



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale

Corso di laurea in Scienze psicologiche cognitive e psicobiologiche

Elaborato finale

**Ontogenesi del comportamento sociale in larve di
zebrafish**

The ontogeny of social behavior in zebrafish larvae

Relatore

Prof. Dadda Marco

Correlatrice

Gjinaj Gabriela

Laureanda: Battisti Claudia

Matricola: 1221197

Anno Accademico 2022/2023

Ontogenesi del comportamento sociale in larve di zebrafish

Claudia Battisti

Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 Panoramica sullo studio del comportamento sociale nelle specie animali	2
1.2 Il comportamento sociale nello zebrafish	4
1.2.1 Shoaling e schooling.....	5
2. Scopo della tesi	7
3. Biologia della specie.....	9
4. Materiali e metodi	13
4.1 Soggetti sperimentali.....	13
4.2 Apparato sperimentale	14
4.3 Procedura e stimoli sperimentali	15
4.4 Analisi statistiche.....	16
5. Risultati.....	19
6. Discussione	23
7. Riferimenti bibliografici e sitografia	27

1. Introduzione

La psicologia è una disciplina multidimensionale che si propone di analizzare, comprendere e spiegare il complesso mondo della mente umana e del comportamento. Grazie alle notevoli somiglianze con gli esseri umani, i modelli animali da laboratorio consentono di sviluppare teorie psicologiche più robuste e di plasmare strategie terapeutiche più efficaci. Il loro valore nella ricerca è innegabile poiché, oltre a contribuire significativamente alla comprensione di molteplici aspetti della biologia, della medicina, dell'ecologia e di molte altre discipline, consentono di esplorare in modo controllato molteplici aspetti del comportamento umano che altrimenti rimarrebbero inaccessibili.

Uno degli obiettivi principali dei modelli animali è quello di scoprire e replicare le caratteristiche meccaniche sconosciute delle malattie umane, agevolando così la sperimentazione di interventi capaci di modificarne i meccanismi nella direzione desiderata (Gerlai, 2014). Gli avanzamenti nel campo della medicina, come i trapianti di cuore, i trattamenti dell'insufficienza coronarica, l'uso degli anticorpi monoclonali in varie patologie e l'utilizzo delle ciclosporine come farmaco antirigetto, sono solo alcuni esempi dei progressi resi possibili grazie alla sperimentazione animale (Rescigno et al., 2021).

Tra le specie da laboratorio più comunemente utilizzate, in particolare per lo studio del comportamento sociale, rientrano i roditori. Grazie al loro sofisticato repertorio comportamentale, offrono notevoli vantaggi per la comprensione dei meccanismi alla base dell'espressione di comportamenti sociali sia naturali che disfunzionali (Faccioli&Gerlai, 2020). Tra i più famosi esperimenti condotti con i ratti possiamo citare quelli di Tolman, che hanno contribuito a esplorare la

cognizione spaziale e la formazione di mappe cognitive, il labirinto di Skinner, utilizzato per lo studio dell'apprendimento e del condizionamento operante, e il noto esperimento del "Rat Park" condotto da Bruce K. Alexander che dimostrò come il contesto sociale influenzasse il consumo di droghe nei ratti.

Tuttavia, è importante notare che la ricerca condotta su mammiferi può comportare costi significativi. Per ridurre tali costi e risparmiare tempo, la ricerca si è rivolta ai pesci, in particolare al *Danio rerio* (Bozkurt, 2020). Questo piccolo pesce d'acqua dolce è diventato un modello prezioso in diversi campi della scienza in quanto la sua riproduzione rapida, la trasparenza dei suoi embrioni, l'elevata somiglianza genetica e la fisiologia omologa con gli esseri umani (soprattutto in termini di sistema nervoso centrale) lo rendono un modello ideale per una vasta gamma di studi scientifici (Bozkurt, 2020).

In definitiva, i modelli animali da laboratorio rappresentano una risorsa inestimabile per la ricerca scientifica e continuano a contribuire in modo significativo alla conoscenza e al progresso nel campo della psicologia e in numerosi altri campi scientifici.

1.1 Panoramica sullo studio del comportamento sociale nelle specie animali

Nell'ambito della psicologia animale e comparata una delle sfide più affascinanti è la comprensione del modo in cui gli organismi sviluppano e manifestano il comportamento sociale. La rarità di tale fenomeno tra gli animali sembrerebbe indicare che si tratti di una strategia evolutiva non troppo conveniente, in realtà gioca un ruolo cruciale nell'adattamento e nella sopravvivenza della specie,

poiché influisce sulla ricerca di risorse, sulla riproduzione e sulla gerarchia sociale (Celli, 1998).

La diversità e la complessità dei comportamenti sociali negli animali variano notevolmente tra le diverse specie. Nonostante ciò, esistono tendenze comuni e tipi di comportamenti sociali riscontrabili in molte di esse. La comunicazione, per esempio, rappresenta uno dei principali strumenti nell'ambito delle interazioni sociali e può assumere diverse forme, come suoni, segnali chimici (es. feromoni) o variazioni nelle posture corporee (Celli, 1998). Essa è essenziale per coordinare azioni, per avvisare i membri del gruppo riguardo a potenziali pericoli o, come nelle api, attraverso una danza stereotipata, per comunicare la posizione di risorse preziose ai compagni (Couvillon, 2012).

L'ontogenesi del comportamento sociale ci permette di esplorare come gli organismi sviluppino e modifichino le loro abilità sociali durante la loro crescita, dalla nascita fino all'età adulta. Questo processo è influenzato da una combinazione di fattori genetici ed ambientali. Infatti, anche se gran parte del comportamento negli animali è appreso attraverso l'esperienza, esiste anche una predisposizione genetica (Parmigiani, 2007). Ad esempio, il circuito neurale alla base del comportamento sociale innato umano è stabilito già nell'utero, per questo i neonati mostrano comportamenti sociali fin dalla nascita, come la preferenza nell'osservare e imitare i conspecifici (Dreosti et al., 2015).

