per l'esperimento di condizionamento individuale nel quale l'apparato era tuttavia di dimensione minore rispetto a quello dell'esperimento di addestramento collettivo (**Figura 1.3**). In entrambi gli esperimenti per ovviare al problema della neofobia, i soggetti sperimentali erano esposti per quattro giorni, dai 4dpf al momento del test, a un gran numero di oggetti di forma colore e dimensioni (dei mattoncini LEGO) nella capsula petri in cui erano tenuti. Questa è una procedura di arricchimento ambientale che precedentemente è stata dimostrata essere efficace nel ridurre la paura della novità in questa specie (Gatto et al 2022).

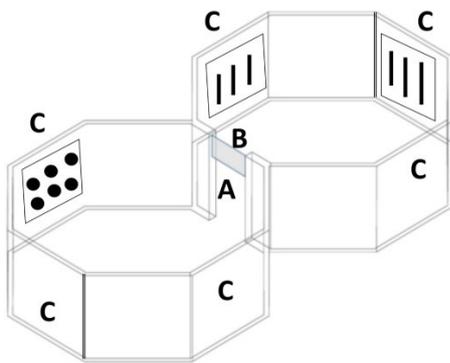


Figura 1.2: Apparato per l'addestramento collettivo utilizzato da Falsitta (2023). Con "B" è indicata la barriera divisoria per impedire il passaggio di cibo tra aree.

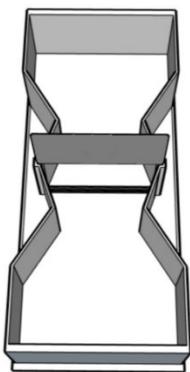


Figura 1.3: Apparato per l'addestramento individuale usato da Falsitta (2023).

I risultati dello studio mostrano come entrambe le procedure si siano dimostrate meno efficaci di quelle messe a punto originariamente nella ricerca di Santacà e collaboratori (2022). Entrambi gli esperimenti evidenziano una significativa preferenza per lo stimolo rinforzato alla fine del training

ma la performance è inferiore in entrambi i casi a quella mostrata nel primo studio. Una analisi dettagliata dell'esperimento individuale evidenzia il fatto che molti soggetti si muovono poche volte tra i compartimenti anche con il nuovo passaggio notevolmente allargato rispetto al precedente. Inoltre, l'analisi dimostra che i soggetti che si muovono frequentemente tra i compartimenti hanno una performance molto migliore di quelli che passano poche volte, a conferma ulteriore che c'è un problema di difficoltà a muoversi tra i settori. Le larve di questa età nuotano quasi esclusivamente a pelo d'acqua, ed una analisi dei video degli esperimenti mostra come molte larve appaiano "rimbalzare" quando arrivano in prossimità della barriera orizzontale come se non vi fosse un passaggio. L'ipotesi fatta dall'autrice dello studio è che le larve di questa età siano proco propense ad immergersi anche per i pochi millimetri che sarebbero necessari per passare sotto la barriera a pelo d'acqua.

1.3- Scopo della ricerca

Dati questi problemi negli studi precedenti, lo scopo della mia ricerca è stato quello di sviluppare e valutare l'efficacia di una nuova metodologia di condizionamento operante che supera le suddette limitazioni. Da una parte quella del passaggio del cibo tra aree, dall'altra quella dei soggetti potenzialmente impauriti la prima volta che vedono uno stimolo. La struttura di questo esperimento segue principalmente quella degli esperimenti precedenti, ma apporta alcune modifiche per superare le difficoltà incontrate in essi. In primo luogo, un nuovo setup per l'apparato di testing dei soggetti. Per ovviare al problema della barriera orizzontale che bloccava il passaggio delle larve, abbiamo creato una disposizione rettangolare con due ampie aperture laterali senza nessun ostacolo a livello della superficie dell'acqua. Così facendo però, rimaneva il problema della diffusione del cibo anche all'area che non volevamo rinforzata. Dato che è impossibile bloccare il passaggio del cibo senza bloccare anche quello delle larve la soluzione è stata quella di inserire al momento del rinforzo, in entrambi i compartimenti, due stimoli identici, entrambi del tipo rinforzato.

