

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie
Zoologie obratlovců



Bc. Patrik Stehlík

**Buněčné složení mozku zoborožců, šplhaviců
a srostloprstých ptáků**

Cellular composition of brains of hornbills, woodpeckers and coraciiform birds

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Praha, 2021

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, Mgr. Pavlu Němcovi, Ph.D., za cenné rady, věcné připomínky a všechnen čas, který mi věnoval. Stejným dílem bych rád poděkoval všem členům týmu: Mgr. Kristině Kverkové, Mgr. Lucii Marhounové, Mgr. Martinovi Kocourkovi, Mgr. Yicheng Zhangovi, Mgr. Alexandře Polonyiové a Mgr. Sewerynowi Olkowiczovi, Ph.D. za veškerou pomoc a rady, které mi poskytli. Též bych chtěl poděkovat Mgr. Barboře Strakové za poskytnutí a konzultaci dat z její diplomové práce. Dík patří také všem blízkým za pomoc a trpělivost, se kterou snášeli má rozpoložení po dobu sepisování téhle práce.

Děkuji.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt č. 1438217).

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. srpna 2021

Patrik Stehlík

ABSTRAKT

Recentní srovnávací studie ukazují, že mozky ptáků, ačkoliv malé, disponují vysokou procesní kapacitou. Mozky papoušků a pěvců mají vyšší hustoty neuronů než mozky savců, a zejména velcí papoušci a krkavcovití ptáci konkurují či dokonce předčí počtem neuronů v koncovém mozku primáty. Ukazuje se však, že se procesní kapacita mozku ptáků významně liší mezi různými fylogenetickými liniemi. Bazální skupiny jako hrabaví mají mnohem nižší absolutní počty neuronů a nižší hustoty než pěvci a papoušci. V této diplomové práci jsem pomocí metody izotropní frakční homogenizace stanovil počty neuronů a non-neurálních buněk ve vybraných částech mozku u 19 druhů z tradičně uznávaných řádů zoborožců (*Bucerotiformes*), šplhavců (*Piciformes*) a srostloprstých ptáků (*Coraciiformes*). Mozky zoborožců i šplhavců (nikoliv však srostloprstých) mají počty neuronů srovnatelné se stejně velkými mozky pěvců a papoušků. Škálování neuronů u těchto skupin je podobné a signifikantně se liší od téhož pro holuby (*Columbiformes*) a hrabavé (*Galliformes*). U korunových skupin můžeme pozorovat podobné trendy jako je vysoká míra encefalizace, proporčně větší koncový mozek a rostoucí procento neuronů koncového mozku. U holubů a hrabavých můžeme pozorovat trendy zcela opačné, tedy nízkou míru encefalizace, proporčně menší koncový mozek a rostoucí procento neuronů v mozečku. U zoborožců byly prokázány signifikantně vyšší počty non-neurálních buněk než u ostatních skupin. Podrobnější analýza koncového mozku reprezentativních druhů ukázala, že značná část neuronů (40–57 %) je alokovaná do nidopallia, které zabezpečuje mnohé kognitivní funkce. Naopak relativní velikost a procento neuronů v hyperpalliu, které je funkčním homologem zrkové kůry savců, je pravděpodobně druhově specifické a odráží ekologii daného druhu či taxonu.

Klíčová slova: alometrie, velikost mozku, srovnávací neuroanatomie, počet gliových buněk, počet neuronů, izotropická frakční homogenizace.

ABSTRACT

Recent comparative studies have shown that bird brains, although small, have a high processing capacity. The brains of parrots and songbirds have higher neuronal densities than brains of mammals; especially large parrots and corvids compete with or even outnumber primates by the number of telencephalic neurons. However, the processing capacity of the avian brain appears to differ significantly between various phylogenetic lineages. Basal groups such as galliform birds have much lower absolute numbers of neurons and lower neuronal densities than songbirds and parrots. In this Master thesis, I used the isotropic fractionator to determine numbers of neurons and non-neural cells in specific brain regions in 19 species of hornbills (*Bucerotiformes*), woodpeckers (*Piciformes*) and coraciiform birds (*Coraciiformes*). The brains of hornbills and woodpeckers (but not coraciiform birds) have numbers of neurons comparable to that of songbirds and parrots and significantly more neurons than equivalently sized brains of pigeons (*Columbiformes*) and galliform birds (*Galliformes*). In the crown groups, we can observe similar trends such as a higher degree of encephalization, a proportionally larger telencephalon and increasing percentage of telencephalic neurons. On the contrary, in pigeons and galliform birds, we can observe completely opposite trends such as a lower degree of encephalization, a proportionally smaller telencephalon and increasing percentage of cerebellar neurons. Hornbills have significantly higher numbers of non-neuronal cells than any other avian group studied so far. A more detailed analysis of the telencephalon in representative species showed that most telencephalic neurons (40–57 %) are allocated in the nidopallium, which subserve numerous higher cognitive functions. On the contrary, the relative size and percentage of neurons in the hyperpallium, the functional homologue of the mammalian visual cortex, is probably species-specific and reflects the ecology of a given species or taxon.

Keywords: **allometry, brain size, comparative neuroanatomy, number of glial cells, number of neurons, isotropic fractionator.**

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1 ÚVOD	1
1.1 STAVBA MOZEČKU	1
1.2 STAVBA A SPECIFIKA PTAČÍHO KONCOVÉHO MOZKU	2
1.3 HOMOLOGIE A PODOBNOSTI SE SAVCI	4
1.4 OD VELIKOSTI MOZKU K POČTU NEURONŮ	6
1.5 CÍLE PRÁCE	8
2 MATERIÁL A METODIKA	9
2.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA	9
2.2 PŘÍPRAVA TKÁNĚ	9
2.3 STANOVENÍ POČTU BUNĚK	12
2.4 STANOVENÍ POČTU NEURONŮ	14
2.5 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT	15
3 VÝSLEDKY	16
3.1 VELIKOST TĚLA, MOZKU A CELKOVÉ POČTY BUNĚK	23
3.2 HMOTNOSTNÍ PODÍL JEDNOTLIVÝCH ČÁSTÍ MOZKU	24
3.3 HUSTOTA A DISTRIBUCE NEURONŮ	25
3.3 HUSTOTY A DISTRIBUCE NON-NEURÁLNÍCH BUNĚK	27
3.4 POMĚR MEZI NEURONY A NON-NEURÁLNÍMI BUŇKAMI	28
3.5 SUBPALLIUM A PALLIUM	29
3.6 DISTRIBUCE NEURONŮ V KONCOVÉM MOZKU	30
4 DISKUZE	33
4.1 POROVNÁNÍ S OSTATNÍMI PTAČÍMI SKUPINAMI	33
4.2 POROVNÁNÍ SE SAVCI	39
4.3 VELIKOST MOZKU A TĚLA	41
4.4 ŠKÁLOVÁNÍ NEURONŮ	42
4.5 POČTY NEURONŮ A JEJICH DISTRIBUCE	43
4.6 NON-NEURÁLNÍ BUŇKY	44
4.7 SUBPALLIUM A PALLIUM	45
4.3 KOGNITIVNÍ SCHOPNOSTI	48
5 SHRNUÍ	51
POUŽITÁ LITERATURA	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	<i>amygdala</i>
ARC	<i>arcopallium</i>
B	<i>nucleus basorostralis pallii</i>
BO	čichový lalok (<i>bulbus olfactorius</i>)
BS	mozkový kmen (z angl. brainstem)
CB	mozeček (<i>cerebellum</i>)
CV	variační koeficient (z angl. coefficient of variation)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DIE	mezimozek (<i>diencephalon</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DP	dorzální pallium
DVR	dorzální komorový hřbet (z angl. dorsal ventricular ridge)
E	<i>entopallium</i>
EQ	encefalizační kvocient (a angl. encephalization quotient)
GP	<i>globus pallidus</i>
Hp	hipokampus (<i>hippocampus</i>)
HYP	<i>hyperpallium</i>
IH	vmezeřené hyperpallium (z angl. intercalated hyperpallium)
IN	vmezeřené nidopallium (z angl. intercalated nidopallium)
L	sluchové pole L
L1–L6	jednotlivé vrstvy kůry mozkové (neokortexu)
LP	laterální pallium
n	počet jedinců
N	neurony, počet neuronů
NCL	<i>nidopallium caudolaterale</i>
NID	<i>nidopallium</i>
MES	<i>mesopallium</i>
MP	mediální pallium
O	non-neurální buňky, počet non-neurálních buněk (z angl. other cells)
OLS	ordinary least square regression
OT	<i>tectum opticum</i>
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PFA	paraformaldehyd
PFC	prefrontální kortex
PGLS	phylogenetic generalized least squares regression
SBP	<i>subpallium</i>
TEL	koncový mozek (<i>telencephalon</i>)
V	postranní mozková komora
VP	ventrální pallium

Některé zkratky vychází z latinské nebo anglické terminologie. České ekvivalenty často nejsou zavedeny, nebo se vůbec nepoužívají.

1 ÚVOD

Mozek (*cerebrum*) je hlavním řídicím centrem těla. Vývojově je tvořen zadním (*rhombencephalon*), středním (*metencephalon*) a předním mozkem (*prosencephalon*). Morfologicky odlišujeme prodlouženou míchu (*medulla oblongata*), mozeček (*cerebellum*), střední mozek (*mesencephalon*), mezimozek (*diencephalon*) a koncový mozek (*telencephalon*). Relativně největší a nejkompexnější mozky mají dvě endotermní skupiny suchozemských obratlovců, tedy savci a ptáci (Butler & Hodos, 2005; Striedter & Northcutt, 2020). Tyto dvě skupiny zvětšili koncový mozek a mozeček nezávisle, a není proto překvapivé, že struktura těchto částí mozku je u obou taxonů značně odlišná (Jarvis et al., 2005). Rovněž tak velmi podobný repertoár kognitivních schopností ptáků a savců je výsledkem konvergentní evoluce (Güntürkün & Bugnyar, 2016).

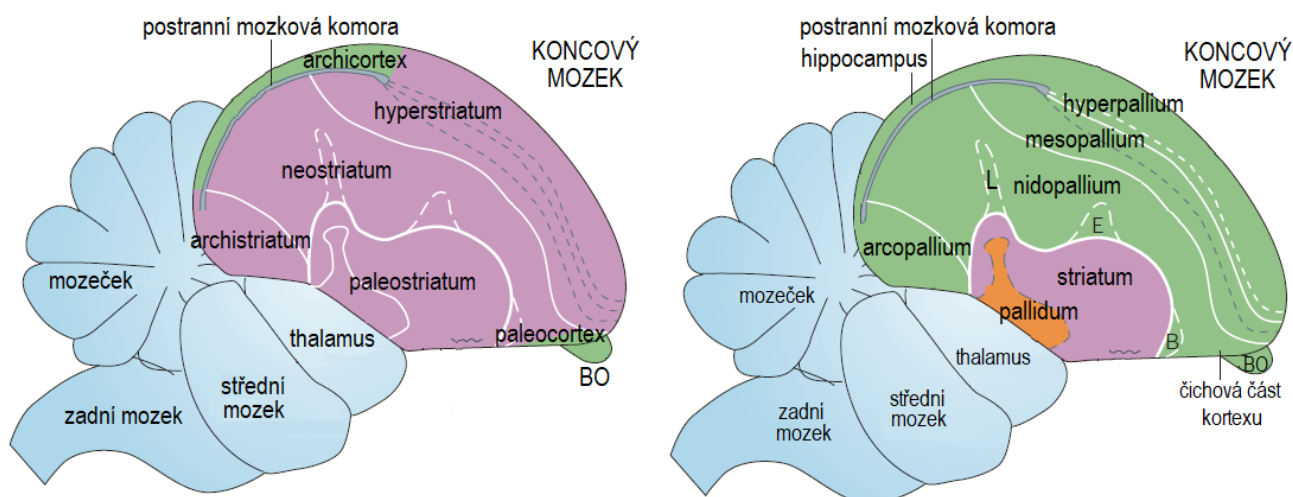
1.1 STAVBA MOZEČKU

Ačkoli se velikost a tvar mozečku u jednotlivých skupin obratlovců značně liší, jeho vnitřní stavba a cytoarchitektonika je velmi konzervovaná (Yopak et al., 2017). Ptačí mozek se skládá z mediální, červovité části (*vermis*) a flocculu (*flocculus*); cereberální hemisféry, typické pro savčí mozek, nejsou u ptáků vyvinuty (Yopak et al., 2017). Tento tradiční pohled zpochybnily některé recentní vývojové studie naznačující, že mozeček ptáků a jiných obratlovců je naopak homologický savcím mozečkovým hemisférám a *vermis* je evoluční novinkou savců (Butts et al., 2014). Tento názor však není všeobecně přijímaný.

Dlouhou dobu bylo usuzováno, že mozeček zajišťuje pouze koordinaci pohybů a udržování rovnováhy, mozeček je ale důležitým asociačním centrem savčího mozku a účastní se i vyšších kognitivních funkcí (Barton, 2012; Sokolov et al., 2017; Smaers et al., 2018). Zatímco drtivou většinu neuronů savčího mozku obsahuje mozeček (Herculano-Houzel et al., 2015), u korunových skupin ptáků je většina neuronů v koncovém mozku (Olkowicz et al., 2016). I u ptáků však funguje mozeček ve funkčním sepětí s koncovým mozkem, do jaké míry se však podílí na vyšších kognitivních funkcích je nejasné. Recentní studie nicméně prokazuje roli mozečku ve vokálním učení pěvců (Pidoux et al., 2018). Recentně bylo rovněž demonstrováno, že mozek papoušků disponuje většími jádry, která zprostředkovávají cerebello-telencephalická spojení (Gutiérrez-Ibáñez et al., 2018; Wylie et al., 2018).

1.2 STAVBA A SPECIFIKA PTAČÍHO KONCOVÉHO MOZKU

Zatímco u savců tvoří většinu koncového mozku šestivrstevná kůra mozková (neokortex), u ptáků má většina koncového mozku charakter kompaktních mas buněk, běžně označovaných jako jádra. Právě tato skutečnost byla hlavním důvodem vzniku zcela nesprávné nomenklatury v první polovině 20. století a definici většiny koncového mozku u ptáků jako struktury, která je homologická pouze k bazálním gangliím u savců (Obr. 1A) (Edinger, 1908; Ariëns Kappers et al., 1936), a to i přes některé studie, které byly s tímto pohledem zcela v rozporu (Homlgren, 1925; Kuhlenbeck, 1938). Druhá polovina 20. století se tak nesla v postupném zpochybňování této představy (např. Karten, 1969; Striedter, 1997; Puelles et al., 2000), což vyústilo vytvořením zcela nové nomenklatury na začátku milénia (Reiner et al., 2004), která zohlednila všechny dostupné poznatky (Obr. 1B).



Obr. 1: Ptačí mozek a jeho hlavní části (A) podle předválečné nomenklatury a (B) podle nomenklatury z roku 2004 (ex Jarvis et al., 2005, upraveno).

B, nucleus basorostralis pallii; **E**, entopallium; **L**, sluchové pole L, **BO**, čichový lalok (bulbus olfactorius).

Ptačí koncový mozek se dělí na dvě hlavní části: *subpallium* a *pallium* (Obr. 1B). **Subpallium** zabírá mnohem menší část koncového mozku než *pallium* a jako takové je ještě dále děleno na *septum*, *pallidum* a *striatum*. Subpallium těsně navazuje na palliální struktury, od kterých je odděleno pouze tenkou bezbuněčnou laminou (Striedter & Beydler, 1997). **Pallium** má poměrně komplikovanou stavbu a jeho hlavními součástmi jsou: *entopallium*, *nidopallium*, *mesopallium*, *hyperpallium*, *arcopallium* a *hippocampus* (Obr. 1B). **Hyperpallium** (Wulst), nejdorzálnější umístěný oddíl pallia, je makroskopicky snadno odlišitelné, jelikož ho od zbylých částí pallia odděluje na povrchu mozku brázda (zvaná *valeculia*). Zvláště nápadné je hyperpallium u predátorů, především pak u sov, kde je hypertrofované a vrstevnatě uspořádané (Pettigrew, 1979; Butler & Hodos, 2005). Ventrální hranice hyperpallia je stále diskutována. Reiner a kolektiv (2004) vytyčili hranici podél *lamina frontalis suprema*, kdy by tak hyperpallium tvořily celkem čtyři části. Jarvis a kol. (2013)

však později demonstrovali, že (dvě) ventrální části hyperpallia vykazují téměř shodný genetický profil s ventrálně uloženým mesopalliem, což by znamenalo, že hyperpallium by tvořilo mnohem menší část Wulstu. Hyperpallium jako takové je cílovým místem retino-thalamo-telencephalické zrakové dráhy a jedná se o analog (viz následující kapitola) geniculo-striální zrakové dráhy u savců (Karten, 1969; Kaas, 2012). Do Wulstu zasahuje částečně i **hipokampus**, který je umístěn dorzomediálně (Obr. 1). Nejčastěji je spojován s pamětí, zpracováním prostorové informace; zvláště vyvinutý hipokampus mají ptáci ukrývající si zásoby potravy (Yaskin, 2011).

Většinu ptačího pallia tvoří tzv. DVR (dorzální komorový hřbet, dorsal ventricular ridge), které tvoří obrovské masy šedé hmoty pod postranními mozkovými komorami. DVR se dělí na *nidopallium*, *mesopallium* a *arcopallium*. **Nidopallium** z větší části funguje jako asociační centrum zodpovídající za nejrůznější kognitivní funkce, včetně exekutivní kontroly. *Nidopallium caudolaterale* (NCL) je pak označováno jako funkční ekvivalent savčího prefrontálního kortexu (Güntürkün, 2005; Nieder, 2017). Tři primární sensorické oblasti jsou cílem extratelencephalických sensorických vstupů a zasahují hluboko do nidopallia, konkrétně sluchové pole L, *entopallium* a *nucleus basorostralis pallii* (Obr. 2). Stejně jako nidopallium i **mesopallium** se významně podílí na zpracování informací vyššího řádu a významně přispívá k ptačí kognici, učení a paměti (Atoji & Wild, 2012; Güntürkün & Bugnyar, 2016). Hranice mesopallia jsou diskutované stejně jako hranice hyperpallia, jelikož spolu tyto dvě oblasti sousedí (viz výše). Ventrální a dorzální část mesopallia tvoří dvě populace buněk, které jsou od sebe odděleny postranní mozkovou komorou v dorzální části koncového mozku a přechází jedno v druhé skrze *lamina mesopallium intermediale* ve ventrální části (Chen et al., 2013; Jarvis et al., 2013). Kaudo-basolaterálně umístěné **arcopallium** přijímá nejrůznější informace z ostatních palliálních struktur a projikuje do motorických systémů mozkového kmene (Güntürkün et al., 2017); funkčně je rozděleno na kaudomediální (amygdala) a anteriorní část (premotorické centrum).

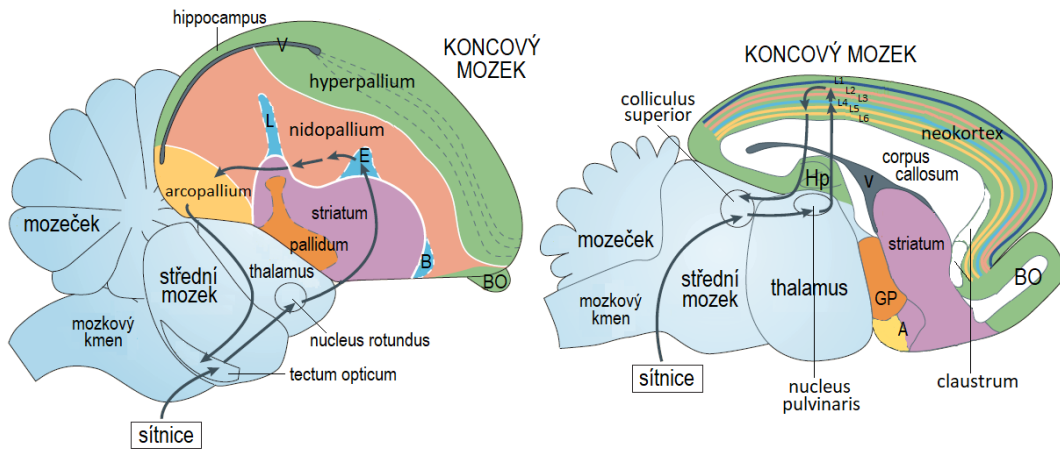
Některé oblasti pallia zpracovávající sensorické a motorické informace jsou uspořádány do masivních funkčních modulů, které propojují vrstevnaté struktury sensorických oblastí. Skrytá laminace a uspořádání do vertikálních sloupců notně připomínají zapojení jednotlivých vrstev kůry mozkové, avšak tyto funkční moduly jsou u savců maličké a je jich obrovské množství. Spíše se tak jedná o podobný organizační princip vlastní centrální nervové soustavy. V minulosti bylo detekováno několik modulů mezi různými částmi ptačího pallia a subpallia (Stacho et al., 2020), u některých dnes známe i jejich přesnou funkci: např. sloupec sluchový (Wang et al., 2010), zrakový (Ahumada-Galleguillos et al., 2015), motorický a sloupce somatosenzorické (Jarvis et al., 2013) a sloupec pro denní a noční vidění (Mouritsen et al., 2005)

1.3 HOMOLOGIE A PODOBNOSTI SE SAVCI

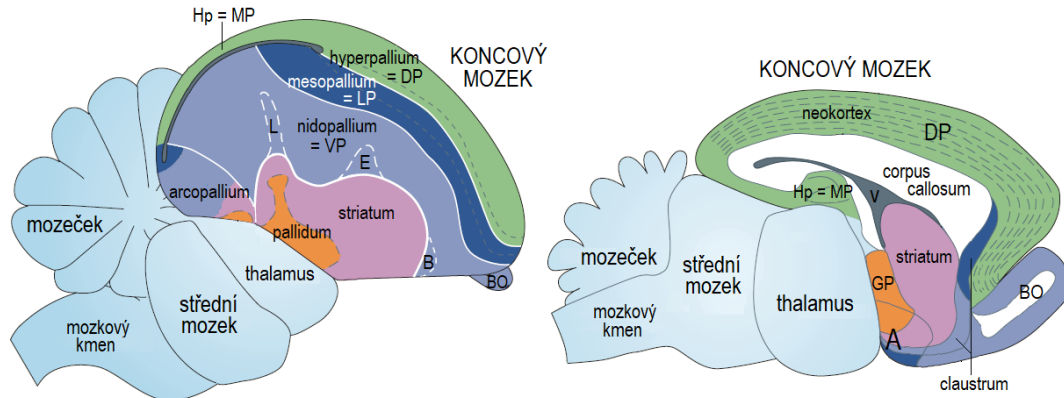
Všechny části subpallia dnes mají jasné homology u savců (Obr. 2; Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2013). Subpalliální oblast koncového mozku je tedy v evoluci konzervovaná napříč blanatými (*Amniota*) a pravděpodobně i napříč všemi obratlovci (Stephenson-Jones et al., 2011). Podjednotkám ptačího subpallia byly přiřazeny názvy odpovídající termínům pro savčí bazální ganglia (Reiner et al., 2004). Striatum je plně homologické ke komplexu *caudate-putamen* (*striatum* u menších savců, kde tyto dvě struktury splývají) a pallidum homologické ke *globus pallidus* u savců, a to i přes poměrně rozdílnou stavbu této části subpallia (Reiner et al., 2004).

Co se týká homologie savčího a ptačího pallia, shoda nepanuje. Jednoznačnými homology mezi ptáky a savci jsou pouze hipokampus a čichová část kůry mozkové s čichovým lalokem (Atoji & Wild, 2006; Atoji et al., 2016; Tosches et al., 2018). Pro zbylé části pallia koncového mozku bylo navrženo poměrně velké množství hypotéz (Karten, 1969; Puelles et al., 2000; Butler & Molnár, 2002; Briscoe et al., 2018). Kvantum znalostí nabytých za posledních 150 let výzkumu však bohužel stále neumožňuje uspokojivě rozřešit otázku homologií mezi savcím a ptačím palliem. **Neokortikální hypotéza** navrhuje, že jednotlivá jádra ptačího pallia (případně jejich části) jsou homologická k jednotlivým vrstvám kůry mozkové u savců (Obr. 2A) a plně tak homologizuje celé ptačí pallium s neokortexem u savců (Karten, 1969; Shimizu et al., 1995). Této hypotéze vyhovují dostupná hodologická, histologická, imunohistochemická a cytoarchitektonická data. **Klaustro-amygdalární hypotéza** navrhuje mnohem méně homologií na základě embryologických dat (Puelles et al., 2000; Striedter, 1997). Podle této hypotézy jako jediné homology ke kůře mozkové u savců mohou být označeny struktury dorzálního (hyperpallium) a mediálního (hipokampus) pallia (Obr. 2B). Struktury DVR jako je nidopallium (ventrální pallium) a mesopallium (laterální pallium) by pak byly částečně homologní k subkortikálním jaderným strukturám u savců (basolaterální část amygdaly a *claustrum*). **Hypotéza buněčných polí** navrhuje, že DVR je homologické jak k neokortexu, tak amygdale a klaustru u savců (Butler & Molnár, 2002; Jarvis et al., 2013). Podle této hypotézy tvoří ptačí pallium čtyři buněčné populace (Obr. 2C), jež jsou homologické k jednotlivým vrstvám neokortexu, amygdale a klaustru (Jarvis et al., 2013). Další a další molekulární data vedla k formování nové hypotézy, která částečně vychází z hypotézy neokortikální. Tato hypotéza navrhuje, že to, co zůstává v evoluci konzervované nejsou neurální obvody (Karten, 1969), ale regulační sítě genů, které formují neurony do **homologických buněčných typů**, a které se různými vývojovými mechanismy formují do zcela odlišných struktur (Dugas-Ford et al., 2012; Briscoe et al., 2018).

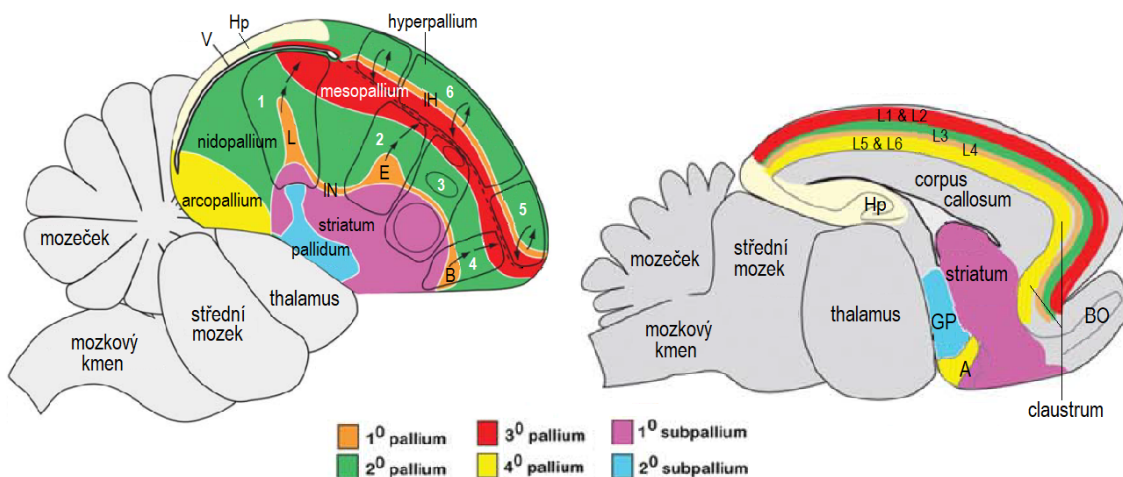
NEOKORTIKÁLNÍ HYPOTÉZA



KLAUSTRO-AMGYDALÁRNÍ HYPOTÉZA



HYPOTÉZA BUNĚČNÝCH POLÍ



Obr. 2: Homologie navrhané neokortikální hypotézou, klaustro-amygdalární hypotézou a hypotézou buněčných polí. A, amygdala; B, nucleus basorostralis pallii; BO, čichový lalok; DP, dorzální pallium; E, entopallium; GP, globus pallidus; Hp, hipokampus; IH, vmezeřené hyperpallium; IN, vmezeřené nidopallium; L, sluchové pole; L1–L6, jednotlivé vrstvy kůry mozkové; LP, laterální pallium; MP, mediální pallium; V, postranní mozková komora; VP, ventrální pallium; funkční sloupce: 1 – sluchový, 2 – zrakový, 3 – motorický, 4, 5 – somatosenzorické, 6 – denní a noční vidění (ex Jarvis et al., 2005; Jarvis et al., 2013; upraveno).

Všechny homologie navrhované výše zmíněnými hypotézami (mimo hypotézu klaustroamygdalární) jsou v přímém rozporu s embryologickými a transkriptomickými daty (Belgard et al., 2013; Tosches et al., 2018). Zatímco novější vývojové studie ukazují, že ve srovnání se savcím koncovým mozkem je migrace neuronů u ptáků do značné míry omezena (García-Moreno et al., 2018), autoři transkriptomických studií upozorňují, že genová exprese může být do určité míry zkreslující, jelikož pokud neurony vznikají z různých embryonálních oblastí, bude se pravděpodobně jednat o případ molekulární konvergence (Tosches et al., 2018). Vskutku recentní studie demonstrují, že neurony DVR mají podobné fyziologické vlastnosti (Spool et al., 2021) a exprimují podobné funkce determinující geny jako projekční neurony neokortexu (Colquitt et al., 2021), ale vývojové regulační transkripční faktory typické pro centrální, nikoli dorzální pallium (Colquitt et al., 2021). Nejpočetnější inhibiční interneuron ptačího DVR je běžný ve ventrálním palliu savců, ale nevyskytuje se v neokortexu (Colquitt et al., 2021). Současná data tak upřednostňují klaustroamygdalární hypotézu, která předpokládá konvergentní evoluci ventrálního a dorzálního pallia, kdy expanzí různých embryonálních polí vznikají analogické neurální obvody a buněčné typy.

1.4 OD VELIKOSTI MOZKU K POČTU NEURONŮ

Velikost mozku je jedno z velmi diskutovaných témat na poli srovnávací neuroanatomie. Absolutní velikost mozku je snadno měřitelná jako hmotnost vypreparovaného mozku. U savců a ptáků lze měřit absolutní velikost mozku i nepřímo jako objem mozkovny násobený hustotou nervové tkáně (Iwaniuk & Nelson, 2001), pouze u těchto skupin doléhá mozek těsně na stěnu lebeční dutiny. Dostupnost moderních technologií umožňuje určit velikost mozku u vymřelých skupin (Balanoff et al., 2016), jichž však není u ptáků mnoho, ale mohou být zcela zásadní pro rekonstrukci evoluce centrální nervové soustavy u ptáků (Ksepka et al., 2020; Torres et al., 2021), v budoucnu s možným přesahem do paleoekologie (Early et al., 2020). Absolutní velikost mozku se málokdy používá jako proxy pro výpočetní kapacitu mozku, přesto v některých případech (např. u primátů) je patrně lepším prediktorem kognitivních schopností (Deaner et al., 2007; MacLean et al., 2014). Mnohem častěji se používá relativní velikost mozku. Mozek však roste negativně alometricky s hmotností těla, která vysvětluje až 90 % variability jeho velikosti (Striedter, 2005; Dicke & Roth, 2016), proto zde vždy byla snaha o co možná největší odfiltrování vlivu velikosti těla na velikosti mozku. Relativní velikost mozku je tak zpravidla odvozována od alometrického vztahu mezi velikostí těla a velikostí mozku a vyjádřena buď jako reziduál, nebo skrze encefalizační kvocient (EQ).