1.2 Il comportamento sociale nello zebrafish

Tra le numerose specie animali che hanno affascinato gli studiosi per la loro capacità di sviluppare complesse interazioni sociali, il *Danio rerio* (zebrafish) emerge come un modello particolarmente intrigante e utile per la neurobiologia sociale. Le sue larve trasparenti consentono un'osservazione dettagliata del loro sistema nervoso e dei comportamenti fin dalle prime fasi dello sviluppo (Bozkurt, 2020; Lawrence, 2007), inoltre presenta somiglianza genetica e biologica con i vertebrati, incluso l'essere umano (Landin et al., 2020; Lawrence, 2007). Queste affinità emergono in molte regioni cerebrali condivise con i mammiferi, tra cui la corteccia, l'ippocampo, l'amigdala, il talamo e il cervelletto (Liu et al., 2016).

La preferenza sociale nello zebrafish, similmente all'essere umano, si basa sulla visione (Landin et al., 2020). Questa preferenza emerge gradualmente a partire da 14 *days post fertilization* (dpf) e diventa evidente a 21dpf grazie alla maturazione dei sistemi neurali. Tuttavia, già a 7dpf, si possono osservare comportamenti sociali molto deboli, ma significativi (Dreosti et al., 2015).

L'attrazione si orienta verso conspecifici di età/taglia simili, infatti, come evidenziato nelle ricerche condotte da Dreosti e colleghi (2015), un pesce di 21dpf non mostra preferenze sociali quando è presentato con pesci di 7dpf, mentre un pesce di 7dpf, oltre a non mostrare preferenze per pesci di 21dpf, mostra anche una leggera avversione alla visione del pesce più grande. Questi risultati supportano la conclusione che lo sviluppo della preferenza sociale è influenzato dalla maturazione dell'osservatore e non dipende semplicemente dall'età o dalla dimensione dello stimolo.

1.2.1 Shoaling e schooling

Tra i comportamenti sociali più distintivi osservati negli zebrafish vi è lo *shoaling*, un termine che denota l'atto di aggregazione in cui un gruppo di pesci si riunisce e nuota insieme in vicinanza reciproca (Gerlai, 2014). Quando i membri del gruppo si polarizzano nuotando nella stessa direzione e in modo coordinato, questa dinamica viene invece definita *schooling* (Miller&Gerlai, 2012).

Il comportamento di *shoaling* è influenzato sia dalle dimensioni del gruppo che dal suo grado di attività. Gli zebrafish, infatti, mostrano una propensione ad interagire con gruppi più numerosi, ma preferiscono associarsi a quelli più dinamici (Pritchard et al., 2001). In uno studio condotto da Sheardown e colleghi (2022) sull'ontogenesi della discriminazione quantitativa basata sulle dimensioni dei gruppi negli zebrafish, è emerso che già a 21dpf mostrano un'attrazione spontanea per il gruppo più numeroso di compagni sociali rispetto a confronti più facili (come 1 contro 3 e 2 contro 5). Invece, la capacità di discriminare confronti più complessi (come 2 contro 3), si sviluppa solo alla quarta settimana di vita, evidenziando che, similmente agli esseri umani, l'acuità numerica aumenta durante lo sviluppo. Queste preferenze possono variare anche in base al sesso degli individui: le femmine tendono a prediligere gruppi più numerosi, indipendentemente dalla composizione di genere, mentre i maschi non mostrano preferenze per le dimensioni del gruppo ma hanno una tendenza ad unirsi a quelli con una maggiore presenza femminile (Spence et al., 2008).

L'osservazione di zebrafish allevati in isolamento che tendono a formare

rapidamente dei gruppi quando vengono messi insieme suggerisce che questo comportamento sia innato (Spence et al., 2008). Tuttavia, è importante notare che gli individui cresciuti in un ambiente socialmente isolato sembrano avere difficoltà a distinguere gruppi di conspecifici da quelli di altre specie. Queste osservazioni possono indicare che il comportamento di *shoaling* coinvolga sia componenti genetiche che apprese (Spence et al., 2008).

Molteplici benefici sono associati allo *shoaling*. Viaggiare in gruppo può effettivamente facilitare la ricerca di cibo e aumentare la sicurezza dei membri in quanto il numero maggiore di individui confonde i predatori e rende più complesso per loro selezionare un singolo pesce come preda (Gerlai, 2014). Inoltre, la polarizzazione del gruppo agevola il rilevamento di qualsiasi improvviso cambiamento nella direzione di un compagno, il che potrebbe indicare un potenziale pericolo imminente (Miller&Gerlai, 2012). Il nuoto in gruppo offre anche vantaggi idrodinamici poiché gli individui posizionati nella parte posteriore consumano meno energie grazie alla minore resistenza dell'acqua (Facciol&Gerlai, 2020).

Tuttavia, lo *shoaling* presenta anche diversi svantaggi. Gruppi grandi di pesci, oltre ad essere più visibili ai predatori rispetto ad un singolo pesce, comportano una diffusione più rapida di agenti patogeni e un aumento della competizione sia per il cibo che per i partner sessuali (Facciol&Gerlai, 2020).

2. Scopo della tesi

Nella presente tesi ci concentreremo sull'ontogenesi del comportamento sociale nelle larve di zebrafish, con l'obiettivo di evidenziare come e quando queste larve, nonostante si trovino in una fase iniziale di sviluppo, manifestino comportamenti sociali.