Per ridurre la neofobia invece, una modifica abbastanza semplice è stata apportata alla fase pre-sperimentale. I pesci sono stati inseriti in gruppo, dai 4 ai 6 dpf (48 ore) in una piccola vasca, con al lato uno stimolo e l'altro stimolo posizionato al lato opposto. Così facendo, le larve hanno avuto la possibilità di familiarizzare con entrambi gli stimoli che avrebbero incontrato nelle fasi di test in modo simile. Rispetto all'esperimento più recente, in cui i pesci stavano nell'ambiente arricchito fino a 7 dpf, in questo studio l'addestramento è stato anticipato di un giorno. Questo è stato fatto per necessità, in quanto a 6 dpf, le larve devono essere per forza alimentate, e se questo fosse stato fatto nella vaschetta con i due stimoli, avremmo corso il rischio che le larve sviluppassero

un'associazione con entrambi. Come risultato di ciò, l'addestramento è stato prolungato di un giorno, per fare finire i soggetti alla stessa età in cui avevano finito negli esperimenti precedenti.

II-LO STUDIO SCIENTIFICO

2.1- Materiali e Metodi

2.1.1- Soggetti

I soggetti dell'esperimento erano 32 larve di *Danio rerio*, nate da uova raccolte in due diversi periodi, originate da accoppiamenti in un gruppo di adulti con una proporzione 2/3 femmine e 1/3 di maschi. Dopo la loro raccolta, le uova sono state posizionate in piastre petri, in una soluzione di *Fishwater* e blu metilene, fino alla mattina del 4dpf. Successivamente, le larve venivano trasferite con una pipetta in gruppi di 15-20 in vaschette di plastica bianca rettangolari 7cm x 4cm, con i due possibili stimoli che sarebbero stati usati nel training posizionati nei lati corti. I soggetti hanno passato 2 giorni in questa vasca per familiarizzare con gli stimoli da discriminare, senza ricevere cibo. Dopo questa fase di pre-training, le larve sono state trasferite ciascuna nel proprio apparato sperimentale durante il pomeriggio del 5dpf, e l'addestramento è cominciato alla mattina del giorno successivo (6dpf) e concluso a 11dpf, per una durata totale di 6 giorni (**Figura 2.1**).