Vliv velikosti mozku na kognici, resp. procesní kapacitu, byla a je detailně zkoumána především u savců a ptáků, jelikož tyto dvě skupiny disponují relativně nejkomplexnějšími a relativně

největšími mozky (Striedter, 2005; Butler & Hodos, 2005). Recentní ancestrální rekonstrukce u ptáků a savců zpracované novými technikami tuto souvislost rozhodně nepodporují (Straková, 2018; Ksepka et al., 2020; Smaers et al., 2021). Evoluce velikosti mozku u ptáků byla výrazně ovlivněna adaptivní radiací na přelomu křída-paleogén, kdy docházelo k obrovským selekčním tlakům na velikost těla a zachování schopnosti letu. Naopak ztráta schopnosti letu vede k velmi rychlému navýšení tělesné hmotnosti. Evoluce velikosti mozku u ptáků je charakterizována spíše nezávislým zvětšením v několika různých liniích (Straková, 2018; Ksepka et al., 2020). U různých skupin docházelo ke zvětšení velikosti mozku odlišnými mechanismy (Straková, 2018; Ksepka et al., 2020), podobně jako u savců (Smaers et al., 2021). Zatímco např. u papoušků a datlovitých docházelo ke zmenšování velikosti těla při zachování velikosti mozku, u zoborožců a krkavcovitých docházelo k rychlejšímu zvětšování mozku při zvětšování velikosti těla (Straková, 2018). Ancestrální rekonstrukce naznačují, že silný selekční tlak na větší velikost těla u dravců (*Accipitriformes*, *Falconiformes* a *Strigiformes*) mohl být zcela zásadním evolučním milníkem pro relativně větší mozek (Ksepka et al., 2020). Relativně velké mozky však nenajdeme pouze u papoušků (*Psittaciformes*), pěvců (*Passeriformes*), šplhavců (*Piciformes*) a zoborožců (*Bucerotiformes*), ale i některých skupin vodních ptáků (*Aequornithes*) či vrubozobých (*Anseriformes*).

Přestože je relativní velikost mozku běžně používána jako proxy pro odhad kognitivních schopností daného druhu (např. Jerison, 1985; Roth & Dicke, 2005; Overington et al., 2009; Benson-Amram et al., 2016), je nutné si uvědomit, že mozek je vysoce anizotropní struktura, v které jsou neurony distribuovány vysoce nerovnoměrně. Používání velikosti mozku pro srovnání procesní kapacity mozku, kognitivních schopností či inteligence může být tím pádem značně zavádějící. Počet neuronů a jejich hustota, počet gliových buněk a nervových spojení, či průměrná délka vzdálenosti mezi neurony jsou dnes považovány za mnohem přesnější faktory pro porovnání procesní kapacity mozku u různých skupin (Dicke & Roth, 2016). Prozatím neexistuje efektivní a spolehlivá metoda kvantifikace počtu synapsí u většího množství druhů. Metoda izotropické frakční homogenizace však umožňuje rychle a přesně určit počet neuronů a gliových buněk v jakékoli části mozku (Herculano-Houzel, 2005). Do dnešního dne bylo publikováno poměrně velké množství prací analyzujících buněčné složení mozku u 76 druhů savců včetně člověka (Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2007, 2011, 2014, 2020; Azevedo et al., 2009; Sarko, 2009; Gabi et al., 2010; Neves et al., 2014; Kazu et al., 2014; Dos Santos et al., 2017; Jardim-Messeder et al., 2017; Kverková et al., 2018), dále u 37 druhů ptáků (Massen et al., 2021; Olkowicz et al., 2016) a krokodýla nilského (Ngwenya et al., 2016).

Kůra mozková je výrazným rysem savčího mozku a přestože neokortex zpravidla dominuje celému mozku a zabírá největší objemový podíl, drtivá většina všech neuronů mozku je překvapivě v mozečku (Herculano-Houzel et al., 2015). Např. 80 % všech neuronů lidského mozku je v mozečku, zatímco pouze 19 % v kůře mozkové (Azevedo et al., 2009). Podobná situace je nejen u primátů (Gabi et al., 2010), ale i u všech dalších analyzovaných skupin savců (Herculano-Houzel et al., 2015). Až na výjimky (Herculano-Houzel et al., 2014) poměr neuronů okolo 4:1 ve prospěch mozečku charakterizuje téměř všechny dosud studované savce (Herculano-Houzel et al., 2020) a pravděpodobně reflektuje nejen společnou evoluci, ale i důležitou úlohu mozečku při nejrůznějších kognitivních procesech (např. Barton, 2012; Stoodley, 2012; Sokolov et al., 2017; Smaers et al., 2018). Přestože můžeme pozorovat klidně i násobné rozdíly v počtech neuronů mezi různými skupinami savců (Herculano-Houzel et al., 2015), množství non-neurálních buněk škáluje s hmotností mozku u všech taxonů stejně, včetně ptáků (Olkowicz et al., 2016). Na rozdíl od savčích mozků je drtivá většina neuronů mozku papoušků a pěvců alokována do koncového mozku, nikoli do mozečku (Olkowicz et al., 2016). Efektivní stavba ptačího mozku, kdy jsou malé neurony napěchované ve vysokých hustotách do malého objemu, zajišťuje vysokou procesní kapacitu, která se odráží v podobných kognitivních výkonech srovnatelnými např. s primáty (Güntürkün & Bugnyar, 2016). Analýza buněčného složení mozku hrabavých ptáků však ukázala, že mezi různými skupinami ptáků se může počet neuronů markantně lišit (Zhang, 2018). Zda jsou vysoké hustoty neuronů odvozeným znakem charakteristickým pouze pro pěvce a papoušky, nebo pro všechny altriciální skupiny zůstává stále otázkou, na jejíž odpověď jsou nezbytné analýzy buněčného složení mozku i u dalších ptačích skupin.

1.5 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je **(1)** s použitím metody izotropické frakční homogenizace stanovit buněčné složení v šesti hlavních oddílech mozku u vybraných druhů zoborožců, šplhavců a srostloprstých ptáků. **(2)** Na základě těchto dat porovnat buněčné složení mozků s dříve studovanými skupinami ptáků (pěvci, papoušci, holubi a hrabaví) a vybranými skupinami savců (primáti, hmyzožravci, vačnatci a hlodavci). **(4)** Pomocí již zmíněné metody zanalyzovat podrobnější buněčné složení vybraných částí koncového mozku a **(5)** pokusit se interpretovat tato neuro-anatomická data v kontextu kognitivních schopností u analyzovaných skupin.

2 MATERIÁL A METODIKA

2.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA

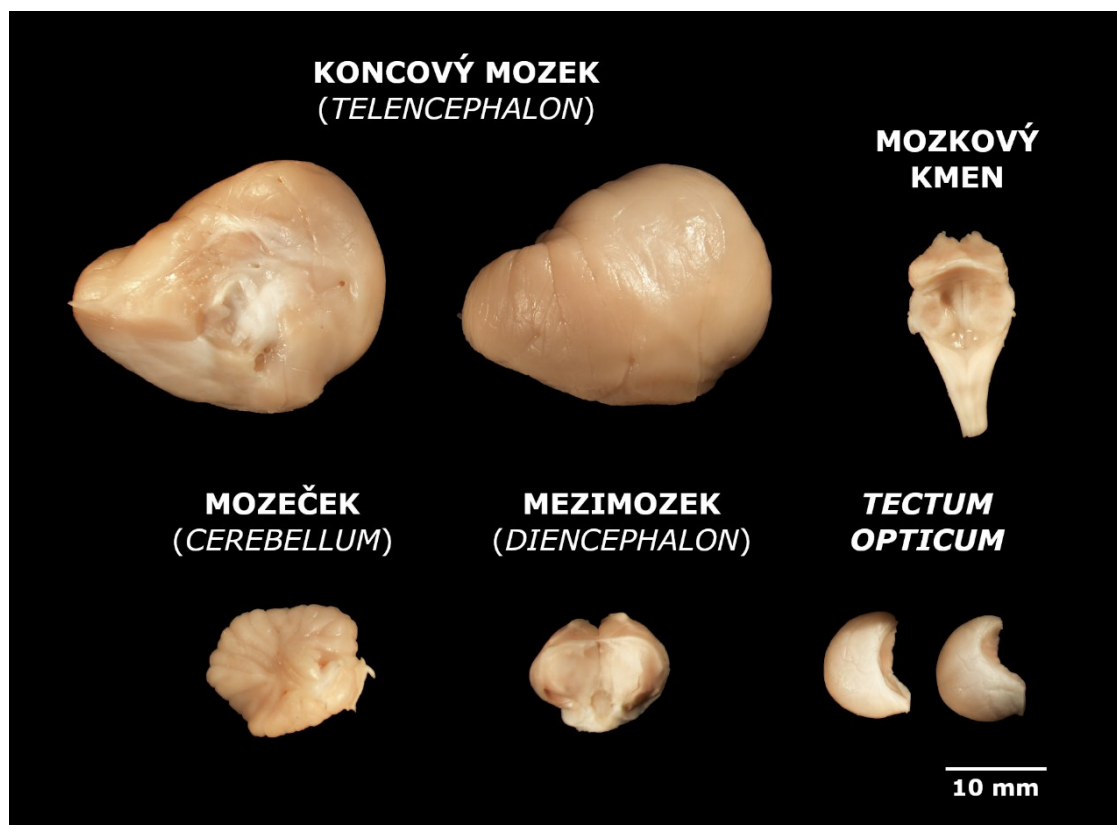
V této diplomové práci bylo zpracováno celkem 25 jedinců reprezentujících 19 druhů z pěti tradičně uznávaných ptačích řádů: myšáci (*Coliiformes*), zoborožci (*Bucerotiformes*), dudci (*Upupiformes*), srostloprstí (*Coraciiformes*) a šplhavci (*Piciformes*) (DNA hybridizace; Sibley & Ahlquist, 1990). Novější celogenomové analýzy (Jarvis et al., 2014; Prum et al., 2015; Kimball et al., 2019) řadí všechny tyto řády do jednoho monofyletického taxonu *Coraciimorphae*, který společně se sovami a dravci tvoří klad *Afroaves* sesterský k *Australaves*, tedy sokolům, papouškům a pěvcům. Druhy byly vybrány tak, aby v rámci možností dostatečně pokryly fylogenetický strom celé skupiny. U následujícího výčtu druhů byla získána data: myšák hnědokřídlý (*Colius striatus*), zoborožec šedolící (*Bycanistes brevis*), zoborožec naříkavý (*Bycanistes bucinator*), toko Deckenův (*Tockus deckeni*), toko rudozobý (*Tockus erythrorhynchus*), dudek chocholatý (*Upupa epops*), ledňák obrovský (*Dacelo novaeguineae*), mandelík hajní (*Coracias garrulus*), datel černý (*Dryocopus martius*), žluna zelená (*Picus viridis*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*), datel Elliotův (*Dendropicos elliotii*), krutihlav obecný (*Jynx torquilla*), medozvěstka menší (*Indicator minor*), medozvěstka vousatá (*Indicator exilis*), vousák senegalský (*Lybius dubius*), vousák žlutoskrvný (*Buccanodon duchaillui*), vousák žlutokostřecový (*Pogoniulus bilineatus*), vousák bělovousý (*Pogoniulus coryphagea*).

Většina zvířat pocházela z odchyťů ve volné přírodě (Česká republika a Kamerun), menší část pak ze zájmových chovů (zoborožec šedolící, zoborožec naříkavý, toko Deckenův, toko rudozobý, ledňák obrovský). Všechna zvířata byla pohlavně dospělá. Pohlaví všech jedinců zahrnutých do této studie jsou uvedena v Tab. 1 (str. 16).

2.2 PŘÍPRAVA TKÁNĚ

Všechna zvířata byla předávkována halotanem (2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan; Sigma-Aldrich), inhalačním anestetikem, které je doporučováno pro svou vysokou účinnost, snadnou manipulaci (Close et al., 1996) a vasodilatační účinky (Close et al., 1997). Ihned po usmrcení byla zvířata zvážena. Po otevření hrudní dutiny a přerušení všech vazů mezi srdcem a hrudníkem byl odstraněn osrdečník, aby zde nedocházelo ke hromadění a srážení krve, a rozstřížena stěna pravé srdeční předsíně. Byly odebrány vzorky krve a jater (případně i trusu). Následovala transkardiální perfuze skrze levou srdeční komoru ohřátým (na teplotu 40 °C) pufrovaným fyziologickým roztokem (fosfátový pufr s 0,134M chloridem sodným, pH 7,4; dále jen PBS) s příměsí 0,1 % heparinu.

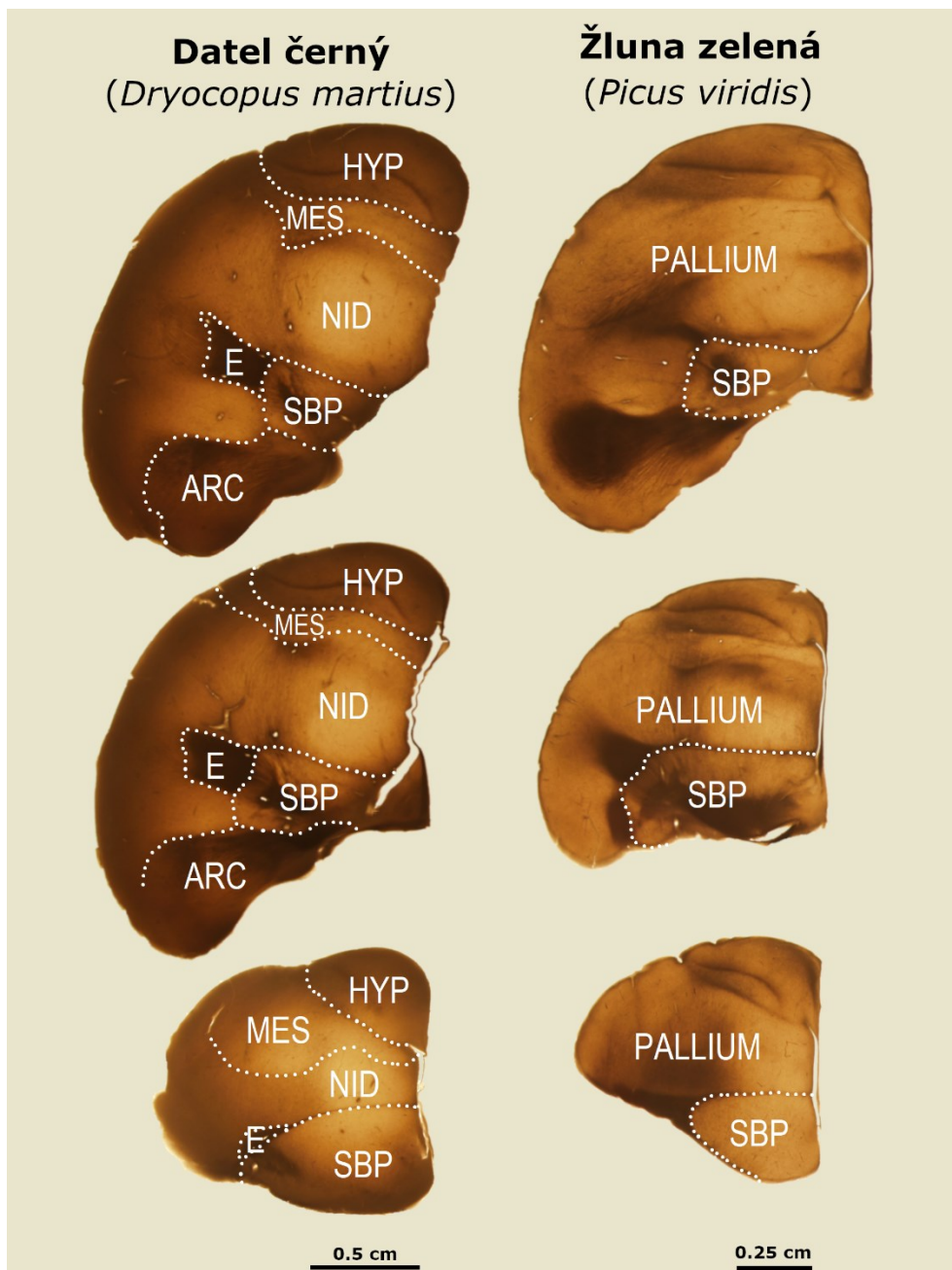
Po vyplavení veškeré krve z cévního řečiště bylo PBS nahrazeno 4% roztokem paraformaldehydu (dále jen PFA) s fosfátovým pufr (o teplotě 4–10 °C). Po ukončení perfuze byly změřeny základní metrické údaje (délka těla, křídla a běháku) a určeno či potvrzeno pohlaví jedince. Po dekapitaci a částečném otevření lebeční dutiny byly vzorky ponechány 30–60 minut postfixaci v roztoku PFA, aby došlo k částečné fixaci měkké nervové tkáně a bylo možné vyjmutí mozku z lebeční dutiny bez jeho poškození. Po krátké fixaci byl mozek vypreparován a neprodleně zvážen, aby došlo k co nejmenší ovlivnění jeho hmotnosti. Mícha byla vyjmuta, zvážena a změřena v co nejkratším čase, zpravidla však až druhý den, aby došlo k dostatečné fixaci před jejím vytažením. Mozek i mícha byly fixovány ve 4% PFA po dobu 14–21 dní (v závislosti na velikosti). Ideálně ještě během postfixace byla pořízena fotodokumentace (Obr. 7A, 7B, str. 21, 22). Po ukončení postfixace byly všechny vzorky převedeny do nemrznoucí směsi (30 % glycerol, 30 % ethylenglykol, 40 % 0,024M fosfátový pufr) na dobu 3–5 dní (opět podle velikosti mozku) tak, aby došlo k dostatečnému nasycení tkáně směsí. Následně byly vzorky uskladněny při teplotě –25 °C do dalšího zpracování.



Obr. 3: Mozek krkavce rozdělený na pět hlavních částí. Foto: S. Olkowicz (upraveno).

Každý mozek byl rozdělen na pět hlavních, anatomicky snadno definovatelných částí (Obr. 3). Pomocí tupé strany skalpelu byla přerušena všechna spojení mezi pravou a levou hemisférou koncového mozku (*telencephalon*) včetně rozdělení čichových laloků. Obě hemisféry byly odděleny přímým řezem od zbytku mozku na hranici thalamu a subpallia. Mozeček (*cerebellum*) byl oddělen

od povrchu mozkového kmene. Střecha středního mozku (*tectum opticum*) byla bilaterálně odříznuta od mezimozku (*diencephalon*), Obr. 3. Zbylá část mozku byla rozdělena na samotný diencephalon rostrálně a mozkový kmen posteriorně. Všechny části mozku byly po parcelaci a před samotným zpracováním osušeny a zváženy. Jelikož však hmotnost tkáně mohla být ovlivněna nasycením roztoky PFA a nemrznoucí směsí, bylo nutné hmotnost jednotlivých částí upravit v poměru vůči výchozí hmotnosti mozku. Pro stanovení počtu buněk v celém koncovém mozku byly použity hodnoty pouze jedné (vždy levé) hemisféry násobené dvěma, jelikož dřívější studie ukázala, že rozdíl v počtu buněk mezi hemisférami je zcela zanedbatelný (Olkowicz et al., 2016).

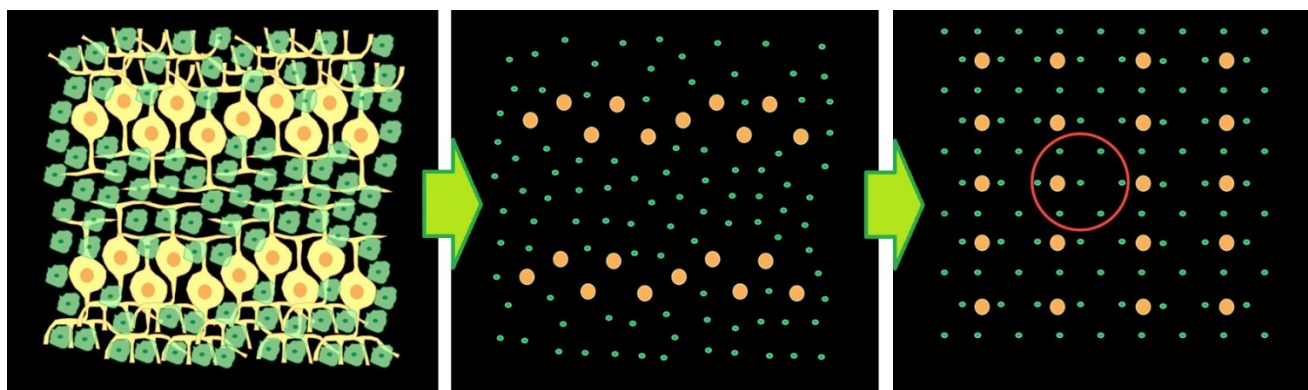


Obr. 4: Frontální řezy koncovým mozkiem datla černého (*Dryocopus martius*) a žluny zelené (*Picus viridis*) s vyznačenými jednotlivými oddíly. ARC, arcopallium; E, entopallium; HYP, hyperpallium; MES, mesopallium; NID, nidopallium; SBP, subpallium. Foto: autor, měřítko: 0,5 cm a 0,25 cm.

Pravé hemisféry byly využity pro podrobnější rozčlenění koncového mozku (Obr. 4). Hemisféry byly přes noc převedeny z nemrznoucí směsi do PBS a následně zality do roztoku 2–4% agarózy (Sigma-Aldrich) v PBS zahřátém na teplotu 60 °C. Zatuhlé želatinové bločky byly na vibratomu (Leica VT1200 S) nařezány na 250–500µm plátky ve frontální rovině. V šikmém světle pod stereomikroskopem (Olympus SZX 16) pak byly jednotlivé řezy zbaveny želatiny a pomocí mikroskalpelu rozděleny na subpallium a pallium. U šesti druhů s největším mozkem byly hemisféry rozčleněny podrobněji na celkem deset částí: *subpallium*, čichový lalok (*bulbus olfactorius*), *entopallium*, *nidopallium*, *mesopallium ventrale*, *mesopallium dorsale*, *hyperpallium*, *arcopallium*, *hippocampus* a zbytek pallia. Hranice mezi subpalliem a palliem byla vedena podél *lamina pallio-subpallialis* (Reiner et al., 2004). Všechny části hemisféry byly vysušeny a zváženy až těsně před samotným zpracováním, aby se zredukoval počet manipulací, a došlo tak k co nejmenším ztrátám tkáně.

2.3 STANOVENÍ POČTU BUNĚK

Pro stanovení počtu buněk byla použita izotropická frakční homogenizace (Herculano-Houzel, 2005). Tato metoda je založena na přeměně anizotropní tkáně na homogenní suspenzi volných jader. Nutnou podmínkou je tkáň, která obsahuje pouze jednojaderné buňky, což nervová tkáň splňuje. V principu je veškerá tkáň mechanicky rozmělněna a narušené buněčné membrány chemicky dezintegrovány, a to bez poškození membrán jaderných (Obr. 5). K tomuto účelu slouží skleněné ruční homogenizátory s přesně definovanou vzdáleností mezi pístem a stěnou homogenizátoru. Počet jader je nejprve stanoven v malém vzorku odebraném ze vzniklé homogenní suspenze a následně přepočten na celkový objem homogenátu. Tak získáme celkový počet jader (tedy buněk) ve vybrané zhomogenizované části zcela nezávisle na její velikosti či komplexnosti. Izotropická frakční homogenizace poskytuje analogické odhady počtu neuronů jako podstatně pracnější objektivní stereologie (Ngwenya et al., 2017).



Obr. 5: Schématické znázornění procesu homogenizace.

Zvolená část mozku byla osušena od nemrzoucí směsi, v případě potřeby rozkrájena na Petriho misce na menší kousky, a vložena do ručního homogenizátoru (typ Tenbroeck Tissue Grinder; Wheaton nebo Ningbo Ja-Hely Technology Co. Ltd) o vhodném objemu (rozmezí 0,5 až 40 ml). Disociačním roztokem (0,04M roztok citrátu sodného s 1 % Triton X-100; Sigma-Aldrich) byly omyty všechny použité nástroje do homogenizátoru – pro metodu je totiž zcela zásadní, aby byla homogenizována veškerá tkáň. Během vlastní homogenizace byl pravidelně přidáván disociační roztok, aby se zamezilo ulpívání buněk a kousků tkáně na stěně homogenizátoru. Homogenizace byla ukončena ve chvíli, kdy proti ostrému světlu nebyly patrné žádné kousky tkáně. Vzniklá suspenze jader byla pomocí skleněné pipety přenesena do odměrného válce. Pro minimalizaci ztráty jader byly vždy pečlivě omyty všechny části homogenizátoru včetně všech odměrných nádob po změření objemu. Přidáním disociačního roztoku bylo dosaženo požadovaného celkového objemu a homogenát byl přemístěn do nádoby vhodné k pozdější centrifugaci. Závěrem bylo přidáno DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol; Sigma-Aldrich) ze zásobního roztoku (40 mg DAPI na 200 ml dH₂O) v takovém množství, aby výsledný objem obsahoval zhruba 5 % zásobního roztoku DAPI.

Suspenze volných jader označených fluorescenčním DNA markerem DAPI byla před každým počítáním buněk řádně promíchána, aby byla skutečně homogenní. Teprve poté byla odebrán 10 μ l vzorek a napipetován do Neubauerovy počítací komůrky (Karl Hecht GmbH & Co. KG). Komůrka byla umístěna do fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX51) s optimálním filtrem pro DAPI (U-MWU2). Při 400x zvětšení byla spočítána jádra na všech 25 polích vnitřního čtverce počítací mřížky (s přesně definovaný objem 0,0001 ml nad mřížkou). Tento postup byl opakován minimálně čtyřikrát. Pro maximální omezení statistické chyby náhodným odběrem vzorku byl stanoven variační koeficient (CV). Hranice variačního koeficientu byla stanovena na <0,10 (variabilita menší než 10 %). V případě, že CV nesplňoval tuto stanovenou hranici, byl postup opakován, dokud tato podmínka nebyla splněna. Vynásobením průměrného počtu buněk ze všech počítání $\times 10\,000$ (počet buněk v 1 ml homogenátu) a celkovým objemem suspenze jader byl stanoven celkový počet buněk v celé zhomogenizované části mozku. Případná jádra erytrocytů ve vzorku, jejichž typický oválný tvar je díky fixaci zachován, nebyla do počtu jader nad mřížkou započítávána. Homogenát jednotlivých struktur byl po stanovení počtu buněk zcentrifugován při 1900–2000 otáčkách/s po dobu 15–20 minut, aby došlo k sedimentaci všech jader v suspenzi. Po odebrání supernatantu bylo přidáno dostatečné množství nemrzoucí směsi, obsah důkladně promíchán a vzorky uskladněny ve 2ml mikrozskumavkách při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

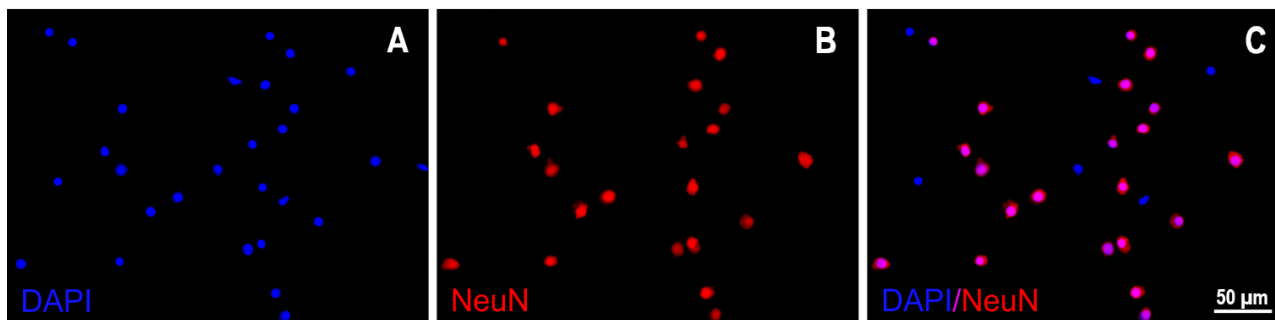
2.4 STANOVENÍ POČTU NEURONŮ

Pokud známe přesný celkový počet buněk v dané struktuře, stačí nám pak určit jaký podíl z nich tvoří neurony. Jako marker neuronů byla použita monoklonální protilátka anti-NeuN (MAB377; MerckMillipore), pro její vizualizaci pak sekundární protilátka Alexa Fluor 594 (A11005; Merck-Millipore). Protein NeuN je produkt genu Fox-3 a je specifický pouze pro jaderné membrány neuronů (Kim et al., 2009). Výjimku však tvoří Purkyňovy buňky mozečku, mitrální buňky čichového laloku (Mullen et al., 1992), Golgiho buňky, košíčkovité a hvězdicovité interneurony mozečku (Weyer & Schilling, 2003), které nejsou touto protilátkou rozpoznávány. Jedná se však o opravdu malé neuronální subpopulace, které jsou zanedbatelné pro potřeby této diplomové práce.

Z řádně rozpipetovaných homogenátů uložených v nemrznoucí směsi byla odebrána frakce 100–300 μ l do 2ml mikrozkuvek a doplněna do 1000 μ l roztokem PBS. Obsah byl důkladně protřepán a zkuvky stočeny na mikrocetřifuze (při 4000 otáčkách/s po dobu 5 minut). Po odebrání supernatantu bylo k peletě přidáno 1000 μ l PBS a obsah opět resuspendován protřepáním. Promývání roztokem PBS bylo opakováno celkem třikrát, aby došlo k vyplavení veškeré nemrznoucí směsi ze vzorku. Po posledním promytí bylo ke každému vzorku přidáno 400 μ l směsi primární monoklonální protilátky (MAB377; MerckMillipore) v koncentraci 1:800 v PBS a 10 % kozího séra (Sigma-Aldrich) pro zamezení vzniku nespecifických vazeb protilátky. Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 7 °C. Následující den byly vzorky stočeny a třikrát promyty v roztoku PBS-Tx (PBS s 0,3% příměsí Tritonu X100). Po posledním promytí bylo přidáno 400 μ l směsi sekundární protilátky (Alexa Fluor 594; A11005; MerckMillipore) opět v koncentraci 1:800 v PBS a namísto kozího séra bylo přidáno 10 % DAPI. Následně byly vzorky jednu až dvě hodiny inkubovány na třepačce při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace byly vzorky stočeny a minimálně třikrát promyty PBS-Tx (tak, aby došlo k dostatečnému vyplavení protilátky) a jednou PBS (pro vyplavení PBS-Tx). Následně bylo přidáno adekvátní množství PBS pro dosažení ideální konečné hustoty jader pro počítání neuronů.

U jednoho druhu (*Upupa epops*) nefungovala primární monoklonální protilátka a bylo nutno přistoupit k tzv. „heat-induced epitope retrieval“ pro obnovení reaktivity vazebného antigenu po příliš dlouhé fixaci v paraformaldehydu (Herculano-Houzel, 2005). Vzorky byly nejdříve třikrát promyty v PBS a zbaveny nemrznoucí směsí. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 1 000 μ l 0,2M kyseliny borité (vypufrované hydroxidem sodným na pH 9,0). Vzorky byly v uzavřených 2ml mikrozkuvkách ponořeny na 45 minut do vodní lázně vyhřáté na 75 °C. Po dané době byly vzorky vyjmuty, stočeny a bylo postupováno stejně jako v předchozím odstavci s výjimkou výměny

primární monoklonální protilátky za polyklonální anti-NeuN (ABN78; MerckMillipore) a sekundární protilátky za Alexa Fluor 594 (A11012; Life Technologies).



Obr. 6: **Suspenze fluorescenčně značených jader neuronů koncového mozku.** Jádra všech buněk obarvena pomocí DAPI (A) a jádra neuronů protilátkou NeuN (B). Použitím duálního filtru (C) lze snadno určit poměrné zastoupení jader neuronů (fialová) a non-neurálních buněk (modrá). Foto: S. Olkowitz, upraveno (měřítko, 50 µm).

