

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Yicheng Zhang**

Pravidla buněčného škálování mozku u hrabavých ptáků

Cellular scaling rules for brains of gallinaceous birds

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Praha 2018

*Poděkování: Mé díky patří přátelům a rodině za podporu při sepisování, a především mým kolegům a školiteli za jejich cenné rady, návrhy a připomínky bez nichž by realizace této práce nebyla možná.*

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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, 6. 8. 2018

Podpis:

## Obsah

<b>0. ABSTRAKT .....</b>	<b>0</b>
<b>0. ABSTRACT .....</b>	<b>0</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
1. 1. KOMPARATIVNÍ NEUROANATOMIE .....	1
1. 2. PROCESNÍ KAPACITA MOZKU .....	1
1. 3. RELATIVNÍ VELIKOST MOZKU A ENCEFALIZANÍ KVOCIENT .....	2
1. 4. ABSOLUTNÍ VELIKOST MOZKU .....	3
1. 5. POČET NEURONŮ .....	4
1. 6. KOGNITIVNÍ SCHOPNOSTI .....	5
1. 7. VLASTNOSTI PTAČÍHO MOZKU A JEHO ODLIŠNOSTI OD SAVCŮ .....	5
1. 8. CÍLE PRÁCE .....	8
<b>2. MATERIÁLY A METODIKA .....</b>	<b>9</b>
2. 1. ZVÍŘATA .....	9
2. 2. CHEMIKÁLIE .....	9
2. 3. VYBAVENÍ .....	9
2. 4. PŘÍPRAVA TKÁNĚ .....	10
2. 5. IZOTROPICKÁ FRAKČNÍ HOMOGENIZACE .....	11
2. 6. STANOVENÍ POČTU BUNĚK .....	12
2. 7. ANALÝZA DAT .....	14
<b>3. VÝSLEDKY .....</b>	<b>15</b>
3. 1. VELIKOST TĚLA, MOZKU A ABSOLUČNÍ POČTY NEURONŮ .....	19
3. 2. HUSTOTY NEURONŮ .....	21
3. 3. RELATIVNÍ DISTRIBUCE HMOTNOSTI A NEURONŮ .....	22
3. 4. SUBPALLIUM .....	24
3. 5. PRAVIDLA ŠKÁLOVÁNÍ NONNEURONÁLNÍCH BUNĚK .....	26
3. 6. POMĚR NEURONŮ A NONNEURONÁLNÍCH BUNĚK (GLIÍ) .....	27
3. 7. POROVNÁNÍ SE SAVCI .....	28
<b>4. DISKUZE .....</b>	<b>31</b>
4. 1. PRAVIDLA BUNĚČNÉHO ŠKÁLOVÁNÍ MOZKU U HRABAVÝCH PTÁKŮ .....	31
4. 1. 1. Škálování hustoty neuronů .....	31
4. 1. 2. Relativní distribuce podílu hmotností jednotlivých částí mozku .....	31
4. 1. 3. Relativní distribuce neuronů .....	32
4. 1. 4. Relativní distribuce nonneuronálních buněk v mozku .....	32
4. 2. POROVNÁNÍ HRABAVÝCH PTÁKŮ S PĚVCI A PAPOUŠKY .....	33
4. 2. 1. Porovnání buněčného složení mozku .....	34
4. 2. 2. Porovnání relativní distribuce hmotnosti .....	35
4. 2. 3. Subpallium .....	36
4. 2. 4. Porovnání nonneuronálních buněk .....	37
4. 2. 5. Poměry neuronů a gliových buněk .....	37
4. 2. 6. Porovnání kognitivních schopností .....	38

4. 3. POROVNÁNÍ SE SAVCI.....	44
4. 3. 1. <i>Porovnání buněčného složení mozku</i> .....	44
4. 3. 2. <i>Porovnání kognitivních schopností se savci</i> .....	46
4. 4. POROVNÁNÍ BUNĚČNÉHO SLOŽENÍ MOZKU S KROKODÝLEM NILSKÝM.....	47
4. 5. MOŽNÝ VLIV DOMESTIKACE NA VELIKOST MOZKU .....	48
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
<b>6. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>52</b>

## 0. Abstrakt

Hrabaví ptáci (Galliformes) tvoří spolu s vrubozobými ptáky (Anseriformes) skupinu Galloanserae, která je sesterská všem Neoaves a je nejbazálnější skupinou neognátních ptáků. Přes jejich zásadní pozici ve fylogenezi ptáků, dosud nejsou k dispozici kvantitativní data o buněčném složení mozků hrabavých ptáků. V předložené práci jsem pomocí izotropní frakční homogenizace určil počty neuronů a nonneurálních buněk ve specifických částech mozků u 15 druhů hrabavých ptáků. Zjistil jsem, že buněčná škálovací pravidla pro hrabavé ptáky se výrazně odlišují od téhož pro pěvce a papoušky. Ve srovnání s těmito skupinami ptáků mají hrabaví nižší míru encefalizace, proporcčně menší koncový mozek, většinu všech neuronů v mozečku a menšinu v koncovém mozku, obecně nižší neuronální hustoty a vyšší poměr gliových buněk ku neuronům. Jejich mozek, a především koncový mozek proto obsahuje podstatně menší absolutní počty neuronů než stejně velký mozek / koncový mozek pěvce nebo papouška, což jistě limituje kognitivní schopnosti hrabavých ptáků. Neznamená to však, že jsou hrabaví jakýmsi „hloupými stvořeními“ s limitovanou schopností učení. Protože mají vysoké neuronální hustoty, jejich relativně malé mozky obsahují přibližně stejné množství neuronů jako mozky stejně velkých hlodavců nebo vačnatců. Navíc, hrabaví mají vyšší hustoty neuronů v koncovém mozku, a proto také vyšší podíl neuronů lokalizovaných v palliu koncového mozku než jmenovaní savci. Trochu překvapivě tedy hrabaví ptáci mají vyšší počty neuronů v koncovém mozku než hlodavci a vačnatci o stejné tělesné velikosti. Není proto překvapivé, že se kognitivní schopnosti hrabavých ptáků v mnoha doménách vyrovnají těm savcím.

### **Klíčová slova:**

Hrabaví ptáci, procesní kapacita mozku, počet neuronů, počet gliových buněk, izotropická frakční homogenizace, srovnávací neuroanatomie, alometrie.

**0. Abstract**

Galliform birds (Galliformes) make up together with anseriform birds (Anseriformes) the clade Galloanserae, the sister group of Neoaves and the most basal clade of Neognathae. However, to date no quantitative data on cellular composition of their brains have been available. Here, I used the isotropic fractionator to determine numbers of neurons and non-neuronal cells in specific brain regions of 15 species of galliform birds. I find that cellular scaling rules for galliforms differ starkly from those for songbirds and parrots. When compared to these crown avian lineages, galliform birds feature lower degree of encephalization, a proportionally smaller telencephalon, small telencephalic and dominant cerebellar neuronal fractions, generally lower neuronal densities and larger glia/neuron ratios. Consequently, their brains and especially their forebrains harbor much smaller absolute numbers of neurons than those of equivalently sized songbird and parrots, the fact that undoubtedly constrains cognitive abilities of galliforms. However, this not to say that galliform birds are “bird brains” with low numbers of neurons and a limited ability to learn. Because they have high neuronal densities, their relatively small brains contain about equal numbers of neurons as brains of equivalently sized rodents and marsupials. Moreover, galliforms have higher telencephalic neuronal densities and, consequently, higher proportion of brain neurons located in the pallial telencephalon compared to these mammals. Thus, remarkably enough, galliform birds have forebrain neuron counts greater than rodents or marsupials of the same body mass. Therefore, it is not surprising in this context that cognitive abilities of galliforms are on par with mammals in many domains.

**Key words:**

Galliform birds, brain processing capacity, number of neurons, number of glial cells, isotropic fractionator, comparative neuroanatomy, allometry.

## 1. ÚVOD

### 1.1 Komparativní neurobiologie

Počátky studia nervového systému by se daly datovat až do dob starověkého Egypta (Mohamed, 2008), tedy doby před téměř 4000 lety. Staří Egyptané již měli základní povědomí o příznacích poškozeného mozku. Nicméně k dramatickému rozvoji tohoto vědeckého oboru došlo až relativně nedávno – na přelomu 19. a 20. století (Striedter, 2005). V dnešní době již v sobě neurovědy zahrnují nespočet vědeckých odvětví. Jedním odvětvím neurověd je právě komparativní neurobiologie, která vychází ze skutečnosti, že nervový systém je v celé živočišné říši ohromně diverzifikovaný, příkladem můžou být ohromné rozdíly ve velikosti mozku (jen u savců) s rozsahem od necelé pětiny gramu (rejsci) až po něco málo přes 7 kg u kytovců (plejtváci) (Manger, 2006; Sarko et al., 2009). Někteří samci vorvaně obrovského (*Physeter macrocephalus*) měli mozek o hmotnosti přes 9 kg. Cílem komparativní neurobiologie je tuto ohromnou diverzitu a disparitu nervových soustav popsat a odhalit organizační a funkční principy, které jsou společné jednotlivým taxonům.