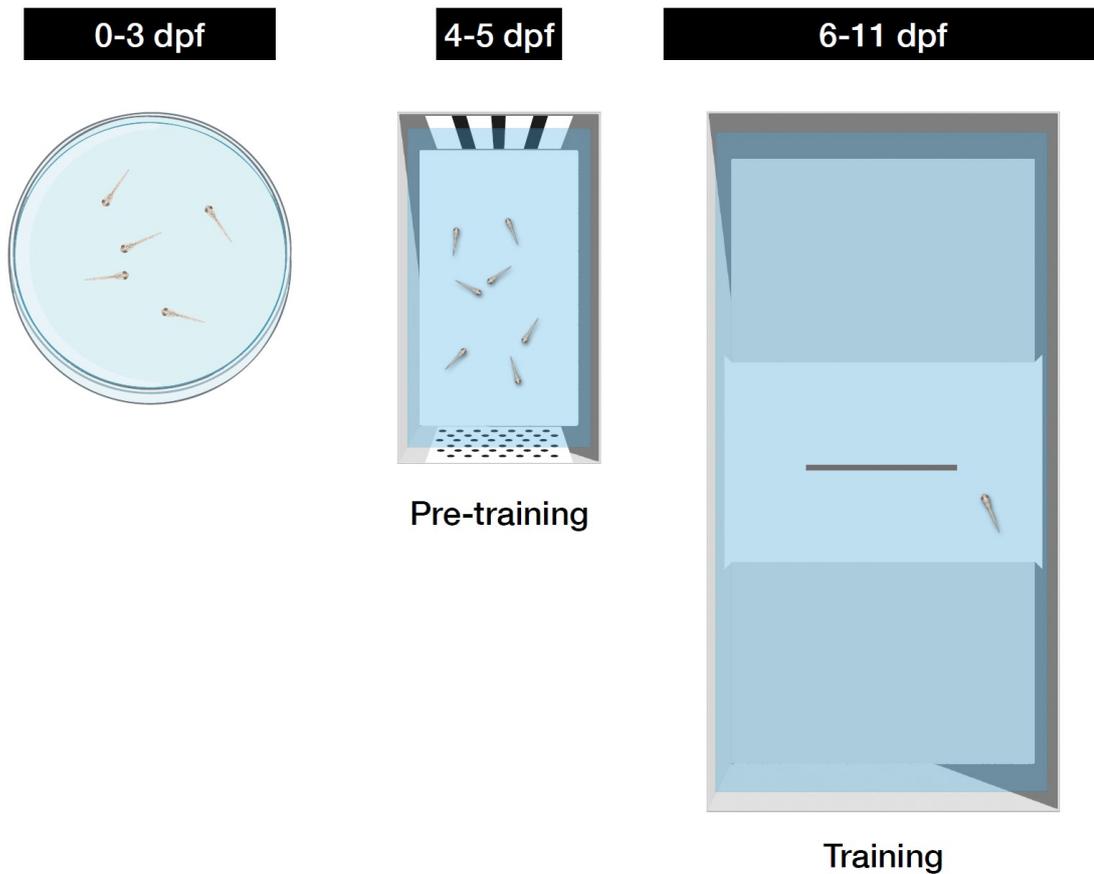


Figura 2.1: Apparatii utilizzati per l'esperimento. Da sinistra, capsula Petri utilizzata per la stabulazione iniziale, vaschetta utilizzata per l'abituazione agli stimoli sperimentali nel periodo di pre-training, vasca usata per la fase sperimentale.

Per l'intera durata della procedura sperimentale, le larve sono state tenute in una stanza con una temperatura di 29°C, ed esposte a cicli di luce/buio rispettivamente della durata di 14 e 10 ore. Per quanto riguarda il sesso dei soggetti sperimentali, questo è rimasto un'incognita, in quanto negli zebrafish il dimorfismo sessuale non è visibile fino a molto più avanti nel loro sviluppo, a circa 12 settimane successive alla fertilizzazione delle uova.

2.1.2- Apparato sperimentale

Gli apparati utilizzati per la procedura di training erano vaschette di forma rettangolare (7 x 14 cm, alte 4 cm) realizzate con la stampante 3D in PLA. I due stimoli da discriminare erano posti ai lati corti della vaschetta. All'altezza della metà del lato più lungo, è stata inserita una barriera, in modo tale che i soggetti non potessero vedere entrambi gli stimoli contemporaneamente, ma lasciando due

aperture laterali che permettevano alle larve di passare facilmente da un compartimento all'altro (Figura 2.2).

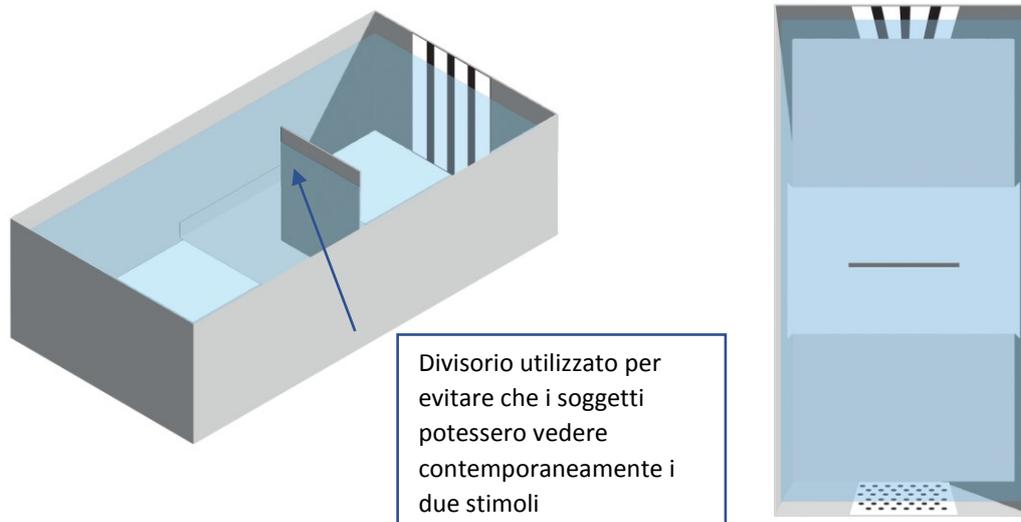


Figura 2.2. Apparato utilizzato per la fase sperimentale

Ciascuno degli apparati è poi stato riempito con una soluzione di *Fishwater* con blu metilene diluito al 50% rispetto a quella usata per le capsule petri. Gli stimoli con cui i soggetti sono stati presentati consistevano stampe laser plastificate di 3x3 cm e presentavano due possibili pattern neri su sfondo bianco: 3 barre verticali o una disposizione di 63 pallini equidistanti tra loro (Figura 2.3). Gli stimoli sono gli stessi impiegati nei due precedenti studi (Santacà et al 2022; Falsitta 2023) e la proporzione di bianco e nero era la stessa nei due stimoli. Le vaschette erano allineate sopra un tavolo posto in una stanza buia e circondate da una barriera di plastica opaca per impedire che i soggetti vedessero all'esterno. Esse erano illuminate da due strisce led poste a 50 cm sopra la superficie del tavolo (Figura 2.4). Videocamere sono state posizionate sopra gruppi di 2 vaschette per registrare le fasi di training e test durante ciascun trial.