Per condurre l'analisi, abbiamo adottato una procedura sperimentale basata sulla scelta spontanea. In accordo con precedenti studi che avevano indicato una mancanza di comportamento sociale significativo nelle larve di una settimana di età, abbiamo analizzato separatamente un gruppo composto da larve di 14dpf e un altro da larve di 21dpf. Ciò è stato fatto considerando la possibilità che il comportamento sociale, come l'aggregazione (*shoaling*), in soggetti di età e dimensioni diverse potrebbe provocare risposte di attacco/fuga piuttosto che di interazione sociale. Entrambi i gruppi sono stati sottoposti a due diverse condizioni sperimentali: nella prima, un lato della vasca in cui le larve sono state testate ospitava 4 conspecifici e l'altro lato rimaneva vuoto, mentre nella seconda condizione la vasca ospitava 2 conspecifici da un lato e 4 dall'altro.

La valutazione del comportamento sociale è basata sulla quantità di tempo che ciascuna larva trascorre nelle vicinanze del lato della vasca con il maggior numero di conspecifici.

3. Biologia della specie

Il *Danio rerio*, anche chiamato zebrafish, è un pesce tropicale d'acqua dolce appartenente alla famiglia *cyprinidae* che fu descritto per la prima volta dal chirurgo Francis Hamilton (Spence et al., 2008).

Originario del continente asiatico, è un pesce sociale che vive in piccoli banchi da 5-20 individui (Lawrence, 2007), occupando i bacini fluviali dell'India, Pakistan, Nepal, Bangladesh, Sri Lanka, Thailandia, Malesia e dello Yunnan in Cina (Barman, 1991). Abitano principalmente in corsi d'acqua poco profondi e poco mobili o stagnanti, spesso collegati alle coltivazioni di riso in quanto, l'uso dei fertilizzanti nelle risaie, favorisce la crescita di zooplancton, principale fonte di nutrimento dello zebrafish (Spence et al., 2008). Tuttavia, essendo un pesce onnivoro, la sua dieta è varia e consiste (oltre agli zooplancton) in insetti, uova di invertebrati, squame di pesce, sabbia e fango (Spence et al., 2008); tutto ciò suggerisce che si nutrano principalmente nella colonna d'acqua, ma sono anche in grado di nutrirsi in superficie e nel substrato (Ribas & Piferrer, 2014).

Lo zebrafish è un animale ectotermico, ovvero la sua temperatura corporea è influenzata dall'ambiente circostante (Ribas & Piferrer, 2014). L'intervallo di temperatura considerato ottimale per il suo benessere si aggira tra i 22° e i 30°, ma è in grado di sopravvivere anche in un intervallo da 6,2° a 42° (Ribas & Piferrer, 2014).

Presenta un corpo fusiforme caratterizzato dalla presenza di strisce blu scuro orizzontali (da 5 a 7) che si estendono lungo il corpo, da cui prende il nome "zebrafish" (Spence et al., 2008; Barman, 1991) e mediamente cresce fino a una lunghezza di circa 40mm con un peso che varia da 0,5 a 0,9g (Spence et

al., 2008; Ribas & Piferrer, 2014). I maschi solitamente hanno il corpo più allungato e più piccolo delle femmine, mostrano una colorazione più vivace, con strisce oro e blu, e sviluppano papille genitali nell'area anale più pronunciate (Spence et al., 2008; Ribas & Piferrer, 2014). Le femmine adulte invece mostrano strisce argento e blu e un addome più rotondo rispetto ai maschi, soprattutto quando sono gravide (Ribas & Piferrer, 2014) (Fig. 1).

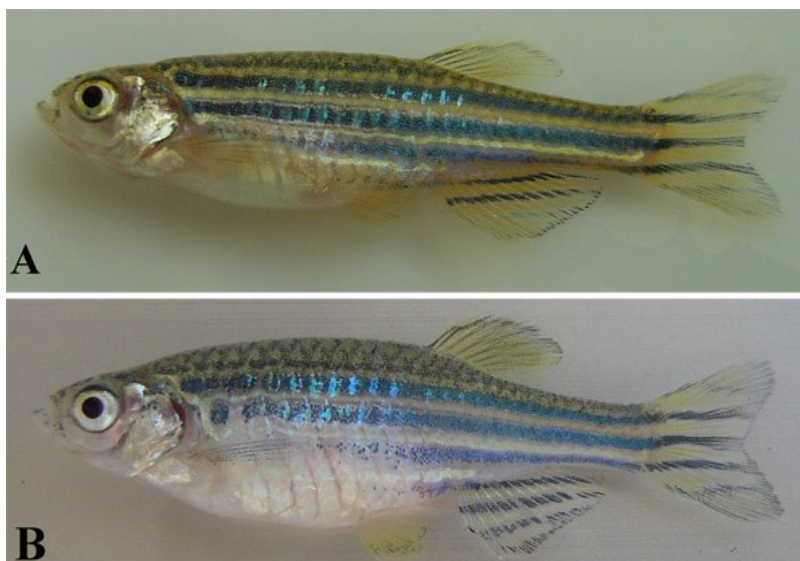


Figura 1: Illustrazione di zebrafish maschio (A) e femmina (B) (jove.com)

Il ciclo di vita dello zebrafish è relativamente breve, Gerhard e colleghi (2002) affermano in uno dei loro studi che in media ha un'aspettativa di vita di 42 mesi; tuttavia, l'individuo più longevo da loro analizzato è sopravvissuto fino a 66 mesi.

Sono noti per la loro prolificità e la capacità di riprodursi frequentemente già a partire dal terzo mese di età, possono deporre le uova ogni 1-14 giorni e produrre in una covata diverse centinaia di uova (Ribas & Piferrer, 2014). In natura la stagione riproduttiva combacia con quella dei monsoni, in condizioni di

laboratorio invece avviene tutto l'anno (Ribas & Piferrer, 2014). Le uova vengono deposte in acqua e fecondate esternamente dal maschio e la schiusa avviene tra le 48 e le 72 ore, senza necessità di nessun tipo di cura parentale (Kimmel et al., 1995; Spence et al., 2008). Gli embrioni si sviluppano rapidamente e sono trasparenti, il che consente di studiare lo sviluppo degli organi interni e facilita gli studi nei programmi di sviluppo genetico, perché è possibile monitorare e manipolare il suo sviluppo senza difficoltà (Bozkurt, 2020) ed è questo uno dei principali motivi per la quale sono diventati popolari come modello di studio (Lawrence, 2007).