Suspence takto značených jader byla důkladně rozmíchána. Vzorek 10 µl byl napipetován do počítačící komůrky, která byla umístěna do fluorescenčního mikroskopu vybaveného patřičnými filtry pro DAPI (U-MWU2) a výše zmíněnou sekundární protilátkou Alexa Fluor 594 (U-MWG2). Jádra emitující signál pro DAPI i NeuN zároveň byla započítána jako neurony. Jádra emitující pouze signál pro DAPI byla započítána jako non-neurální buňky (Obr. 6). Podíly neuronů a non-neurálních buněk v jednotlivých vzorcích byly zaznamenávány pomocí počítadla krevního diferenciálu. Tímto způsobem bylo prověřeno minimálně 500 jader v každém vzorku. Pro stanovení počtu neuronů v jednotlivých částech mozku stačilo pouze vynásobit počet buněk v dané zhomogenizované části mozku podílem neuronů.

2.5 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Pro statistické analýzy a vytvoření všech grafů byl použit programovací jazyk R 4.0.4 (R Core Team, 2021) skrze otevřené prostředí RStudio 1.4.1106 (RStudio, PBC, 2021). Pro případné grafické úpravy byl využit vektorový editor Inkscape 1.0.2 (The Inkscape Team, 2021). Časově kalibrovaný fylogenetický strom pro ptáky byl převzat z Ksepka et al., 2020 a v programu R (pomocí balíčku {phytools}) upraven tak, aby obsahoval pouze analyzované druhy. Pro všechny srovnávací analýzy byly použity průměrné hodnoty na druh. Data byla před statistickým hodnocením transformována dekadickým logaritmem. Pro popis škálování a vyhodnocení rozdílů mezi taxony byla použita fylogenetická regrese (PGLS; balíček {nlme}) a hladina významnosti (p) byla stanovena na hodnotu 0,05.

Pro porovnání buněčného škálování zoborožců, šplhaviců a srostloprstých ptáků se savci byla použita dříve publikovaná data pro primáty (Gabi et al., 2010; Herculano-Houzel et al., 2007), hmyzožravce (Sarko, 2009), hlodavce (Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2011) a vačnatce (Dos Santos et al., 2017). Pro porovnání s ostatními ptačími skupinami byla použita publikovaná data naší skupinou pro papoušky a pěvce (Olkowicz et al., 2016) a prozatím nepublikovaná data pro hrabavé ptáky (Kocourek et al., v přípravě) a holuby (Marhounová et al., v přípravě). Celkem byla pro srovnání využita data pro 33 druhů savců a 54 druhů ptáků.

3 VÝSLEDKY

Všechna hlavní kvantitativní data získaná během této studie jsou uvedena v tabulkách níže. V tabulce 1 jsou uvedena souhrnná data pro tělo a celý mozek; v tabulkách 2.1, 2.2 a 2.3 data pro hlavní oddíly mozku. Tabulky 3.1 a 3.2 shrnují pravidla buněčného škálování pro mozky a jeho části u zoborožců a šplhaviců. Tabulky 4.1, 4.2 a 4.3 shrnují získaná data pro jednotlivé části koncového mozku.

Tabulka 1: Hmotnosti těla a mozku, celkový počet neuronů a non-neurálních buněk

	n	sex	Hmotnost těla [g]	Hmotnost mozku [g]	Počet neuronů celkem [$\times 10^6$]	Počet non-neurálních buněk celkem [$\times 10^6$]
Vousák bělovousý	2	M,F	9,9 ± 0,5	0,393 ± 0,002	116,97 ± 1,81	57,06 ± 4,02
Medozvěstka vousatá	1	M	15,0	0,451	150,73	67,33
Vousák žlutokostřecový	2	F,F	11,2 ± 0,2	0,470 ± 0,020	118,03 ± 13,38	58,42 ± 0,07
Medozvěstka menší	1	M	26,5	0,636	180,46	84,48
Krutihlav obecný	1	M	34,6	0,840	214,74	117,99
Vousák žlutoskvřinný	2	M,F	42,8 ± 2,5	1,145 ± 0,046	245,29 ± 20,17	140,39 ± 15,21
Myšák hnědokřídlý	2	M,M	58,5 ± 2,8	1,273 ± 0,003	200,66 ± 2,05	145,55 ± 0,46
Dudek chocholatý	1	M	60,0	1,360	265,52	215,20
Vousák senegalský	1	M	102,6	1,656	358,41	192,69
Datel Elliotův	1	M	37,5	1,763	448,50	207,26
Mandelík hájní	2	M,F	142,7 ± 0,02	1,993 ± 0,088	269,07 ± 8,35	221,28 ± 8,53
Strakapoud velký	1	M	77,9	2,801	637,95	295,48
Toko rudozobý	1	M	190,0	4,153	757,27	558,08
Žluna zelená	1	F	184,3	4,162	736,45	449,91
Toko Deckenův	1	M	222,0	4,463	783,67	522,14
Ledňák obrovský	1	F	380,5	4,608	511,80	426,59
Datel černý	2	M,F	291,0 ± 21,9	8,491 ± 0,428	1 080,6 ± 107,40	744,81 ± 51,53
Zoborožec naříkavý	1	M	598,8	9,328	1 355,98	1 023,85
Zoborožec šedolící	1	M	1 037,0	13,613	2 116,99	1 593,49

Druhy jsou řazeny podle rostoucí hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD. n = počet jedinců; sex = pohlaví (M samec; F samice)

Tabulka 2.1: Hmotnosti jednotlivých částí mozku

	Mozkový kmen [g]	Diencephalon [g]	Tectum opticum [g]	Cerebellum [g]	Telencephalon [g]	Subpallium [% TEL]
Vousák bělovousý	0,033 ± 0,001	0,032 ± 0,002	0,050 ± 0,0001	0,057 ± 0,001	0,220 ± 0,006	15,70
Medozvěstka vousatá	0,041	0,031	0,053	0,093	0,232	15,44
Vousák žlutokostřecový	0,037 ± 0,001	0,034 ± 0,004	0,058 ± 0,005	0,070 ± 0,001	0,272 ± 0,021	17,38
Medozvěstka menší	0,065	0,043	0,070	0,128	0,329	17,34
Krutihlav obecný	0,068	0,062	0,079	0,108	0,522	13,38
Vousák žlutoskvrnný	0,085 ± 0,002	0,068 ± 0,011	0,130 ± 0,009	0,154 ± 0,006	0,708 ± 0,058	15,83
Myšák hnědokřídlý	0,078 ± 0,004	0,082 ± 0,005	0,098 ± 0,004	0,132 ± 0,009	0,882 ± 0,016	13,93
Dudek chocholátý	0,081	0,088	0,116	0,138	0,937	10,72
Vousák senegalský	0,132	0,106	0,205	0,243	0,970	14,91
Datel Elliotův	0,091	0,075	0,130	0,179	1,288	13,33
Mandelík hájní	0,146 ± 0,004	0,151 ± 0,018	0,233 ± 0,008	0,263 ± 0,014	1,198 ± 0,044	12,29
Strakapoud velký	0,135	0,145	0,176	0,317	2,027	15,70
Toko rudozobý	0,230	0,215	0,316	0,412	2,980	13,34
Žluna zelená	0,249	0,175	0,279	0,420	3,039	10,16
Toko Deckenův	0,268	0,273	0,398	0,488	3,035	15,69
Leďňák obrovský	0,305	0,279	0,631	0,496	2,896	9,40
Datel černý	0,332 ± 0,025	0,391 ± 0,011	0,399 ± 0,028	0,730 ± 0,067	6,639 ± 0,297	9,38
Zoborožec naříkavý	0,399	0,448	0,629	0,863	6,989	10,67
Zoborožec šedolící	0,676	0,647	0,885	1,333	10,072	13,12

Druhy jsou řazeny podle rostoucí hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD.

Tabulka 2.2: Absolutní počty neuronů v jednotlivých částech mozku

	Mozkový kmen [×10 ⁶]	Diencephalon [×10 ⁶]	Tectum opticum [×10 ⁶]	Cerebellum [×10 ⁶]	Telencephalon [×10 ⁶]	Subpallium [% TEL]
Vousák bělovousý	0,94 ± 0,01	1,29 ± 0,23	10,56 ± 0,60	55,61 ± 2,24	48,57 ± 0,81	10,33
Medozvěstka vousatá	1,08	1,08	9,31	85,90	53,36	19,23
Vousák žlutokostřecový	1,03 ± 0,12	1,28 ± 0,24	11,54 ± 0,26	62,83 ± 5,32	41,34 ± 7,92	8,26
Medozvěstka menší	1,19	1,16	11,07	107,98	59,06	17,16
Krutihlav obecný	1,87	2,35	12,03	104,73	93,77	8,94
Vousák žlutoskvrnný	1,48 ± 0,03	2,21 ± 0,28	17,17 ± 0,54	125,8 ± 1,02	98,54 ± 18,30	15,62
Myšák hnědokřídlý	1,10 ± 0,10	2,55 ± 0,22	11,68 ± 0,36	87,60 ± 0,50	97,73 ± 1,07	13,87
Dudek chocholátý	0,93	2,19	9,45	107,45	145,50	6,27
Vousák senegalský	2,99	3,31	22,29	201,25	128,56	15,53
Datel Elliotův	1,42	2,26	14,34	153,24	277,25	9,37
Mandelík hájní	1,96 ± 0,23	3,42 ± 0,48	26,52 ± 0,32	160,01 ± 9,11	77,16 ± 0,85	12,43
Strakapoud velký	2,17	4,27	18,88	241,92	370,72	15,87
Toko rudozobý	2,51	4,77	31,74	318,76	399,49	11,29
Žluna zelená	2,08	3,76	16,99	241,00	472,62	10,21
Toko Deckenův	3,08	5,11	35,93	336,22	403,33	13,73
Leďňák obrovský	1,90	4,68	82,75	244,33	178,15	8,39
Datel černý	4,56 ± 0,10	7,80 ± 0,33	33,24 ± 3,21	529,12 ± 75,10	505,90 ± 29,32	9,59
Zoborožec naříkavý	4,73	11,83	30,09	434,14	875,20	8,60
Zoborožec šedolící	7,66	16,59	48,73	764,52	1 279,50	8,03

Druhy jsou řazeny podle rostoucí hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD.

Tabulka 2.3: Absolutní počty non-neurálních buněk v jednotlivých částech mozku

	Mozkový kmen [×10 ⁶]	Diencephalon [×10 ⁶]	Tectum opticum [×10 ⁶]	Cerebellum [×10 ⁶]	Telencephalon [×10 ⁶]	Subpallium [% TEL]
Vousák bělovousý	5,64 ± 0,27	5,75 ± 0,62	10,61 ± 0,66	11,75 ± 1,62	23,32 ± 2,62	25,98
Medozvěstka vousatá	8,57	5,79	11,02	14,45	27,49	31,98
Vousák žlutokostřecový	5,82 ± 0,27	5,40 ± 0,38	9,99 ± 0,93	11,36 ± 0,09	25,85 ± 0,81	19,25
Medozvěstka menší	10,11	7,44	11,53	20,88	34,53	21,05
Krutihlav obecný	12,10	10,62	12,87	19,36	63,03	16,17
Vousák žlutoskvřinný	14,94 ± 1,14	10,58 ± 1,25	19,22 ± 1,26	24,17 ± 1,46	71,48 ± 18,05	18,83
Myšák hnědokřídlý	14,11 ± 0,69	15,42 ± 1,71	17,23 ± 0,33	22,31 ± 0,85	76,47 ± 0,04	14,45
Dudek chocholátý	12,13	16,39	21,44	28,22	137,02	12,33
Vousák senegalský	18,55	16,76	28,03	55,77	73,58	16,47
Datel Elliotův	12,80	12,79	20,81	36,88	123,98	22,65
Mandelík hájní	21,79 ± 0,73	29,70 ± 2,77	37,04 ± 2,45	36,49 ± 1,33	96,26 ± 2,71	13,74
Strakapoud velký	18,70	21,14	27,85	44,38	183,42	21,17
Toko rudozobý	35,54	33,98	58,43	78,70	351,43	17,03
Žluna zelená	29,88	24,10	37,30	60,25	298,38	13,91
Toko Deckenův	40,33	44,52	66,14	71,81	299,34	16,28
Leďňák obrovský	34,57	28,26	72,21	46,54	245,00	10,70
Datel černý	37,99 ± 3,33	45,72 ± 2,73	47,57 ± 3,21	86,78 ± 5,78	526,74 ± 36,47	12,61
Zoborožec nařikavý	62,79	75,13	75,12	100,52	710,30	13,07
Zoborožec šedolící	98,68	107,21	143,11	163,29	1 081,20	15,58

Druhy jsou řazeny podle rostoucí hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD.

Tabulka 3.1: Škálování neuronů a non-neurálních buněk u zoborožců

Závislá proměnná	Vysvětlující proměnná	Mocinná funkce	p hodnota
M _{BR}	N _{BR}	$N_{BR} = 10^{8,374} \times M_{BR}^{0,876}$	<0,001
M _{TEL}	N _{TEL}	$N_{TEL} = 10^{8,228} \times M_{TEL}^{0,924}$	<0,001
M _{CB}	N _{CB}	$N_{CB} = 10^{8,762} \times M_{CB}^{0,821}$	<0,001
M _{OT}	N _{OT}	$N_{OT} = 10^{7,621} \times M_{OT}^{0,691}$	<0,001
M _{DIE}	N _{DIE}	$N_{DIE} = 10^{7,072} \times M_{DIE}^{0,961}$	<0,001
M _{BS}	N _{BS}	$N_{BS} = 10^{6,692} \times M_{BS}^{1,005}$	<0,001
M _{BR}	O _{BR}	$O_{BR} = 10^{8,203} \times M_{BR}^{0,868}$	<0,001
M _{TEL}	O _{TEL}	$O_{TEL} = 10^{8,124} \times M_{TEL}^{0,912}$	<0,001
M _{CB}	O _{CB}	$O_{CB} = 10^{8,130} \times M_{CB}^{0,732}$	<0,001
M _{OT}	O _{OT}	$O_{OT} = 10^{8,167} \times M_{OT}^{0,837}$	<0,001
M _{DIE}	O _{DIE}	$O_{DIE} = 10^{8,185} \times M_{DIE}^{0,973}$	<0,001
M _{BS}	O _{BS}	$O_{BS} = 10^{8,090} \times M_{BS}^{0,980}$	<0,001

BR = celý mozek; TEL = koncový mozek; CB = mozeček; OT = tectum opticum; DIE = mezimozek; BS = mozkový kmen

Tabulka 3.2: Škálování neuronů a non-neurálních buněk u šplhaviců

Závislá proměnná	Vysvětlující proměnná	Mocninná funkce	p hodnota
M_{BR}	N_{BR}	$N_{BR} = 10^{8,389} \times M_{BR}^{0,747}$	0,001
M_{TEL}	N_{TEL}	$N_{TEL} = 10^{8,189} \times M_{TEL}^{0,753}$	0,001
M_{CB}	N_{CB}	$N_{CB} = 10^{8,773} \times M_{CB}^{0,841}$	0,001
M_{OT}	N_{OT}	$N_{OT} = 10^{7,688} \times M_{OT}^{0,543}$	0,001
M_{DIE}	N_{DIE}	$N_{DIE} = 10^{6,976} \times M_{DIE}^{0,769}$	0,001
M_{BS}	N_{BS}	$N_{BS} = 10^{6,746} \times M_{BS}^{0,602}$	0,001
M_{BR}	O_{BR}	$O_{BR} = 10^{8,096} \times M_{BR}^{0,844}$	0,001
M_{TEL}	O_{TEL}	$O_{TEL} = 10^{7,980} \times M_{TEL}^{0,883}$	0,001
M_{CB}	O_{CB}	$O_{CB} = 10^{8,075} \times M_{CB}^{0,862}$	0,001
M_{OT}	O_{OT}	$O_{OT} = 10^{8,106} \times M_{OT}^{0,774}$	0,001
M_{DIE}	O_{DIE}	$O_{DIE} = 10^{8,116} \times M_{DIE}^{0,835}$	0,001
M_{BS}	O_{BS}	$O_{BS} = 10^{8,053} \times M_{BS}^{0,794}$	0,001

BR = celý mozek; TEL = koncový mozek; CB = mozeček; OT = tectum opticum; DIE = mezimozek; BS = mozkový kmen

Tabulka 4.1: Hmotnosti jednotlivých částí koncového mozku [v gramech]

	Zoborožec šedolící	Zoborožec naříkavý	Datel černý	Leďňák obrovský	Toko Deckenův	Toko rudozobý
Subpallium	1,321	0,746	0,623	0,272	0,476	0,398
Bulbus olfactorius	<0,001	0,017	0,010	0,008	<0,001	<0,001
Entopallium	0,124	0,090	0,039	0,060	0,052	0,048
Nidopallium	4,293	3,003	2,447	1,460	1,290	1,332
Mesopal. ventrale	1,877	1,453	1,321	0,600	0,561	0,602
Mesopal. dorsale	0,378	0,258	0,457	0,034	0,086	0,106
Hyperpallium	1,166	0,967	0,860	0,113	0,312	0,297
Arcopallium	0,371	0,158	0,180	0,160	0,080	0,076
Hippokampus	0,311	0,135	0,382	0,088	0,101	0,074
Zbytek pallia	0,232	0,163	0,320	0,100	0,077	0,047

Druhy jsou řazeny podle klesající hmotnosti mozku zleva doprava

Tabulka 4.2: Počty neuronů v jednotlivých částech koncového mozku [v milionech]

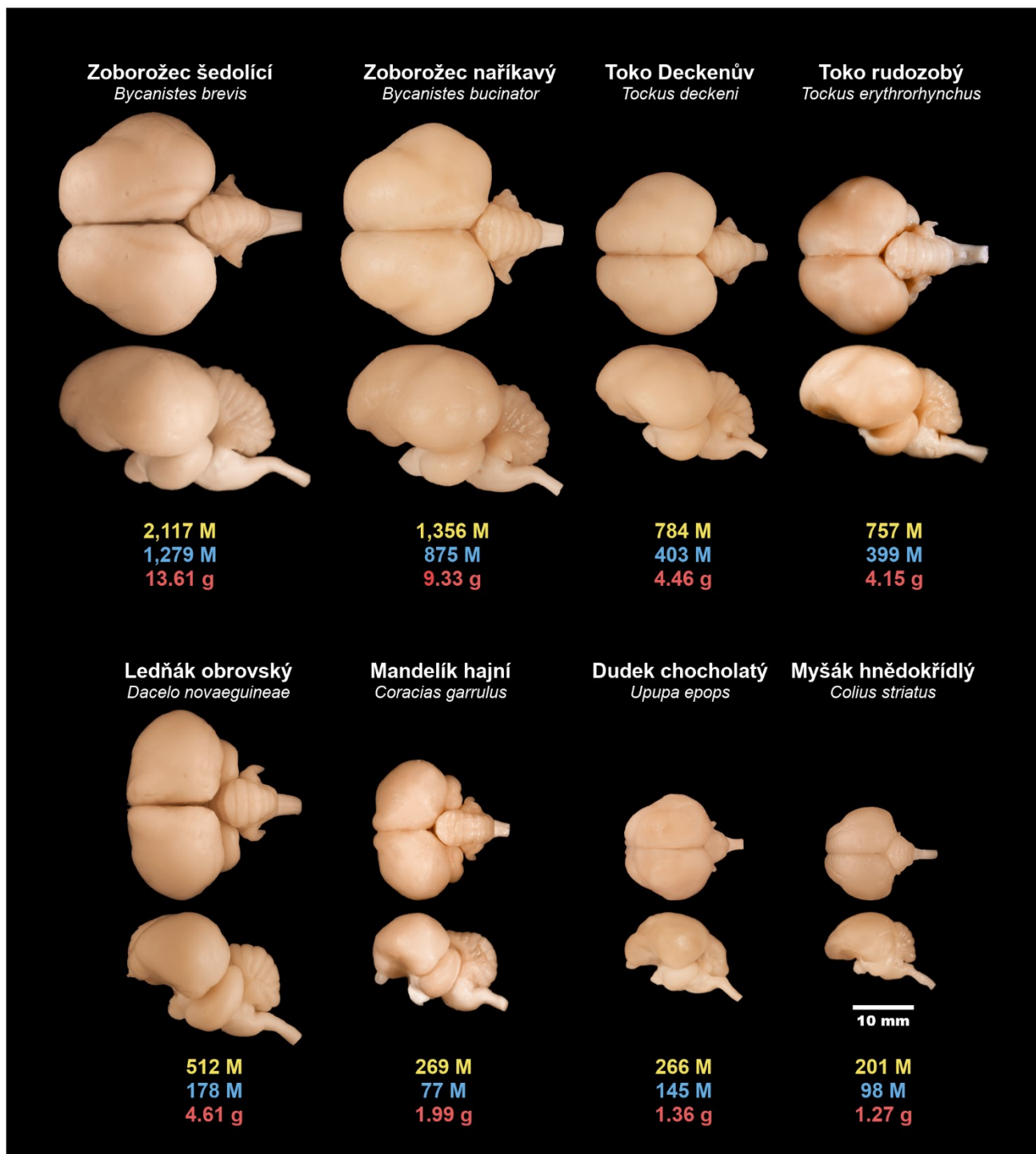
	Zoborožec šedolící	Zoborožec naříkavý	Datel černý	Ledňák obrovský	Toko Deckenův	Toko rudozobý
Subpallium	102,74	75,30	48,53	14,94	55,38	45,12
Bulbus olfactorius	0,0	0,07	1,56	0,18	0,0	0,0
Entopallium	4,62	2,89	1,93	2,50	1,68	2,14
Nidopallium	641,29	391,59	201,34	100,92	190,05	191,61
Mes. ventrale	285,77	208,76	117,78	36,99	88,63	85,38
Mes. dorsale	61,00	38,37	37,52	2,28	11,65	18,76
Hyperpallium	139,58	134,86	68,23	7,40	39,44	42,93
Arcopallium	14,27	6,48	3,99	4,38	2,88	3,45
Hippokampus	18,85	3,92	10,95	3,24	5,82	4,99
Zbytek pallia	11,37	12,94	14,06	5,31	7,79	5,10

Druhy jsou řazeny podle klesající hmotnosti mozku zleva doprava

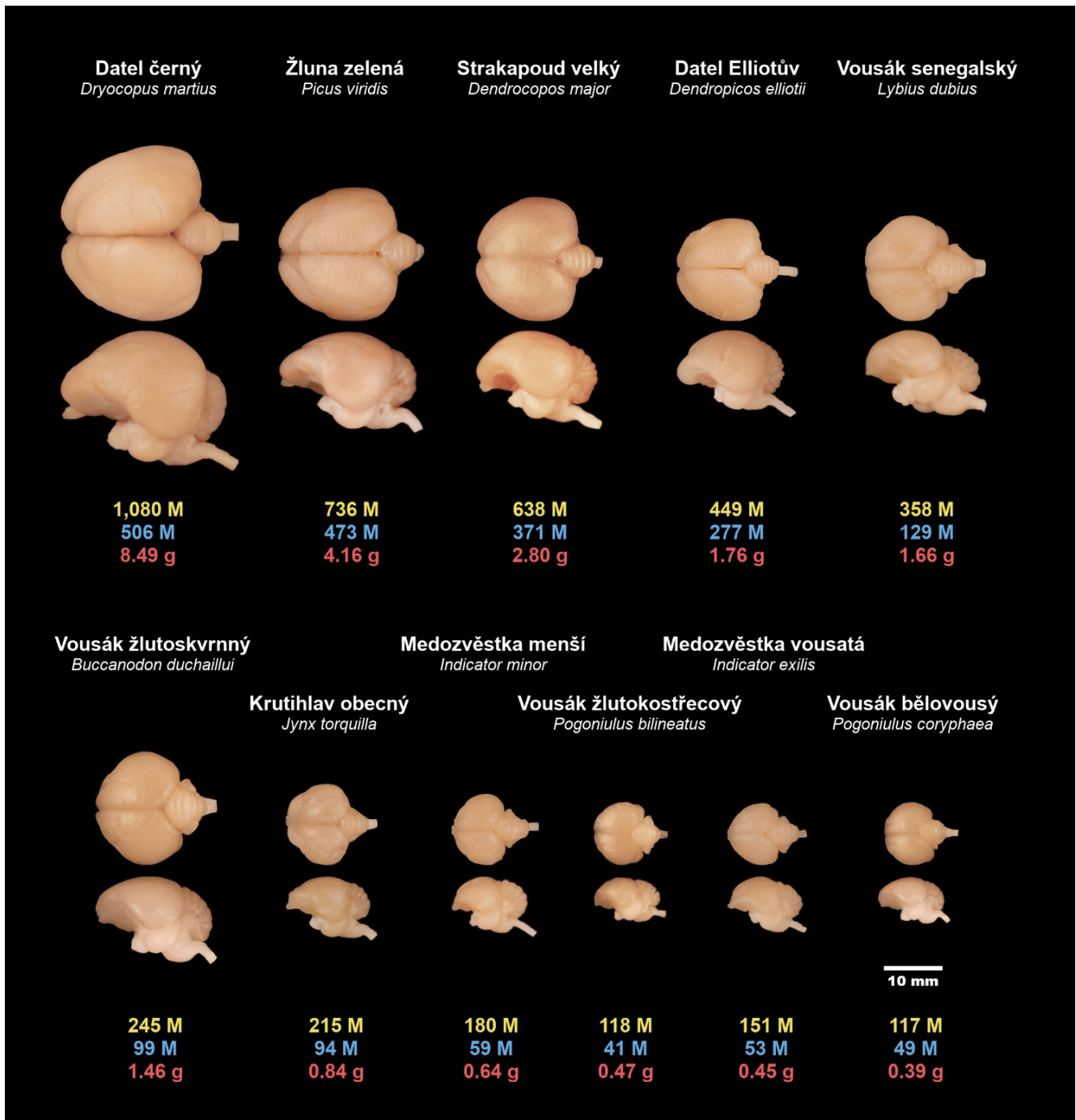
Tabulka 4.3: Počty non-neurálních buněk v jednotlivých částech koncového mozku [v milionech]

	Zoborožec šedolící	Zoborožec naříkavý	Datel černý	Ledňák obrovský	Toko Deckenův	Toko rudozobý
Subpallium	168,49	92,85	66,43	26,21	48,72	59,86
Bulbus olfactorius	0,0	0,31	1,95	1,81	0,0	0,0
Entopallium	30,95	17,58	8,62	9,35	10,54	12,61
Nidopallium	392,22	288,71	189,84	124,94	119,55	142,39
Mes. ventrale	163,42	128,92	100,12	41,88	50,69	66,95
Mes. dorsale	41,64	25,75	42,64	2,28	10,09	13,31
Hyperpallium	169,92	96,50	57,08	9,35	28,09	31,42
Arcopallium	45,55	20,88	14,71	12,98	9,42	9,57
Hippokampus	34,14	20,45	27,26	8,11	14,05	9,86
Zbytek pallia	34,88	18,35	18,09	8,08	8,19	5,45

Druhy jsou řazeny podle klesající hmotnosti mozku zleva doprava



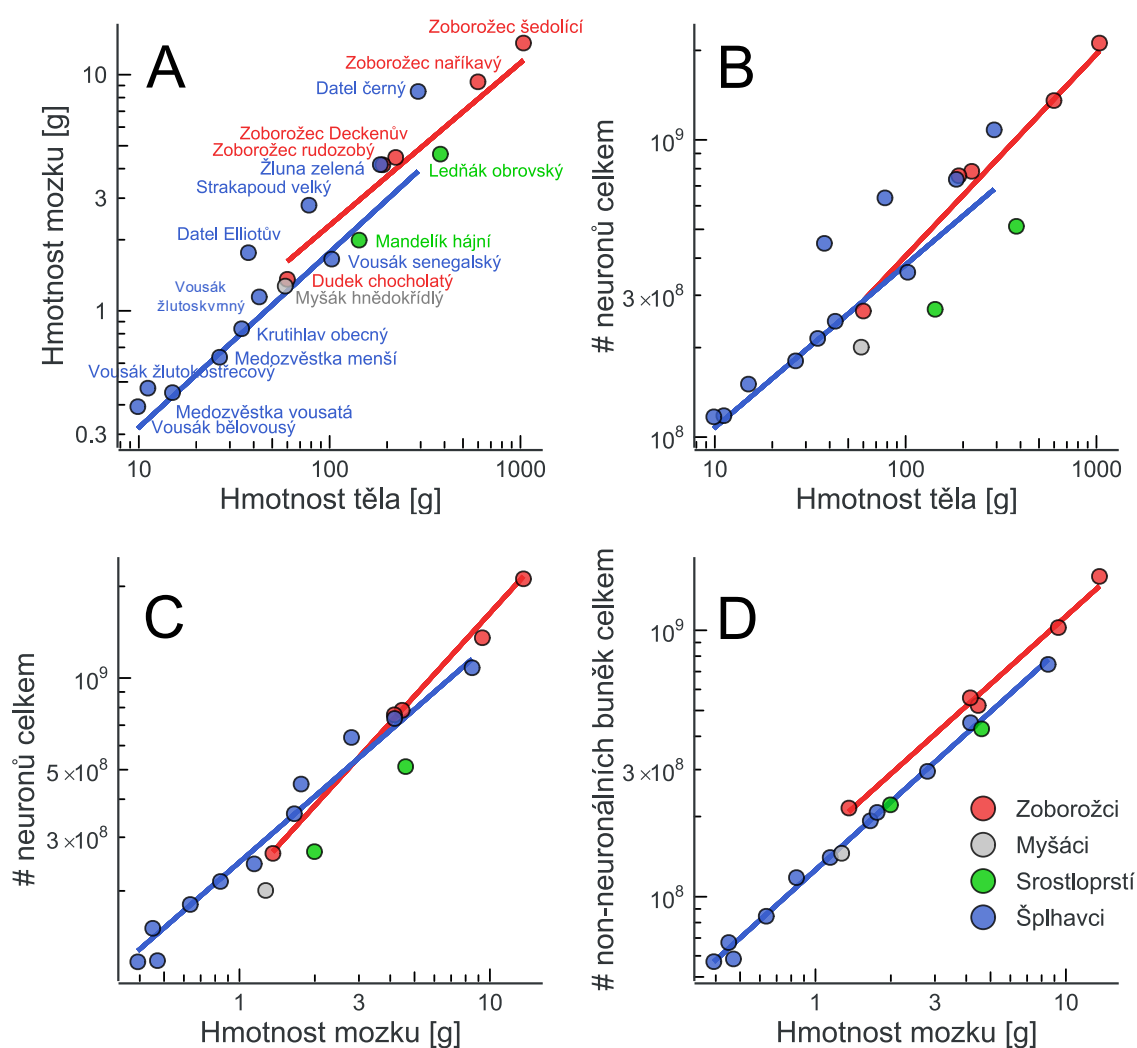
Obr. 7A: Porovnání mozků 5 druhů zoborožců, 2 druhů srostloprstých a myšáka. Mozky jsou ve skupinách řazeny podle hmotnosti od nejvyšší po nejmenší. U každého druhu je uvedena **hmotnost mozku**, **celkový počet neuronů** a **počet neuronů v koncové mozku** (M = v milionech; měřítko = 10 mm)



Obr. 7B: Porovnání mozků 11 druhů šplhaviců. Mozky jsou řazeny podle hmotnosti od nejvyšší po nejmenší. U každého druhu je uvedena **hmotnost mozku**, **celkový počet neuronů** a **počet neuronů v koncové mozku** (M = v milionech; měřítko = 10 mm)

3.1 VELIKOST TĚLA, MOZKU A CELKOVÉ POČTY BUNĚK

Tělesná hmotnost všech 19 studovaných druhů se pohybuje od 10 gramů u vousáků rodu *Pogoniulus* (*P. coryphaea* a *P. bilineatus*) až po kilogram (1,037 kg) těžkého zoborožce šedolícího (*Bycanistes brevis*). Rozdíly ve velikosti těla jsou tedy více jak stonásobné. Váhově nejmenších hodnot dosahují mozky vousáka bělovousého (*P. coryphaea*) a to necelých 400 miligramů. Mozek největšího zoborožce dosahuje 13,6 gramu a je tedy skoro 35krát těžší. Absolutní počty neuronů v celém mozku se pohybují v rozmezí od téměř 120 milionů u vousáků rodu *Pogoniulus*, až po 2,12 miliardy u největšího zoborožce (18násobný rozdíl). Pro představu stejně velký mozek má například nestor kea (13,6 g) nebo o trochu větší krkavec velký (14,25 g) a absolutní počty neuronů u těchto dvou druhů dosahují 2,15 a 2,17 miliardy (Olkowicz et al., 2016). Non-neurální buňky dosahují 57 milionů u vousáka bělovousého a 1,6 miliardy u zoborožce šedolícího (téměř 28násobný rozdíl), tedy menších absolutních počtů než neurony (souhrnně v Tab. 1).