### 1.2 Procesní kapacita mozku

Procesní kapacitu mozku lze nejlépe definovat jako množství a komplexitu zpracovaných informací za jednotku času. Za mozek s nejvyšší procesní kapacitou se tradičně považuje ten lidský. Se svými 86 miliardami neuronů (Azevedo et al., 2009) a několika stovkami bilionů (přibližně  $10^{15}$ ) synapsí (Striedter, 2015; Dicke & Roth, 2016) je lidský mozek schopen zpracovat úctyhodné množství informací během několika milisekund (Marois & Ivanoff, 2005). Přesto existují mechanistické důvody, které výrazně omezují procesní kapacitu i výpočetního systému tak mohutného, jakým je lidský mozek. Třemi hlavními faktory omezujícími procesní výkon lidského mozku se zdají být omezená schopnost soustředit se na více stimulů najednou, omezená krátkodobá zraková paměť a omezená schopnost vykonávat více než jednu senzori-motorickou akci najednou (Marois & Ivanoff, 2005).

Ačkoli se absolutní či relativní velikost mozku stále běžně používá pro hrubý odhad procesní kapacity mozku, neustále přibývá prací využívajících počty neuronů jako spolehlivější prediktor pro procesní kapacitu mozku (např. Herculano-Houzel et al., 2011; Herculano-Houzel et al., 2017; Dicke & Roth, 2016). Nicméně je třeba otevřeně přiznat, že ani tento přístup není všespásný. Procesní kapacita mozku je determinována strukturou a zapojením jednotlivých neuronálních mikroobvodů v daných oblastech mozku. Roli tedy hrají typy neuronů, relativní

množství inhibičních neuronů a jejich specifické zapojení do neuronálních mikroobvodů. O těchto vlastnostech nervového systému máme jen velmi omezené informace, zvláště pak u nesavčích modelů. Výpočetní kapacitu mozku do značné míry ovlivňují i gliové buňky. Oligodendrocyty vytvářejí myelinové pochvy a značně tak zrychlují vedení vzruchu na delší vzdálenosti. Astrocyty se podílejí na udržování iontové a pH homeostázy v nervovém systému, kontrolují cévní zásobení, dodávají neuronům metabolity a odstraňují zplodiny metabolismu, rychle odstraňují z extracelulárních prostor synapticky vylité neurotransmitery (hlavně glutamát a GABU), elektricky a iontově izolují synapse, významně ovlivňují synaptický přenos (viz např. Halassa & Haydon, 2020; Nedergaard & Verkhratsky, 2012; De Pittà et al., 2016). Dalším, patrně ještě důležitějším faktorem je konektivita jednotlivých neuronů, tedy počet a kvalita spojů, respektive synapsí.

Tyto tři faktory jsou v dnešní době převážně považovány za faktory determinující procesní kapacitu mozku – počet neuronů, počet gliových buněk a počet nervových spojů, respektive synapsí. Dalším faktorem je hustota neuronů, determinující průměrnou inter-neuronální vzdálenost a zprostředkovaně tedy i procesní rychlost (Dicke & Roth, 2016). Ačkoli je počet synapsí bezpochyby faktorem, který klíčovým způsobem ovlivňuje celkovou procesní kapacitu, stále neexistuje spolehlivá a efektivní metoda, která by umožnila kvantifikaci a mapování synapsí u většího množství druhů. Proto se v této diplomové práci soustředím na analýzu počtu neuronů a gliových buněk.

### 1.3 Relativní velikost mozku a encefalizační kvocient

Zpočátku byla relativní velikost mozku určována jako prostý poměr velikosti mozku a těla. Výzkumníci si však velmi brzo uvědomili, že malí obratlovci mají relativně větší mozky než obratlovci velcí, jinými slovy, že velikost mozku škáluje negativně alometricky s velikostí těla (Jerison, 1973; van Dongen, 1998; Striedter, 2005). Relativní velikost mozku tedy začala být odvozována od alometrického vztahu mezi velikostí mozku a těla pro daný analyzovaný taxon. Relativní velikost je nejčastěji vyjádřena jako reziduál (tj. rozdíl mezi naměřenou a predikovanou hodnotou) nebo encefalizační kvocient (EQ) (tj. podíl mezi naměřenou a predikovanou hodnotou). Použití relativní velikosti jako proxy pro kognitivní schopnosti je ve srovnávacích korelativních studiích stále běžné (viz např. Benson-Amram et al., 2016). Intuitivní přitažlivost tohoto konceptu vyplývá z jednoduché úvahy: relativní velikost orgánu nám říká něco o jeho relativní důležitosti. Navíc nejvyšší encefalizační kvocient má člověk

následovaný delfínem, šimpanzem, krkavcem, velkými papoušky atd. (Roth & Dicke, 2005; Iwaniuk et al., 2005). Při bližším pohledu je však použití relativní velikosti mozku značně kontroverzní, a to jak z technických důvodů (alometrický vztah mezi velikostí mozku a těla je taxonově specifický a závislý na taxonomické úrovni analýzy, reziduály často nejsou normálně rozložené), tak z důvodů principiálních (Roth & Dicke, 2005; Marino 2006; Herculano-Houzel 2011; Dicke & Roth, 2016). Výpočetní kapacita je přímo závislá na množství neuronů a kvalitě a množství jejich spojů, nikoli na velikosti těla. Ve shodě s touto premisou recentní studie potvrdily, že absolutní velikost mozku je daleko lepším prediktorem kognitivních schopností než jeho velikost relativní (Deaner et al., 2007; MacLean et al., 2014; Stevens 2014).

#### 1.4 Absolutní velikost mozku

Absolutní velikost mozku je snadno měřitelná, buď přímo jako hmotnost čerstvě vypreparovaného mozku, nebo u ptáků a savců také nepřímo jako objem mozkovny s následným vynásobením hustotou nervové tkáně ( $1,036 \text{ g/cm}^3$ ; Stephan, 1960; Iwaniuk & Nelson, 2001). Použití absolutní velikosti mozku jakožto proxy pro výpočetní kapacitu mozku, respektive predispozice pro kognitivní schopnosti, je do značné míry založeno na předpokladu, že velikost mozku dosti těsně koreluje s celkovým počtem neuronů a gliových buněk (Herculano-Houzel, 2009). Tento předpoklad se však stal neudržitelným, neboť velké množství recentních prací demonstrovalo, že počet neuronů se škáluje s velikostí mozku různě u různých taxonomických skupin (např. Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2007; Sarko et al., 2009; Herculano-Houzel, 2009; Gabi et al., 2010; Neves et al., 2014; Olkowicz et al., 2016; Ngwenya et al., 2016; Jardim-Messeder 2017; Dos Santos et al., 2017). Mozky primátů vykazují podstatně vyšší neuronální hustoty než ostatní savci se srovnatelně velkými mozky (Herculano-Houzel et al., 2007; Gabi et al., 2010; Azevedo et al., 2009). Absolutní velikost mozku tedy koreluje spolehlivě s množstvím neuronů pouze v rámci jednotlivých skupin sdílejících stejná pravidla buněčného škálování a je proto použitelná jako spolehlivé proxy jen v rámci těchto skupin (typicky savčích či ptačích řádů), nikoli pro široce pojaté srovnávací analýzy. Hezkým příkladem ošidnosti použití absolutní velikosti jakožto indikátoru kognitivních schopností je značně kontroverzní téma inteligence kytovců (Huggenberger, 2008; Marino et al., 2008; Manger, 2013, Güntürkün, 2014; Chinea, 2017).

## 1.5 Počet neuronů

Neuron byl popsán jako základní výpočetní jednotka mozku už v první polovině 20. století (McCulloch & Pitts, 1943) a již od poloviny 20. století se objevují první studie, které spojují inteligenci či úroveň kognitivních schopností s počty neuronů namísto relativní velikosti mozku (Fankhauser et al., 1955; Vernon & Butsch, 1957). V prvotních studiích se porovnávaly kognitivní schopnosti triploidních a tetraploidních čolků zelenavých (*Notophthalmus viridescens*), jedním z důsledků polyploidizace je zvětšení velikosti buněk, což následně vede k jejich nižším počtům. A skutečně triploidní čolci s většími počty neuronů byli v kognitivních testech (orientace v bludišti) úspěšnější než tetraploidní čolci s nižšími počty neuronů (Vernon & Butsch, 1957).