4. Materiali e metodi

4.1 Soggetti sperimentali

Tutte le larve di zebrafish testate provengono dalla fecondazione di soggetti cresciuti ed allevati nel Laboratorio di Psicologia Comparata del dipartimento di Psicologia Generale dell'Università di Padova.

Le uova raccolte sono state divise in gruppi da 50 e inserite in capsule petri (10 cm Ø, altezza di 1.5 cm) riempite con 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 metilene (0.0016gr/l).

La stanza usata per questa procedura, ovvero la stessa in cui si sono svolti anche gli esperimenti, è stata mantenuta ad una temperatura di circa 28 ± 1 °C e illuminata secondo un ciclo di 14 ore di luce e 10 ore di buio.

Le larve sono state lasciate sviluppare in queste condizioni fino ai 6 dpf, dopodiché sono state spostate in vasche rettangolari (14 x 7 x 4 cm) di acido polilattico, create attraverso una stampante 3D, dove l'acqua è stata cambiata ogni 2 giorni circa e sono state nutrite due volte al giorno, di mattina e di pomeriggio, con dieta di cibo secco (GEMMA Micro 75).

4.2 Apparato sperimentale

L'esperimento prevedeva l'utilizzo di un apparato sperimentale rettangolare in PLA di colore bianco, realizzato tramite una stampante 3D e avente dimensioni di 16x4x4 cm (*Fig. 2*). L'apparato è stato diviso in tre settori da due pareti di plexiglass trasparente 4x4cm. I settori esterni, dove vengono inseriti gli stimoli, sono lunghi 4 cm, mentre la parte centrale, dove viene inserita la larva da testare, è lunga 8 cm.

La vaschetta è stata riempita con *Fish Water* 1x (0.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.5 gr Instant Ocean, 1 L H_2O deionizzata) senza blu di metilene e la temperatura dell'acqua è stata mantenuta a 27.5 ± 1 °C.

L'esperimento, sia in fase di abituazione sia in fase test, è stato monitorato da una videocamera posta sopra all'apparato.

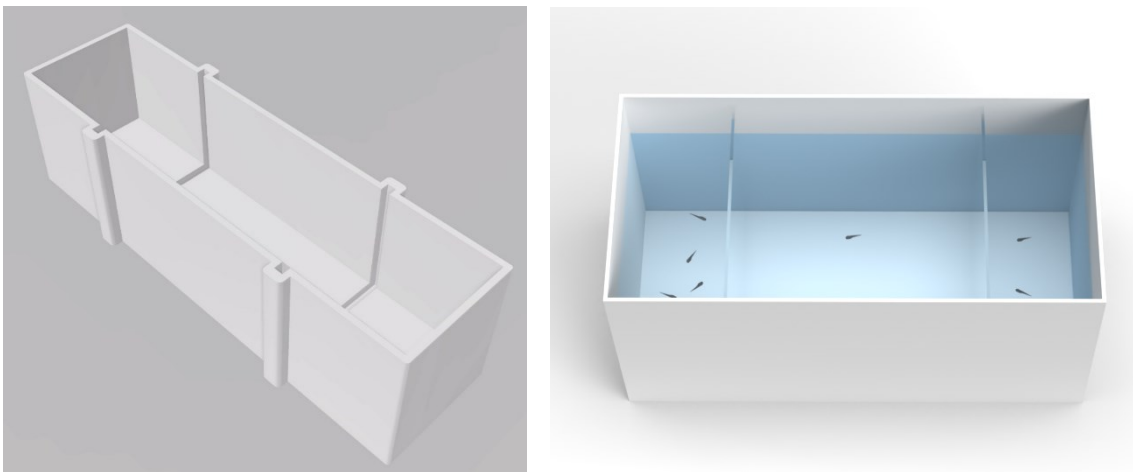


Figura 2: Apparato sperimentale

4.3 Procedura e stimoli sperimentali

I test sono stati eseguiti a 14 e 21 dpf e per ogni test sono stati usati soggetti della stessa età. Alle 9.00 le larve vengono nutrite e, circa 30 minuti dopo, ha inizio l'esperimento. Per prima cosa vengono oscurati da un foglio bianco di acetato i settori più esterni dell'apparato sperimentale, all'interno dei quali vengono inserite le larve-stimolo in base alla condizione a cui i soggetti venivano assegnati:

- Condizione di controllo: nulla vs nulla
- Condizione 1: numerosità (n=4) vs nulla
- Condizione 2: piccola numerosità (n=2) vs grande numerosità (n=4)

Alle 9.45 inizia il periodo di abituazione in cui si avvia la videoregistrazione e, utilizzando una pipetta, si inserisce una larva nel settore centrale dell'apparato. Questa fase dura 15 minuti dopodiché ha inizio la fase test, anch'essa di 15 minuti, in cui vengono rimossi i fogli che coprono i due settori laterali, in questo modo il soggetto è in grado di vedere gli stimoli presenti all'interno ed è possibile verificare le sue preferenze e se è presente un comportamento sociale in base alla percentuale di tempo che passa nelle aree prossimali ai diversi stimoli. Finita anche questa fase la videoregistrazione viene interrotta e la larva rimossa dall'apparato. Successivamente, l'acqua presente nel settore centrale viene sostituita con acqua pulita e le larve presenti nei settori laterali vengono cambiate di posizione (quelle nel settore di sx verranno spostate in quello di dx e viceversa). Quest'ultima procedura ci permette di escludere che il tempo passato in prossimità ai diversi stimoli sia spinto da una preferenza per quella specifica zona della vasca piuttosto che dallo stimolo stesso.