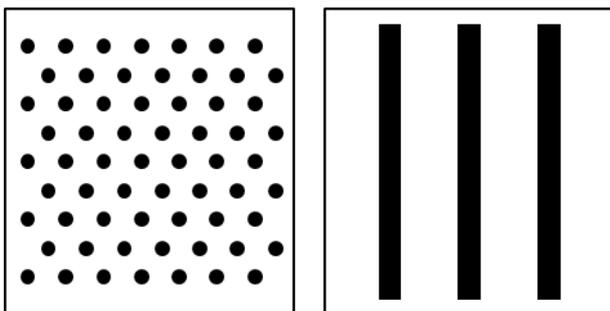


Figura 2.3: I due stimoli utilizzati per l'apprendimento discriminativo nell'esperimento. A sinistra 63 pallini equidistanti e a destra 3 barre verticali.

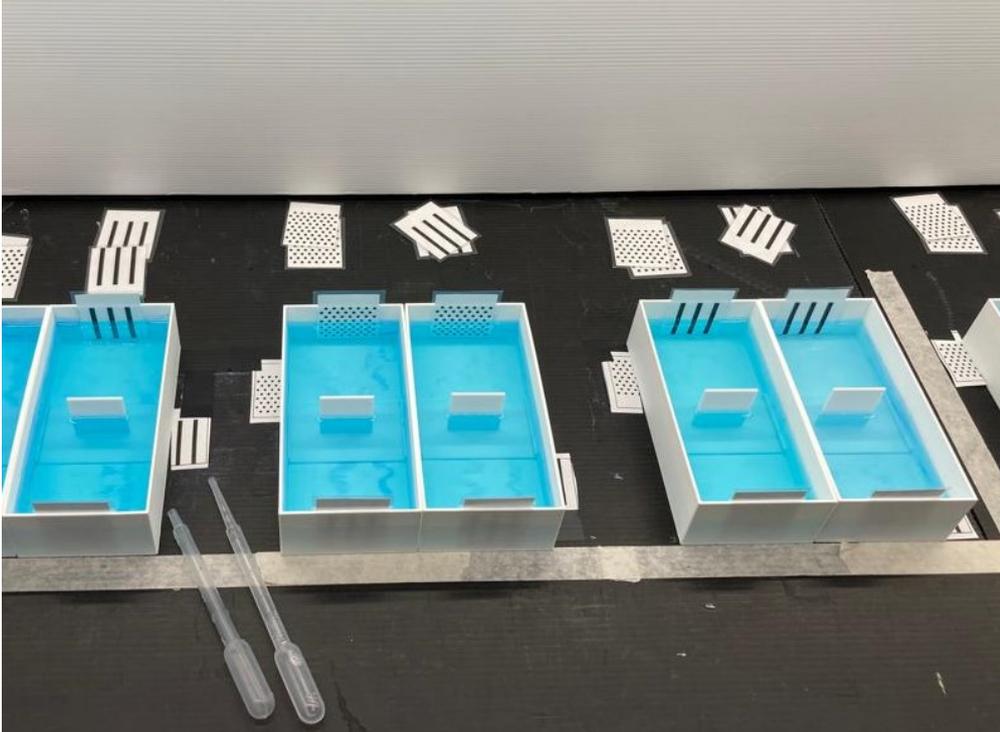


Figura 2.4: Vaschette sperimentali allineate sul tavolo. Sul fondo si intravede la barriera di plastica bianca che impediva alle larve di vedere all'esterno

2.2- Procedura

Al pomeriggio del 5dpf, il giorno prima dell'inizio dell'addestramento, ciascuno dei 32 soggetti sperimentali è stato rimosso dalle vaschette per l'arricchimento ambientale pre-training e trasferito negli apparati sperimentali, un soggetto in ciascun apparato. L'esperimento si è prolungato per 6 giorni, da 6 a 11 dpf, durante i quali i soggetti venivano sottoposti a due trial di condizionamento operante al giorno, uno alla mattina e uno al pomeriggio, per un totale di 12 trial. Ciascun trial era distinto in una fase di condizionamento ed una fase di test. Metà dei soggetti sperimentali hanno ricevuto il rinforzo per stimolo barre e l'altra metà per lo stimolo pallini.