První pokusy odhadnout celkové množství neuronů v lidském mozku jsou ještě o mnoho starší. Například Helena Bradford Thompsonová odhadla, že se v neokortexu lidského mozku nachází 9,2 miliard neuronů (Thompson, 1899). V podobné studii o necelé století později za pomoci stereologických metod byli Pakkenberg & Gundersen (1997) schopni spočítat neurony v různých makro i mikroskopických strukturách neokortexu a odhadli tak průměrný počet neuronů u lidí v celém neokortexu. U žen napočítali kolem 19 miliard, zatímco u mužů 23 miliard (rozdíl kolem 16 %), dále popsali přibližně 10% pokles v počtu neuronů ve věku od 20 do 90 let. Zdá se tedy, že pohlaví a věk mají na počty neuronů vliv, ovšem hmotnost (velikost) těla už vliv na počet neuronů neměla (Pakkenberg & Gundersen, 1997). Obdobných, na stereologických přístupech založených prací bylo publikováno více, jejich výsledky jsou však dosti rozporuplné (viz shrnující článek Azevedo et al., 2009). Je zajímavé, že se bez většího zakotvení v reálných datech ujala učebnicová pravda, že lidský mozek obsahuje 100 miliard neuronů a přibližně 10krát více buněk gliových (viz např. Kandel et al., 2000). Situace byla do značné míry vyjasněna až díky zavedení metody izotropické frakční homogenizace (Herculano-Houzel & Lent, 2005), která umožňuje rychle a poměrně přesně ( $\pm 10\%$ ) určit absolutní počty neuronů a gliových buněk v homogenátech celých mozků. Tato metoda vedla k následujícím odhadům: lidský mozek obsahuje  $86,1 \pm 8,1$  miliardy neuronů a  $84,6 \pm 9,8$  miliardy gliových buněk (Azevedo et al., 2009). Zajímavé je to, že cca 80 % všech neuronů lidského mozku je v mozečku a pouze 19 % v kůře mozkové (Azevedo et al., 2009).

Metoda izotropní homogenizace byla, díky své přesnosti, efektivitě a cenové přístupnosti široce použita ve srovnávacích studiích. Do dnešního dne bylo jejím prostřednictvím (počítaje pouze již publikované studie) určeno množství neuronů v mozcích 56 druhů savců reprezentujících 7 savčích monofyletických skupin (Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al.,

2007; Sarko et al., 2009; Herculano-Houzel, 2009; Gabi et al., 2010; Neves et al., 2014; Jardim-Messeder, 2017; Dos Santos et al., 2017), 28 ptáků reprezentujících 5 monofyletických skupin (Olkowicz et al., 2016) a u jednoho druhu plaza (Ngwenya et al., 2016).

## 1.6 Kognitivní schopnosti

Řada kognitivních schopností, které byly dlouho považovány za specificky lidské, byla demonstrována u podstatně širší skupiny živočichů (viz např. Güntürkün, 2014; Güntürkün & Bugnyar, 2016). Nicméně většina pozornosti je zaměřena na několik málo skupin, jakými jsou primáti, krkavcovití ptáci a papoušci, neboť právě tyto skupiny dosahují nejlepších výsledků v mnoha kognitivních doménách (podrobněji se této tématice budu věnovat v diskuzi). Jedním z dalších často zkoumaných ptačích skupin jsou holubi, kteří vynikají ve schopnosti rozeznávat a kategorizovat zrakové vzory / obrazce (von Fersen & Delius, 1989), a právě hrabaví ptáci, kteří jsou však většinou testováni v poměrně jednoduchých testech (viz např. Vallortigara et al., 2006), ačkoli v některých doménách (např. sociální kognice) jsou velmi úspěšní (viz např. Marino et al., 2017).

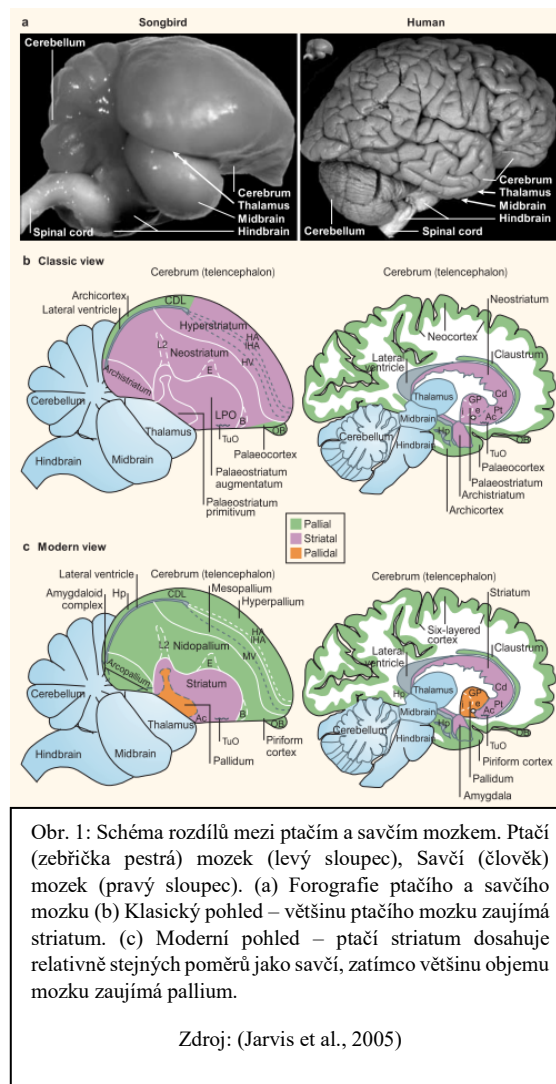
Ideální by samozřejmě bylo srovnávat kognitivní výkony mezidruhově přímo, bez použití zástupných proměnných, jakými jsou velikost mozku, počty neuronů a podobně. Tato snaha však naráží na velkou pracnost takovéhoto srovnání, jakož i na technické obtíže spojené s designem obdobných testů pro vzdáleně příbuzné druhy. Obdobně, zatím nejsou k dispozici kognitivní testy, které by umožnily na druhové úrovni korelovat počty neuronů s kognitivními výkony. Ve své práci se tedy omezují na velmi obecné srovnání celkových počtů neuronů s kognitivními výkony u hrabavých ptáků (Galliformes), pěvců (Passeriformes), papoušků (Psittaciformes), hlodavců (Rodentia) a také primátů (Primates).

## 1.7 Vlastnosti ptačího mozku a jeho odlišnosti od savců

Ptačí mozek byl ještě před relativně krátkou dobou chápán zcela jinak než dnes. Až do 70. let 20. století byl většinou vnímán jako orgán skládající se převážně z bazálních ganglií. Ptáci byli považováni za jednoduché tvory schopné pouze instinktivního chování. Porovnávací studie kognitivních schopností prováděné v dané době na holubech, kurech a křepelkách tuto myšlenku jen dále podporovaly (např. Lorenz, 1950). Autorem tohoto tzv. „klasického

pohledu“ (obr. 1 B) na ptačí mozek byl Ludwig Ebinger, jehož dílo *Untersuchungen ber die vergleichende Anatomie des Gehirns* (svazek 5 knih vydaných v letech 1888-1903) vytvořilo první ucelenou teorii o evoluci mozku a stalo se základem nomenklatury (Jarvis et al., 2005). Postupem času přibývalo studií, které byly v rozporu s tímto klasickým pohledem (viz např. Holmgren, 1922; Karten, 1969; Puelles et al., 2000; Northcutt, 2001; Jarvis et al., 2005). Koncem 20. století se klasický pohled stal neudržitelným a bylo nezbytné upravit zastaralé názvosloví jednotlivých částí ptačího mozku. Pod dohledem mezinárodní skupiny odborníků The Avian Brain Nomenclature Consortium došlo k postupnému přejmenování jednotlivých částí ptačího mozku (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005). Ptačí koncový mozek byl dále rozdělen na Pallium, Striatum a Pallidum. Bazální ganglia (Striatum a Pallidum)

se od těch savčích téměř neliší, kdežto rozdíly najdeme v Palliu. Ptačí koncový mozek je tzv. „jaderného“ uspořádání. Pod pojmem „jádro“ si můžeme představit shluk většího počtu neuronů tvořící semiautonomní populaci, jehož jednotlivé neurony posílají signály společně do jiných populací neuronů (jader) v mozku (Striedter, 2015). Naopak savčí koncový mozek má výrazně vytvořenou vrstevnatou kůru mozkovou na povrchu (Obr. 1 zelené části), kdežto vnitřek má opět „jaderné“ uspořádání. Neurony neokortexu savců jsou uspořádány do šesti navzájem komunikujících vrstev. Mocnost této mozkové kůry je však omezená, neboť apikální dendrity pyramidálních neuronů v těchto vrstvách nejsou myelinované, a vzruch se v těchto výběžcích šíří pouze pasivně (Striedter, 2005). Zvětšení procesní kapacity savčího mozku lze při určité velikosti dosáhnout pouze zvětšováním povrchu mozkové kůry. Tento proces je u větších mozků spojen se zvrásněním (gyrifikací) mozkové kůry. Gyrfikace je tedy charakteristickým znakem velkých mozků savců. I přes tyto strukturální odlišnosti zastávají pallium ptáků a neokortex savců podobné funkce a byly u nich popsány i mnohé podobné dráhy (Jarvis, 2009). Vyskytují se i docela odvážné návrhy, že by jednotlivé funkční sloupce



v neokortexu savců mohly být homologické ohromným funkčním sloupcům v palliu ptáků (Jarvis, 2013). Recentní studie však jednoznačně dokládají, že velké mozky a inteligence se vyvinuli u ptáků a savců nezávisle (Güntürkün 2005; Dugas-Ford et al., 2012; Shanahan et al., 2013; Briscoe et al., 2018).