Obr. 8: Vztah mezi hmotnostmi těla a velikostí mozku (A), respektive počtem neuronů (B). Vztah mezi velikostí mozku a počtem neuronů (C), respektive počtem non-neurálních buněk (D).

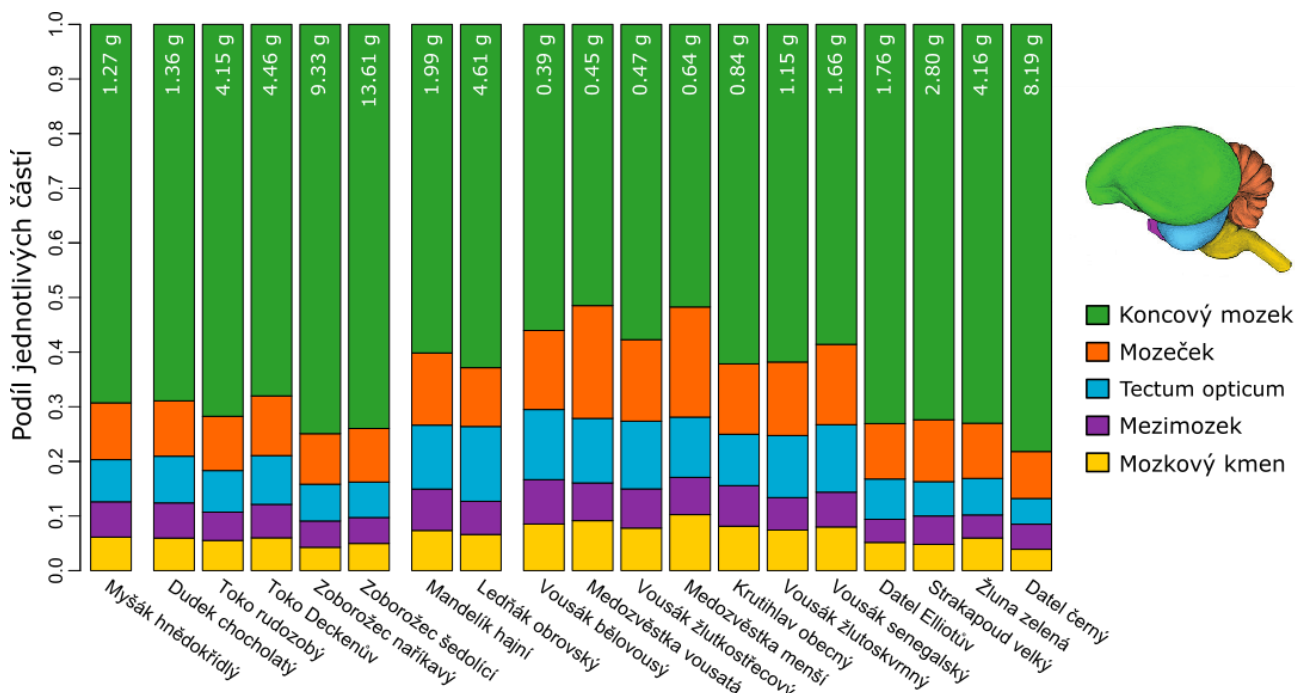
Dle očekávání hmotnost mozku u všech skupin signifikantně koreluje s hmotností těla ($p < 0,001$) a roste negativně alometricky (směrnice regresí přímky 0,74 u zoborožců a 0,75 u šplhavců) stejně jako u ostatních obratlovců. Z alometrického vztahu mezi velikostí těla a hmotností mozku (Obr. 8A) můžeme pozorovat vyšší intercept u zoborožců, nicméně tento rozdíl není statisticky významný ($p = 0,18$), relativní velikost mozku se tak mezi zoborožci a šplhavci signifikantně neliší. Z grafu je patrné, že myšák i srostloprstí mají relativní velikost mozku podobnou jako medozvěstky a vousáci. Z grafu je dále patrné, že všechny čtyři druhy šplhavců spadající do čeledi *Picidae* vykazují vyšší relativní velikost mozku než zbytek této skupiny (medozvěstky a vousáci). Ještě větší rozdíly uvnitř řádu šplhavců můžeme vidět na grafu (Obr. 8B), který zobrazuje vztah mezi velikostí těla a celkovým počtem neuronů a nezohledňuje pouze relativní velikost mozku, ale zahrnuje i hustotu neuronů. Analyzované druhy čeledi *Picidae* tedy mají nejen relativně větší mozky, ale i více neuronů pro danou hmotnost těla než ostatní příslušníci stejného řádu. Zástupci řádu srostloprstých a myšák mají naopak celkové počty neuronů pro danou hmotnost těla podstatně menší než ostatní studované druhy.

Vztah mezi velikostí mozku a počtem neuronů znázorňuje Obr. 8C. Alometrické přímky se mezi zoborožci a šplhavci signifikantně neliší ($p = 0,69$), škálování počtu neuronů s velikostí mozku je tedy pro obě skupiny velmi podobné (Tab. 3.1 a Tab. 3.2). Z grafu je dále patrné, že srostloprstí a myšák mají celkové počty neuronů v celém mozku výrazně nižší než šplhavci a zoborožci. Škálování počtu non-neurálních buněk s velikostí mozku (Obr. 8D) se mezi analyzovanými skupinami signifikantně liší ($p = 0,03$). Zoborožci mají signifikantně vyšší intercept než šplhavci, jinak řečeno: mozek zoborožce má více non-neurálních buněk než stejně veliký mozek šplhavce. Tento rozdíl je způsoben odlišným škálováním non-neurálních buněk v koncovém mozku (nezobrazeno; $p = 0,04$). Takto velké rozdíly ve škálování non-neurálních buněk mezi papoušky a pěvci nebyly zaznamenány (Olkowicz et al., 2016). Z grafu je též patrné, že škálování non-neurálních buněk u srostloprstých a myšáka je podobné jako totéž u šplhavců.

3.2 HMOTNOSTNÍ PODÍL JEDNOTLIVÝCH ČÁSTÍ MOZKU

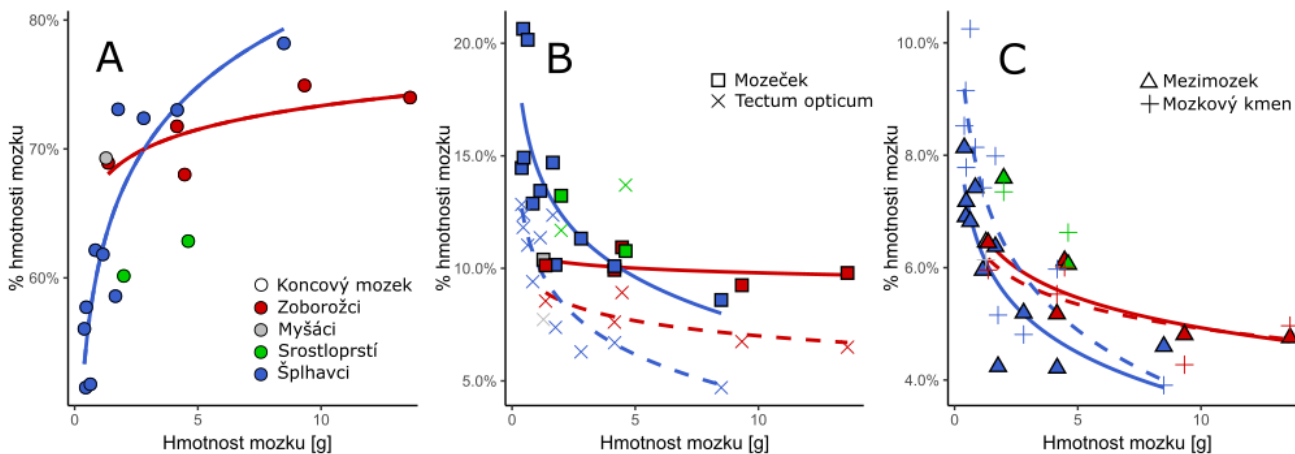
Dle očekávání velikost jednotlivých oddílů mozku signifikantně koreluje s celkovou velikostí mozku ($p < 0,001$ ve všech případech, Tab. 3.1 a Tab. 3.2). Z celkové hmotnosti mozku tvoří největší část koncový mozek, a to 52–78 %. Podílové zastoupení zbylých částí mozku je pak poměrně vyrovnané: mozkový kmen 4–10 %, diencephalon 4–8 %, tectum opticum 5–14 % a cerebellum 9–21 % (Obr. 9). Koncový mozek je jedinou částí mozku, jejíž podíl se s rostoucí hmotností mozku zvětšuje (Obr. 10A), zatímco podíl ostatních částí s velikostí mozku klesá (Obr. 10B a 10C). Koncový mozek

roste s velikostí mozku u šplhavic mnohem rychleji než u zoborožců (Obr. 10A). Naproti tomu hmotnost všech zbylých částí mozku klesá rychleji u šplhavic (Obr. 10B a 10C).



Obr. 9: Relativní hmotnost jednotlivých částí mozku.

Druhy jsou ve skupinách řazeny zleva doprava dle vzrůstající hmotnosti mozku (uvedena v horní části sloupců).

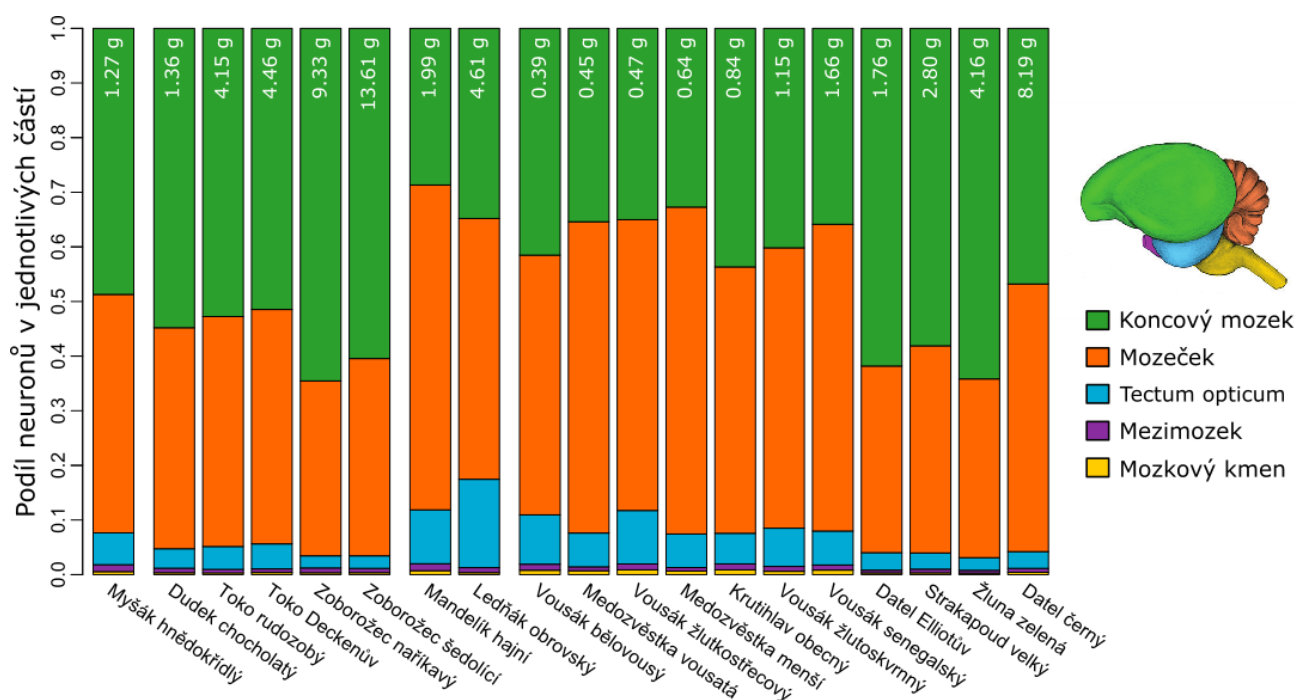


Obr. 10: Relativní velikost koncového mozku (A), mozečku a tectum opticum (B), mezimozku a mozkového kmene (C) u zoborožců, šplhavic, srostloprstých a myšáka.

3.3 HUSTOTA A DISTRIBUCE NEURONŮ

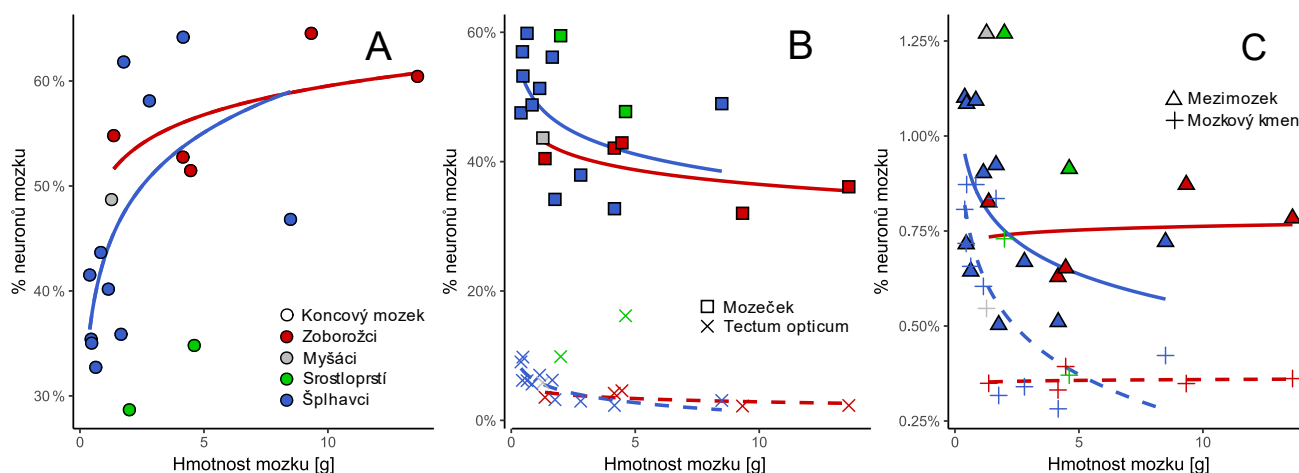
Hustoty neuronů se v jednotlivých oddílech mozku výrazně liší. Zatímco nejvyšších hustot (neuronů na miligram tkáně) dosahuje mozeček ($492\text{--}979 \times 10^3 \text{ N/mg}$), v koncovém mozku ($62\text{--}230 \times 10^3 \text{ N/mg}$) a tectum opticum ($48\text{--}209 \times 10^3 \text{ N/mg}$) jsou hustoty neuronů podstatně nižší. Nejnižších hodnot pak dosahuje mozkový kmen ($6\text{--}28 \times 10^3 \text{ N/mg}$) a diencephalon ($17\text{--}40 \times 10^3 \text{ N/mg}$). Takto

odlišné hustoty neuronů způsobují nerovnoměrnou distribuci neuronů v mozku (Obr. 11), kdy většina neuronů je alokovaná do hemisfér koncového mozku (29–65 %) nebo mozečku (32–60 %), přičemž se zvětšující se hmotností mozku se zvyšuje podíl neuronů alokovaných do koncového mozku (Obr. 12A). V tectum opticum jsou 2–10 % neuronů; výjimkou je zde ledňák obrovský (*Dacelo novaeguineae*), který má v tectum opticum více jak 16 % neuronů celého mozku (Obr. 11). V mezimozku je méně než 1,3 % neuronů a v mozkovém kmeni méně než 0,9 % neuronů (Obr. 11).



Obr. 11: Relativní distribuce neuronů.

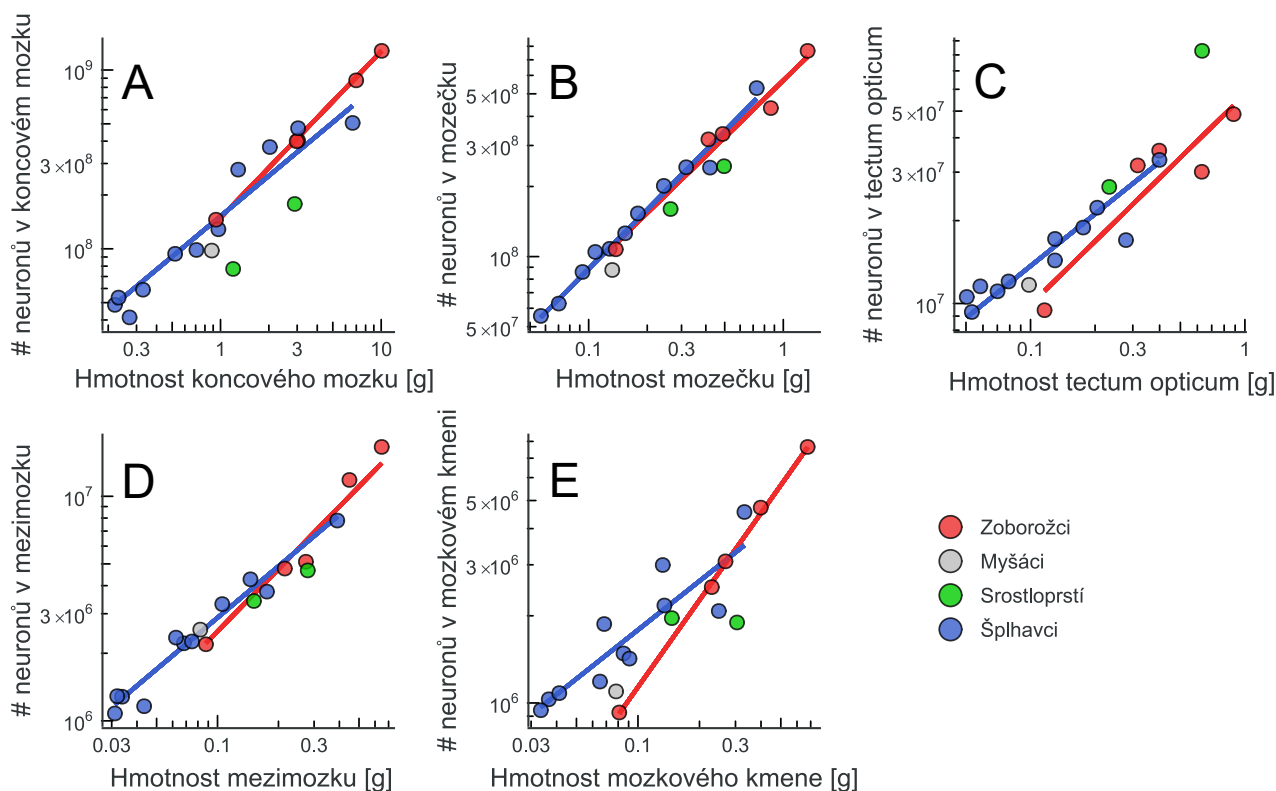
Druhy jsou ve skupinách řazeny zleva doprava dle vzrůstající hmotnosti mozku (uvedena v horní části sloupců).



Graf 12: Relativní distribuce neuronů v koncového mozku (A), mozečku a tectum opticum (B), mezimozku a mozkového kmene (C) u zoborožců, šplhavců, srostloprstých a myšáka.

Alometrické vztahy mezi hmotností a počtem neuronů v pěti hlavních částech mozku jsou zobrazeny na Obr. 13A–13E. Alometrické přímky se významně neliší v interceptech (ve všech případech $p \geq 0,29$) ani v jedné z analyzovaných částí. Směrnice přímek se mezi zoborožci a šplhavci

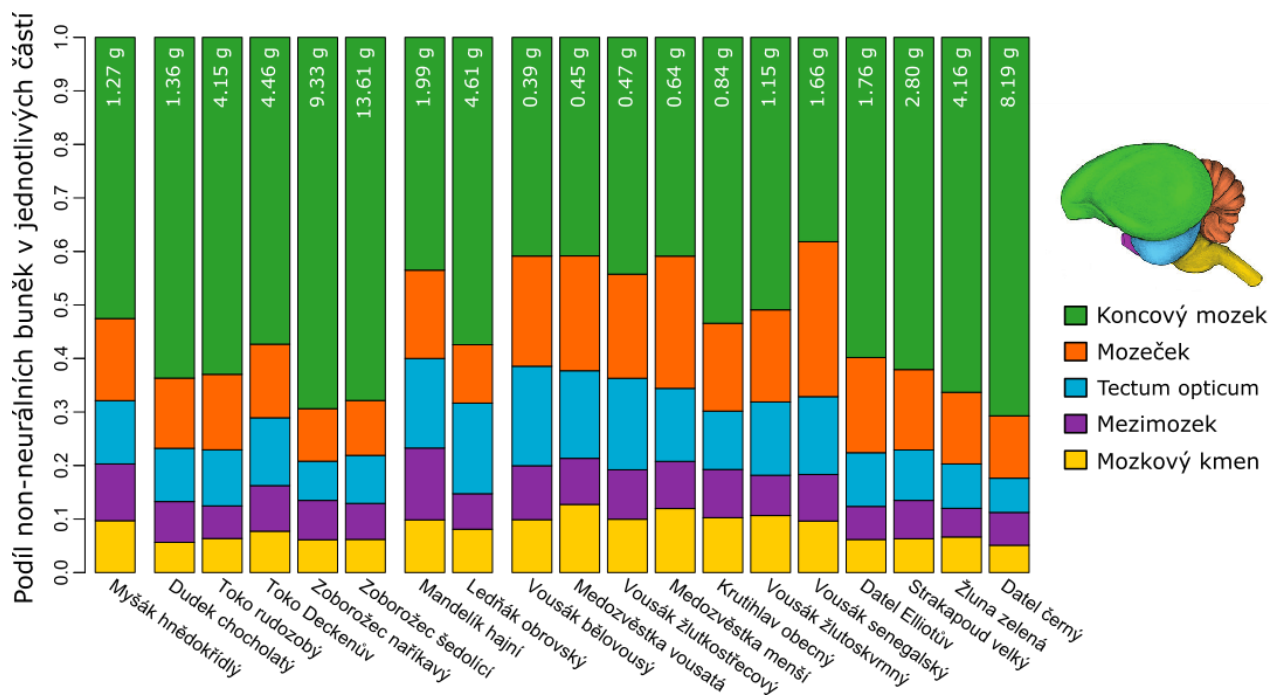
neliší v koncovém mozku, mozečku ani tectum opticum (ve všech případech $p \geq 0,32$); liší se pouze v mezimozku (Obr. 7D; $p = 0,02$) a mozkovém kmeni (Obr. 7E; $p = 0,006$). V těchto oddílech mozku roste počet neuronů u zoborožců rychleji než u šplhavců.



Graf 13A–E: Škálování mezi hmotností a počtem neuronů v jednotlivých oddílech mozku (A – koncový mozek, B – mozeček, C – tectum opticum, D – mezimozek, E – mozkový kmen).

3.3 HUSTOTY A DISTRIBUCE NON-NEURÁLNÍCH BUNĚK

Hustoty non-neurálních buněk se mezi jednotlivými oddíly mozku neliší tak výrazně jako hustoty neuronů. V mozkovém kmeni ($113\text{--}208 \times 10^3$ O/mg), mezimozku ($101\text{--}196 \times 10^3$ O/mg), tectum opticum ($114\text{--}210 \times 10^3$ O/mg) a mozečku ($94\text{--}229 \times 10^3$ O/mg) jsou hustoty non-neurálních buněk velmi podobné. V koncovém mozku jsou pak hustoty o něco nižší ($76\text{--}146 \times 10^3$ O/mg). Rozdíly v hustotách nejsou natolik výrazné, aby se projevíly v relativní distribuci non-neurálních buněk, většina non-neurálních buněk je tedy v koncovém mozku (Obr. 14). Hustoty non-neurálních buněk v koncovém mozku zoborožců jsou vyšší než u šplhavců, s rostoucí velikostí koncového mozku však u obou skupin dochází ke stejnému poklesu hustot.

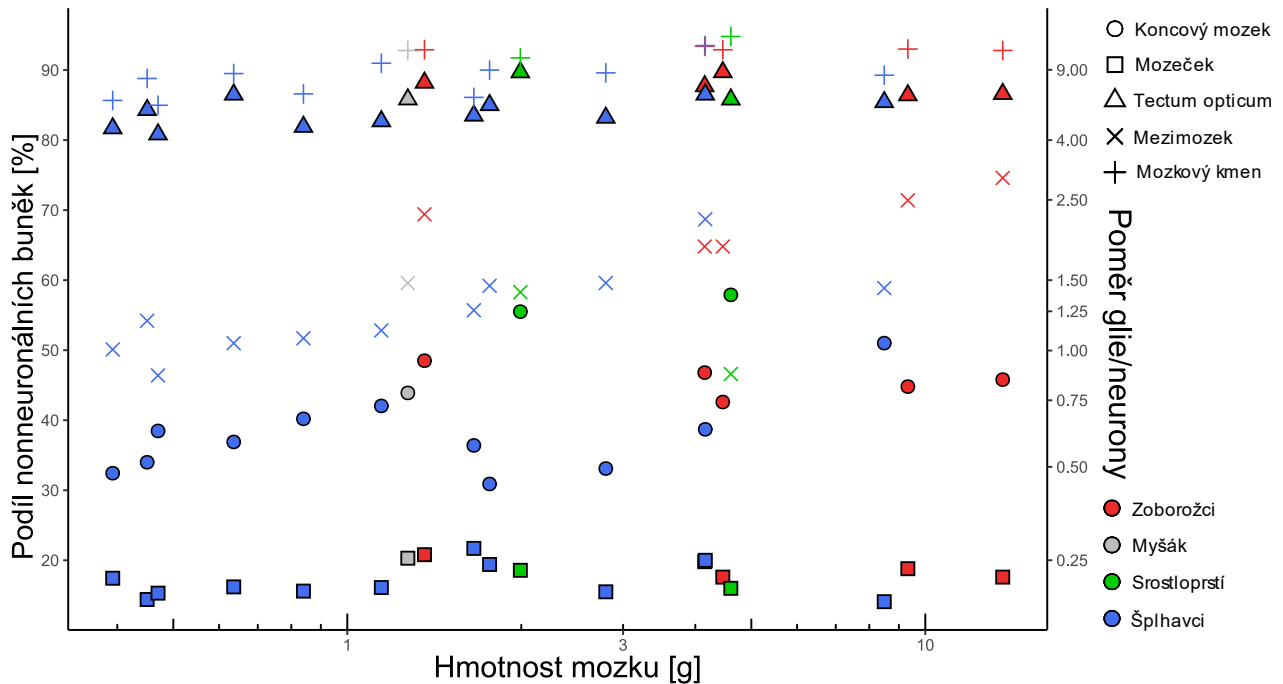


Obr. 14: Relativní distribuce non-neurálních buněk.

Druhy jsou ve skupinách řazeny zleva doprava dle vzrůstající hmotnosti mozku (uvedena v horní části sloupců).

3.4 POMĚR MEZI NEURONY A NON-NEURÁLNÍMI BUŇKAMI

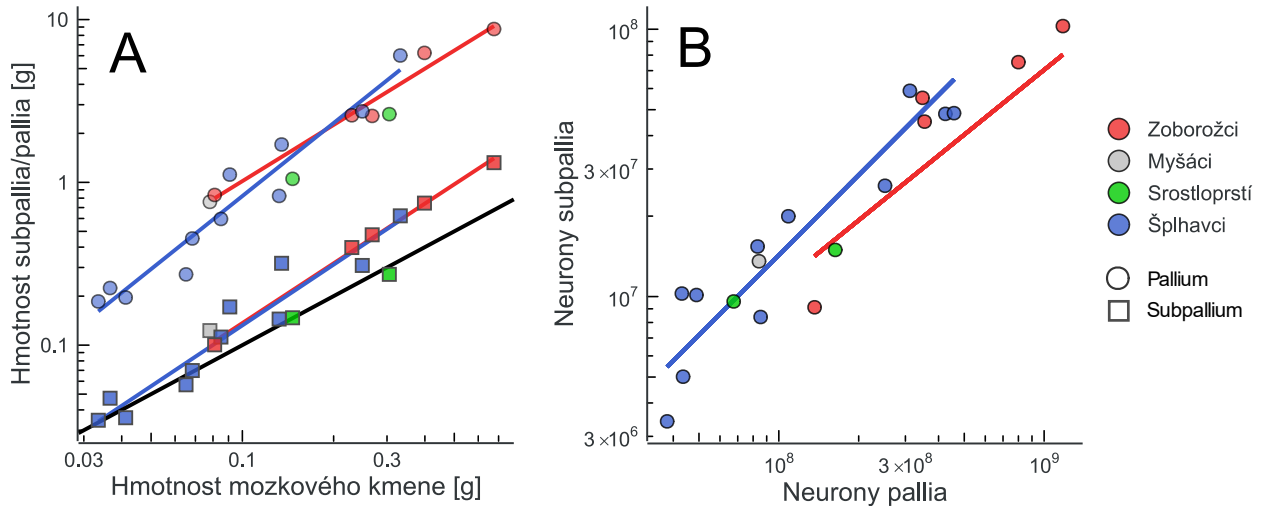
V každém oddíle mozku tvoří neurony různý podíl z celkového počtu buněk. V mozковém kmeni tvoří 5–14 % neurony, v mezimozku 10–18 %, v tectum opticum 25–53 %, v mozečku 78–86 % a v koncovém mozku 42–69 %. U všech analyzovaných druhů převažují v celém mozku neurony nad non-neurálními buňkami a non-neurální buňky tak tvoří méně než 45 % všech buněk v mozku (u myšáka 42 %, u zoborožců 42–45 %, u srostloprstých 45% a u šplhavců 31–41 %). Procentuálně je nejméně non-neurálních buněk v mozečku (14–22 %), nejvíce v mozkovém kmeni (86–95 %) a mezimozku (82–90 %). Nejvariabilnější je procentuální zastoupení non-neurálních buněk v tectum opticum (47–69 %) a koncovém mozku (31–42 % u šplhavců, 43–49 % u zoborožců, u myšáka 44 % a u srostloprstých 56–58 %) (Obr. 15).



Obr. 15: Poměr mezi neurony a non-neurálními buňkami, resp. podíl non-neurálních buněk v jednotlivých oddílech mozku.