In ciascuna delle 6 giornate dell'esperimento, la prima *fase test* iniziava alle 8:00, con l'introduzione nella vasca di due stimoli da discriminare che venivano posizionati ai due estremi in posizione centrale lungo il lato corto (**Figura 2.5**). Dopo circa 60 secondi di ambientamento dei soggetti si iniziava a registrare per la durata di 30 minuti. Al termine della fase test, alle 8:30, gli

stimoli erano rimossi e iniziava la *fase di condizionamento*. Questa consisteva nell' introdurre una nuova coppia di stimoli, questa volta identici tra loro entrambi del tipo rinforzato per quel soggetto. Dopo due minuti di attesa, veniva rilasciata una piccola quantità di cibo per larve in entrambi i settori dell'apparato (**Figura 2.5**). La fase di rinforzo si prolungava per 1 ora, al termine della quale gli stimoli venivano rimossi. Dopo un' ulteriore ora, l'eccesso di cibo ormai degradato e aggregato in piccole masse veniva rimosso dalla superficie mediante una pipetta. All'inizio della fase di condizionamento veniva effettuata una breve registrazione di 5 minuti per poter verificare a posteriori se lo sperimentatore aveva eseguito il trial correttamente.

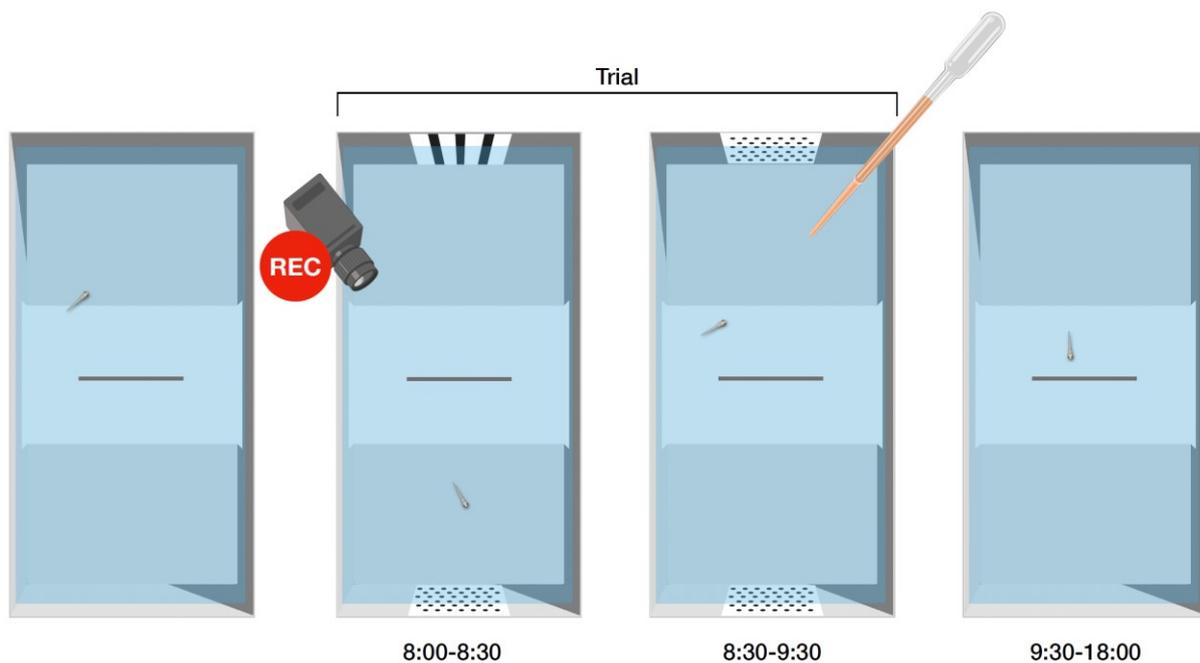


Figura 2.5: Timeline del trial del mattino. A) Le larve trascorrevano il periodo notturno inter-trial in una vasca senza stimoli. B) All'inizio del trial si introducevano due stimoli diversi e veniva misurata per mezzora la preferenza. C) Venivano quindi introdotti due stimoli uguali del tipo rinforzato, si dava il cibo e si lasciavano le larve indisturbate per un'ora. D) Al termine gli stimoli venivano rimossi per tutta la durata dell'inter-trial successivo

Questa procedura era poi ripetuta in modo identico nel secondo trial della giornata, che iniziava alle ore 18:00. La posizione degli stimoli veniva invertita tra i due lati corti tra il trial della mattina e quello del pomeriggio.