## 1.8 Cíle práce

Cíle této diplomové práce lze shrnout v několika následujících bodech:

- 1) S použitím metody izotropické frakční homogenizace analyzovat buněčné složení mozku u vybraných druhů hrabavých ptáků – tj. stanovit počty a hustoty neuronů a nonneuronálních buněk v šesti částech jejich mozku
- 2) Stanovit pravidla buněčného škálování pro mozky hrabavých ptáků
- 3) Porovnat tyto pravidla buněčného škálování s mozky dříve studovaných skupin ptáků (tj. s pěvci a papoušky) a s vybranými skupinami savců (primáti, hmyzožravci, vačnatci, hlodavci).
- 4) Interpretovat kvantitativní neuroanatomická zjištění v kontextu kognitivních schopností hrabavých ptáků.

## 2. MATERIÁLY A METODIKA

### 2.1. Zvířata

V této diplomové práci bylo dohromady zpracováno 36 jedinců reprezentujících 15 druhů hrabavých ptáků (Galliformes). Dále byl do této diplomové práce zařazen ještě jeden již dříve zpracovaný druh – kur banivský (*Gallus gallus*) (Olkowicz et al., 2016). Druhy byly vybrány tak, aby v rámci možností pokrývaly rovnoměrně fylogenetický strom řádu Galliformes. U následujících druhů byla data získána od třech jedinců: křepel virginský (*Colinus virginianus*), orebice rudá (*Alectoris rufa*), křepelka polní (*Coturnix coturnix*), křepelka čínská (*Coturnix chinensis*), páv korunkatý (*Pavo cristatus*), krocan divoký (*Meleagris gallopavo*), koroptev polní (*Perdix perdix*), bažant královský (*Syrnaticus reevesii*), bažant obecný (*Phasianus colchicus*) a perlička kropenatá (*Numida meleagris*). U zbylých čtyř druhů byli zpracováni pouze jeden až dva jedinci: hoko žlutolaločnatý (*Crax daubentoni*), křepel kalifornský (*Callipepla californica*), frankolín obecný (*Francolinus francolinus*) a tetřívek obecný (*Lyrurus tetrix*).

Jedinci druhů orebice rudé, bažanta královského a koroptve polního byli chovní ptáci pocházející z polo-přírodních populací. Všichni ostatní jedinci byli odkoupeni od tuzemských chovatelů. Do této studie byli zahrnuti pouze dospělí jedinci, jejichž pohlaví bylo určeno/potvrzeno při pitvě.

### 2.2 Chemikálie

Halotan (2-brom-2chlor-1,1,1-trifluorethan; Sigma-Aldrich), heparin, fyziologický roztok (PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným o koncentraci 0,137 M a pH 7,4), 4% roztok paraformaldehydu (PFA), nemrznoucí směs (30% glycerol, 30% ethylenglykol, 40% fosfátový pufr), 30% roztok sacharózy, DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), monoklonální primární protilátka Anti-NeuN, sekundární protilátka Alexa Fluor 546 (Merck spol. s.r.o.), disociační roztok (citrát sodný, Triton X-100).

### 2.3 Vybavení

Nářadí pro pitvu a manipulaci se vzorky (pinzety, skalpely, peany...), stereomikroskop (Olympus SZX16), homogemizátory (Wheaton Sigma-Aldrich), Neubauerova počítací

komůrka (Karl Hecht GmbH & Co. KG), automatické pipety, fluorescenční mikroskop OLYMPUS BX51, vibratom (Leica VT1200 S).

## 2.4 Příprava tkáně

Zvířata byla usmrcena předávkováním inhalačním anestetikem halotanem. Halotan je doporučován pro jeho snadnou manipulaci a vysokou účinnost (Close et al. 1997), ale také pro jeho vasodilatační efekt (Close et al. 1996). Ihned po usmrcení byla zvířata zvážena a transkardikálně perfundována ohřátým (40 °C) fyziologickým roztokem s 0,1% příměsí heparinu. Ve chvíli, kdy se z cévního systému vyplavila veškerá krev, následovala perfuze 4% roztokem



Obr. č. 2: Ptačí mozek rozdělen na jednotlivé části. Nahoře levá (vlevo) a pravá (vpravo) hemisféra, vlevo dole diencephalon, uprostřed dole mozkový kmen, vpravo uprostřed optická tecta a vpravo dole cerebellum.

Foto: S. Olkowicz

paraformaldehydu. Hlava byla oddělena od těla a lebka částečně otevřena pro další post-fixaci trvající 30-60 minut, po níž následovalo vypreparování mozku a jeho okamžité zvážení, aby se co nejvíce omezilo změnám hmotnosti zapříčiněným paraformaldehydem (dokumentováno bylo např. zmenšení mozkového kmene u lidí; Quester & Schröder, 1997). Z těl zvířat bylo následně určeno (či potvrzeno) pohlaví podle přítomnosti pohlavních orgánů (vaječníku, varlat). Pro následné studie byly vypreparovány také míchy. Mozky byly dále post-fixovány po dobu 7-21 dní ve 4% roztoku paraformaldehydu. Poté byl každý mozek vyfocen a rozdělen na pět hlavních částí: telencephalon (dvě samostatné hemisféry), diencephalon, tectum opticum, cerebellum a mozkový kmen. Zjednodušený postup byl následovný; hemisféry byly odděleny od diencephala přímým řezem oddělujícím subpallium od thalamu. Tectum opticum bylo následně bilaterálně odříznuto od povrchu mozkového kmene. Mozeček byl odříznut od povrchu mozkového kmene. Zbylá část byla rozdělena na diencephalon (rostrálně) a mozkový kmen (kaudálně) řezem podél roviny spojující dorzálně posteriorní komisury a ventrálně hranici hypothalamus-mesencephalon. Pro uskladnění jednotlivých struktur byla použita nemrzoucí směs, která obsahovala 30% glycerolu, 30% ethylenglycolu a 40% fosfátového pufru. Vzorke byly uskladněny při teplotě -25°C. Pro kvantifikování počtu buněk a neuronů byla u každého jedince využita jen jedna hemisféra, zatímco druhá hemisféra byla

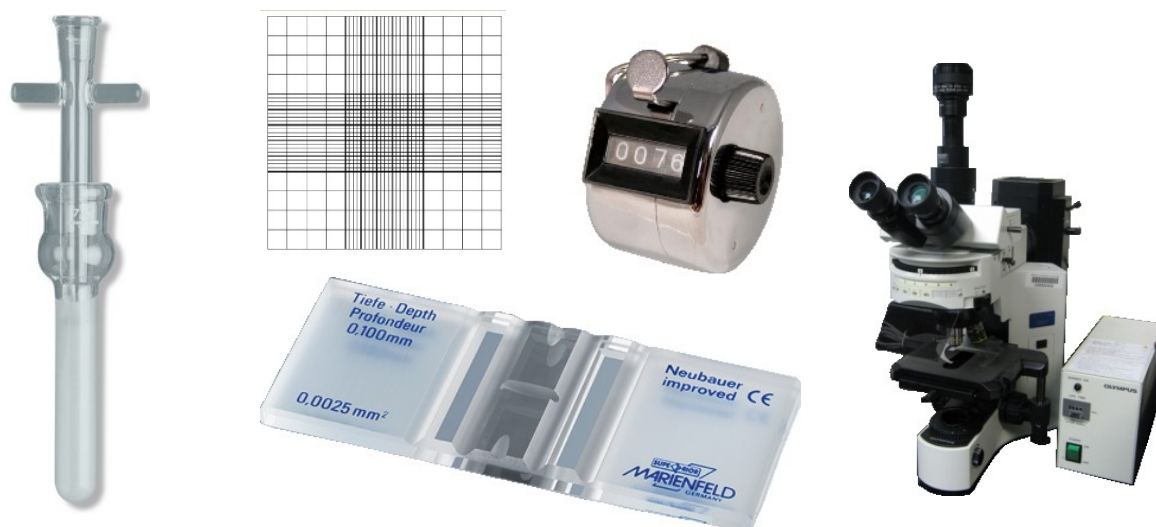
následně rozdělena na pallium a subpallium. Hemisféry určené pro rozdělení na pallium a subpallium byly zalaty do agarózy a pomocí vibratomu nařezány koronálně na plátky o tloušťce 300-500  $\mu\text{m}$  (v závislosti na velikosti hemisféry). Tyto plátky byly poté na nepřímém světle pod stereomikroskopem nařezány a rozděleny na pallium a subpallium pomocí chirurgického mikro-skalpelu. Na každém plátku vedla linie řezu podél palliální-subpalliální hranice (psp). Takto rozdělené struktury byly následně osušeny papírovým ubrouskem, zváženy v nemrznoucí směsi uloženy při teplotě  $-25^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Izotropická frakční homogenizace