4.4 Analisi statistiche

In totale sono stati testati 80 soggetti: 40 per ciascuna condizione (20 per ciascuna fascia d'età). Ogni soggetto è stato videoregistrato per tutta la durata dell'esperimento, ovvero 30 minuti che comprende una prima fase di ambientamento, della durata di 15 minuti, ed una seconda fase di esposizione agli stimoli della durata di 15 minuti. Di ciascun soggetto è stata analizzata la seconda fase attraverso l'utilizzo di Ciclic Timer (Ver. 1.3), un programma che permette di ricavare quanto tempo viene trascorso da ciascun soggetto nelle due zone d'interesse. In particolare, per quanto riguarda la condizione 1, la zona 1 corrisponde all'area vicina al settore dove sono presenti 4 larve, mentre la zona 2 corrisponde all'area vicina al settore dove non sono presenti larve (Fig. 3).

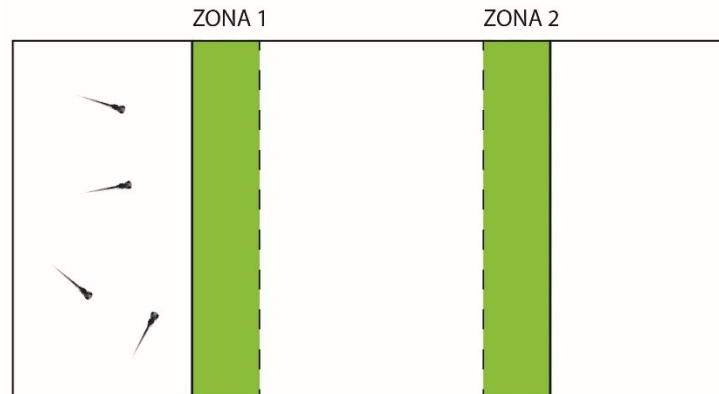


Figura 3: Condizione 1

Per quanto riguarda la condizione 2, la zona 1 corrisponde all'area vicina al settore in cui sono inserite 4 larve, mentre la zona 2 corrisponde all'area vicina al settore contenente 2 larve (Fig. 4).

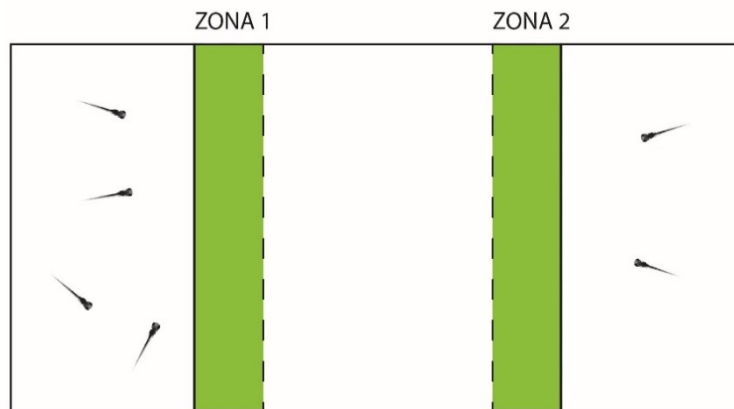


Figura 4: Condizione 2

Successivamente alle analisi video, è stato calcolato un indice che varia da 0 ad 1 attraverso la seguente formula:

$$\frac{\text{tempo zona 1}}{\text{tempo zona 1} + \text{tempo zona 2}}$$

La variabile dipendente è dunque la proporzione di tempo trascorsa in prossimità del settore con le 4 larve.

Le analisi statistiche sono state condotte andando a considerare sia le due condizioni separatamente, sia le due condizioni e le due fasce d'età separatamente. È stato condotto un t-test a campione unico per poter verificare se i soggetti, a livello di condizione, hanno preferito la zona 1. Successivamente, è stato condotto un t-test considerando separatamente le due fasce di età.

Infine, per ciascuna condizione è stato creato un modello lineare misto (LMM,

funzione 'lmer' del pacchetto R 'lme4') inserendo come fattore fisso il passare dei minuti e la fascia d'età, mentre come fattore random il soggetto.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma statistico RStudio, versione 4.3.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.rproject.org>).

5. Risultati

Risultati: condizione 1

Considerando tutti i soggetti della condizione 1 (4vs0), si osserva che durante i 15 minuti, la proporzione media di tempo spesa nella zona 1 è di 0.57 ± 0.18 (media \pm SD), che risulta essere statisticamente significativa (t-test a campione unico, $t_{34} = 2.332$, p-value=0.026).