2.3- Analisi delle registrazioni video

Per ottenere il tempo trascorso nel settore con stimolo rinforzato e nel settore con stimolo non rinforzato, ho analizzato le registrazioni video utilizzando il software BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software; Università di Torino, Torino, Italia). Utilizzando la tastiera per contrassegnare il momento in cui il soggetto cambiava compartimento, il software ha calcolato il tempo totale trascorso in ogni settore dell'apparato dal quale è stato calcolato o un indice di preferenza come tempo trascorso nel settore con la formula:

$$\frac{\text{tempo trascorso nel settore rinforzato}}{(\text{tempo trascorso nel settore rinforzato} + \text{tempo trascorso nel settore } \mathbf{non} \text{ rinforzato})}$$

Infine, i dati sono stati analizzati attraverso il software statistico IBM SPSS (Statistical Package for Social Science).

III-RISULTATI

3.1- Analisi dati

Per motivi tecnici non è stato possibile ottenere i dati di tutti 32 soggetti nel dodicesimo e ultimo trial dell'addestramento. Per questa tesi ho perciò analizzato solo i primi 11 trial. Nel corso dell'esperimento i soggetti hanno cambiato compartimento in media 20.50 volte all'ora (DS = 7.82) con un range di 9.27-43.64.

Nel complesso dell'esperimento i soggetti hanno mostrato una lieve ma significativa preferenza per lo stimolo rinforzato. Questo si rileva dall'analisi della preferenza media nei trial 3-11 (i trial del primo giorno in questo caso sono stati omessi per l'ovvia ragione che le larve dopo una sola associazione non potevano ancora aver associato stimolo e rinforzo) tramite T test per campione singolo ($t = 3.032$, $df = 8$, $p = 0.016$). Se si fa la stessa analisi a livello individuale, 6 soggetti risultano avere una preferenza sopra il caso per lo stimolo rinforzato ma vi è anche un soggetto che mostra una preferenza significativa per lo stimolo non rinforzato (T Test per campione singolo con $p < 0.05$)

Per verificare se vi era apprendimento e quindi un aumento della preferenza nel corso dell'esperimento e se vi era differenza tra soggetti addestrati sui pallini o sulle barre, abbiamo condotto una Anova con analisi del trend nella quale il trial (da 1 a 11) rappresentava il fattore within ed il tipo di stimolo rinforzato è il fattore between. Il risultato mostra che la preferenza per lo stimolo rinforzato aumenta con il trascorrere del tempo (Trend lineare $F_{(1,29)} = 6.654$ $p = 0.015$;

Figura 3.1).

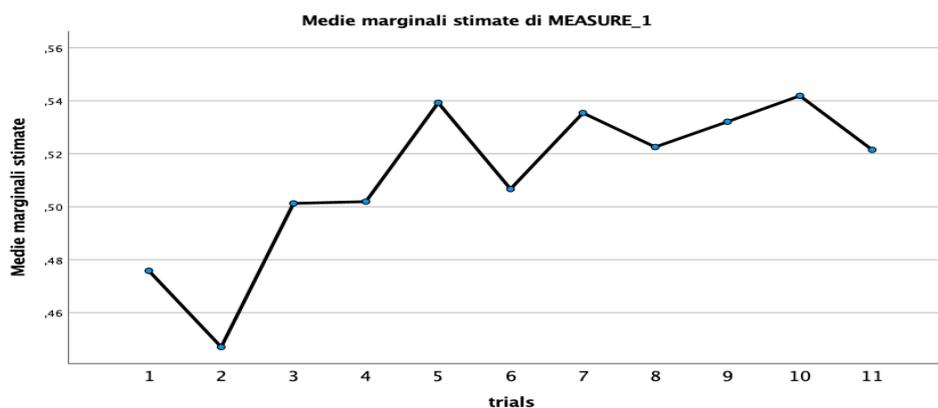


Figura 3.1. Andamento della preferenza per lo stimolo rinforzato nel corso del training

Vi è tuttavia una forte differenza di performance tra i soggetti addestrati sui pallini e quelli addestrati sulle barre, con i primi che mostrano una netta preferenza per lo stimolo non rinforzato

($F_{(1,29)}=59,96$, $p<0.001$) nei primi trial ed una interazione significativa trend x tipo di stimolo (Trend lineare $F_{(1,29)}=5.452$ $p=0.027$ (**Figura 3.2**). Il fattore trial non è significativo ($F_{(10,290)}=1.125$, $p=0.343$) mentre è fortemente significativa l'interazione Trial x tipo di stimolo ($F_{(10,290)}=3.494$, $p<0.001$).