3.5 SUBPALLIUM A PALLIUM

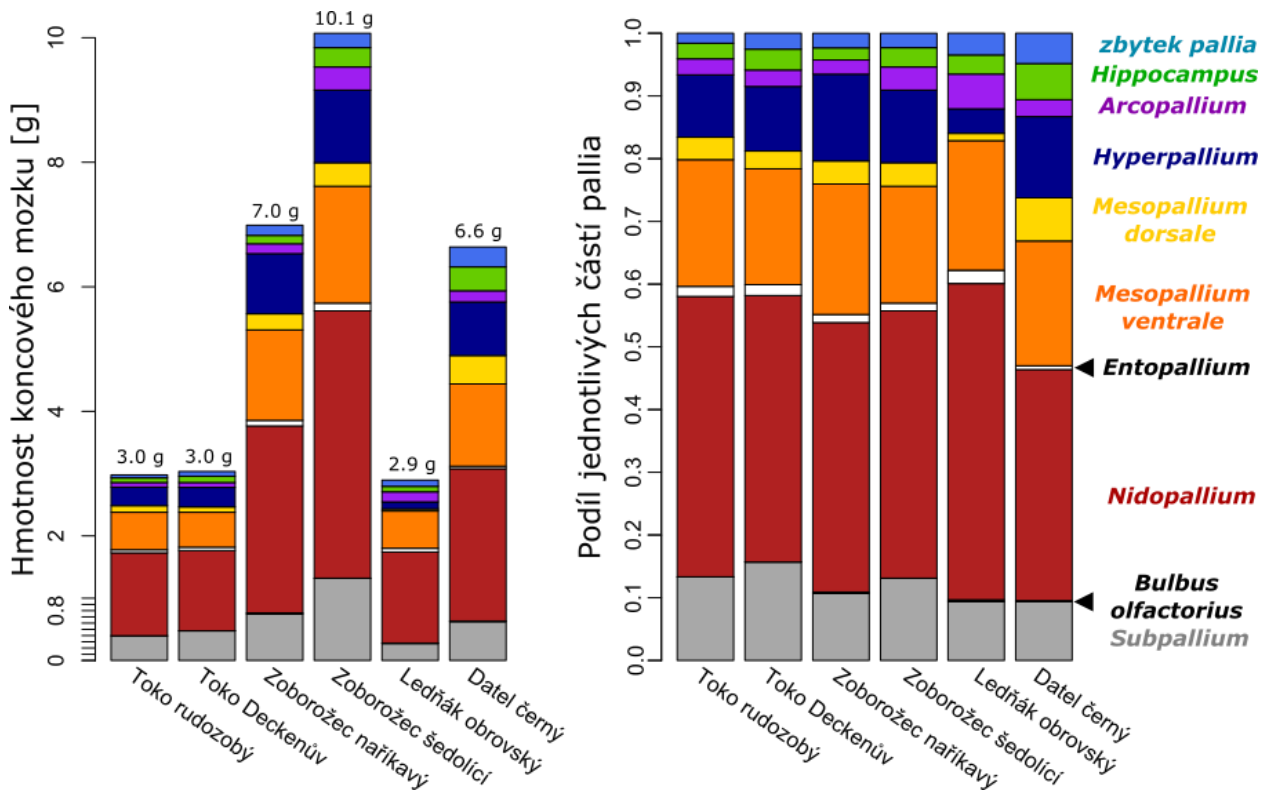
Koncový mozek můžeme rozdělit na subpallium (zahrnující *striatum*, *pallidum* a *septum*) a pallium (dělené na *entopallium*, *nidopallium*, *mesopallium*, *hyperpallium*, *arcopallium* a *hippocampus*). U všech analyzovaných druhů dle očekávání tvoří drtivou většinu koncového mozku pallium. Subpallium zaujímá pouze 9–17 % z celkové hmotnosti koncového mozku (Tab. 2.1), obsahuje 6–19 % neuronů (Tab. 2.2) a 11–32 % non-neurálních buněk (Tab. 2.3). Absolutní počty neuronů v subpalliu (resp. palliu) se pohybují od 3,4 milionu (resp. 41 milionů) neuronů u vousáka žlutokostřecového (*Pogonius bilineatus*) po více jak 100 milionů (resp. 1,28 miliardy) neuronů u zoborožce šedolícího (*Bycanistes brevis*). Koncový mozek u zoborožců a šplhavců je jedinou částí mozku, jejíž podíl se s rostoucí velikostí mozku zvětšuje (Obr. 10A). Hmotnost obou částí koncového mozku se však nezvětšuje stejnou měrou. Pokud se podíváme na závislost hmotnosti subpallia/pallia a např. mozkového kmene (reprezentuje velikost mozku, která v sobě neobsahuje hmotnost pallia a subpallia), zjistíme, že u zoborožců i šplhavců roste s velikostí mozku více pallium než subpallium (Obr. 16A) (škálovací koeficienty: 1,22 a 1,48 pro subpallium a pallium u zoborožců; 1,24 a 1,49 pro subpallium a pallium u šplhavců). Subpallium je tak u obou skupin se zvětšující se koncovým mozkem proporčně menší. Stejně tak roste počet neuronů v palliu u obou skupin rychleji, než počet neuronů v subpalliu (škálovací koeficient $0,90 \pm 0,16$ pro zoborožce a $0,96 \pm 0,18$ pro šplhavce; Obr. 16B).



Obr. 16: **Subpallium a pallium u šplhavců a zoborožců.** Pallium se u zoborožců i šplhavců zvětšuje rychleji než subpallium (A). Stejně tak u obou skupin přibývá počet neuronů rychleji v palliu než subpalliu (B).

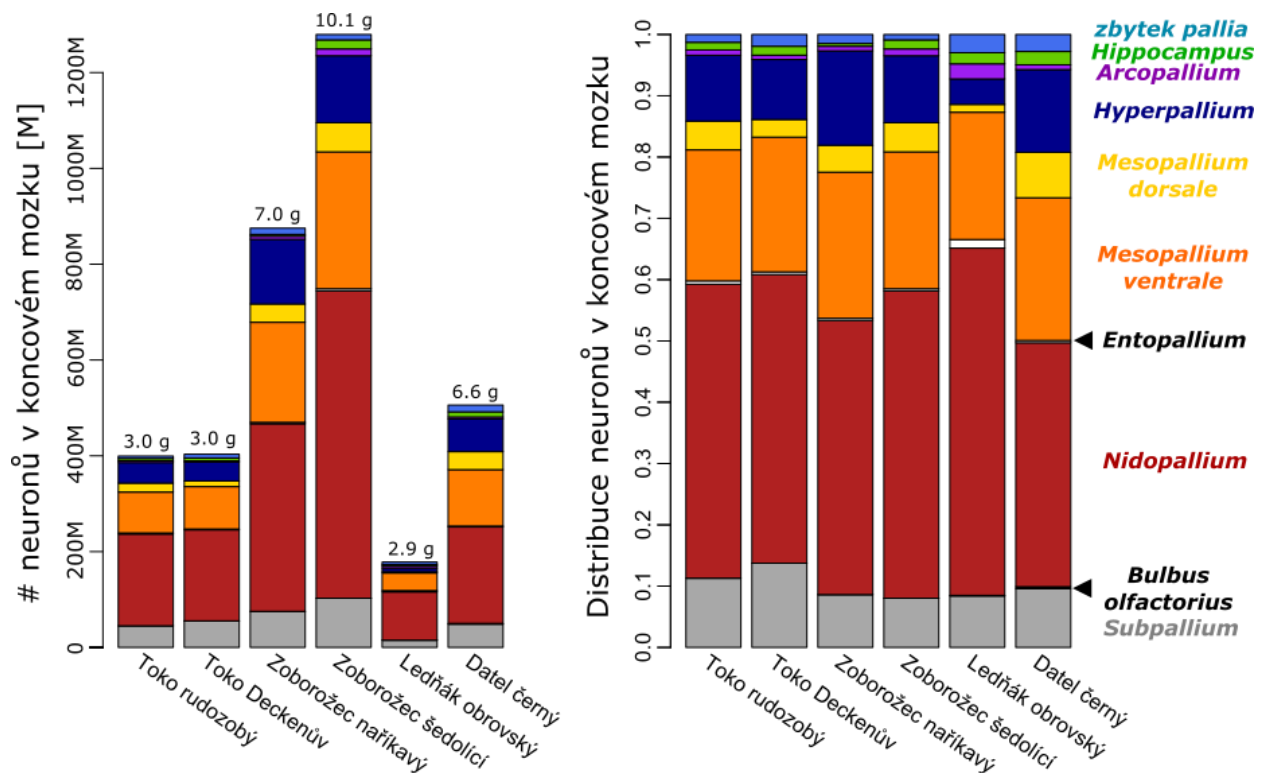
3.6 DISTRIBUCE NEURONŮ V KONCOVÉM MOZKU

Pallium všech čtyř zoborožců, datla černého a ledňáka obrovského bylo parcelováno podrobněji, na osm (resp. devět) částí: (1) *nidopallium*, (2) *entopallium*, (3) ventrální a (4) dorzální *mesopallium*, (5) *hyperpallium*, (6) *arcopallium*, (7) *hippocampus*, (8) *bulbus olfactorius* (čichový lalok) a (9) zbytek pallia. U všech šesti podrobněji analyzovaných druhů má největší hmotnostní podíl na koncovém mozku zcela jednoznačně *nidopallium* (36,9–50,4 %). Značnou část koncového mozku pak zabírá *mesopallium ventrale* (18,5–20,8 %), *subpallium* (9,4–15,7 %) a *hyperpallium*, jehož hmotnostní podíl na koncovém mozku se pohybuje u zoborožců a datla černého od 10,0 do 13,8 %. *Hyperpallium* ledňáka obrovského zabírá o poznání menší část koncového mozku, a to pouze 3,9 %. *Mesopallium dorsale* (1,2–6,9 %), *arcopallium* (2,3–5,5 %), *hippocampus* (1,9–5,8 %) a *entopallium* (0,6–2,1 %) zabírají znatelně menší část koncového mozku. Zcela minoritní částí koncového mozku je čichový lalok, který tvoří méně jak 0,3 % z celkové hmotnosti koncového mozku (Obr. 17).



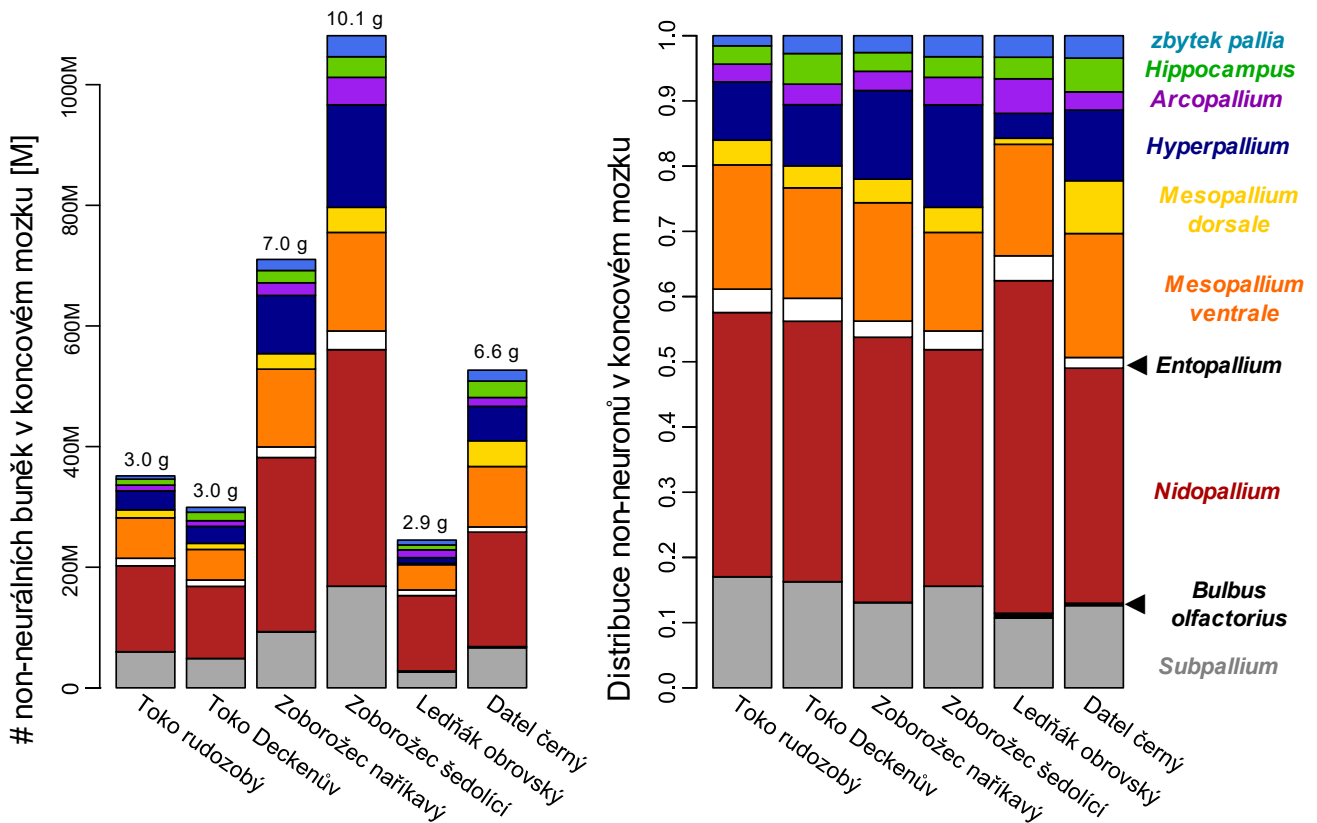
Obr. 17: Hmotnostní podíly jednotlivých částí koncového mozku (A) v absolutních a (B) relativních hodnotách.

Vysokých hustot neuronů dosahuje nidopallium ($69\text{--}149 \times 10^3$ N/mg), mesopallium ventrale ($61\text{--}157 \times 10^3$ N/mg), mesopallium dorsale ($66\text{--}176 \times 10^3$ N/mg) a hyperpallium ($65\text{--}144 \times 10^3$ N/mg). V těchto částech jsou tedy hustoty vyšší, než je celkový průměr pro hemisféru ($62\text{--}134 \times 10^3$ N/mg). V ostatních částech koncového mozku jsou hustoty neuronů menší: hippocampus ($29\text{--}67 \times 10^3$ N/mg), entopallium ($32\text{--}49 \times 10^3$ N/mg), arcopallium ($22\text{--}46 \times 10^3$ N/mg), čichový lalok ($4\text{--}49 \times 10^3$ N/mg) a zbytek pallia ($44\text{--}108 \times 10^3$ N/mg). Drtivá většina neuronů koncového mozku je alokována v nidopalliu (39,8–56,7 %) a ventrálním mesopalliu (20,8–23,9 %). Je zajímavé, že přestože má ledňák obrovský v hemisférách ze šesti analyzovaných druhů nejnižší počet neuronů, má relativně nejvíce neuronů alokovaných právě do nidopallia. Dále je zajímavé, že zatímco hyperpallium zoborožců obsahuje 9,8–15,4 % a datla černého 13,5 % všech neuronů, hyperpallium ledňáka obrovského obsahuje pouze 4,2 % neuronů koncového mozku. Subpallium obsahuje 8,0–13,7 % neuronů koncového mozku. Zbýlé části koncového mozku jako mesopallium dorsale (1,3–7,4 %), arcopallium (0,7–2,4 %), hippocampus (0,45–2,2 %) a zbytek pallia (1,3–3,0 %) obsahují relativně menší počty neuronů. V entopalliu (<0,014 %) a čichových lalocích (<0,003 %) je neuronů nejméně (Obr. 18).



Obr. 18: Distribuce neuronů ve vybraných částech koncového mozku (A) v absolutních a (B) relativních hodnotách.

Nejvyšších hustot non-neurálních buněk dosahuje u všech analyzovaných druhů entopallium a čichové laloky (2× až 3× vyšších než průměrné hustoty pro celé koncové mozky). Hustoty non-neurálních buněk v nidopalliu a mesopallium ventrale se pohybují lehce pod průměrnými hodnotami pro hemisféry. V ostatních částech (mesopallium dorsale, arcopallium, hippocampus, subpallium a zbytek mozku) se hustoty non-neurálních buněk pohybují naopak lehce nad průměrem pro celý koncový mozek. Největší rozdíly hustot non-neurálních buněk mezi analyzovanými druhy jsou v hyperpalliu. Rozdíly v hustotách non-neurálních buněk nejsou natolik velké, aby se významně projevily na relativní distribuci, distribuce non-neurálních buněk tak dosti věrně kopíruje distribuci hmotností. Většina (36–41 %) non-neurálních buněk je v nidopalliu (Obr. 19).

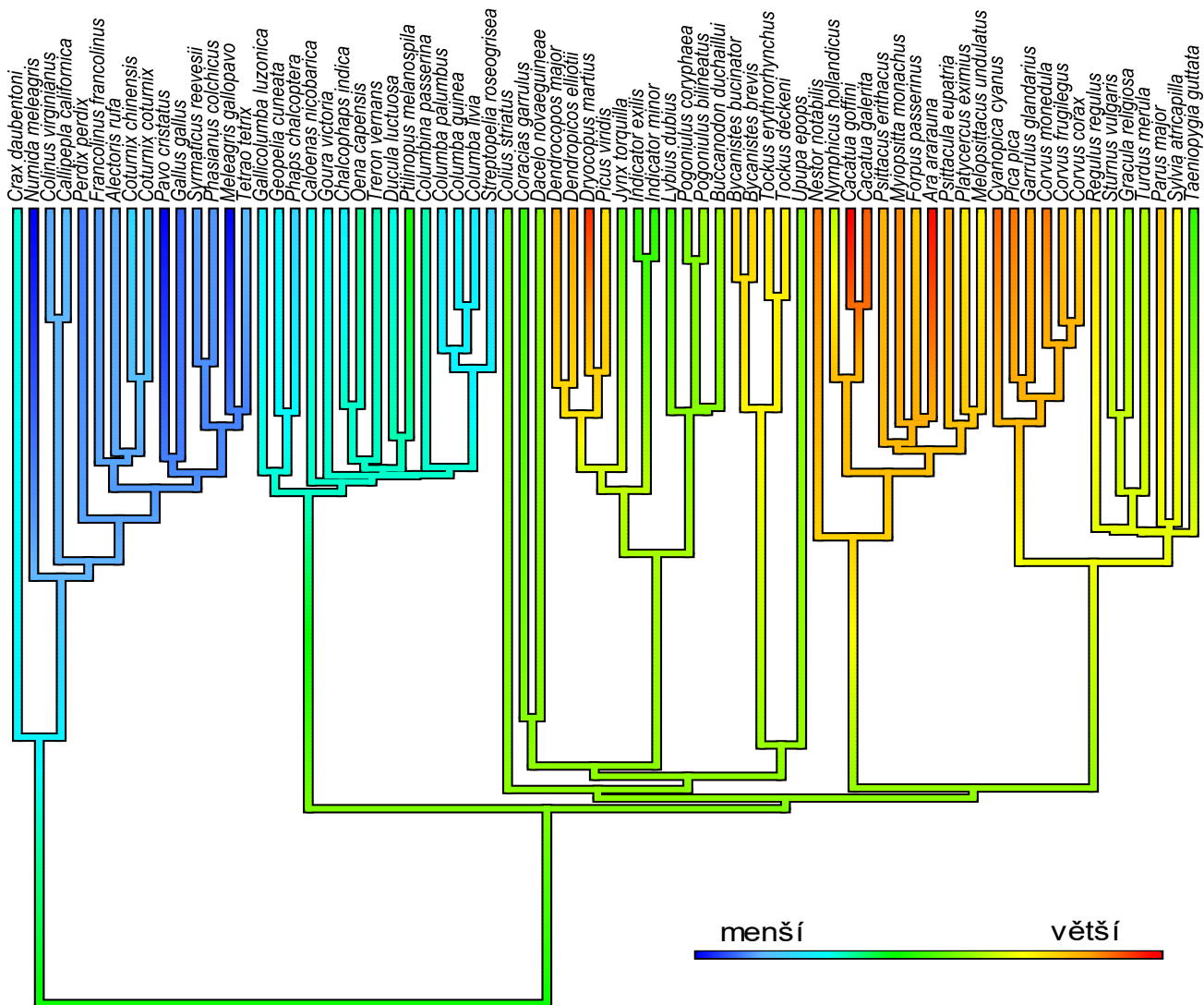


Obr. 19: Distribuce non-neurálních buněk ve vybraných částech koncového mozku (A) v absolutních a (B) relativních hodnotách.

4 DISKUZE

4.1 POROVNÁNÍ S OSTATNÍMI PTAČÍMI SKUPINAMI

Data získaná pro zoborožce, šplhavce, srostloprsté ptáky a myšáka v této diplomové práci byla porovnána s již publikovanými daty pro papoušky a pěvce (Olkowicz et al., 2016) a dosud nepublikovanými daty pro holuby (Marhounová *et al.*, v přípravě) a hrabavé ptáky (Kocourek *et al.*, v přípravě). Pro fylogenetické analýzy byla využita data pro 54 druhů (11 papoušků, 13 pěvců, 15 holubů a 15 hrabavých ptáků). V porovnání s druhy analyzovanými v této diplomové práci dosahují vyšších tělesných hmotností především zástupci z řádu hrabavých – bažant obecný (1,2 kg; *Phasianus colchicus*) a královský (1,2 kg; *Syrnaticus reevesii*), perlička kropenatá (1,7 kg; *Numida meleagris*), hoko žlutolaločnatý (2,5 kg; *Crax daubetoni*), krocan divoký (3,5 kg; *Meleagris gallopavo*) a páv korunkatý (3,6 kg; *Pavo cristatus*) – a korunáč vějířový (1,4 kg; *Goura victoria*) jako největší zástupce holubů. Na druhé straně menší než vousáci rodu *Pogoniulus* (10 gramů) je pouze králíček obecný (*Regulus regulus*), jehož tělesná váha dosahuje pouhých 4,5 gramu. Králíček má také nejmenší mozek, který váží pouhých 0,35 gramu. Naopak největší analyzované ptačí mozky má ara ararauna (20,7 g; *Ara ararauna*), krkavec obecný (14,1 g; *Corvus corax*), zoborožec šedolící (13,6 g; *Bycanistes brevis*) a nestor kea (13,6 g; *Nestor notabilis*).

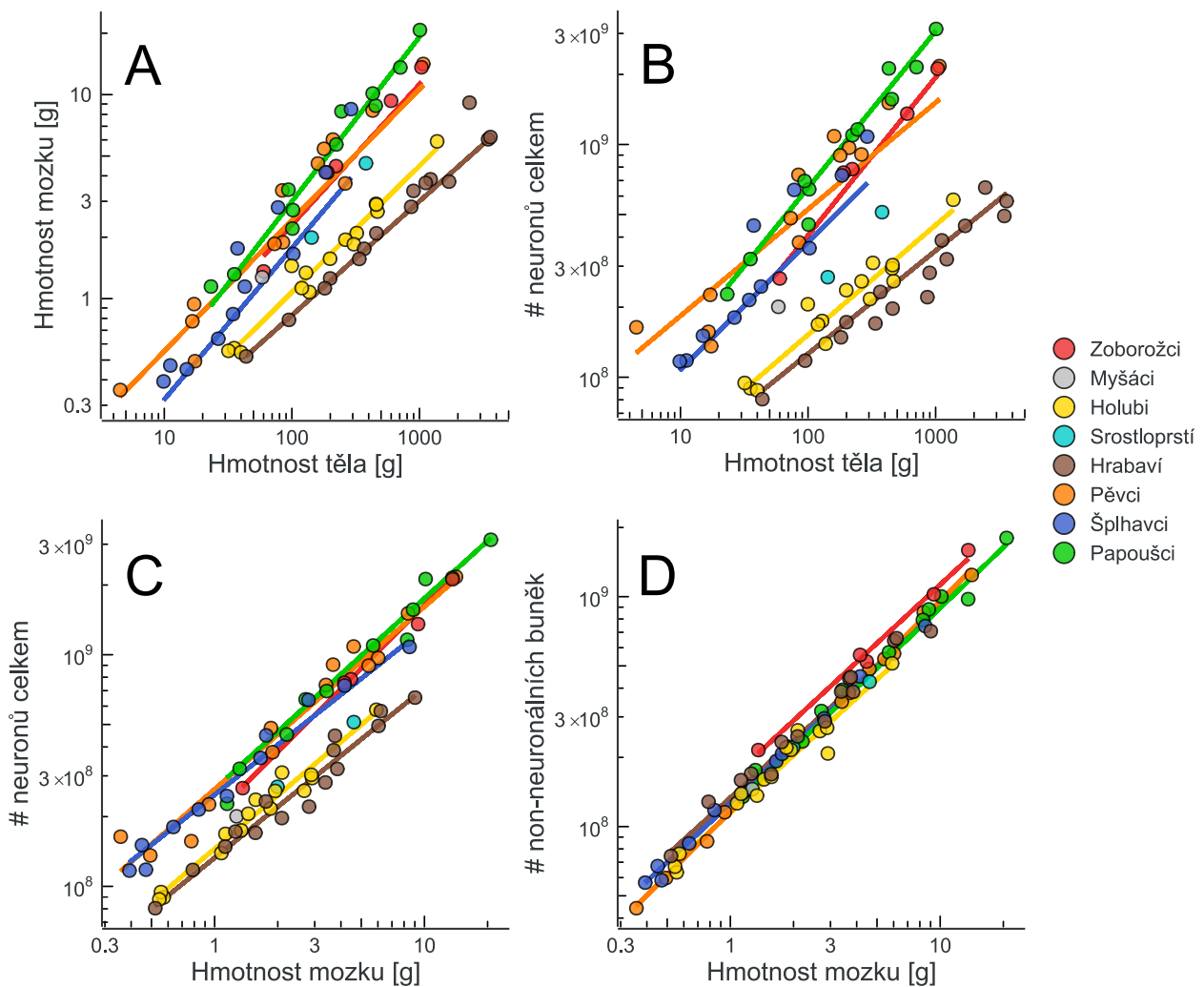


Obr. 20: Relativní velikost mozku vynesena na fylogenetický strom s rekonstrukcí ancestrálních stavů znaku.

Relativní velikost mozku (Obr. 20; Obr. 21A), tedy alometrický vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku, se mezi korunovými (pěvci, papoušky, zoborožci a šplhavci) a bazálními skupinami (holuby a hrabavými) signifikantně liší ($p \leq 0,01$). Mezi pěvci, papoušky, zoborožci a šplhavci ($p \geq 0,18$) ani mezi holuby a hrabavými ($p = 0,34$) signifikantní rozdíly nenajdeme. Hrabaví ptáci a holubi mají relativně menší mozky než korunové skupiny. Například kilogramový hrabavý pták má přibližně čtyřikrát ($3,7\times$) menší mozek než stejně velký zoborožec a skoro šestkrát ($5,6\times$) menší než papoušek o stejné váze. Při zohlednění nejen relativní velikosti mozku, ale i celkového počtu neuronů (Obr. 21B) je zřejmé, že rozdíly mezi bazálními a korunovými skupinami jsou ještě větší. Korunové skupiny disponují výrazně vyšším počtem neuronů pro danou velikost těla než holubi a hrabaví ptáci.

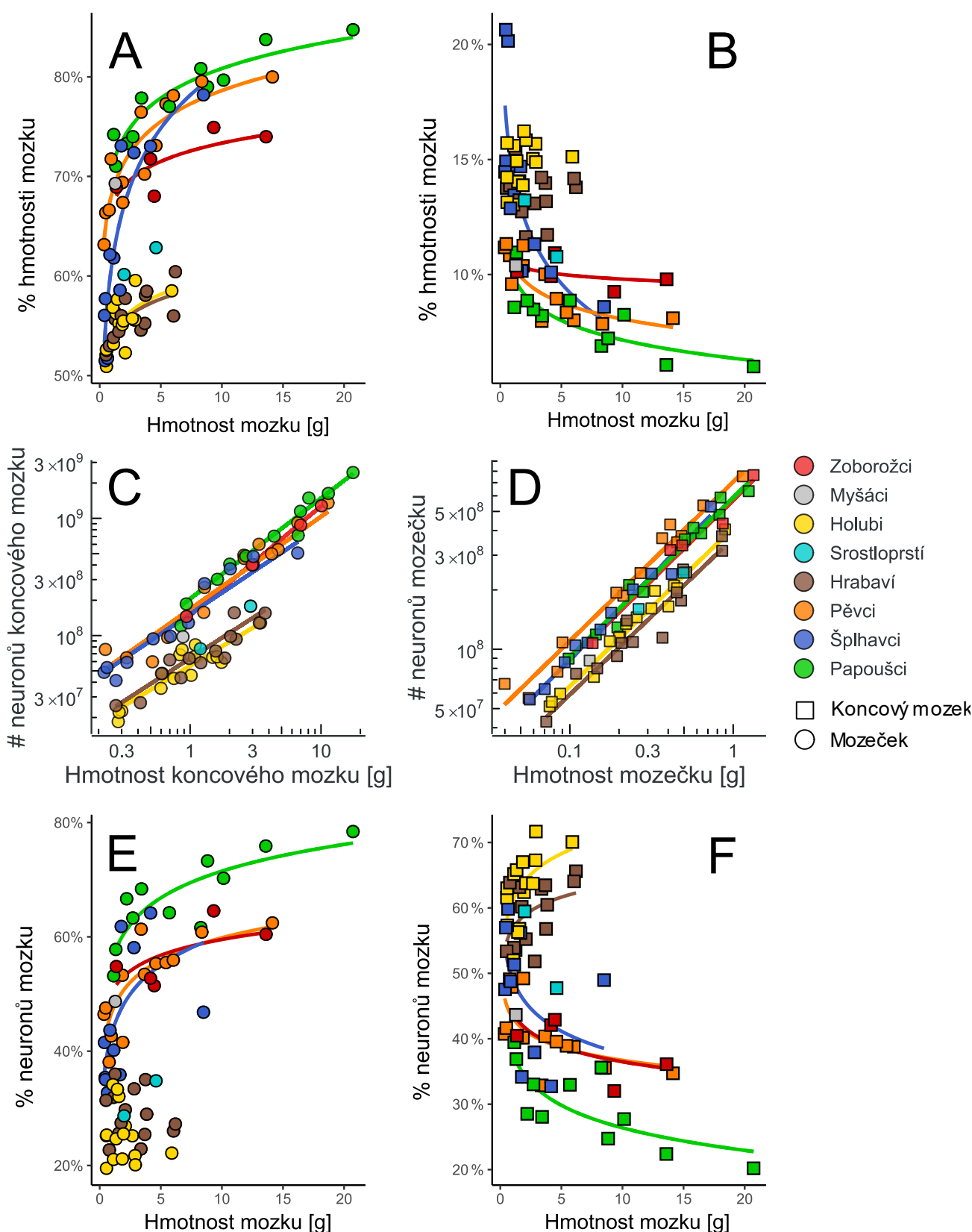
Alometrické vztahy mezi velikostí mozku a celkovým počtem neuronů (Graf 21C) nám formují jednotlivé řády do dvou velkých celků – holuby a hrabavé na jedné straně a pěvce, papoušky,

zoborožce a šplhavce na straně druhé (statisticky navzájem signifikantně odlišných; ve všech případech $p \leq 0,001$). Rozdíl mezi alometrickými přímkami není u hrabavých a holubů statisticky významný ($p = 0,07$), stejně jako mezi korunovými skupinami (ve všech případech $p \geq 0,23$). Oba zástupci srostloprstých ptáků stojí zcela mimo skupinu pěvci-papoušci-zoborožci-šplhavci. Škálování mezi velikostí mozku a počtem non-neurálních buněk (Graf 21D) je na rozdíl od téhož pro neurony mnohem konzervativnější a pro všechny analyzované skupiny velmi podobné. Výjimkou jsou zde zoborožci, u kterých je počet non-neurálních buněk signifikantně vyšší než u ostatních ptačích skupin (ve všech případech $p \geq 0,03$ kromě hrabavých, kde $p = 0,09$).



Obr. 21: Vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku (A), respektive počtem neuronů (B). Vztah mezi velikostí mozku a počtem neuronů (C), respektive počtem non-neurálních buněk (D).