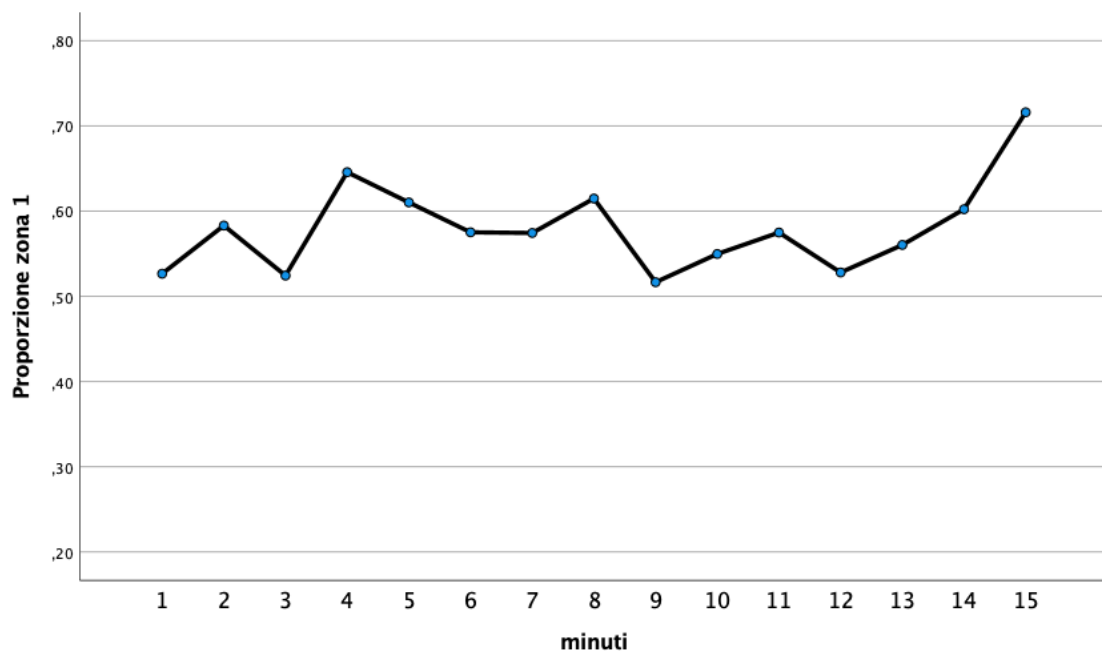


Figura 5: CONDIZIONE 1: andamento in media di tutti i soggetti durante i 15 minuti di test. Asse x=minuti, Asse y=proporzione di tempo nella zona 1

Considerando il campione composto da soggetti aventi 14dpf, si osserva che durante la fase di esposizione, la proporzione di tempo spesa in media nella zona 1 è di 0.57 ± 0.19 (media \pm SD), e non è statisticamente significativa (t-test a campione unico, $t_{16} = 1.418$, p-value=0.175). Lo stesso risultato emerge andando ad osservare i soggetti di 21dpf (media di 0.57 ± 0.17 , t-test a campione unico, $t_{17} = 1.854$, p-value=0.081).

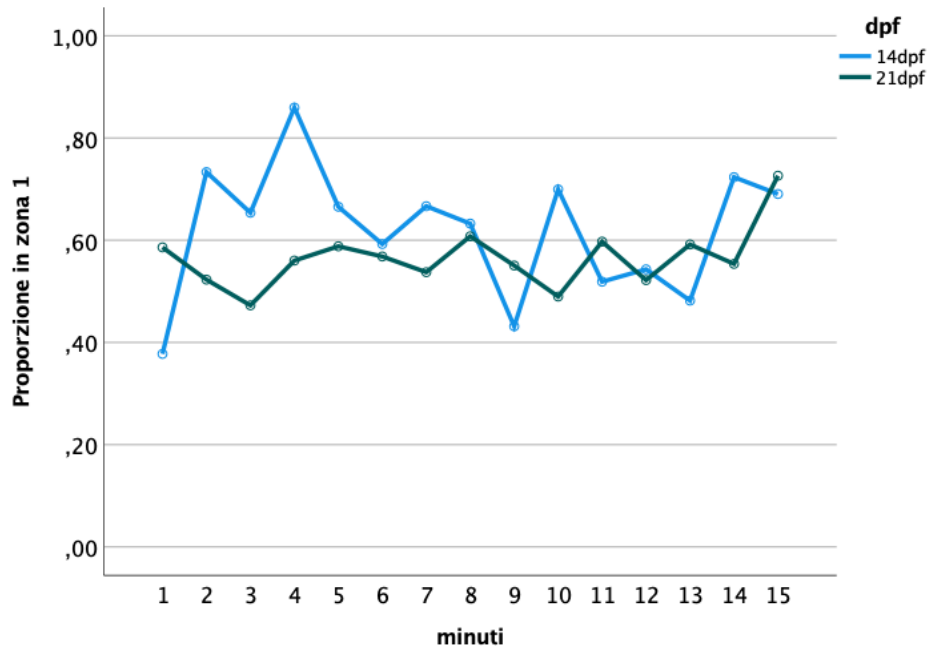


Figura 6: andamento in media di tutti i soggetti diviso per età durante i 15 minuti di test.
 Asse x=minuti, Asse y=proporzione di tempo nella zona 1

I risultati del modello lineare misto non mostrano effetti significativi del trascorrere dei minuti ($F_{14,266} = 0.842$, $p = 0.311$), della fascia d'età ($F_{1,19} = 0.353$, $p = 0.559$) e dell'interazione tra il passare dei minuti e la fascia d'età ($F_{14,266} = 0.982$, $p = 0.472$).

Risultati: condizione 2

Complessivamente, per i soggetti della condizione 2 (2vs4) la proporzione di tempo trascorsa nella zona 1, dove è presente il settore con 4 larve è di 0.54 ± 0.27 (media \pm SD). Il dato non risulta essere statisticamente significativa (t-test a campione unico, $t_{33} = 1.434$, $p\text{-value}=0.161$).