Pro určení absolutního počtu neuronů a ostatních buněk v mozkové tkáni byla použita metoda izotropické frakční homogenizace (Herculano-Houzel & Lent, 2005). Její spolehlivost byla recentně potvrzena u kuřat (*Gallus domesticus*): metoda poskytuje obdobné odhady počtu neuronů a nonneurálních buněk jako podstatně pracnější objektivní stereologie (Ngwenya et al. 2017). Tato metoda umožňuje rychle a spolehlivě kvantifikovat počty neuronů a ostatních buněk v jakékoli struktuře mozku, a dokonce i dalších tkání. Její princip je založen na převodu jakkoli uspořádané struktury na homogenní suspenzi volných jader, a to manuálně pomocí homogenizátorů s definovanou vzdáleností mezi stěnou pístu a stěnou vlastního homogenizátoru. Rytmičnými pohyby pístu se roztrhají buněčné membrány a dojde k vylití organel z buňky do roztoku. Poté se fluorescenčně označí jádra DNA markerem DAPI, který se váže nejsilněji na A-T bohaté sekvence DNA dvojšroubovice (v poměru 1 molekula na 3 A-T páry) (Kapuściński & Szer, 1979). Pro určení absolutního počtu buněk už stačí jen spočítat počet jader v malé objemové frakci odebrané z promíchané homogenní suspenze a vynásobit jej celkovým objemem homogenátu. Nakonec se pro rozlišení samotných neuronů od ostatních buněk používá monoklonální protilátka Anti-NeuN, která se váže na protein NeuN, jež je produktem genu Fox-3, a je specifický pouze pro jádra neuronů (Kim et al. 2009). Existují ovšem typy neuronů, jejichž jádra nejsou touto protilátkou rozpoznávány, jako jsou například Purkyněho buňky mozečku, mitrální buňky čichového laloku, retinální fotoreceptorové neurony (Mullen et al., 1992) anebo košíčkové a hvězdicovité interneurony (Weyer & Schilling, 2003). Celkové množství neuronů je tedy poněkud podhodnoceno. Nicméně v rámci celého mozku a jeho velkých částí je podhodnocení počtu neuronů zanedbatelné, protože populace buněk, které NeuN neznačí, jsou relativně malé. Vazebná místa primárních protilátek byla vizualizována pomocí sekundární protilátky Alexa Fluor 546.

## 2.6 Stanovení počtu buněk

Každá část mozku byla manuálně zhomogenizována do izotropické suspenze za přítomnosti disociačního roztoku (40mM roztok citrátu sodného s 1 % Tritonu X-100). V průběhu homogenizace byl průběžně přidáván disociační roztok za účelem splachování buněk či tkáně zadržných na stěnách homogenizátoru. V okamžiku, kdy proti světlu v homogenizátoru nebylo možné zpozorovat kousky tkáně, byl homogenát přenesen do odměrného válce. Homogenizátor byl opláchnut disociačním roztokem pro maximální snížení ztrát zbytkových jader a tento objem z homogenizátoru přidán k homogenátu. Pro získání požadovaného objemu byl přidáván disociační roztok současně s takovým množstvím DAPI, aby výsledný roztok obsahoval 5 % roztoku DAPI v celkovém objemu (200 ml roztoku DAPI byl předem připraven rozpuštěním 40 mg DAPI ve 200 ml destilované vody). Absolutní počet buněk v takto připraveném homogenátu a tím pádem i v původní struktuře byl kvantifikován určením denzity jader drobné frakce odebrané z tohoto homogenátu. Před odebráním frakce o objemu alespoň 10  $\mu$ l byl homogenát vždy pečlivě zamíchán. Tato frakce byla následně umístěna do Neubauerovy počítací komůrky (BDH, Dagenham, Essex, UK) a spočítána pomocí fluorescenčního mikroskopu (OLYMPUS BX 51) s optimálními filtry (U-MWU2 pro DAPI a U-MWG2 pro Alexa Fluor 546-konjugované sekundární protilátky) při zvětšení 400x. Objem suspenze nad mřížkou v počítací komůrce činil 0,0001 ml. Po určení počtu jader v této mřížce poté stačilo vynásobit počet jader celkovým objemem homogenátu, čímž se získal absolutní počet jader, a tím pádem buněk, v celé struktuře. Ovšem aby byla co nejvíce omezena statistická chyba vnesená náhodným odběrem vzorku, byla odebrána a spočítána frakce nejméně čtyři krát

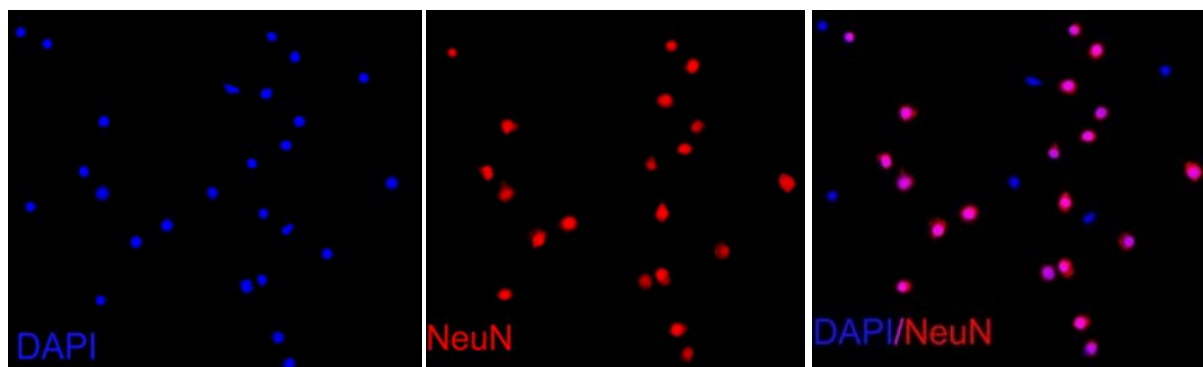


Obr. č. 3: Pomůcky nezbytné pro izotropní frakční homogenizaci: Homogenizátor (vlevo), Neubauerova počítací komůrka (uprostřed dole), mřížka počítací komůrky (vlevo nad počítací komůrkou), mechanické počítadlo (vpravo nad počítací komůrkou), fluorescenční mikroskop OLYMPUS BX 51 (vpravo).

Foto: informační materiály výrobce

pro každý homogenát. Pro tyto výsledky se dále vypočítal koeficient variace (CoV), jehož limit byl arbitrárně nastaven na 15 %, nicméně ve většině případů bylo dosaženo hodnot CoV nižší než 10 %. Homogenáty jednotlivých struktur byly poté zcentrifugovány a po odebrání supernatantu (čímž jsme výrazně snížili objem, a tím pádem i prostor, který tyto vzorky zaberou) byly zality do nemrznoucí směsi, zamíchány a uskladněny do mrazáku o teplotě -25°C.