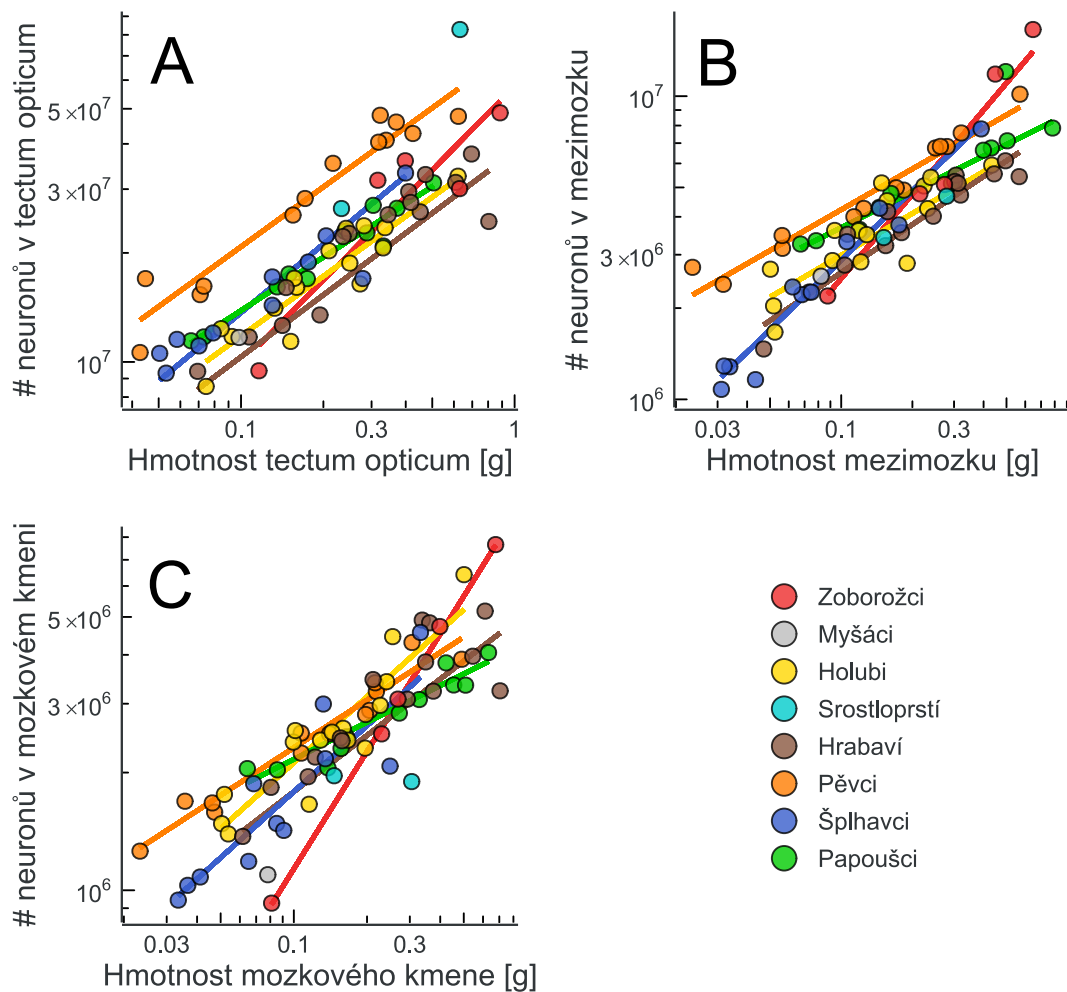
Velikost jednotlivých částí mozku se mezi skupinami liší. Nejmarkantnější rozdíly jsou především v relativní velikosti koncového mozku. Relativně největší koncový mozek mají jednoznačně papoušci (71–85 %). U zoborožců (68–75 %) a šplhavců (52–78 %) je koncový mozek relativně menší, podobně jako u pěvců (63–80 %). Do tohoto rozmezí spadá i myšák hnědokřídlý,



Graf 22: Srovnání s ostatními analyzovanými ptačím skupinami.
 Relativní velikost koncového mozku (A) a mozečku (B).
 Škálování neuronů v koncovém mozku (C) a mozečku (D).
 Procentuální podíl neuronů v koncovém mozku (E) a mozečku (F).

u kterého koncový mozek zabírá více než 69 % celkové hmotnosti mozku. U ledňáka obrovského (63 %) a mandelíka hajního (60 %) jako dvou zástupců srostloprstých je koncový mozek relativně menší než u myšáka, a to i přesto, že oba mají větší mozek (myšák hnědokřídlý: 1,27 g; mandelík hajní: 1,99 g; ledňák obrovský: 4,61 g). U holubů (51–60 %) a hrabavých (52–64 %) tvoří koncový mozek znatelně menší část z celkové hmotnosti mozku než u zmíněných korunových skupin. U všech skupin se hmotnostní frakce koncového mozku zvyšuje s hmotností mozku (Graf 22A), tento trend je však u holubů a hrabavých nevýrazný. Hmotnostní frakce zbylých částí s velikostí mozku naopak klesá (nezobrazeno), vyjma mozečku, jehož hmotnost se u hrabavých a holubů významně nemění (Graf 22B).

Alometrické přímky pro škálování neuronů v koncovém mozku (Obr. 22C) se mezi papoušky, pěvci, šplhavci a zoborožci neliší ani v interceptu, ani ve sklonu ($p \geq 0,23$; $p \geq 0,10$). Stejná situace je mezi hrabavými a šplhavci ($p = 0,89$; $p = 0,98$). Alometrické přímky se signifikantně liší v interceptu pouze mezi bazálními a korunovými skupinami ($p \leq 0,002$). Ve sklonu se alometrické přímky liší pouze mezi papoušky a holuby a hrabavými ($p \leq 0,02$). Ze škálování neuronů v mozečku (Obr. 22D) je patrné, že šplhavci, zoborožci a papoušci škálují stejně (ve všech případech $p \geq 0,59$). Pěvci dosahují vyšších absolutních počtů neuronů v mozečku než zoborožci, šplhavci a papoušci ($p \geq 10^{-4}$). Naopak nižší absolutní počty neuronů v mozečku mají holubi ($p \geq 10^{-4}$) a signifikantně méně než holubi hrabaví ($p = 0,002$). Ve sklonu se alometrické přímky mezi skupinami neliší ani v jednom případě ($p \geq 0,61$). U zoborožců, šplhavců, pěvců i papoušků můžeme pozorovat, že s rostoucí velikostí mozku roste i podíl neuronů v koncovém mozku (Obr. 22E), přičemž u papoušků je tento trend nejvýraznější. U hrabavých a holubů však podobné trendy nejsou patrné. Podíl neuronů v mozečku u korunových skupin s velikostí mozku klesá, naopak u holubů a hrabavých roste (Obr. 22F).

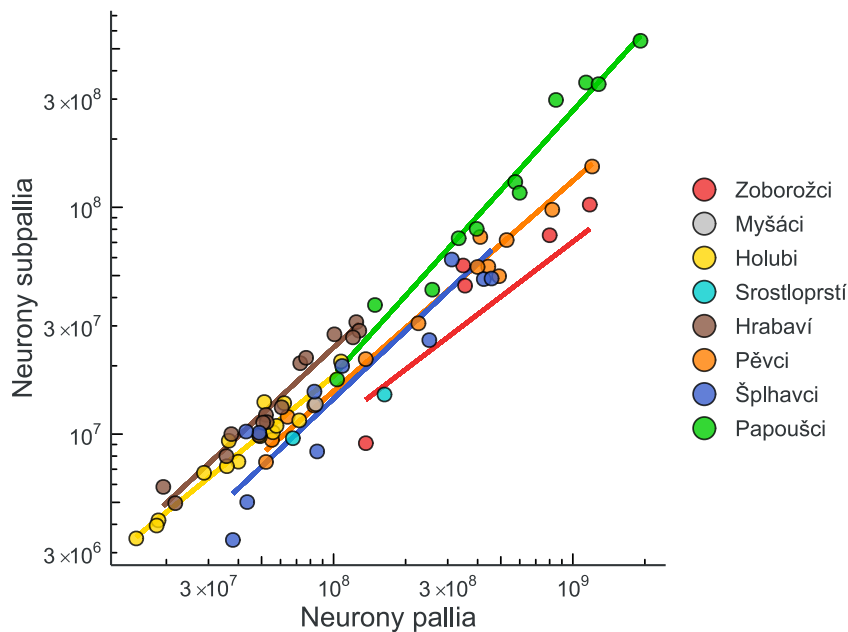


Obr. 23: Škálování neuronů v tectum opticum (A), mezimozku (B) a mozkovém kmeni (C).

Pěvci mají signifikantně vyšší počty neuronů v tectum opticum než ostatní skupiny (Obr. 23A; ve všech případech $p \leq 0,04$). Mezi ostatními skupinami se škálování neuronů v tectum opticum neliší ($p \geq 0,38$). Nejvyšší počet neuronů v mezimozku je opět u pěvců (Obr. 23B) a signifikantně se liší od škálování neuronů u hrabavých a šplhavců ($p \leq 0,05$). Rozdílné směrnice alometrických přímek škálování neuronů v mezimozku jsou u zoborožců a šplhavců oproti ostatním skupinám ($p \leq 0,002$). V případě mozkového kmene se směrnice alometrické přímky liší pouze u zoborožců v porovnání s ostatními skupinami (ve všech případech $p \leq 0,006$; Obr. 23C).

Relativní velikost subpallia je u všech analyzovaných skupin podobná (šplhavci: 9–17 %, zoborožci: 11–16 %, srostloprstí: 9 a 12 %, myšák: 14 %, pěvci: 10–22 %, papoušci: 15–18 %, holubi: 13–17 % a hrabaví: 14–22 %). U pěvců pallium s velikostí mozku roste rychleji než subpallium (škálovací koeficienty 1,16 a 1,32 pro subpallium a pallium, při porovnání s mozkovým kmenem), tedy stejně jako u šplhavců a zoborožců (viz Výsledky, kap. 3.5). U papoušků (1,34 a 1,32), holubů (1,06 a 1,11) a hrabavých (1,15 a 1,13) roste velikost pallia a subpallia s velikostí mozku víceméně izometricky (nezobrazeno). Subpallium papoušků (14–26 %), hrabavých

(17–23 %) a holubů (15–21 %) obsahuje relativně více neuronů než subpallium zoborožců (6–14 %), šplhavců (8–17 %) a pěvců (9–16 %). U zoborožců (škálovací exponent $0,90 \pm 0,17$), holubů ($0,90 \pm 0,19$), pěvců ($0,94 \pm 0,18$), šplhavců ($0,96 \pm 0,18$) i hrabavých ($0,97 \pm 0,19$) narůstá počet neuronů v subpalliu pomaleji než v palliu. Diametrálně odlišná je situace u papoušků ($1,20 \pm 0,07$), kdy se zvětšujícím se koncovým mozkem přibývá počet neuronů naopak rychleji v subpalliu (Obr. 24). V absolutních číslech se počet neuronů v subpalliu pohybuje od 3,4 milionu u vousáka žlutokostřecového (*Pogoniulus bilineatus*) a 3,5 milionu u hrdličky kapské (*Oena capensis*) po více jak půl miliardy neuronů (542 M) u ary ararauny (*Ara ararauna*). Nejmenší počet neuronů v palliu má opět hrdlička kapská (15 M) a nejvíce ara ararauna, a to skoro dvě miliardy neuronů (1,917 M).

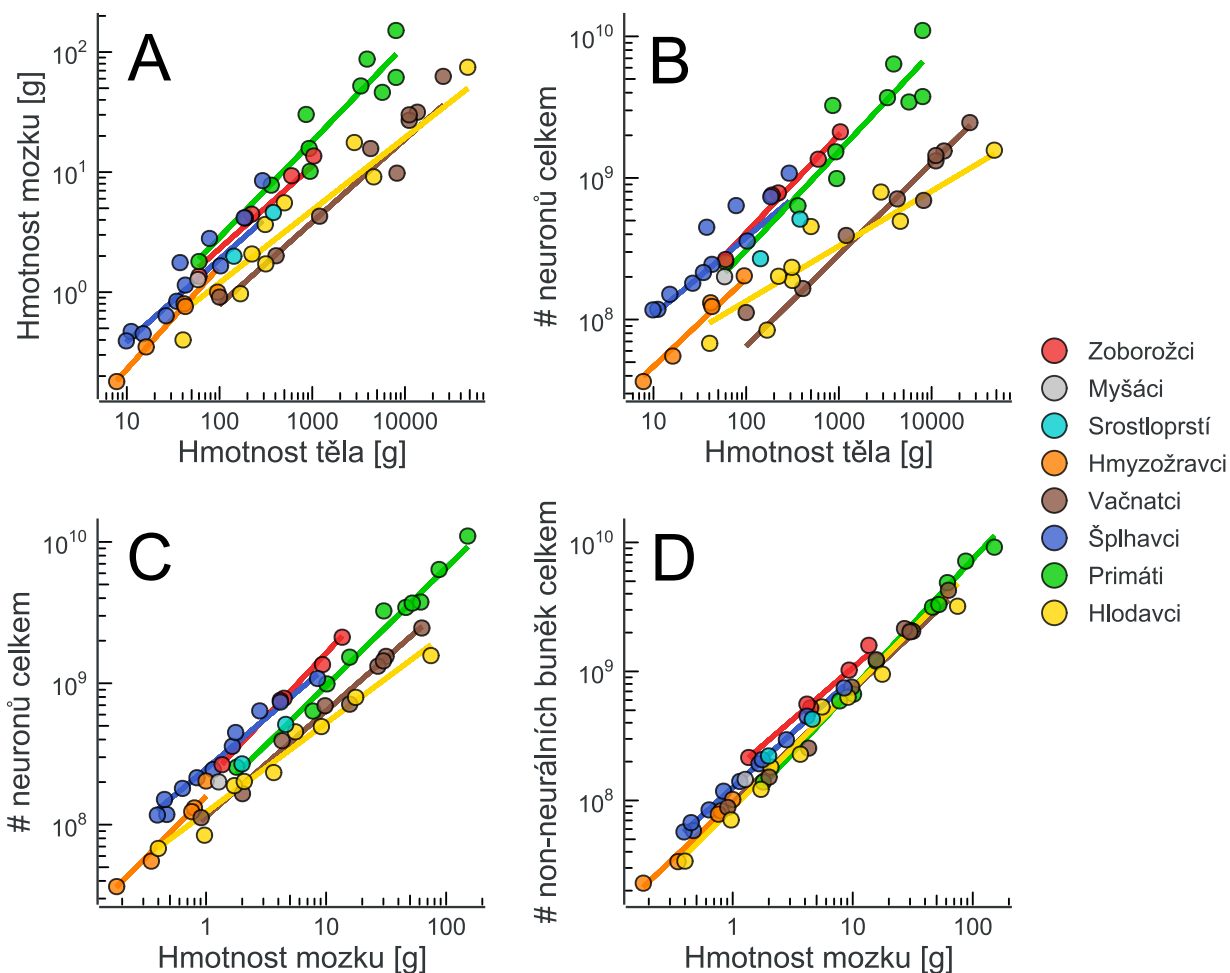


Obr. 24: Vztah mezi počtem neuronů pallia a subpallia u všech analyzovaných skupin

4.2 POROVNÁNÍ SE SAVCI

Mozky zoborožců a šplhavců mají tendenci obsahovat vyšší počet neuronů než stejně velké mozky hlodavců, vačnatců, hmyzožravců i primátů (Graf 25C). Například myš domácí (*Mus musculus*) má stejně velký mozek jako vousák bělovousý (*Pogoniulus coryphaea*), vousák však má přibližně 2× tolik neuronů. Strakapoud velký (*Dendocopos major*) má stejný počet neuronů (necelých 640 M) jako kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*), jeho mozek je však 3× menší. Dále například mirikina obecná (*Aotus trivirgatus*) má sice o 2 gramy větší mozek než zoborožec šedolící (*Bycanistes brevis*), zoborožec má ale v mozku o půl miliardy více neuronů. Relativní velikost mozku zoborožců a šplhavců se signifikantně liší od vačnatců a hlodavců ($p \leq 0,03$), nikoliv však od primátů a hmyzožravců ($p \geq 0,93$; Graf 25A). Počet neuronů na jednotku hmotnosti těla u zoborožců a šplhavců podobný jako u primátů (v obou případech $p \geq 0,93$; Graf 25B). Celkové počty non-

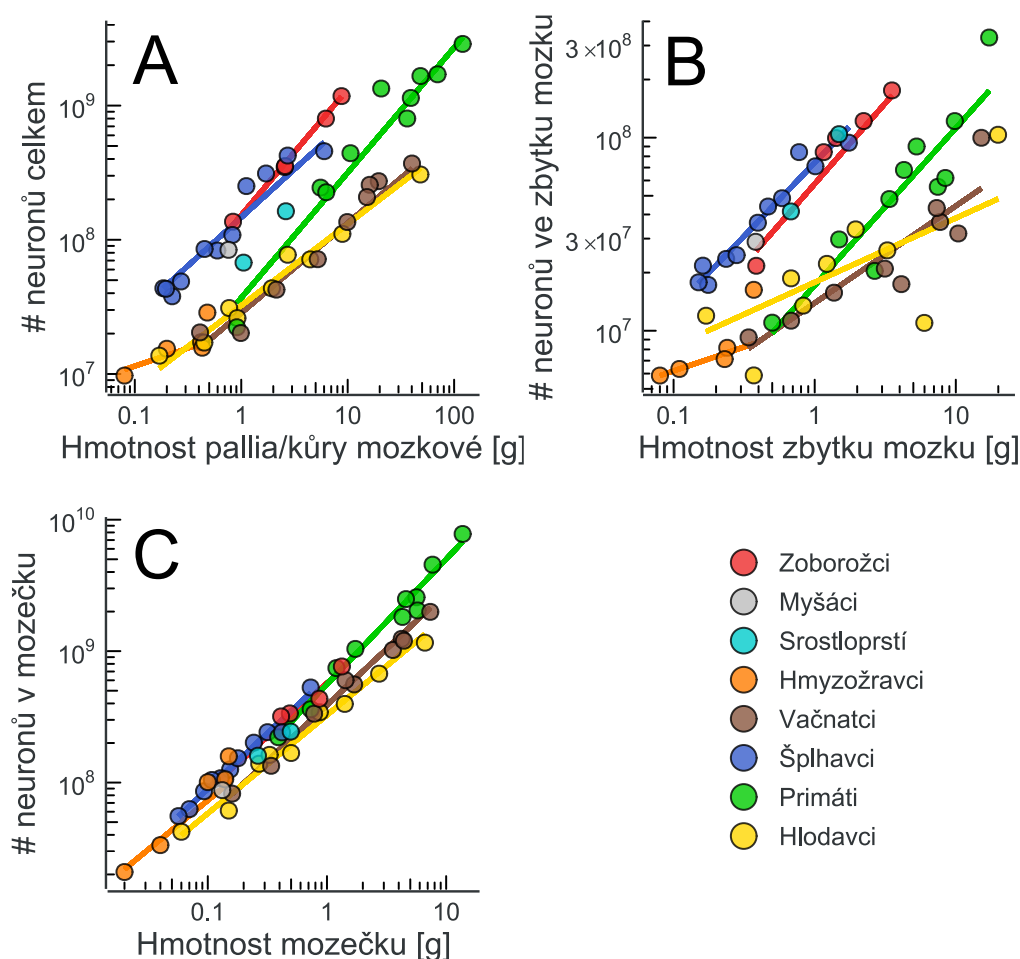
neurálních buněk a jejich pravidla škálování se mezi skupinami významně neliší ($p \geq 0,095$ ve všech případech; Graf 25D). Přesto můžeme vidět, že zoborožci mají nejvyšší celkové počty non-neurálních buněk, stejně jako ve srovnání s ostatními ptačími skupinami (Obr. 21D).



Obr. 25: Srovnání se savci. Vztah mezi hmotnostmi těla a hmotností mozku (A), respektive počtem neuronů (B). Vztah mezi velikostí mozku a počtem neuronů (C), respektive počtem non-neurálních buněk (D).

Hlavním rozdílem mezi mozky savců a ptačích skupin analyzovaných v této diplomové práci je výrazně vyšší počet neuronů v palliu (resp. vyšší hustoty neuronů) oproti mozkové kůře savců (Obr. 26A). Pallium zoborožců obsahuje 44–59 % všech neuronů mozku, pallium šplhavců 27–58 %, pallium srostloprstých 25 % a 32 % a pallium myšáka 42 %. Mozková kůra primátů obsahuje 9–44 % všech neuronů mozku. V absolutních číslech má pallium zoborožce šedolícího (1,117 M; *Bycanistes brevis*) podobný počet neuronů v palliu jako malpa hnědá (*Sajapus apella*) v mozkové kůře (1,140 M). Nebo například strakapoud (312 M; *Dendrocopos major*) má stejně neuronů v palliu jako kapybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) v mozkové kůře (307 M), její mozek je ale 27× větší a váží 75 gramů, zatímco mozek strakapouda váží pouhých 2,8 gramu. Podobná situace je i ve zbylých částech mozku (mozkový kmen + střední mozek + mezimozek), kde jsou opět hustoty

neuronů vyšší u zoborožců a šplhaviců oproti všem vybraným skupinám savců (Obr. 26B). Naopak počty neuronů (resp. hustoty neuronů) v mozečku jsou u zoborožců a šplhaviců podobné těm u primátů, hmyzožravců a vačnatců (ve všech případech $p \geq 0,62$) a liší se pouze od hlodavců ($p = 0,047$; Obr. 26C).

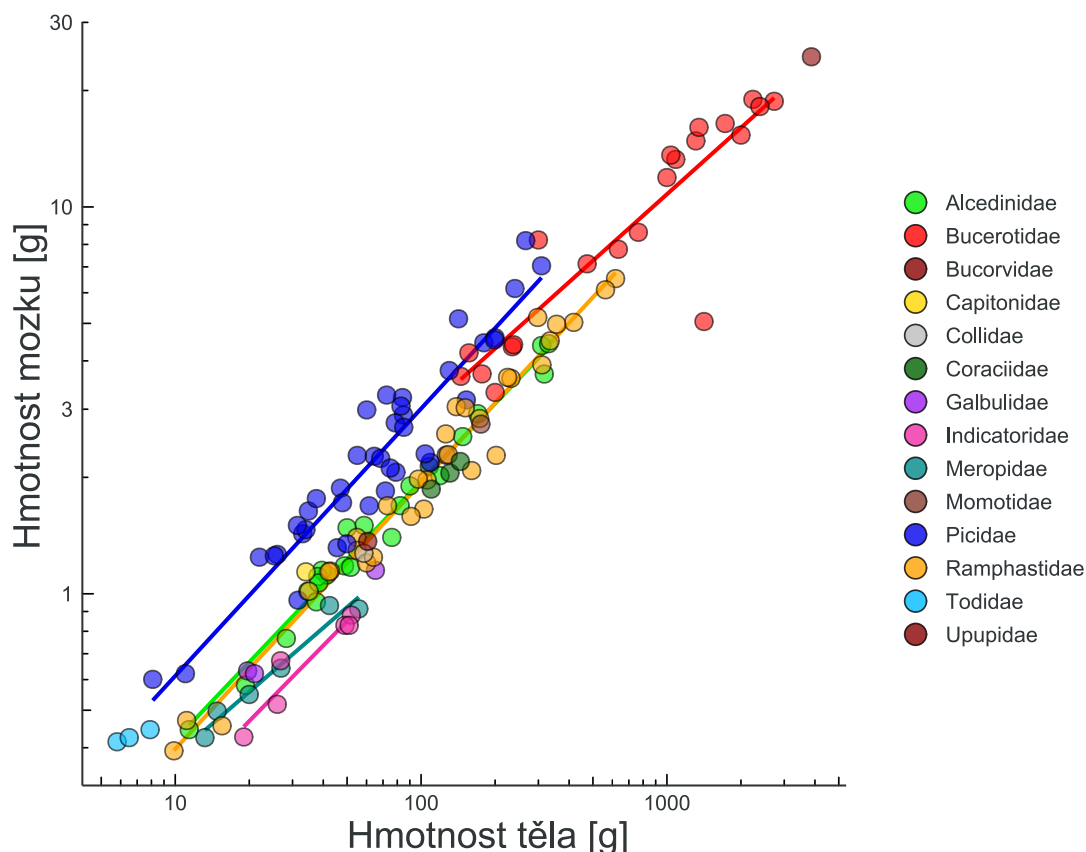


Obr. 26: Srovnání se savci. Škálování neuronů (A) v palliu/kůře mozkové, (B) zbylých částech mozku (C) a mozečku u zoborožců, šplhaviců, primátů, hmyzožravců, vačnatců a hlodavců.

4.3 VELIKOST MOZKU A TĚLA

Mezi nejvíce encefalizované skupiny ptáků patří zcela jednoznačně papoušci (*Psittaciformes*), sovy (*Strigiformes*), z pěvců především čeled' krkavcovití (*Corvidae*) a lemčící (*Ptilonorhynchidae*), ze skupiny *Coraciimorphae* především datlovití (*Picidae*) a zoborožci (*Bucerotiformes*), nicméně u různých skupin docházelo ke zvětšení mozku jinými způsoby (Straková, 2018; Ksepka *et al.*, 2020). Zatímco u papoušků a datlovitých v evoluci docházelo především ke zmenšování velikosti těla při zachování velikosti mozku, u zoborožců docházelo k nepoměrnému zvětšování mozku při zvětšování těla, podobně jako např. u výše zmíněných čeledí pěvců. Signifikantní rozdíly v encefalizaci mezi čeledí *Picidae* a zbylými skupinami řádu šplhaviců byly zachyceny i v této

diplomové práci (Obr. 8A; srovnání s dostupnou literaturou viz Obr. 27). Hrabaví (*Galliformes*) a holubi (*Columbimorphae*) naopak patří mezi méně encefalizované ptáky, společně s potápkami (*Podicipediformes*), stepokury (*Pteroclidiformes*) a samozřejmě všemi paleognátními skupinami mimo kiwiho, u kterého došlo k výrazné redukci tělesné hmotnosti.



Obr. 27: Vztah velikosti těla a mozku u čeledi skupiny *Coraciimorphae*. Relativně nejmenší mozky mají medozvěstky z řádu šplhavců a vlhy z řádu srostloprstých (OLS regrese; data ex Straková, 2018).

4.4 ŠKÁLOVÁNÍ NEURONŮ

Analýza buněčného složení mozku 11 druhů šplhavců a 5 druhů zoborožců ukázala, že alometrické vztahy mezi velikostí mozku a počtem neuronů v celém mozku se mezi těmito skupinami neliší. Výsledky buněčného složení mozku mandelíka hajního (*Coracias garrulus*) a ledňáka obrovského (*Dacelo novaeguinae*) naznačují, že srostloprstí by mohli škálovat poněkud odlišně od zoborožců a šplhavců, a proto by na tuto skupinu měla být v budoucnu zaměřena pozornost.

Alometrické vztahy mezi velikostí mozku a počtem neuronů u zoborožců (Tab. 3.1) a šplhavců (Tab. 3.2) definovaných v této diplomové práci mohou být využity pro odhad počtu neuronů i u dalších zástupců těchto skupin, u kterých známe hmotnost mozku. Například druhý největší zástupce řádu zoborožců je zoborožec havraní (*Bucorvus abyssinicus*) a jeho mozek váží 24,44 g (Straková, 2018). Podle škálování mezi hmotnostmi mozku a počtem neuronů můžeme usuzovat, že

takhle velký mozek zoborožce by obsahoval zhruba 3,6 miliardy neuronů (3,610 M). Nebo například 18,75g mozek dvojzoborožce žlutozobého (*Buceros bicornis*; Straková, 2018) by mohl obsahovat více jak 3 miliardy neuronů (3,084 M). Pro srovnání mozek ary ararauny (*Ara ararauna*) obsahuje 3,1 miliardy neuronů (3,136 M; Olkowicz *et al.*, 2016), podle alometrického vztahu mezi hmotností mozku a počtem neuronů by však 24,7g mozek ary hyacintového (*Anodorhynchus hyacinthinus*; Straková, 2018) obsahoval skoro 4,3 miliardy neuronů (4,264 M). Tato čísla jsou v silném kontrastu v porovnání s největšími zástupci holubů a hrabavých. Mozek korunáče vějířového (*Goura victoria*; 5,9 g) obsahuje necelých 579 milionů neuronů (Marhounová *et al.*, v přípravě) a mozek hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*; 9 g) 653 milionů neuronů (Kocourek *et al.*, v přípravě).

4.5 POČTY NEURONŮ A JEJICH DISTRIBUCE

Výsledky této diplomové práce demonstrují, že mozky zoborožců a šplhavců dosahují podobných celkových počtů neuronů jako stejně velké dříve studované mozky pěvců a papoušků (Olkowicz *et al.*, 2016). Výjimkou jsou zde zástupci srostloprstých ptáků – mandelík hajní (*Coracias garrulus*) a ledňák obrovský (*Dacelo novaeguinae*), kteří mají podstatně nižší počty neuronů a do budoucna by bylo dobré zanalyzovat větší počet druhů tohoto řádu. Současná data a předběžná data pro sovy a dravce naznačují, že vysoké počty neuronů by mohly být společným znakem celé skupiny *Telluraves*. Pro ověření této hypotézy bude zapotřebí zanalyzovat dostatečné množství mozků sov, dravců a sokolů. Dramatické rozdíly v počtu neuronů jsou však patrné při porovnání s hrabavými (Kocourek *et al.*, v přípravě) a holuby (Marhounová *et al.*, v přípravě). Mozky hrabavých a holubů dosahují signifikantně nižších celkových počtů neuronů než zoborožci, šplhavci, papoušci a pěvci.

U všech dosud analyzovaných skupin roste s velikostí mozku hmotnostní podíl koncového mozku, tento trend je však u holubů a hrabavých daleko méně výrazný než u korunových skupin (Obr. 22A). Proporčně zvětšující se koncový mozek se však u holubů a hrabavých nepromítá do zvýšeného podílu neuronů v něm obsažených (Obr. 22E). Naproti tomu u korunových skupin s rostoucí hmotností koncového mozku dramaticky roste podíl neuronů. Signifikantně nižší počet neuronů (resp. hustoty neuronů) v koncovém mozku hrabavých a holubů mohou být zásadním limitujícím faktorem pro kognitivní schopnosti u těchto skupin. Zvětšení koncového mozku u korunových skupin je spjato prodloužením neurogeneze do doby po vyklubání z vejce, u altriciálních skupin ptáků je to pravděpodobně zásadní faktor ovlivňující nejen velikost mozku, ale i zvýšené počty neuronů (Charvet & Striedter, 2011). Vskutku neurogeneze u hrabavých ptáků končí během časné embryogeneze, zatímco u pěvců a papoušků je značně prodloužená (Charvet & Striedter, 2009; Striedter & Charvet, 2008). Starší studie zabývající se vývojem mozku u holubů

a pěvců demonstrují, že neurogeneze je u holubů ukončena oproti pěvcům mnohem dříve (Starck, 1993). To naznačuje, že k dosažení vysokých počtů neuronů a neuronálních hustot samotná altricialita prostě nestačí.