Non vi è correlazione tra il numero medio di passaggi e la performance (Correlazione di Pearson $r = -0.163$, $N=32$, $p = 0.372$)

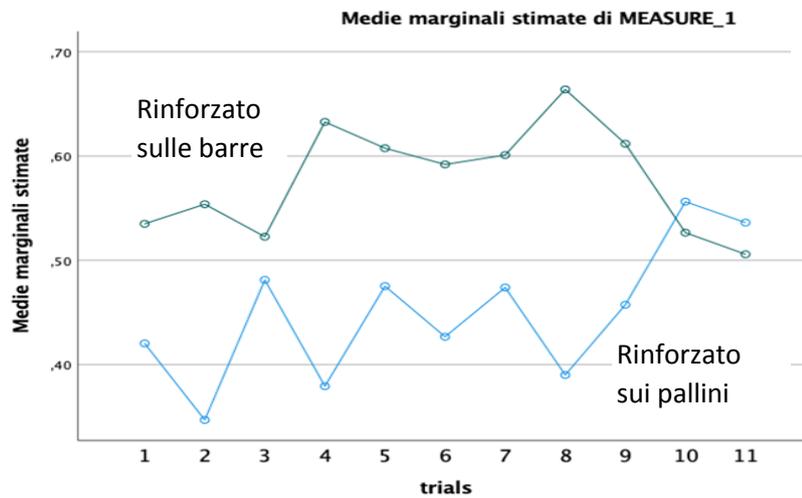


Figura 3.2. Confronto tra soggetti sperimentali addestrati su barre e su pallini

3.2- Discussione

I risultati del mio esperimento suggeriscono che anche con questa nuova procedura di condizionamento le larve di zebrafish sono in grado di discriminare tra due stimoli visivi e imparano ad associare un particolare stimolo ad una ricompensa alimentare. La procedura appare tuttavia molto meno efficace di quella utilizzata in precedenza da Santacà e collaboratori (2022) per addestrare le larve di zebrafish a discriminare tra la stessa coppia di stimoli utilizzata nel mio studio. Nel mio studio, infatti, la preferenza osservata dopo alcuni giorni di addestramento rimane di poco superiore al 50%.

Inoltre, nel mio esperimento si evidenzia una grande differenza nella performance tra i soggetti addestrati sui due stimoli, con i soggetti addestrati sulle barre come stimolo positivo che mostrano una preferenza per lo stimolo rinforzato molto maggiore rispetto ai soggetti addestrati sui pallini. Nei primi trial in particolare, i soggetti addestrati sui pallini mostrano una preferenza marcata per lo stimolo non rinforzato, preferenza che va poi attenuandosi col procedere dell'esperimento. Una preferenza per uno dei due stimoli non si era evidenziata nei due studi precedenti che utilizzavano la stessa coppia di stimoli (Santacà et al 2022; Falsitta 2023) e deve pertanto essere imputabile alle modifiche della procedura introdotte nel mio esperimento.

Non è chiaro che cosa nella mia procedura possa aver indotto una preferenza spontanea per uno dei due stimoli. In un recente studio di Lucon-Xiccato e collaboratori (2023) si è trovato che l'esposizione precoce di larve di zebrafish ad un ambiente in cui ci sono barre verticali induce in seguito in queste larve una preferenza per le barre verticali non presente invece nelle larve che non sono state esposte a barre verticali da giovani. Non è chiaro se un simile trattamento avrebbe lo stesso effetto per altri pattern visivi, ma è stato suggerito che le barre richiamino una situazione naturale di presenza di piante acquatiche e che si tratti di un meccanismo specifico di habitat preference, simile all'imprinting, che predispone gli individui a preferire il tipo di habitat in cui si sono sviluppati (in questo caso con o senza di vegetazione). È quindi possibile che la nuova procedura pre-sperimentale usata nel mio studio abbia attivato questo tipo di meccanismo, generando una preferenza per uno dei due stimoli, quello a barre verticali, che ha poi influenzato l'esito dell'esperimento.