Dalším krokem je určit zastoupení neuronů v tomto celku. Z homogenátu uloženém v nemrznoucí směsi byla odebrána 100-200µl frakce, v závislosti na tom, jak moc byl homogenát zředěn nemrznoucí směsí či o jakou strukturu se jednalo (v případě cerebella stačí odebrat 100 µl kvůli jeho vysoké buněčné hustotě, zatímco z mozkového kmene by se mělo odebrat alespoň o polovinu více), účelem je dosáhnout adekvátní konečné buněčné hustoty v počítačací komůrce. Ovšem výsledná hustota se vždy dá (jednodušeji) snížit přidáním fyziologického roztoku (PBS) nebo (složitěji) zvýšit centrifugací a odebráním části kapalně fáze. Takto odebraná frakce byla zcentrifugována, zbavena nemrznoucí směsí a resuspendována v PBS. Vymývání nemrznoucí směsi pomocí PBS bylo dále třikrát zopakováno. Následně byla ke vzorku přidána primární protilátka Anti-NeuN (MerckMillipore) o koncentraci 1 µl na 800 µl vzorku a 40 µl kozího séra na 800 µl vzorku. Takto připravený vzorek se nechal inkubovat na míchadle přes noc. Druhého dne byl vzorek opět třikrát centrifugován a promyt v PBS s 0,5% příměsí Tritonu X-100. K takto připravenému vzorku se přidala sekundární protilátka Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Life Technologies Corp.) opět v poměru 1:800 vůči konečnému objemu vzorku a vzorek se nechal inkubovat alespoň 3 hodiny na míchadle. Po inkubaci byl vzorek opět třikrát zcentrifugován a promyt v PBS. Takto očištěný vzorek jsme zalili do 800 µl PBS s 5% příměsí DAPI po čemž byl vzorek připraven pro určení poměrového zastoupení neuronů a nonneurálních buněk (buňky gliové a endotelové). Pomocí



Obr. č. 4: Příklad obarveného homogenátu mozečku. Jádra všech buněk obarvena pomocí DAPI modře (vlevo). Jádra neuronů obarvena pomocí NeuN markeru červeně (uprostřed). Při použití duálního filtru lze snadno a rychle určit poměrové zastoupení neuronů a nonneurálních buněk ve studované tkáni (vpravo).

Foto: S. Olkowicz

fluorescenčního mikroskopu vybaveného patřičnými filtry (U-MWU2 pro DAPI a U-MWG2 pro Alexa Fluor 546-konjugované sekundární protilátky) pak byl stanoven poměr počtu neuronů a nonneurálních buněk. Jako neurony byly interpretovány NeuN a DAPI pozitivní jádra, jako buňky nonneurální DAPI pozitivní a NeuN negativní jádra (viz obr. č. 4). Takto bylo prozkoumáno nejméně 500 buněčných jader. Výsledné procentuální zastoupení bylo poté využito k výpočtu celkového počtu neuronů a nonneurálních buněk. Nonneurální buňky zahrnují oligodendrocyty, astrocyty, mikroglie, ependymální a endotelové buňky. Vzájemné poměry těchto buněk nebyly analyzovány.

## 2.7 Analýza dat

Pro veškerou analýzu byly použity průměrné hodnoty pro každý druh. Statistické analýzy byly provedeny v programech R 3.3.2. (R Core Team, 2016) a JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA). Pro testování závislosti mezi proměnnými byl použit neparametrický Spearmanův test. Hladina významnosti ( $p$ ) byla vždy stanovena na hodnotu  $p = 0,05$ . V případě, kdy bylo dosaženo hladiny významnosti, byla použita regresní analýza, která byla provedena metodou nejmenších čtverců. Pomocí Smatr balíčku v programu R se takto vygeneruje hlavní redukovaná regresní přímka. Tato regresní přímka dále vysvětluje, jak se jednotlivé faktory, jako jsou hmotnosti struktury, počty a hustoty buněk, navzájem ovlivňují. Balíček Smatr byl dále použit pro porovnání škálování mezi různými skupinami, a to ať už mezi jednotlivými strukturami mozku nebo mezi taxonomickými ptačími řády. Nejdříve bylo testováno, zdali se jednotlivé regresní přímky liší ve sklonu. Kdyby se regresní přímka skupiny signifikantně lišila ve sklonu od ostatních, došlo by k její odebrání z modelu, následně byl testován efekt kategorického prediktoru napříč skupinami s homogenními sklony a jejich rozdíly byly určovány na základě interceptu. Pro porovnání relativní velikosti mozku mezi hokovitými (*Aves, Cracidae*) a ostatními hrabavými ptáky (*Aves, Galliformes*) byl použit t-test. Do testu vstupovaly residuály odvozené log-log regrese hmotnosti mozku na hmotnosti těla.

Pro porovnání pravidel buněčného škálování hrabavých ptáků s pěvci a papoušky byla použita data publikovaná naší skupinou (Olkowicz et al., 2016), pro porovnání se savci dříve publikovanýmá data pro primáty (Herculano-Houzel et al., 2007; Azevedo et al. 2009; Gabi et al., 2010), hlodavce s výjimkou rypošů (Herculano-houzel et al., 2006, 2011), hmyzožravce (Sarko et al., 2009) a vačnatce (Dos Santos et al., 2017).

### 3. VÝSLEDKY

Hlavní kvantitativní data získaná během této diplomové práce jsou shrnuta v tabulkách č. 1–5. Celý dataset je v excelové tabulce v příloze (Tabulka S1 obsahuje průměrná data pro druhy, Tabulka S2 data pro zkoumané jednotlivce).

**Tabulka č. 1: Hmotnost těla a mozku, celkový počet neuronů a nonneuronálních buněk**

Druh	n	Hmotnost těla [g]	Hmotnost mozku [g]	Neuronů celkem [x 10 <sup>6</sup> ]	Nonneuronálních buněk celkem [x 10 <sup>6</sup> ]
Křepelka čínská	3	43.8 ± 2.9	0.521 ± 0.026	80.48 ± 5.42	74.44 ± 5.57
Křepelka polní	3	94.9 ± 14.0	0.787 ± 0.025	117.76 ± 2.12	128.19 ± 3.02
Křepel virginský	3	181.1 ± 12.1	1.124 ± 0.100	148.40 ± 13.35	159.20 ± 15.69
Křepel kalifornský	1	199.6	1.256	172.39	169.93
Koroptev polní	3	337.3 ± 16.2	1.565 ± 0.035	170.29 ± 22.06	168.91 ± 27.98
Frankolín obecný	2	368.6 ± 11.2	1.755 ± 0.157	232.54 ± 9.34	233.36 ± 19.28
Orebice rudá	3	459.7 ± 59.1	2.091 ± 0.070	197.18 ± 9.30	246.66 ± 11.71
Kur bankivský	3	861.3 ± 107.3	2.819 ± 0.200	220.84 ± 44.50	286.68 ± 17.35
Tetřívěk obecný	2	897.8 ± 192.2	3.375 ± 0.199	280.87 ± 1.96	386.68 ± 43.14
Bažant královský	3	1,119.0 ± 166.6	3.691 ± 0.590	387.17 ± 84.08	440.67 ± 83.70
Perlička kropenatá	3	1,722.0 ± 276.4	3.747 ± 0.345	447.12 ± 58.43	446.56 ± 52.89
Bažant obecný	3	1,221.7 ± 280.3	3.845 ± 0.402	321.36 ± 35.34	385.54 ± 8.86
Krocán divoký	3	3,453.6 ± 555.4	6.041 ± 0.468	492.87 ± 13.52	644.29 ± 47.18
Páv korunkatý	3	3,599.2 ± 707.2	6.194 ± 0.414	570.93 ± 31.59	659.70 ± 16.86
Hoko žlutolaločnatý	1	2,448.6	9.020	652.99	707.84
Variace, max./min.		82.2×	17.3×	8.1×	9.5×

Druhy jsou seřazeny podle narůstající hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uváděné jako průměr ± SD; n – počet zkoumaných jedinců.

Tabulka č. 2: Hmotnosti jednotlivých částí mozku

Druh	Telencephalon [g]	Subpallium [% of Tel]	Diencephalon [g]	Tectum [g]	Cerebellum [g]	Mozkový kmen [g]
Křepelka čínská	0.271 ± 0.014	21.66	0.046 ± 0.002	0.068 ± 0.004	0.070 ± 0.002	0.060 ± 0.004
Křepelka polní	0.417 ± 0.015	14.72	0.077 ± 0.005	0.112 ± 0.005	0.114 ± 0.014	0.084 ± 0.001
Křepel virginský	0.605 ± 0.075	17.52	0.107 ± 0.013	0.151 ± 0.014	0.152 ± 0.003	0.126 ± 0.005
Křepel kalifornský	0.699	15.21	0.109	0.145	0.199	0.117
Koroptev polní	0.852 ± 0.012	15.40	0.151 ± 0.004	0.191 ± 0.009	0.203 ± 0.013	0.155 ± 0.003
Frankolín obecný	0.983 ± 0.102	19.15	0.164 ± 0.000	0.246 ± 0.041	0.233 ± 0.008	0.162 ± 0.015
Orebice rudá	1.208 ± 0.065	14.41	0.184 ± 0.013	0.253 ± 0.008	0.248 ± 0.007	0.216 ± 0.009
Kur bankivský	1.567 ± 0.162	14.83	0.245 ± 0.014	0.345 ± 0.022	0.369 ± 0.024	0.293 ± 0.010
Tetřívěk obecný	1.841 ± 0.117	17.91	0.310 ± 0.029	0.416 ± 0.005	0.487 ± 0.000	0.342 ± 0.020
Bažant královský	2.039 ± 0.316	19.91	0.300 ± 0.040	0.469 ± 0.091	0.513 ± 0.099	0.326 ± 0.083
Perlička kropenatá	2.176 ± 0.208	17.53	0.311 ± 0.036	0.407 ± 0.043	0.471 ± 0.086	0.346 ± 0.028
Bažant obecný	2.248 ± 0.230	18.46	0.329 ± 0.063	0.466 ± 0.081	0.464 ± 0.059	0.386 ± 0.067
Krocán divoký	3.382 ± 0.309	17.11	0.471 ± 0.023	0.662 ± 0.070	0.815 ± 0.037	0.582 ± 0.051
Páv korunkatý	3.743 ± 0.252	18.82	0.453 ± 0.023	0.622 ± 0.037	0.872 ± 0.092	0.556 ± 0.031
Hoko žlutolaločnatý	5.761	17.16	0.622	0.885	1.302	0.776
Variace, max./min.	21.3×		13.5×	13.0×	18.6×	12.9×

Druhy jsou seřazeny podle narůstající hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SD.