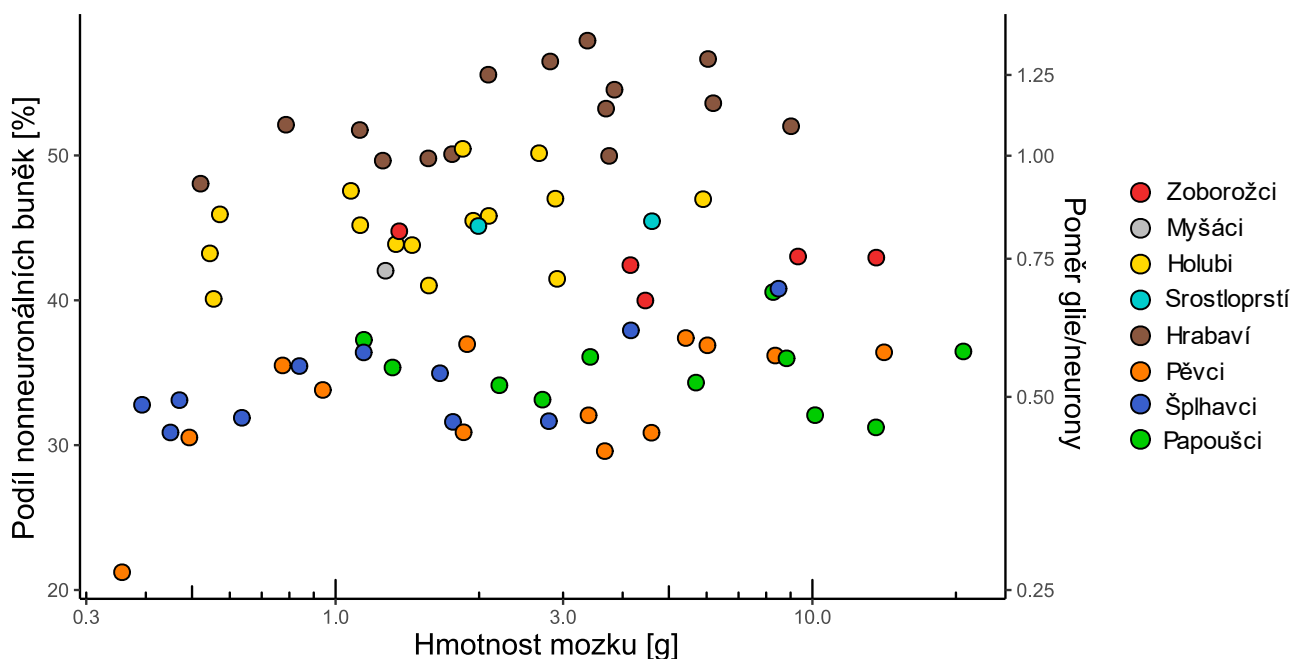
U zoborožců, šplhavců, pěvců a papoušků hmotnostní podíl mozečku na celkové hmotnosti mozku klesá, stejně tak klesá i podíl neuronů alokovaných do této části mozku. U holubů a hrabavých je situace jiná. Zatímco hmotnostní podíl mozečku se s velikostí mozku nemění, podíl neuronů v mozečku roste. Výraznější je tento trend u holubů, kteří mají i vyšší absolutní počty neuronů než hrabaví. Drtivá většina hrabavých není tak schopna dlouhého a setrvalého letu (Coles, 2009), pouze několik druhů je schopných dlouhého letu a migrace na delší vzdálenost, jako například křepelky (Hosner et al., 2017), a to díky malé hmotnosti těla a relativně větší ploše křídel. Oproti hrabavým jsou holubi výborní letci s vynikajícími manévrovacími schopnostmi (Forshaw & William, 2015). Z analýz vyplývá, že právě stěhovavá křepelka polní (*Coturnix coturnix*) dosahuje výrazně vyšších počtů neuronů v mozečku, než by se dalo očekávat z alometrie pro celou skupinu (Obr. 22D). Stejnými outliery jsou však i frankolín obecný (*Francolinus francolinus*), bažant obecný (*Phasianus colchicus*) či perlička obecná (*Numida meleagris*). Recentně bylo u hrabavých demonstrováno, že s velikostí mozečku roste velikost Purkyňových buněk (Cunha et al., 2020), mnohem rychleji však roste jejich počet. Tyto buňky jsou jediným zdrojem vystupního signálu a jako takové jsou zcela zásadní pro zpracovávání informace v mozečku (Apps & Hawkes, 2009).

I přes výše zmíněné trendy jsou počty neuronů v mozečku zoborožců, šplhavců, papoušků i pěvců vyšší než u holubů. Přibývající poznatky o mozečku poukazují na to, že hlavní úlohou mozečku není pouze vysoká procesní kapacita, koordinace pohybu a motorické učení (Butler & Hodos, 2005; Wylie et al., 2018), ale že fungování mozečku a koncového mozku je spřaženo více, než se dříve myslelo (Gutiérrez-Ibáñez et al., 2018; Pidoux et al., 2018; Hull, 2020), stejně jako u savců (Barton, 2012; Sokolov et al., 2017; Smaers et al., 2018). Mozeček tak pravděpodobně zabezpečuje různé typy učení a podílí se na široké škále behaviorálních a kognitivních procesů. Vyšší počty neuronů v mozečku zoborožců, šplhavců, papoušků a pěvců by tak mohly zrcadlit vyšší počty neuronů v koncovém mozku.

4.6 NON-NEURÁLNÍ BUŇKY

Mozky zoborožců obsahují více non-neurálních buněk než stejně velké mozky ostatních dosud analyzovaných ptačích skupin (Obr. 8D, 28D) a vybraných skupin savců (Obr. 25D). Škálování non-neurálních buněk se tak může lišit mezi skupinami, ale je mnohem striktnější než škálování neuronů (Obr. 21C, 25C). Vzhledem k vysokým hustotám neuronů v koncovém mozku a mozečku

u pěvců, šplhaviců, papoušků i zoborožců je poměr non-neurálních buněk ku neuronům vychýlen na stranu neuronů (Obr. 28) (pěvci: 0,27–0,60; šplhavci: 0,46–0,69; papoušci: 0,31–0,41; zoborožci: 0,67–0,81). U holubů (0,67–1,02) a hrabavých (0,92–1,31) je tento poměr buď vyrovnaný, nebo naopak vychýlen na stranu non-neurálních buněk. Hrabaví jsou tak jediná skupina, u které většinu mozkových buněk tvoří non-neurální buňky (50–58 %), zatímco u všech ostatních převažují neurony nad non-neurálními buňkami (Obr. 28). Poměr non-neurálních buněk vůči neuronům roste s velikostí mozku u všech analyzovaných skupin. Hustoty non-neurálních buněk jsou ve všech částech velmi podobné s výjimkou koncového mozku, v kterém jsou hustoty non-neurálních buněk podstatně nižší. Tento znak charakterizuje všechny dosud analyzované ptačí řády.



Obr. 28: Podíl non-neurálních buněk v celém mozku a jejich poměr s neurony u zoborožců, šplhaviců, srostloprstých, pěvců, papoušků, myšáka, holubů a hrabavých.

4.7 SUBPALLIUM A PALLIUM

Přestože subpallium tvoří menší část koncového mozku, jeho role není zanedbatelná. Jednotlivé části subpallia jsou plně homologické k odpovídajícím strukturám u savců (Reiner et al., 2004) a stejně jako u savců disponují řadou neurálních systémů, jež zabezpečují celou škálu funkcí zásadních pro přežití jak jednotlivce tak druhu (review viz Kuenzel et al., 2011). Subpallium zajišťuje některé motorické funkce, ale hraje klíčovou roli například i při námluvách nebo imprintingu a zásadním způsobem ovlivňuje sexuální, impulzivní či agresivní chování. Subpalliální část amygdaly je hlavním příjemcem čichové informace a reguluje chování související se stresem, strachem a úzkostí. Zpěvná jádra jsou pak zcela nezbytná při učení zpěvu a později při jeho modulaci v dospělosti.

Subpallium se však účastní i velmi komplexních procesů jako je například motivační učení skrze odměnu v podobě potravy (review viz Kuenzel et al., 2011).

Subpallium zaujímá podobnou část koncového mozku (9–22 %) u všech dosud analyzovaných skupin ptáků (podrobně viz kap. 4.1). Subpallium zoborožců, šplhavců a pěvců roste s velikostí mozku pomaleji než pallium. U papoušků, holubů a hrabavých roste subpallium i pallium víceméně izometricky. U všech skupin však narůstá počet neuronů v palliu rychleji než v subpalliu, jedinou výjimkou jsou papoušci, u nichž se zvětšujícím se koncovým mozkiem přibývá počet neuronů výrazně rychleji v subpalliu než v palliu (Obr. 24). Subpallium papoušků, hrabavých a holubů tak obsahuje relativně více neuronů v porovnání se zoborožci, šplhavci a pěvci. Škálování neuronů subpallia a pallia je pravděpodobně do jisté míry taxonově-, nebo dokonce druhově-specifické. Relativně vyšší počet neuronů v subpalliu u papoušků by mohl být vysvětlen masivnějším propojením mozečku a subpallia a jeho rolí ve vokálním učení (Chakraborty & Jarvis, 2015; Bradbury & Balsby, 2016; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2018).

Pallium tvoří převážnou část koncového mozku. Podrobná analýza buněčného složení devíti částí pallia u čtyř druhů zoborožců, ledňáka a datla ukázala, že drtivou většinu koncového mozku (64–72 %) tvoří nidopallium a mesopallium (Obr. 18B). Obě tyto oblasti jsou považovány za hlavní asociační centra ptačího mozku, jež zodpovídají za zpracování informací vyššího řádu a největším dílem přispívají k ptačí kognici, učení a paměti (Güntürkün & Bugnyar, 2016). Vzhledem k vyšším hustotám neuronů v mesopalliu a nidopalliu (viz Výsledky, kap. 3.5), obsahují tyto oblasti 70–79 % (Obr. 18B) všech neuronů koncového mozku, resp. 78–86 % palliálních neuronů. Kaudální část nidopallia, *nidopallium caudolaterale* (NCL), je dnes považována za funkční analog savčího prefrontálního kortexu (PFC) (Güntürkün, 2005; Nieder, 2017). PFC je poměrně variabilní struktura, která se liší nejen v relativní a absolutní velikosti, ale například i v počtu podjednotek (Passingham & Wise, 2012; Kaas, 2019). Kupříkladu dorzolaterální části PFC u primátů nejsou přítomny u hlodavců (Carlén, 2017). Recentní analýzy ptačího nidopallia demonstrují, že stavba NCL se může zcela zásadně lišit mezi různými ptačími taxony, a to jak v umístění, tak počtu nalezených podjednotek (von Eugén et al., 2020). Prvotní analýzy tedy naznačují, že stejně jako v případě savců, bude i u ptáků stavba a komplexita NCL pravděpodobně taxonově-specifická. Má data ukazují, že pallium všech šesti analyzovaných druhů je charakterizováno expanzí nidopallia a mesopallia, stejně jako u papoušků a pěvců (Iwaniuk & Hurd, 2005; Mehlhorn et al., 2010).

Zrakové dráhy jsou u ptáků (stejně jako u savců) rozlišeny na dva oddělené systémy (Kaas, 2012). Hyperpallium přijímá a zpracovává zrakovou informaci přicházející skrze thalamus přímo ze sítnice – thalamofugální zraková dráha. Druhá zraková dráha – tectofugální – projikuje ze sítnice

nejdříve do tectum opticum středního mozku a následně skrze thalamus do entopallia (Obr. 2A). Tectofugální zraková dráha je u ptáků velmi dobře vyvinuta (Butler & Hodos, 2005). Zajišťuje vnímání barev, jasů a kontur, ostrost obrazu a zaostření na přibližující se objekty (Wylie et al., 2009; Caves et al., 2018;). Pěvci disponují signifikantně vyššími počty neuronů v této části mozku než ostatní dosud analyzované skupiny (Obr. 23A). Vyšší počty neuronů v tectum opticum by tak mohly souviset s ekologií celé skupiny a mohly by stát za evolučním úspěchem této skupiny. Thalamofugální zraková dráha zachycuje hloubku prostoru a pohyb a umístění objektů v něm, napomáhá tedy orientaci (Watanabe, et al., 2011), podílí se na nočním vidění (Mouritsen et al., 2005; Pettigrew, 1979), hraje důležitou roli v imprintingu (Maekawa et al., 2006) a pravděpodobně se účastní magnetorecepce a zrakem řízené navigace (Mouritsen et al., 2005). Wulst je velmi dobře vyvinut u druhů s noční aktivitou a stereoskopickým binokulárním viděním. Extrému bylo v evoluci dosaženo u sov, kde je hyperpallium hypertrofované a může zabírat až třetinu celého koncového mozku (Pettigrew, 1979). Relativně velké hyperpallium však je například i u lelčků (*Aegothelidae*) a lelounů (*Podargidae*) (Iwaniuk & Wylie, 2006). Hyperpallium zoborožců obsahuje 10–15 % neuronů koncového mozku, podobně 13,5 % u datla černého, ale pouhá 4 % neuronů u ledňáka obrovského (Obr. 11). Předběžná data pro dravce ukazují, že hypertrofovaná hyperpallia sov mohou obsahovat až 44 % všech neuronů koncového mozku (nepublikovaná data). Podle mých předpokladů je hyperpallium jedna z nejvariabilnějších částí koncového mozku a jeho velikost a počet neuronů v něm obsažených bude reflektovat ekologii dané skupiny či druhu. Taktéž je pravděpodobné, že existuje částečné trade-off mezi počtem neuronů v hyperpalliu a tectum opticum středního mozku, což je velmi dobře vidět na příkladu ledňáka obrovského. Wulst a tectum opticum jsou prominentními oblastmi ptačího mozku viditelné pouhým okem, tudíž velikost těchto dvou částí mozku může být užitečným nástrojem pro rekonstrukci ekologie daného druhu ve fosilním záznamu (Early et al., 2020)

Interpretace dat pro menší části koncového mozku jako jsou arcopallium, hippocampus či entopallium je značně obtížná. Entopallium je receptivní oblast tectofugální zrakové dráhy v nidopalliu. Recentně bylo demonstrováno, že entopallium má laminární uspořádání a uspořádání do sloupců (Ahumada-Galleguillos et al., 2015; Jarvis et al., 2013; Stacho et al., 2020), podobně jako neokortex u savců. Arcopallium přijímá nejrůznější signály z ostatních částí pallia a projikuje do motorických systémů mozkového kmene, zároveň však jeho kaudomediální část funguje jako amygdala u savců (Güntürkün et al., 2017). Hipokampus zasahuje částečně do dorzomediální části Wulstu a účastní se procesu prostorové paměti a učení (Yaskin, 2011). Relativně větší hipokampus nalezneme typicky u druhů, které si skladují potravu, např. sojek, brhlíků nebo sýkor (Sherry

& Hoshooley, 2009), ale například i u kolibříků (Ward et al., 2012), nebo u holubů v souvislosti s homingem (Bingman et al., 2005). U severoamerických sýkorek (*Poecile atricapillus*) bylo demonstrováno nejen, že se v rámci ročních období mění celková velikost hipokampu, ale že dochází ke každoroční sezónní neurogenezi a následné migraci neuronů do hipokampu (Barnea & Nottebohm, 1994), přičemž tento nový přírůstek neuronů je striktně omezen pouze na hipokampus. Navyšování počtu neuronů v hipokampu před migrací bylo recentně demonstrováno i u písíka amerického (*Actitis macularius*) (Guerreiro et al., 2021). Počet neuronů v hipokampu by tak mohl být závislý na ekologii daného druhu. Moje data ukazují nižší hustoty neuronů v hipokampu i arcopalliu oproti zbylým částem mozku, ale ne natolik nízké jako v entopalliu (viz Výsledky, kap. 3.5).

Nejmenším oddílem pallia jsou jednoznačně čichové laloky (Obr. 18A), které tvoří méně jak 0,3 % hmotnosti koncového mozku, a ještě menší podíl neuronů (<0,003 %) u všech analyzovaných druhů (Výsledky, kap. 3.6). Ancestrální stav jsou relativně velké čichové laloky. Odvozené skupiny jako jsou papoušci a pěvci mají naopak čichové laloky malé, stejně jako zoborožci a šplhavci (s výjimkou medozvěstek, u kterých ale pallium nebylo podrobněji studováno). Naopak velké čichové laloky najdeme u běžců, kachen a krátkokřídlých, ale také například u holubů, kondorů a mořských ptáků (Corfield et al., 2015; Grigg et al., 2017). U savců platí, že největší čichové laloky mají skupiny terestrické a u akvatických skupin čichové laloky prakticky mizí (Pihlström, 2008). Naše předběžná data ukazují, že přestože čichové laloky zabírají poměrně malou část koncového mozku, mohou obsahovat relativně velké množství neuronů. Čichové laloky lysky černé (*Fulica atra*) a slípky zelenonohé (*Gallinula chloropus*) tvoří necelá 2 % hmotnosti koncového mozku a obsahují 3,5 %, u slípky dokonce přes 5 % neuronů koncového mozku (nepublikovaná data). Zde je však nutné zmínit, že protilátka použitá v této diplomové práci (anti-NeuN) není schopna detekovat mitrální buňky čichového laloku (Mullen et al., 1992), tudíž jsou tyto výsledky pravděpodobně velmi silně podhodnoceny (viz 2.4 Metodika). Recentně bylo demonstrováno, že kondor krocanovitý (*Cathartes aura*) disponuje násobným množstvím mitrálních buněk v čichových lalocích ve srovnání s kondorem havraním (*Coragyps atratus*) (viz Grigg et al., 2017)

4.3 KOGNITIVNÍ SCHOPNOSTI

Papoušci (*Psittaciformes*) a krkavcovití ptáci (*Corvidae*) patří mezi nejstudovanější ptačí skupiny (Güntürkün & Bugnyar, 2016), které v mnoha ohledech dosahují velmi podobných kognitivních schopností jako primáti (De Blois et al., 1998; Call, 2003; Emery, 2006). Jak pěvci, tak papoušci dokážou řešit poměrně komplikované úlohy. Kupříkladu nestor kea (*Nestor notabilis*) dokáže řešit

problémy vzhledem, aniž by nejdříve musel praktikovat metodu pokus-omyl (Schloegl et al., 2009), či používat k řešení problému nástroje (Auersperg et al., 2011). Výbornými řešiteli problémů jsou i zoborožci, kteří podávají v některých doménách výkony srovnatelné se šimpanzi (Danel et al., 2019) a ve vybraných úlohách (string pulling paradigm) předčí jiné ptáky, včetně puštíka vousatého (*Strix nebulosa*) a drobných pěvců (Zorina & Obozova, 2012; Obozova & Zorina, 2013).

Novokaledonská vrána (*Corvus moneduloides*) dokáže pochopit a využít poměrně složité základy hydrostatiky pro získání potravy (Jelbert et al., 2014), využívat nástroje, a dokonce je i zdokonalovat (Hunt, 1996; Hunt & Gray, 2004; Auersperg et al., 2011). Nástroje v laboratorních podmínkách dokážou využívat i druhy, jako např. krkavec velký (*Corvus corax*), sojka obecná (*Garrulus glandularius*) a kakadu Goffinův (*Cacatua goffini*) které nástroje v přirozených podmínkách běžně nepoužívají (Bird & Emery, 2009; Cheke et al., 2011; Auersperg et al., 2013, 2018). U strakapouda velkého (*Dendrocopos major*) bylo pozorováno využívání vhodných prostor mezi větvemi stromů, kam umísťuje plody ořešáku mandžudského ve specifické poloze, která umožňuje rozlousknutí ořechu (Yi et al., 2014), přičemž pokud je s ořechem jakkoli manipulováno, strakapoud ho ihned vrací do polohy určené k otevření skořápky. Inovativní chování nacházíme i u vodních ptáků, například několik druhů volavek loví ryby na návnadu (Ruxton & Hansell, 2011). U mnohých krkavcovitých ptáků, kteří si ukládají potravu, byla prokázána existence výborné epizodické paměti (Balda & Kamil, 1989; Clayton & Dickinson, 1998). Druhy pěvců, které si ukrývají potravu, disponují relativně většími hipokampy (např. Sherry & Vaccarino, 1989), podobně jako někteří šplhavci (Volman et al., 1997), u nichž však epizodická paměť nebyla dosud testována.

Vrány domácí (*Corvus splendens*) a americké (*Corvus branchyrhynchos*), ale například i drozdci mnohohlasí (*Mimus polyglottos*), jsou schopni rozpoznat a uchovat v paměti lidský obličej (Levey et al., 2009; Marzluff et al., 2012; Zareen et al., 2016). Kakadu Goffinův (*Cacatua goffini*), vrána černá (*Corvus corone*) a krkavec velký (*Corvus corax*) jsou schopni krátkodobého plánování a sebekontroly pro získání preferované potravy (Dufour et al., 2012; Auersperg et al., 2013). Tyto schopnosti byly pozorovány pouze hominidů (Hayden & Platt, 2007). Straka obecná (*Pica pica*) dokáže rozeznat svůj vlastní obraz v zrcadle (Prior et al., 2008). Papoušek šedý (*Psittacus erithacus*) dosahuje poměrně pokročilé verbální komunikace (Pepperberg, 2002). Ale například i australská majna obecná (*Acridotheres tristis*) dokáže skvěle napodobit lidskou řeč (Hart et al., 2020).

Holubi (*Columbiformes*) a hrabaví (*Galliformes*) jsou další poměrně často zkoumané skupiny. Holubi jsou schopni s překvapivou přesností kategorizovat objekty, například určit přítomnost či absenci člověka na fotografii (Herrnstein & Loveland, 1964). Po poměrně dlouhou dobu si zapamatují více jak 700 obrazců (von Fersen & Delius, 1989), jsou schopni rozeznat malby Moneta

od Picassa, které dříve neviděli (Watanabe et al., 1995) a dokonce i takticky podvádět (Lanza et al., 1982). Stejně jako holubi, i hrabaví dokáží vyřešit celou škálu kognitivních úloh (shrnuto v Zhang, 2016; Marino, 2017).

Socialita a složitější sociální vztahy v rámci druhu jsou zcela jistě důležitým faktorem, který může výrazně ovlivnit kognitivní schopnosti jak jedince, tak i druhu; kooperativní chování (Seed et al., 2008; Péron *et al.*, 2011) a učení od druhých (Ellison et al., 2015; Klump et al., 2021) tak může být pro směřování druhu zcela zásadní. Dalším důležitými faktory může být proměnlivost a neprediktabilita klimatických podmínek (Sayol *et al.*, 2016; Fristoe et al., 2017), které mohou vyvolávat výrazné selekční tlaky na kognitivní schopnosti (Sol, 2009). Migrace může mít opačný efekt – migrující druhy se vyhnou nepříznivým obdobím, energeticky náročná migrace však může fungovat jako silné omezení pro vývoj energeticky drahých velkých mozků (Sol et al., 2005; Vincze, 2016). Nesmíme opomíjet ani domestikaci, která může výrazně ovlivnit velikost mozku, což bylo demonstrováno např. u hrabavých (Ebinger & Röhrs, 1995). Všechny tyto faktory byly studovány v souvislosti s relativní velikostí mozku a vliv těchto faktorů na počet neuronů nebyl dosud zkoumán. Přestože existuje opravdu velmi málo kognitivních studií pro zoborožce, šplhavce a srostloprsté, naše data jasně demonstrují, že minimálně šplhavci a zoborožci mohou disponovat ekvivalentními kognitivními schopnostmi jako pěvci a papoušci, s kterými sdílejí nejen vysoké počty a hustoty neuronů, ale i expandované oblasti nidopallia a mesopallia (Iwaniuk & Hurd, 2005; von Eugen *et al.*, 2020).

5 SHRNU TÍ

S použitím metody izotropní frakční homogenizace byly stanoveny počty neuronů a non-neurálních buněk ve vybraných částech mozku u 19 druhů ptáků zahrnujících zoborožce (*Bucerotiformes*), šplhavce (*Piciformes*), srostloprsté (*Coraciiformes*) a myšáka (*Coliiformes*). Absolutní počty neuronů, jejich hustoty, poměr neuronů a non-neurálních buněk a jejich škálování byly srovnány se stejnými daty u vybraných skupin savců (konkrétně primátů, hlodavců, hmyzožravců a vačnatců) a ptáků (konkrétně pěvců, papoušků, holubů a hrabavých). Hlavní výsledky této diplomové práce lze shrnout následovně:

(1) Hmotnost mozku zoborožců a šplhavců roste, stejně jako u ostatních skupin obratlovců, negativně alometricky s hmotností těla (směrnice regresní přímky $\sim 0,75$ pro obě skupiny).

(2) Vztahy mezi velikostí mozku a počtem neuronů u zoborožců a šplhavců se neliší od škálování neuronů u pěvců a papoušků, ale signifikantně se liší od hrabavých a holubů.

(3) Největším oddílem mozku je koncový mozek, jehož hmotnostní podíl se s rostoucí velikostí mozku zvětšuje. Tento rys je společný pro všechny dosud analyzované ptačí skupiny, nicméně u holubů a hrabavých tento trend není natolik výrazný. Podíl neuronů alokovaných do koncového mozku se s velikostí mozku zvětšuje u zoborožců, šplhavců, pěvců i papoušků. Tento trend však chybí u holubů a hrabavých.

(4) Velikost mozečku a počet neuronů v něm obsažených klesá s velikostí mozku u všech korunových skupin. U hrabavých a holubů se velikost mozečku s velikostí mozku výrazně nemění a počet neuronů s velikostí mozku naopak roste.

(5) I přes výše zmíněné trendy, nedosahují holubi ani hrabaví vyšších počtů neuronů než zoborožci, šplhavci, pěvci či papoušci v žádné z analyzovaných částí mozku.

(6) Subpallium zaujímá menší část koncového mozku zoborožců, šplhavců, srostloprstých i myšáka, stejně jako u ostatních dosud analyzovaných skupin. Podobně jako u pěvců roste se zvětšujícím se koncovým mozkem pallium zoborožců a šplhavců rychleji než subpallium, a také v něm přibývá více neuronů. Velikost subpallia a počet neuronů v něm obsažených jsou pravděpodobně taxonově-specifické.

(7) Podrobná analýza buněčného složení pallia u zoborožců, datla černého a ledňáka obrovského ukázala, že nidopallium a mesopallium, jež jsou považovány za hlavní asociační centra ptačího mozku, obsahují 70–79 % všech neuronů koncového mozku.

(8) Poměr neuronů a non-neurálních buněk u zoborožců a šplhavců je, podobně jako u pěvců a papoušků, výrazně vychýlen ve prospěch neuronů. U holubů a srostloprstých je tento poměr

spíše vyrovnaný, zatímco hrabaví jsou jediná skupina, u které tvoří non-neurální buňky (50–58 %) většinu mozkových buněk.

(9) Hustoty non-neurálních buněk jsou ve všech strukturách víceméně stejné u všech analyzovaných skupin. Výjimkou je koncový mozek, kde jsou hustoty non-neurálních buněk nižší. Mozky zoborožců obsahují signifikantně více non-neurálních buněk v koncovém mozku oproti jiným skupinám. Nižší hustoty non-neurálních buněk v koncovém mozku obecně jsou pravděpodobně specifickým znakem ptačího mozku.

(10) Mozky zoborožců a šplhavců mají tendenci obsahovat více neuronů než stejně velké mozky hlodavců, vačnatců, hmyzožravců i primátů, což je způsobeno výrazně vyššími hustotami neuronů v palliu i zbylých částech mozku (vyjma mozečku). Většina neuronů u zoborožců je alokována do hemisfér koncového mozku, zatímco u savců je většina neuronů v mozečku.

Výsledky této diplomové práce přinesly první data o buněčném složení mozku šplhavců, zoborožců a srostloprstých ptáků. Data pro zoborožce a šplhavce jasně ukazují, že vysoké počty neuronů nejsou výsadou pouze pro pěvce či papoušky. Právě naopak, data naznačují, že šplhavci a zoborožci mají potenciál vykazovat srovnatelné kognitivní schopnosti jako papoušci či krkavcovití ptáci. Analýza buněčného složení mozku dvou druhů srostloprstých naznačila, že by tato skupina mohla s neurony škálovat zcela odlišně. Do budoucna bude zapotřebí zanalyzovat více druhů z této skupiny. Počet neuronů, jejich hustota a počet synapsí jsou třemi základními faktory, které klíčovým způsobem ovlivňují procesní kapacitu mozku. Počty neuronů představují nejlepší dostupné proxy, jelikož stále neexistuje metoda, která by umožnila efektivní kvantifikaci a mapování synapsí u většího množství fylogeneticky vzdálených druhů. Kvantifikace počtu neuronů v celých mozcích a jejich částech je rovněž v začátcích, data existují pouze pro velmi omezený počet savců a ptáků. Pro drtivou většinu ptačích řádů žádná kvantitativní data nemáme.

POUŽITÁ LITERATURA

- Ahumada-Galleguillos, P., Fernández, M., Marin, G. J., Letelier, J. C., & Mpodozis, J. (2015). Anatomical organization of the visual dorsal ventricular ridge in the chick (*Gallus gallus*): Layers and columns in the avian pallium. *Journal of Comparative Neurology*, 523(17), pp. 2618–2636.
- Apps, R., & Hawkes, R. (2009). Cerebellar cortical organization: A one-map hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), pp. 670–681.
- Ariëns Kappers, C. U., Huber, C. G. & Crosby, E. C. (1936) Comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. *New York: Macmillan* (ex Striedter, 2005; Jarvis *et al.*, 2005).
- Atoji, Y., Sarkar, S., & Wild, J. M. (2016). Proposed homology of the dorsomedial subdivision and V-shaped layer of the avian hippocampus to Ammon's horn and dentate gyrus, respectively. *Hippocampus*, 26(12), pp. 1608–1617.
- Atoji, Y., & Wild, J. M. (2006). Anatomy of the Avian Hippocampal Formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17(1–2), pp. 3–15.
- Atoji, Y., & Wild, J. M. (2012). Afferent and efferent projections of the mesopallium in the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Comparative Neurology*, 520(4), pp. 717–741.
- Auersperg, A. M. I., Köck, C., O'Hara, M., & Huber, L. (2018). Tool making cockatoos adjust the lengths but not the widths of their tools to function. *PLoS ONE*, 13(11), pp. 1–16.
- Auersperg, A. M. I., Laumer, I. B., & Bugnyar, T. (2013). Goffin cockatoos wait for qualitative and quantitative gains but prefer “better” to “more.” *Biology Letters*, 9(3).
- Auersperg, Alice M. I., von Bayern, A. M. P., Gajdon, G. K., Huber, L., & Kacelnik, A. (2011). Flexibility in problem solving and tool use of kea and new caledonian crows in a multi access box paradigm. *PLoS ONE*, 6(6).
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(5), pp. 532–541.
- Balanoff, A. M., Bever, G. S., Colbert, M. W., Clarke, J. A., Field, D. J., Gignac, P. M., Ksepka, D. T., Ridgely, R. C., Smith, N. A., Torres, C. R., Walsh, S., & Witmer, L. M. (2016). Best practices for digitally constructing endocranial casts: examples from birds and their dinosaurian relatives. *Journal of Anatomy*, 229(2), pp. 173–190.
- Balda, R. P., & Kamil, A. C. (1989). A comparative study of cache recovery by three corvid species. *Animal Behaviour*, 38(3), pp. 486–495.
- Barnea, A., & Nottebohm, F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adults free-ranging black-capped chickadees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp. 11217–11221.
- Barton, R. A. (2012). Embodied cognitive evolution and the cerebellum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1599), pp. 2097–2107.
- Belgard, T. G., Montiel, J. F., Wang, W. Z., Garcia-Moreno, F., Margulies, E. H., Ponting, C. P., & Molnar, Z. (2013). Adult pallium transcriptomes surprise in not reflecting predicted homologies across diverse chicken and mouse pallial sectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), pp. 13150–13155.
- Benson-Amram, S., Dantzer, B., Stricker, G., Swanson, E. M., & Holekamp, K. E. (2016). Brain size predicts problem-solving ability in mammalian carnivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), pp. 2532–2537.
- Bingman, V. P., Gagliardo, A., Hough, G. E., Ioalé, P., Kahn, M. C., & Siegel, J. J. (2005). The avian hippocampus, homing in pigeons and the memory representation of large-scale space. *Integrative and Comparative Biology*, 45(3), pp. 555–564.
- Bird, C. D., & Emery, N. J. (2009). Insightful problem solving and creative tool modification by captive nontool-using rooks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), pp. 10370–10375.
- Bradbury, J. W., & Balsby, T. J. S. (2016). The functions of vocal learning in parrots. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(3), pp. 293–312.
- Briscoe, S. D., Albertin, C. B., Rowell, J. J., & Ragsdale, C. W. (2018). Neocortical Association Cell Types in the Forebrain of Birds and Alligators. *Current Biology*, 28(5), pp. 686–696.