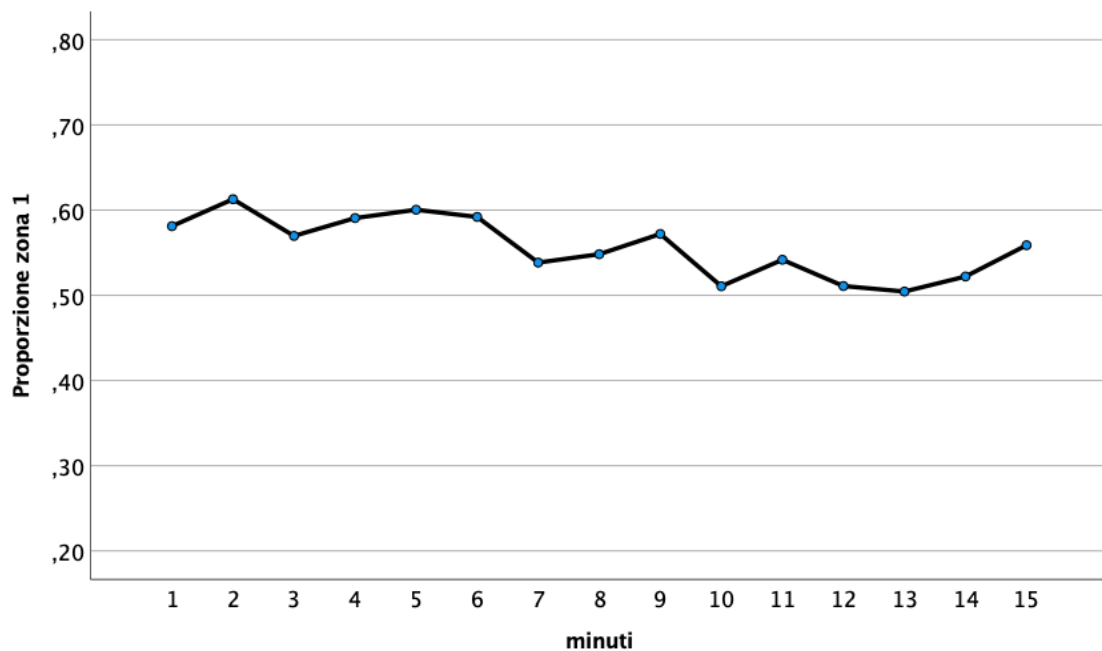


Figura 7: CONDIZIONE 2: andamento in media di tutti i soggetti durante i 15 minuti di test. Asse x=minuti, Asse y=proporzione di tempo nella zona 1

Andando a considerare le due fasce di età separatamente, si osserva che, per quanto riguarda i soggetti di 14dpf, trascorrono 0.52 ± 0.16 (media \pm SD) della proporzione del tempo nella zona 1, mentre la proporzione di tempo trascorsa nella zona 1 dai i soggetti di 21dpf è in media di 0.57 ± 0.18 (media \pm SD). In entrambi i casi, i dati non risultano essere statisticamente significativi (t-test a campione unico 14dpf: $t_{17} = 0.519$, $p\text{-value}=0.610$; t-test per 21dpf: $t_{15} = 1.462$, $p\text{-value}=0.164$).

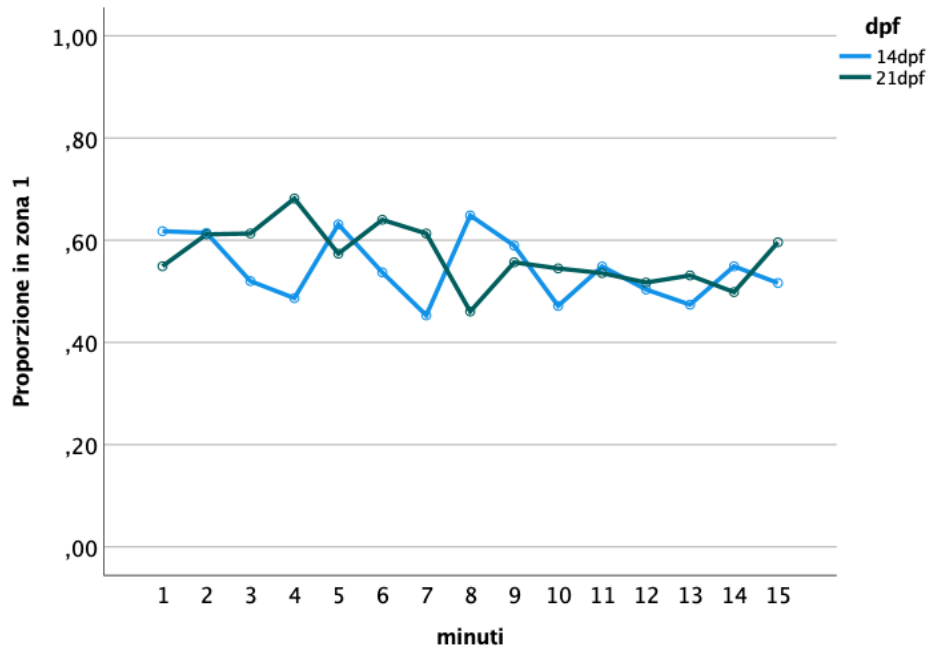


Figura 8: CONDIZIONE 2: andamento in media di tutti i soggetti diviso per età durante i 15 minuti di test. Asse x=minuti, Asse y=proporzione di tempo nella zona 1

Infine, andando ad osservare i risultati del modello lineare misto, non si osserva alcun effetto significativo delle variabili minuti di test ($F_{14,3} = 0.549$, $p = 0.903$), età dei soggetti ($F_{1,28} = 0.132$, $p = 0.719$) e della loro interazione ($F_{14,392} = 1.077$, $p = 0.377$).

6. Discussione

Zebrafish (*Danio rerio*) è un organismo modello comunemente studiato in biologia, comprese le neuroscienze e la ricerca comportamentale. Sebbene non siano animali sociali allo stesso modo di alcuni mammiferi, come i primati o gli esseri umani, mostrano determinati comportamenti sociali.

La ricerca ha cercato di indagare non solo la tipologia di comportamenti sociali messi in atto da zebrafish ma più recentemente si è concentrata sull'individuare il momento in cui la tendenza sociale si manifesta in modo stabile in questa specie. La questione è complicata dal fatto che zebrafish a pochi giorni di vita mostra prima una tendenza esplorativa che nei giorni successivi si riduce grandemente e non è chiaro se questa fluttuazione nel comportamento influenzi anche l'espressione della socialità.