Tabulka č. 3: Počty neuronů v jednotlivých částech mozku

Druh	Telencephalon [x 10 <sup>6</sup> ]	Subpallium [% of Tel]	Diencephalon [x 10 <sup>6</sup> ]	Tectum [x 10 <sup>6</sup> ]	Cerebellum [x 10 <sup>6</sup> ]	Mozkový kmen [x 10 <sup>6</sup> ]
Křepelka čínská	25.27 ± 2.62	23.15	1.46 ± 0.12	9.42 ± 1.22	42.95 ± 1.70	1.37 ± 0.16
Křepelka polní	26.75 ± 1.87	18.54	2.26 ± 0.49	11.72 ± 0.19	75.20 ± 2.01	1.83 ± 0.13
Křepel virginský	47.37 ± 3.36	21.11	2.77 ± 0.30	16.05 ± 1.37	80.02 ± 10.62	2.19 ± 0.45
Křepel kalifornský	62.00	18.12	3.50	12.61	92.32	1.95
Koroptev polní	43.64 ± 12.56	18.31	3.21 ± 0.76	13.48 ± 1.08	107.55 ± 8.56	2.41 ± 0.07
Frankolín obecný	63.80 ± 10.45	17.70	4.16 ± 0.76	22.19 ± 4.09	139.93 ± 4.62	2.45 ± 0.17
Orebice rudá	58.65 ± 8.33	16.86	3.55 ± 0.20	22.63 ± 1.50	108.89 ± 4.70	3.46 ± 0.22
Kur bankivský	73.79 ± 2.46	42233	4.02 ± 0.76	25.50 ± 3.26	114.45 ± 39.59	3.08 ± 0.57
Tetřívěk obecný	64.30 ± 11.47	18.90	5.49 ± 1.14	29.52 ± 2.99	176.65 ± 17.50	4.91 ± 0.06
Bažant královský	98.47 ± 20.68	22.04	5.23 ± 0.46	32.92 ± 7.19	245.72 ± 55.82	4.83 ± 0.20
Perlička kropenatá	156.62 ± 28.22	18.24	5.16 ± 0.54	27.57 ± 1.11	253.93 ± 28.94	3.84 ± 0.62
Bažant obecný	93.11 ± 4.70	22.06	4.72 ± 0.87	25.97 ± 0.84	194.34 ± 36.64	3.23 ± 0.30
Krocán divoký	128.33 ± 16.50	21.46	6.12 ± 0.95	37.50 ± 1.36	315.74 ± 25.31	5.17 ± 0.18
Páv korunkatý	155.59 ± 13.81	20.04	5.54 ± 0.58	31.31 ± 0.68	374.52 ± 21.71	3.97 ± 0.42
Hoko žlutolaločnatý	147.23	18.14	5.43	24.42	472.68	3.24
Variace, max./min.	6.2×		4.2×	4.0×	11.0×	3.8×

Druhy jsou seřazeny podle narůstající hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SD.

**Tabulka č. 4: Počty nonneurálních buněk v jednotlivých částech mozku**

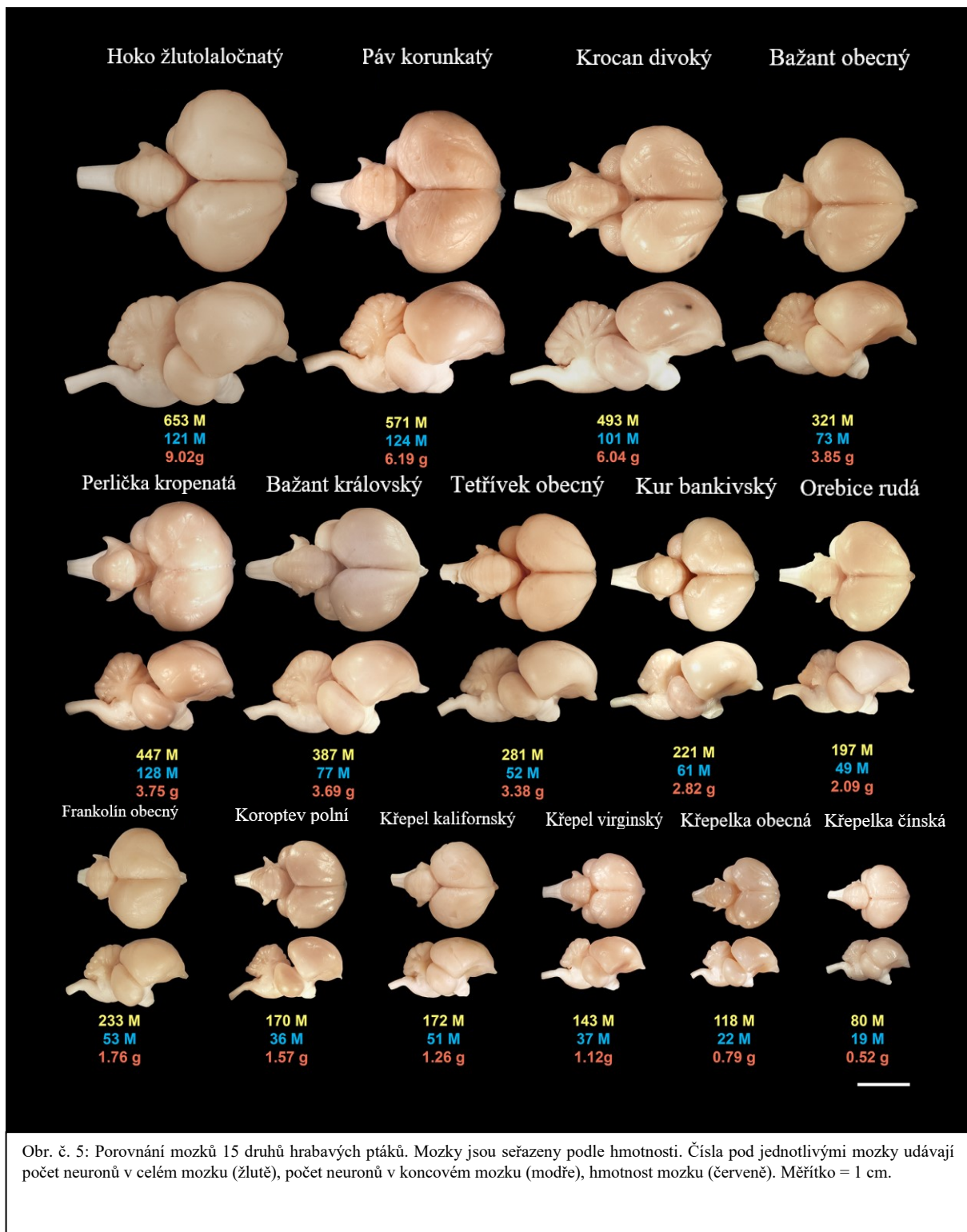
Druh	Telencephalon [x 10 <sup>6</sup> ]	Subpallium [% of Tel]	Diencephalon [x 10 <sup>6</sup> ]	Tectum [x 10 <sup>6</sup> ]	Cerebellum [x 10 <sup>6</sup> ]	Mozkový kmen [x 10 <sup>6</sup> ]
Křepelka čínská	23.54 ± 2.96	23.17	8.65 ± 1.01	10.97 ± 1.53	22.59 ± 1.01	8.69 ± 0.66
Křepelka polní	48.42 ± 2.36	18.44	12.73 ± 0.77	19.92 ± 0.76	33.61 ± 3.31	13.52 ± 0.52
Křepel virginský	57.20 ± 4.82	21.15	17.97 ± 2.01	23.83 ± 2.50	39.95 ± 4.71	20.25 ± 3.49
Křepel kalifornský	62.50	18.56	19.50	21.63	50.33	15.98
Koroptev polní	65.64 ± 20.23	18.32	20.79 ± 4.04	27.75 ± 1.69	34.37 ± 4.06	20.35 ± 1.40
Frankolín obecný	86.83 ± 11.85	17.93	28.71 ± 1.83	36.66 ± 7.23	62.01 ± 0.75	19.16 ± 2.78
Orebice rudá	101.77 ± 13.22	17.01	30.88 ± 1.91	35.54 ± 2.50	46.11 ± 2.86	32.37 ± 3.64
Kur bankivský	131.98 ± 9.48	17.00	38.42 ± 4.70	45.39 ± 7.09	28.28 ± 9.67	42.63 ± 0.98
Tetřívka obecný	157.14 ± 33.44	19.03	48.15 ± 14.02	50.60 ± 4.73	83.36 ± 11.01	47.44 ± 1.96
Bažant královský	181.04 ± 38.34	22.04	48.58 ± 8.18	66.85 ± 15.47	95.19 ± 15.14	49.01 ± 7.97
Perlička kropenatá	205.65 ± 33.11	19.20	46.25 ± 2.70	55.35 ± 2.32	95.47 ± 13.47	43.85 ± 4.59
Bažant obecný	169.31 ± 1.08	22.15	47.32 ± 8.10	55.02 ± 1.77	69.94 ± 10.30	43.95 ± 0.18
Krocán divoký	301.58 ± 38.07	21.85	71.36 ± 3.06	83.86 ± 1.53	110.20 ± 6.40	77.29 ± 12.14
Páv korunkatý	280.56 ± 20.54	20.92	68.36 ± 8.37	89.15 ± 3.16	147.75 ± 1.46	73.88 ± 10.33
Hoko žlutolaločnatý	313.17	18.90	63.37	81.40	192.52	57.36
Variace, max./min.	13.3x		8.3x	8.1x	8.5x	8.9x