- Butler, A. B., & Hodos, W. (2005). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*, 2nd Edition, US: John Wiley & Sons.
- Butler, A. B., & Molnár, Z. (2002). Development and evolution of the collopallium in amniotes: a new hypothesis of field homology. *Brain Research Bulletin*, *57*(3–4), pp. 475–479.
- Butts, T., Green, M. J., & Wingate, R. J. T. (2014). Development of the cerebellum: Simple steps to make a ‘little brain.’ *Development (Cambridge)*, *141*(21), pp. 4031–4041.
- Call, J. (2003). Spatial rotations and transpositions in orangutans (*Pongo pygmaeus*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Primates*, *44*(4), pp. 347–357.
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, *358*(6362), pp. 478–482.
- Caves, E. M., Green, P. A., Zippel, M. N., Peters, S., Johnsen, S., & Nowicki, S. (2018). Categorical perception of colour signals in a songbird. *Nature*, *560*(7718), pp. 365–367.
- Chakraborty, M., & Jarvis, E. D. (2015). Brain evolution by brain pathway duplication. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1684).
- Charvet, C. J., & Striedter, G. F. (2009). Developmental origins of mosaic brain evolution: Morphometric analysis of the developing zebra finch brain. *Journal of Comparative Neurology*, *514*(2), pp. 203–213.
- Charvet, C. J., & Striedter, G. F. (2011). Developmental modes and developmental mechanisms can channel brain evolution. *Frontiers in Neuroanatomy*, *5*(FEB), pp. 1–5.
- Cheke, L. G., Bird, C. D., & Clayton, N. S. (2011). Tool-use and instrumental learning in the Eurasian jay (*Garrulus glandarius*). *Animal Cognition*, *14*(3), pp. 441–455.
- Chen, C.-C., Winkler, C. M., Pfenning, A. R., & Jarvis, E. D. (2013). Molecular profiling of the developing avian telencephalon: Regional timing and brain subdivision continuities. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(16), pp. 3666–3701.
- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, *395*(6699), pp. 272–274.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, *30*(4), pp. 293–316.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., & Warwick, C. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, *31*(1), pp. 1–32.
- Coles, B. H. (2009). Galliformes, In *Handbook of Avian Medicine*, Saunders Ltd. Elsevier, pp. 309–334.
- Colquitt, B. M., Merullo, D. P., Konopka, G., Roberts, T. F., & Brainard, M. S. (2021). Cellular transcriptomics reveals evolutionary identities of songbird vocal circuits. *Science*, *371*(6530).
- Corfield, J. R., Price, K., Iwaniuk, A. N., Gutiérrez-Ibáñez, C., Birkhead, T., & Wylie, D. R. (2015). Diversity in olfactory bulb size in birds reflects allometry, ecology, and phylogeny. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*(JULY), pp. 1–16.
- Cunha, F., Racicot, K., Nahirney, J., Heuston, C., Wylie, D. R., & Iwaniuk, A. N. (2020). Allometric Scaling Rules of the Cerebellum in Galliform Birds. *Brain, Behavior and Evolution*, *95*(2), pp. 78–92.
- Danel, S., von Bayern, A. M. P., & Osiurak, F. (2019). Ground-hornbills (*Bucorvus*) show means-end understanding in a horizontal two-string discrimination task. *Journal of Ethology*, *37*(1), pp. 117–122.
- De Blois, S. T., Novak, M. A., & Bond, M. (1998). Object Permanence in Orangutans (*Pongo pygmaeus*) and Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). *Journal of Comparative Psychology*, *112*(2), pp. 137–152.
- Deaner, R. O., Isler, K., Burkart, J., & Van Schaik, C. (2007). Overall brain size, and not encephalization quotient, best predicts cognitive ability across non-human primates. *Brain, Behavior and Evolution*, *70*(2), pp. 115–124.
- Dicke, U., & Roth, G. (2016). Neuronal factors determining high intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1685).
- Dos Santos, S. E., Porfirio, J., da Cunha, F. B., Manger, P. R., Tavares, W., Pessoa, L., Raghanti, M. A., Sherwood, C. C., & Herculano-Houzel, S. (2017). Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as “Primitive” as Expected. *Brain, Behavior and Evolution*, *89*(1), pp. 48–63.

- Dufour, V., Wascher, C. A. F., Braun, A., Miller, R., & Bugnyar, T. (2012). Corvids can decide if a future exchange is worth waiting for. *Biology Letters*, 8(2), pp. 201–204.
- Dugas-Ford, J., Rowell, J. J., & Ragsdale, C. W. (2012). Cell-type homologies and the origins of the neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), pp. 16974–16979.
- Early, C. M., Iwaniuk, A. N., Ridgely, R. C., & Witmer, L. M. (2020). Endocast structures are reliable proxies for the sizes of corresponding regions of the brain in extant birds. *Journal of Anatomy*, 237(6), pp. 1162–1176.
- Ebinger, P., & Röhrs, M. (1995). Volumetric analysis of brain structures, especially of the visual system in wild and domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Journal für Hirnforschung*, 36(2), 219–228.
- Edinger, L. (1908). Vorlesugen über den Bau der Nervösen Zentralorgane des Menschen und der Tiere: für Ärzte und Studierende, *Leipzig: Vogel* (ex Striedter, 2005; Jarvis, 2005).
- Ellison, A. M., Watson, J., & Demers, E. (2015). Testing problem solving in turkey vultures (*Cathartes aura*) using the string-pulling test. *Animal Cognition*, 18(1), pp. 111–118.
- Emery, N. J. (2006). Cognitive ornithology: The evolution of avian intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1465), pp. 23–43.
- Fristoe, T. S., Iwaniuk, A. N., & Botero, C. A. (2017). Big brains stabilize populations and facilitate colonization of variable habitats in birds. *Nature Ecology and Evolution*, 1(11), pp. 1706–1715.
- Gabi, M., Collins, C. E., Wong, P., Torres, L. B., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2010). Cellular Scaling Rules for the Brains of an Extended Number of Primate Species. *Brain, Behavior and Evolution*, 76(1), pp. 32–44.
- García-Moreno, F., Anderton, E., Jankowska, M., Begbie, J., Encinas, J. M., Irimia, M., & Molnár, Z. (2018). Absence of Tangentially Migrating Glutamatergic Neurons in the Developing Avian Brain. *Cell Reports*, 22(1), pp. 96–109.
- Grigg, N. P., Krilow, J. M., Gutierrez-Ibanez, C., Wylie, D. R., Graves, G. R., & Iwaniuk, A. N. (2017). Anatomical evidence for scent guided foraging in the Turkey vulture. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10.
- Guerreiro, L. C. F., Henrique, E. P., da Silva Rosa, J. B., Pereira, P. D. C., de Abreu, C. C., Fernandes, T. N., de Moraes Magalhães, N. G., de Jesus Falcão da Silva, A., da Costa, E. R., Guerreiro-Diniz, C., Diniz, C. W. P., & Diniz, D. G. (2021). Plasticity in the hippocampal formation of shorebirds during the wintering period: Stereological analysis of parvalbumin neurons in *Actitis macularius*. *Learning & Behavior*.
- Güntürkün, O. (2005). The avian “prefrontal cortex” and cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), pp. 686–693.
- Güntürkün, O., & Bugnyar, T. (2016). Cognition without Cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 20(4), pp. 291–303.
- Güntürkün, O., Stacho, M., & Ströckens, F. (2017). The Evolution of The Nervous Systems in Nonmammalian Vertebrates, In *Evolution of Nervous Systems*, 2nd Edition, pp. 171–222.
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A. N., & Wylie, D. R. (2018). Parrots have evolved a primate-like telencephalic-midbrain-cerebellar circuit. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11.
- Hart, L. A., Rogers, A. M., & van Rensburd, B. J. (2020). Common Myna (*Acridotheres tristis*, Linnaeus, 1766). In Downs, C. T., & Hart, L. A. (eds) *Invasive Birds: Global Trends and Impacts*. *CAB International, Wallingford, UK*, pp. 25–32.
- Hayden, B. Y., & Platt, M. L. (2007). Animal Cognition: Great Apes Wait for Grapes. *Current Biology*, 17(21), pp. 922–923.
- Herculano-Houzel, S. (2005). Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), pp. 2518–2521.
- Herculano-Houzel, S., Avelino-de-Souza, K., Neves, K., Porfírio, J., Messeder, D., Feijó, L. M., Maldonado, J., & Manger, P. R. (2014). The elephant brain in numbers. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(JUN), pp. 1–9.
- Herculano-Houzel, S., Catania, K., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2015). Mammalian Brains Are Made of These: A Dataset of the Numbers and Densities of Neuronal and Nonneuronal Cells in the Brain of Glires, Primates, Scandentia, Eulipotyphlans, Afrotherians and Artiodactyls, and Their Relationship with Body Mass. *Brain, Behavior and Evolution*, 86(3–4), pp. 145–163.
- Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., & Kaas, J. H. (2007). Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), pp. 3562–3567.

- Herculano-Houzel, S., da Cunha, F. B., Reed, J. L., Kaswera-Kyamakya, C., Gillissen, E., & Manger, P. R. (2020). Microchiropterans have a diminutive cerebral cortex, not an enlarged cerebellum, compared to megachiropterans and other mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 528(17), pp. 2978–2993.
- Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), pp. 12138–12143.
- Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Valotta da Silva, A., Torres, L. B., Catania, K. C., & Kaas, J. H. (2011). Updated Neuronal Scaling Rules for the Brains of Glires (Rodents/Lagomorphs). *Brain, Behavior and Evolution*, 78(4), pp. 302–314.
- Herrnstein, R. J., & Loveland, D. H. (1964). Complex visual concept in the pigeon. *Science*, 146(3643), pp. 549–551.
- Holmgren, N. (1925) Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates, *Acta Zoologica*, 6(3), pp. 413–459.
- Hosner, P. A., Tobias, J. A., Braun, E. L., & Kimball, R. T. (2017). How do seemingly non-vagile clades accomplish trans-marine dispersal? Trait and dispersal evolution in the landfowl (Aves: Galliformes). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854).
- Hull, C. (2020). Prediction signals in the cerebellum: Beyond supervised motor learning. *ELife*, 9, pp. 1–22.
- Hunt, G. R. (1996). Manufacture and use of hook-tools by New Caledonian crows. In *Nature* (Vol. 379, Issue 6562, pp. 249–251).
- Hunt, G. R., & Gray, R. D. (2004). The crafting of hook tools by wild New Caledonian crows. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(3), pp. 88–90.
- Iwaniuk, A. N., & Hurd, P. L. (2005). The evolution of cerebrotypes in birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 65(4), pp. 215–230.
- Iwaniuk, A. N., & Nelson, J. E. (2001). A comparative analysis of relative brain size in waterfowl (Anseriformes). *Brain, Behavior and Evolution*, 57(2), pp. 87–97.
- Iwaniuk, A. N., & Wylie, D. R. W. (2006). The evolution of stereopsis and the Wulst in caprimulgidiform birds: A comparative analysis. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 192(12), pp. 1313–1326.
- Jardim-Messeder, D., Lambert, K., Noctor, S., Pestana, F. M., de Castro Leal, M. E., Bertelsen, M. F., Alagaili, A. N., Mohammad, O. B., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2017). Dogs have the most neurons, though not the largest brain: Trade-off between body mass and number of neurons in the cerebral cortex of large carnivoran species. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(DEC), pp. 1–18.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Bossau, B., Bayzid, Md. S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocini, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Poten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F. E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F. K., Jønsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K.-P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E. L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., & Zhang, G. (2014). A Phylogeny of Modern Birds. *Science*, 346(6215), pp. 1126–1138.
- Jarvis, E. D., Yu, J., Rivas, M. V., Horita, H., Feenders, G., Whitney, O., Jarvis, S. C., Jarvis, E. R., Kubikova, L., Puck, A. E. P., Siang-Bakshi, C., Martin, S., McElroy, M., Hara, E., Howard, J., Pfenning, A., Mouritsen, H., Chen, C. C., & Wada, K. (2013). Global view of the functional molecular organization of the avian cerebrum: Mirror images and functional columns. *Journal of Comparative Neurology*, 521(16), pp. 3614–3665.
- Jarvis, E., Güntürkün, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Perkel, D. J., Shimizu, T., Striedter, G., Martin Wild, J., Ball, G. F., Dugas-Ford, J., Durand, S. E., Hough, G. E., Husband, S., Kubikova, L., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., Siang, C., Smulders, T. V., Wada, K., White, S. A., Yamamoto, K., Yu, J., Reiner, A., & Butler, A. B. (2005). Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), pp. 151–159.

- Jelbert, S. A., Taylor, A. H., Cheke, L. G., Clayton, N. S., & Gray, R. D. (2014). Using the aesop's fable paradigm to investigate causal understanding of water displacement by new caledonian crows. *PLoS ONE*, *9*(3).
- Jerison, H. J. (1985). Animal intelligence as encephalization, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, *308*(1135), pp. 21–35.
- Kaas, J. H. (2012) The evolution of neocortex in primates, in *Progress in Brain Research*. 1st Edition, pp. 91–102.
- Kaas, J. H. (2019). The origin and evolution of neocortex: From early mammals to modern humans, *Progress in Brain Research*, *250*, pp. 61–81.
- Karten, H. J. (1969). The organization of the avian telencephalon and some speculations on the phylogeny of the amniote telencephalon. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *16*(1), pp. 164–179.
- Kazu, R. S., Maldonado, J., Mota, B., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2014). Cellular scaling rules for the brain of Artiodactyla include a highly folded cortex with few neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*(November), pp. 1–19.
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(45), pp. 31052–31061.
- Kimball, R. T., Oliveros, C. H., Wang, N., White, N. D., Barker, F. K., Field, D. J., Ksepka, D. T., Chesser, R. T., Moyle, R. G., Braun, M. J., Brumfield, R. T., Faircloth, B. C., Smith, B. T., & Braun, E. L. (2019). A Phylogenomic Supertree of Birds. *Diversity*, *11*(7).
- Klump, B. C., Martin, J. M., Wild, S., Hörsch, J. K., Major, R. E., & Aplin, L. M. (2021). Innovation and geographic spread of a complex foraging culture in an urban parrot. *Science*, *373*(6553), pp. 456–460.
- Ksepka, D. T., Balanoff, A. M., Smith, N. A., Bever, G. S., Bhullar, B.-A. S., Bourdon, E., Braun, E. L., Burleigh, J. G., Clarke, J. A., Colbert, M. W., Corfield, J. R., Degrange, F. J., De Pietri, V. L., Early, C. M., Field, D. J., Gignac, P. M., Gold, M. E. L., Kimball, R. T., Kawabe, S., Lefabvre, L., Marugán-Lobón, J., Mongle, C. S., Morhardt, A., Norel, M. A., Ridgely, R. C., Rothman, R. S., Scofield, R. P., Tambussi, C. P., Torres, Ch. R., van Tuinen, M., Walsh, S. A., Watanabe, A., Witmer, L. M., Wright, A. K., Zanno, L. E., Jarvis, E. D., & Smaers, J. B. (2020). Tempo and Pattern of Avian Brain Size Evolution. *Current Biology*, *30*(11), pp. 2026–2036.
- Kuenzel, W. J., Medina, L., Csillag, A., Perkel, D. J., & Reiner, A. (2011). The avian subpallium: New insights into structural and functional subdivisions occupying the lateral subpallial wall and their embryological origins. *Brain Research*, *1424*, pp. 67–101.
- Kuhlenbeck, H. (1938) The ontogenetic development and phylogenetic significance of the cortex telencephali in the chick, *The Journal of Comparative Neurology*, *69*(2), pp. 273–301.
- Kverková, K., Bělková, T., Olkowicz, S., Pavelková, Z., O'Riain, M. J., Šumbera, R., Burda, H., Bennett, N. C., & Němec, P. (2018). Sociality does not drive the evolution of large brains in eusocial African mole-rats. *Scientific Reports*, *8*(1), pp. 1–14.
- Lanza, R. P., Starr, J., & Skinner, B. F. (1982). "Lying" in the pigeon. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *38*(2), pp. 201–203.
- Levey, D. J., Londoño, G. A., Ungvari-Martin, J., Hiersoux, M. R., Jankowski, J. E., Poulsen, J. R., Stracey, C. M., & Robinson, S. K. (2009). Urban mockingbirds quickly learn to identify individual humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(22), pp. 8959–8962.
- MacLean, E. L., Hare, B., Nun, C. L., Adress, E., Amic, F., Anderson, R. C., Aureli, F., Baker, J. M., Bania, A. E., Barnard, A. M., Boogert, N. J., Brannon, E. M., Bray, E. E., Bray, J., Brent, L. J. N., Burkart, J. M., Call, J., Cantlo, J. F., Cheke, L. G., Clayton, N. S., Delgado, M. M., DiVincenti, L. J., Fujita, K., Herrman, E., Hiramatsu, C., Jacobs, L. F., Jordan, K. E., Laude, J. R., Leimgruber, K. L., Messer, E. J. E, Moura, A. C. de A., Ostojić, L., Platt, M. L., Plotnik, J. M., Range, F., Reader, S. M., Reddy, R. B., Sandel, A. A., Santos, L. R., Schumann, K., Seed, A. M., Sewall, A. M., Shaw, R. C., Slocombe, K. E., Su, Y., Takimoto, A., Tan, J., Tao, R., van Schaik, C. P., Virányi, Z., Visalberghi, E., Wade, J. C, Watanabe, A., Widness, J., Young, J. K., Zentall, T. R., & Zhao, Y. (2014). The evolution of self-control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(20).
- Maekawa, F., Komine, O., Sato, K., Kanamatsu, T., Uchimura, M., Tanaka, K., & Ohki-Hamazaki, H. (2006). Imprinting modulates processing of visual information in the visual wulst of chicks. *BMC Neuroscience*, *7*, pp. 1–13.
- Marino, L. (2017). Thinking chickens: a review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken. *Animal Cognition*, *20*(2), pp. 127–147.

- Marzluff, J. M., Miyaoka, R., Minoshima, S., & Cross, D. J. (2012). Brain imaging reveals neuronal circuitry underlying the crow's perception of human faces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(39), pp. 15912–15917.
- Massen, J. J. M., Hartlieb, M., Martin, J. S., Leitgeb, E. B., Hockl, J., Kocourek, M., Olkowicz, S., Zhang, Y., Osadnik, C., Verkleij, J. W., Bugnyar, T., Němec, P., & Gallup, A. C. (2021). Brain size and neuron numbers drive differences in yawn duration across mammals and birds. *Communications Biology*, *4*(1), pp. 1–10.
- Mehlhorn, J., Hunt, G. R., Gray, R. D., Rehkämper, G., & Güntürkün, O. (2010). Tool-making new caledonian crows have large associative brain areas. *Brain, Behavior and Evolution*, *75*(1), pp. 63–70.
- Mouritsen, H., Feenders, G., Liedvogel, M., Wada, K., & Jarvis, E. D. (2005). Night-vision brain area in migratory songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(23), pp. 8339–8344.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, *116*(1), pp. 201–211.
- Neves, K., Ferreira, F. M., Tovar-Moll, F., Gravett, N., Bennett, N. C., Kaswera, C., Gilissen, E., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2014). Cellular scaling rules for the brain of afrotherians. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*(FEB), pp. 1–13.
- Ngwenya, A., Nahirney, J., Brinkman, B., Williams, L., & Iwaniuk, A. N. (2017). Comparison of estimates of neuronal number obtained using the isotropic fractionator method and unbiased stereology in day old chicks (*Gallus domesticus*). *Journal of Neuroscience Methods*, *287*, pp. 39–46.
- Ngwenya, A., Patzke, N., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2016). Continued Growth of the Central Nervous System without Mandatory Addition of Neurons in the Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Brain, Behavior and Evolution*, *87*(1), pp. 19–38.
- Nieder, A. (2017). Inside the corvid brain—probing the physiology of cognition in crows. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *16*, pp. 8–14.
- Obozova, T. A. & Zorina, Z. A. (2013) Do Great Grey Owls Comprehend Means-end Relationships? *International Journal of Comparative Psychology*, *26*(3), pp. 197–201.
- Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R. K., Porteš, M., Fitch, W. T., Herculano-Houzel, S., & Němec, P. (2016). Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(26), pp. 7255–7260.
- Overington, S. E., Morand-Ferron, J., Boogert, N. J., & Lefebvre, L. (2009). Technical innovations drive the relationship between innovativeness and residual brain size in birds. *Animal Behaviour*, *78*(4), pp. 1001–1010.
- Passingham, R. R., & Wise, S. P. (2012). *The Neurobiology of the Prefrontal Cortex: Anatomy, Evolution, and the Origin of Insight*, Oxford University Press.
- Pepperberg, I. M. (2002). In search of King Solomon's Ring: Cognitive and communicative studies of Grey parrots (*Psittacus erithacus*). *Brain, Behavior and Evolution*, *59*(1–2), pp. 54–67.
- Péron, F., Rat-Fischer, L., Lalot, M., Nagle, L., & Bovet, D. (2011). Cooperative problem solving in African grey parrots (*Psittacus erithacus*). *Animal Cognition*, *14*(4), pp. 545–553.
- Pettigrew, J. D. (1979). Binocular visual processing in the owl's telencephalon. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, *204*(1157), pp. 435–454.
- Pidoux, L., Leblanc, P., Levenes, C., & Leblois, A. (2018). A subcortical circuit linking the cerebellum to the basal ganglia engaged in vocal learning. *ELife*, *7*, pp. 1–31.
- Pihlström, H. (2008). Sensory Evolution on the Threshold, In *Comparative Anatomy and Physiology of Chemical Senses in Aquatic Mammals*, Berkeley: University of California Press, pp. 95–110.
- Prior, H., Schwarz, A., & Güntürkün, O. (2008). Mirror-induced behavior in the magpie (*Pica pica*): Evidence of self-recognition. *PLoS Biology*, *6*(8), pp. 1642–1650.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., & Lemmon, A. R. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, *526*(7574), pp. 569–573.

- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., & Rubenstein, J. L. R. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *Journal of Comparative Neurology*, *424*(3), pp. 409–438.
- Reiner, A., Perkel, D. J., Bruce, L. L., Butler, A. B., Csillag, A., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Shimizu, T., Striedter, G., Wild, M., Ball, G. F., Durand, S., Gütürkün, O., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., White, S. A., Hough, G., Kubikova, L., Smulders, T. V., Wada, K., Dugas-Ford, J., Husband, S., Yamamoto, K., Yu, J., Siang, C. & Jarvis, E. D. (2004). Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, *473*(3), pp. 377–414.
- Roth, G., & Dicke, U. (2005). Evolution of the brain and intelligence. *Trends in Cognitive Sciences*, *9*(5), pp. 250–257.
- Ruxton, G. D., & Hansell, M. H. (2011). Fishing with a Bait or Lure: A Brief Review of the Cognitive Issues. *Ethology*, *117*(1), pp. 1–9.
- Sarko, D. (2009). Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in Neuroanatomy*, *3*(JUN).
- Sayol, F., Maspons, J., Lapiedra, O., Iwaniuk, A. N., Székely, T., & Sol, D. (2016). Environmental variation and the evolution of large brains in birds. *Nature Communications*, *7*.
- Schloegl, C., Dierks, A., Gajdon, G. K., Huber, L., Kotschal, K., & Bugnyar, T. (2009). What you see is what you get? Exclusion performances in ravens and keas. *PLoS ONE*, *4*(8).
- Seed, A. M., Clayton, N. S., & Emery, N. J. (2008). Cooperative problem solving in rooks (*Corvus frugilegus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1641), pp. 1421–1429.
- Sherry, D. F., & Hoshoooley, J. S. (2009). The seasonal hippocampus of food-storing birds. *Behavioural Processes*, *80*(3), pp. 334–338.
- Sherry, D. F., & Vaccarino, A. L. (1989). Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behavioral Neuroscience*, *103*(2), pp. 308–318.
- Shimizu, T., Cox, K., & Karten, H. J. (1995). Intratelencephalic projections of the visual wulst in pigeons (*Columba livia*). *The Journal of Comparative Neurology*, *359*(4), pp. 551–572.
- Sibley, Ch., & Ahlquist, J. E. (1990). Phylogeny and classification of birds, *New Haven: Yale University Press*.
- Smaers, J. B., Rothman, R. S., Hudson, D. R., Balanoff, A. M., Beatty, B., Dechmann, D. K. N., de Vries, D., Dunn, J. C., Fleagle, J. G., Gilbert, C. C., Goswami, A., Iwaniuk, A. N., Jungers, W. L., Kerney, M., Ksepka, D. T., Manger, P. R., Monge, C. S., Rohlf, F. J., Smith, N. A., Soligo, C., Weisbecker, V. & Safi, K. (2021). The evolution of mammalian brain size. *Science Advances*, *7*(18), pp. 1–12.
- Smaers, Jeroen B., Turner, A. H., Gómez-Robles, A., & Sherwood, C. C. (2018). A cerebellar substrate for cognition evolved multiple times independently in mammals. *ELife*, *7*, pp. 1–19.
- Sokolov, A. A., Miall, R. C., & Ivry, R. B. (2017). The Cerebellum: Adaptive Prediction for Movement and Cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, *21*(5), pp. 313–332.
- Sol, D. (2009). Opinion piece. Revisiting the cognitive buffer hypothesis for the evolution of large brains. *Biology Letters*, *5*(1), pp. 130–133.
- Sol, D., Lefebvre, L., & Rodríguez-Teijeiro, J. D. (2005). Brain size, innovative propensity and migratory behaviour in temperate Palearctic birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1571), pp. 1433–1441.
- Spool, J. A., Macedo-Lima, M., Scarpa, G., Morohashi, Y., Yazaki-Sugiyama, Y., & Remage-Healey, L. (2021). Genetically identified neurons in avian auditory pallium mirror core principles of their mammalian counterparts. *Current Biology*, *31*(13), pp. 2831–2843.
- Stacho, M., Herold, C., Rook, N., Wagner, H., Axer, M., Amunts, K., & Gütürkün, O. (2020). A cortex-like canonical circuit in the avian forebrain. *Science*, *369*(6511).
- Starck, J. M. (1993). Evolution of avian ontogenies. In *Current ornithology*, Springer, Boston, MA.
- Stephenson-Jones, M., Samuelsson, E., Ericsson, J., Robertson, B., & Grillner, S. (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Current Biology*, *21*(13), pp. 1081–1091.
- Stoodley, C. J. (2012). The cerebellum and cognition: Evidence from functional imaging studies. *Cerebellum*, *11*(2), pp. 352–365.
- Straková, B. (2018) Evoluce velikosti mozku u ptáků. *Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie*. Vedoucí práce: Němec, P.

- Striedter, G. F. (1997). The Telencephalon of Tetrapods in Evolution; pp. 205–213. *Brain, Behavior and Evolution*, 49(4), pp. 205–213.
- Striedter, G. F. (2005). Principles of brain evolution. *Sunderland, MA, US: Sinauer Associates*.
- Striedter, G. F., & Beydler, S. (1997). Distribution of radial glia in the developing telencephalon of chicks. *Journal of Comparative Neurology*, 387(3), pp. 399–420.
- Striedter, G. F., & Charvet, C. J. (2008). Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: Morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *Journal of Comparative Neurology*, 507(5), pp. 1663–1675.
- Striedter, G. F., & Northcutt, R. G. (2020). *Brains Through Time*, Oxford University Press.
- Torres, C. R., Norell, M. A., & Clarke, J. A. (2021). Bird neurocranial and body mass evolution across the end-Cretaceous mass extinction: The avian brain shape left other dinosaurs behind. *Science Advances*, 7(31).
- Tosches, M. A., Yamawaki, T. M., Naumann, R. K., Jacobi, A. A., Tushev, G., & Laurent, G. (2018). Evolution of pallium, hippocampus, and cortical cell types revealed by single-cell transcriptomics in reptiles. *Science*, 360(6391), pp. 881–888.
- Vincze, O. (2016). Light enough to travel or wise enough to stay? Brain size evolution and migratory behavior in birds. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 70(9), pp. 2123–2133.
- Volman, S. F., Grubb, Jr., T. C., & Schuett, K. C. (1997). Relative Hippocampal Volume in Relation to Food-Storing Behavior in Four Species of Woodpeckers. *Brain, Behavior and Evolution*, 49(2), pp. 110–120.
- von Eugen, K., Tabrik, S., Güntürkün, O., & Ströckens, F. (2020). A comparative analysis of the dopaminergic innervation of the executive caudal nidopallium in pigeon, chicken, zebra finch, and carrion crow. *Journal of Comparative Neurology*, 528(17), pp. 2929–2955.
- von Fersen, L., & Delius, J. D. (1989). Long-term Retention of Many Visual Patterns by Pigeons. *Ethology*, 82(2), pp. 141–155.
- Wang, Y., Brzozowska-Prechtel, A., & Karten, H. J. (2010). Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), pp. 12676–12681.
- Ward, B. J., Day, L. B., Wilkening, S. R., Wylie, D. R., Saucier, D. M., & Iwaniuk, A. N. (2012). Hummingbirds have a greatly enlarged hippocampal formation. *Biology Letters*, 8(4), pp. 657–659.
- Watanabe, S., Mayer, U., & Bischof, H. J. (2011). Visual Wulst analyses “where” and entopallium analyses “what” in the zebra finch visual system. *Behavioural Brain Research*, 222(1), pp. 51–56.
- Watanabe, S., Sakamoto, J., & Wakita, M. (1995). Pigeons’ discrimination of paintings by Monet and Picasso. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 63(2), pp. 165–174.
- Weyer, A., & Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of Neuroscience Research*, 73(3), pp. 400–409.
- Wylie, D. R., Gutiérrez-Ibáñez, C., Gaede, A. H., Altshuler, D. L., & Iwaniuk, A. N. (2018). Visual-cerebellar pathways and their roles in the control of avian flight. *Frontiers in Neuroscience*, 12(APR), pp. 1–10.
- Wylie, D. R. W., Gutierrez-Ibanez, C., Pakan, J. M. P., & Iwaniuk, A. N. (2009). The optic tectum of birds: Mapping our way to understanding visual processing. *Canadian Journal of Experimental Psychology*, 63(4), pp. 328–338.
- Yaskin, V. A. (2011). Seasonal changes in hippocampus size and spatial behavior in mammals and birds. *Biology Bulletin Reviews*, 1(3), pp. 279–288.
- Yi, X., Steele, M. A., & Shen, Z. (2014). Manipulation of walnuts to facilitate opening by the great spotted woodpecker (*Picoides major*): Is it tool use? *Animal Cognition*, 17(1), pp. 157–161.
- Yopak, K. E., Pakan, J. M. P., & Wylie, D. (2016). The Cerebellum of Nonmammalian Vertebrates. In *Evolution of Nervous Systems: Second Edition* (Second Edi, Vols. 1–4). Elsevier.
- Zareen, S., Rehman, H. U., Zareen, H., Bukhari, N., Saeed, K., Raqeebullah, W. A., & Ateeq, M. (2016). Ability of Grey-necked Crow (*Corvus splendens*) in Human face recognition from Kohat, KPK, Pakistan. 4(SEP), pp. 364–365.
- Zhang, Y. (2016). Nervový systém a kognitivní schopnosti hrabavých ptáků. *Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie*. Vedoucí práce: Němec, P.

- Zhang, Y. (2018). Pravidla buněčného škálování mozku u hrabavých ptáků. *Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie*. Vedoucí práce: Němec, P.
- Zorina, Z. A., & Obozova, T. A. (2012). New data on the brain and cognitive abilities of birds. *Biology Bulletin*, 39(7), pp. 601–617.