Da alcune ricerche precedenti è comunque emerso che zebrafish mostrerebbe una tendenza sociale solo a partire da circa 18-20 dpf mentre in precedenza le risposte di aggregazione verso conspecifici non risultano evidenti. Un limite a queste considerazioni è relativo al setting sperimentale comunemente usato per indagare la socialità. È abbastanza frequente, infatti, che questo tipo di ricerca (piuttosto comune in biologia e farmacologia) si accompagni ad una somministrazione di droghe che alterano il comportamento dei soggetti e all'uso di apparati che spesso non isolano chimicamente i soggetti dagli stimoli sociali. Spesso, inoltre, i soggetti sono esposti a compagni di età differente per cui non è escluso che indagare una tendenza sociale come l'aggregazione (*shoaling*) in soggetti di età (e dimensioni) diverse possa dar vita a risposte di attacco/fuga

piuttosto che di interazione sociale. Ultimo punto è quello relativo al tipo di stimolazione; frequentemente la scelta è tra uno stimolo sociale versus il nulla, in altre parole la tendenza è quella di massimizzare una possibile risposta sociale. Per tutte queste ragioni abbiamo condotto un esperimento che non solo considerasse le due fasce d'età entro le quali le risposte sociali sono già state documentate ma abbiamo adottato una metodologia che includesse la scelta tra due gruppi numericamente differente (4 vs 2 compagni), utilizzando come rinforzo sociale soggetti della stessa età di quello sperimentale e limitando alla sola esposizione visiva il contatto tra soggetto e compagni. In ultimo abbiamo mantenuto un apparato che permettesse un costante contatto visivo tra soggetti e stimoli in modo da ridurre possibili risposte di stress da apparente isolamento sociale.

I risultati raccolti sono piuttosto contraddittori; da un lato abbiamo riscontrato, in accordo con la letteratura, una risposta sociale più consistente limitatamente alla condizione di 4vs0, dall'altro questa preferenza per lo stimolo sociale si manifesta solo considerando tutti i soggetti indipendentemente dall'età. È necessario sottolineare come osservando le medie complessive in realtà il comportamento sociale a 14 e 21dpf non sembra differire qualitativamente né nella condizione 4vs0 che nella 4vs2 e che in termini strettamente quantitativi il tempo medio trascorso accanto agli stimoli nei due esperimenti è molto simile (54% nel 4vs2, 57% nel 4vs0), una differenza che si riduce ulteriormente se consideriamo separatamente i due intervalli d'età. In poche parole, è possibile che i risultati ottenuti siano limitati dal campione relativamente esiguo di individui osservati e che solo la loro somma porti ad individuare una preferenza.

A conferma di quanto detto i risultati mostrano una ridotta dispersione dei punteggi attorno alla media suggerendo che il comportamento osservato sia comune alla grande maggioranza dei soggetti osservati. È necessario indicare comunque come anche la misura raccolta debba essere perfezionata; nel presente esperimento non viene considerato il comportamento degli stimoli se non relativamente all'età. Non è possibile escludere che in alcuni casi gli stimoli, magari muovendosi in modo minore e attirando quindi meno l'attenzione del soggetto, abbiano influenzato in modo significativo l'esito del test.

I primi accorgimenti da includere in questo genere di test riguardano quindi non solo l'aumento del campione ma anche il possibile utilizzo di filmati al posto degli stimoli sociali che possano essere controllati per la quantità di movimento prodotto.

7. Riferimenti bibliografici e sitografia

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

Bozkurt, Y. (2020). Introductory Chapter: Importance of Zebrafish (*Danio rerio*) as Model Organism in Biomedical Research. IntechOpen. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91319>

Celli, G. (1998). Società animali. Enciclopedia delle scienze sociali, <https://www.treccani.it>

Couvillon, M.J. (2012). L'eredità della danza di Karl von Frisch. Insectes Sociaux. 59, 297–306 <https://doi.org/10.1007/s00040-012-0224-z>

Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A.R., and Wilson, S.W. (2015). Development of social behavior in young zebrafish. Front. Neural Circuits 9, 39.

Facciol, A., & Gerlai, R. (2020). Zebrafish Shoaling, Its Behavioral and Neurobiological Mechanisms, and Its Alteration by Embryonic Alcohol Exposure: A Review. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 14, 572175. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.572175>

Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E. & Cheng, K. C. (2002). Life spans and senescent phenotypes of zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology* 37, 1055–1068.

Gerlai, R. (2014). Social behaviour of zebrafish: From synthetic images to biological mechanism of shoaling. *Journal of Neuroscience Methods*. 234, 59-65

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.

Landin, J., Hovey, D., Xu, B., Lagman, D., Zettergren, A., Larhammar, D., Kettunen, P., & Westberg, L. (2020). Oxytocin Receptors Regulate Social Preference in Zebrafish. *Scientific reports*, 10(1), 5435.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61073-4>

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269 (1-4), 1-20.

Liu, X., Zhang, Y., Lin, J., Xia, Q., Guo, N., & Li, Q. (2016). Social Preference Deficits in Juvenile Zebrafish Induced by Early Chronic Exposure to Sodium Valproate. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10, 201.

<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00201>

Miller, N., & Gerlai, R. (2012). From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*). *PloS one*, 7(11), e48865.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048865>

Parmigiani, S. (2007). Imprinting animale. *Enciclopedia italiana-VII Appendice*,

<https://www.treccani.it>

Pritchard, V. L., Lawrence, J., Butlin, R. K. & Krause, J. (2001). Shoal choice in zebrafish, *Danio Rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*. 62, 1085–1088.

Rescigno, F., Tallacchini, M., Rizzolatti, G., Morelli, M., Battaglia, L., & Garattini, S. (2021). La sperimentazione con gli animali in Italia: opinioni a confronto. *BioLaw Journal-Rivista di BioDiritto*, (2), 5-16.

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>

Sheardown, E., Torres-Perez, J.V., Anagianni, S., Fraser, S.E., Vallortigara, G., Butterworth, B., Miletto-Petrazzini, M.E., & Brennan, C.H. (2022).

Characterizing ontogeny of quantity discrimination in zebrafish, *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1968), 20212544.

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://www.jove.com>

<https://www.treccani.it>