Per quanto riguarda la scarsa performance mostrata dalle larve nel mio esperimento, è probabile che in larga misura essa dipenda dalla interferenza causata dalla preferenza spontanea per uno dei due stimoli. Altri fattori possono aver tuttavia contribuito. Uno di questi è il tipo di procedura adottata al momento della somministrazione dello stimolo. Come avviene nel condizionamento operante dei pesci adulti (ad es. Santacà et al 2021, Sovrano et al 2022) in entrambi gli studi precedenti, al

momento del rilascio del cibo erano presenti entrambi gli stimoli anche se il rinforzo era ottenibile solo vicino allo stimolo da rinforzare. In questo esperimento invece ho usato una procedura atipica in cui al momento del rilascio di cibo era presente solo lo stimolo da rinforzare. Non si sa se questo possa aver determinato una minor efficacia del meccanismo di associazione.

L'unico aspetto positivo della nuova procedura è che effettivamente favorisce il passaggio tra i compartimenti. Ho infatti osservato che tutti i soggetti si muovevano regolarmente tra i due compartimenti, con un minimo di 9 passaggi per ora nei soggetti meno attivi. Nel lavoro di Santacà e coll. (2022) i soggetti scartati perché poco attivi passavano meno di una volta all'ora.

In sintesi, la mia ricerca pur confermando la capacità di apprendimento discriminativo delle larve di zebrafish fin dai primi giorni dopo la schiusa, evidenzia la difficoltà nel mettere a punto procedure efficaci per studiare questo processo e come possano essere molteplici, e in molti casi inaspettati, i fattori che possono influenzare l'esito di un esperimento di questo tipo.

BIBLIOGRAFIA

Yang, W., Meng, Y., Li, D., and Wen, Q. (2019). *Visual contrast modulates operant learning responses in larval Zebrafish*. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 4.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00004>.

Haeusler, M., Grunstra, N.D., Martin, R.D., Krenn, V.A., Fornai, C., and Webb, N.M. (2021). *The obstetrical dilemma hypothesis: there's life in the old dog yet*. *Biol. Rev.* 96, 2031–2057.
<https://doi.org/10.1111/brv.12744>.

Guggiana-Nilo, D., & Engert, F. (2016). *Properties of the Visible Light Phototaxis and UV Avoidance Behaviors in the Larval Zebrafish*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00160>

Tappeiner, C., Gerber, S., Enzmann, V., Balmer, J., Jaźwińska, A., & Tschopp, M. (2012). *Visual acuity and contrast sensitivity of adult zebrafish*. *Frontiers in Zoology*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-10>

Santacà, M., Dadda, M., Valle, L. D., 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.2022.10428>

Falsitta N. (2023) *Development of an innovative operant conditioning procedure to investigate cognitive abilities in Zebrafish larvae*. Final Dissertation, Bachelor's Degree Course in Psychology.

Gatto, E., Dadda, M., Bruzzone, M., Chiarello, E., De Russi, G., Maschio, M. D., Bisazza, A., & Lucon-Xiccato, T. (2022). *Environmental enrichment decreases anxiety-like behavior in zebrafish larvae*. *Developmental Psychobiology*, 64(3).
<https://doi.org/10.1002/dev.22255>

Lucon-Xiccato, T., Gatto, E., Fontana, C.M. *et al.* (2023). *Quantity discrimination in newly hatched zebrafish suggests hardwired numerical abilities*. *Commun Biol* **6**, 247.

<https://doi.org/10.1038/s42003-023-04595-7>

Sovrano VA, Vicidomini S, Potrich D, Miletto Petrazzini ME, Baratti G, Rosa-Salva O (2022). *Visual discrimination and amodal completion in zebrafish*. *PLoS ONE* **17**(3): e0264127.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264127>

Santacà M, Dadda M, Miletto Petrazzini ME, Bisazza A (2021). *Stimulus characteristics, learning bias and visual discrimination in zebrafish (Danio rerio)*, *Behavioural Processes*, Volume 192, 104499, ISSN 0376-6357

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104499>.

Evans, J. P. & Magurran, A. E. (2000). *Multiple benefits of multiple mating in guppies*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 10074–10076

Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M. & Bisazza, A. (2012) *Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies*. *Behav. Brain Res.* **233**, 443–449 (2012).

Robert Gerlai. (2023). *Zebrafish (Danio rerio): A newcomer with great promise in behavioral neuroscience*, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 144, 104978, ISSN 0149-7634.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104978>.

Alim A. Bashirzade, Konstantin N. Zabegalov, Andrey D. Volgin, Alisa S. Belova, Konstantin A. Demin, Murilo S. de Abreu, Vladislav Ya. Babchenko, Kseniya A. Bashirzade, Konstantin B. Yenkovyan, Maria A. Tikhonova, Tamara G. Amstislavskaya, Allan V. Kalueff, (2022) *Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish*, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Volume 138, 104679, ISSN 0149-7634.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104679>.