Druhy jsou seřazeny podle narůstající hmotnosti mozku. Všechny hodnoty jsou uváděné jako průměr ± SD.

**Tabulka č. 5: Pravidla buněčného škálování**

Závislá proměnná	Vysvětlující proměnná	Mocnná funkce	r <sup>2</sup>	p hodnota (exponent)	95 % konfidenční interval
M <sub>BR</sub>	N <sub>BR</sub>	$M_{BR} = 1.583 \times 10^{-11} \times N_{BR}^{1.331}$	0.953	<0.000 1	1.168 - 1.516
M <sub>TEL</sub>	N <sub>TEL</sub>	$M_{TEL} = 5.370 \times 10^{-12} \times N_{TEL}^{1.452}$	0.876	<0.000 1	1.177 - 1.790
M <sub>DIE</sub>	N <sub>DIE</sub>	$M_{DIE} = 1.500 \times 10^{-13} \times N_{DIE}^{1.841}$	0.899	<0.000 1	1.523 - 2.224
M <sub>TEC</sub>	N <sub>TEC</sub>	$M_{TEC} = 8.989 \times 10^{-14} \times N_{TEC}^{1.707}$	0,850	<0.000 1	1,356 - 2,148
M <sub>CB</sub>	N <sub>CB</sub>	$M_{CB} = 5.217 \times 10^{-11} \times N_{CB}^{1.197}$	0.945	<0.000 1	1.041 - 1.376
M <sub>BS</sub>	N <sub>BS</sub>	$M_{BS} = 1.214 \times 10^{-13} \times N_{BS}^{1.898}$	0.772	<0.000 1	1.431 - 2.518
M <sub>BR</sub>	O <sub>BR</sub>	$M_{BR} = 1.236 \times 10^{-10} \times O_{BR}^{1.217}$	0.979	<0.000 1	1.116 - 1.329
M <sub>TEL</sub>	O <sub>TEL</sub>	$M_{TEL} = 1.278 \times 10^{-9} \times O_{TEL}^{1.120}$	0.972	<0.000 1	1.014 - 1.237
M <sub>DIE</sub>	O <sub>DIE</sub>	$M_{DIE} = 5.461 \times 10^{-10} \times O_{DIE}^{1.142}$	0.979	<0.000 1	1.047 - 1.245
M <sub>TEC</sub>	O <sub>TEC</sub>	$M_{TEC} = 2.706 \times 10^{-10} \times O_{TEC}^{1.187}$	0.979	<0.000 1	1.089 - 1.294
M <sub>CB</sub>	O <sub>CB</sub>	$M_{CB} = 3.684 \times 10^{-11} \times O_{CB}^{1.276}$	0.797	<0.000 1	0.978 - 1.667
M <sub>BS</sub>	O <sub>BS</sub>	$M_{BS} = 7.148 \times 10^{-10} \times O_{BS}^{1.136}$	0.957	<0.000 1	1.004 - 1.286

Pro výpočet alometrických vztahů byly použity průměrné hodnoty pro jednotlivé druhy (viz tabulky 3–6). BR – mozek, CB – cerebellum, DIE – diencephalon, M – hmotnost (v gramech), N – počet neuronů, O – počet ostatních (nonneurálních) buněk, r<sup>2</sup> – koeficient determinace vypočítaný z hlavní redukované regresní přímky průměrných hodnot jednotlivých druhů, TEC – tectum, TEL – telencephalon



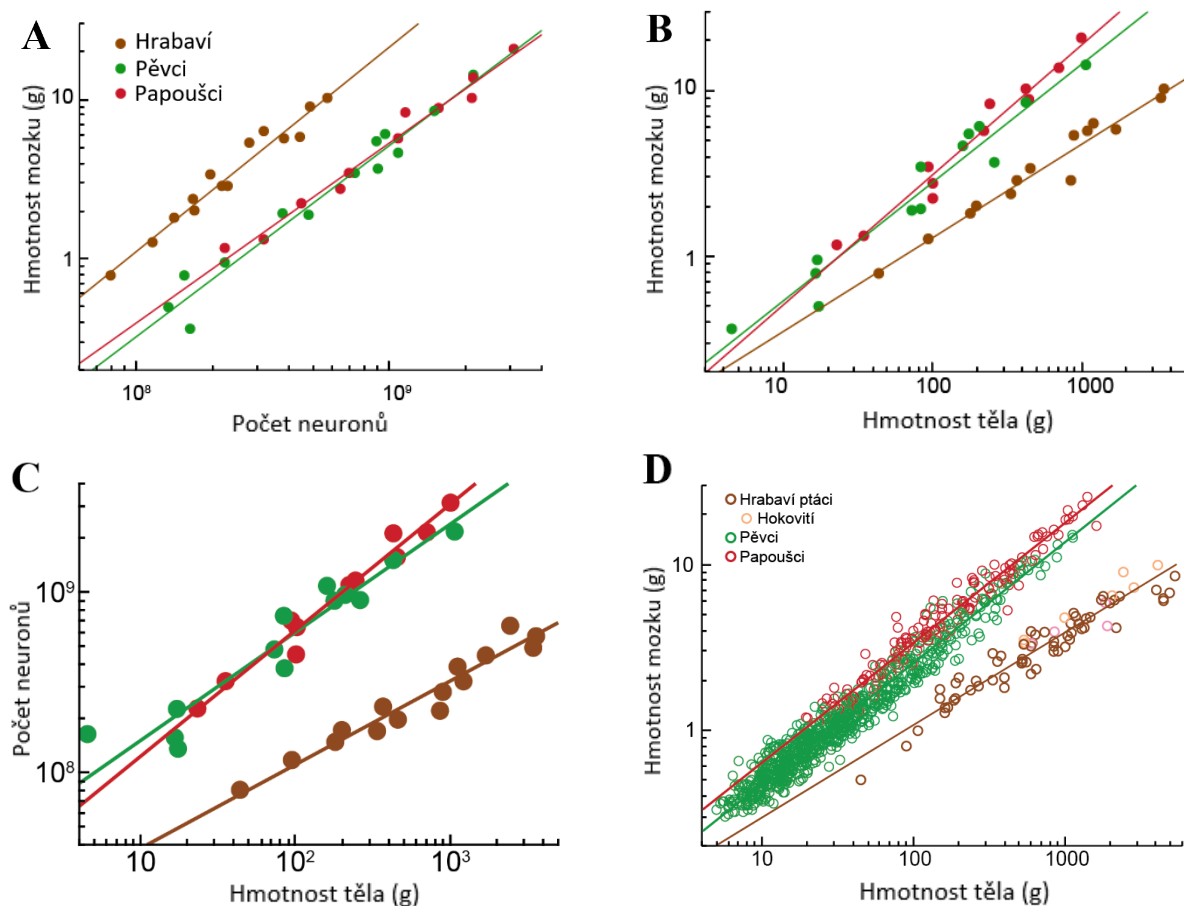
### 3. 1. Velikost těla, mozku a absolutní počty neuronů

Zkoumáno bylo 15 druhů hrabavých ptáků. Hmotnost jejich těla byla v rozmezí od 44 g u křepelky čínské (*Coturnix chinensis*) až po 3600 g u páva korunkatého (*Pavo cristatus*), hmotnost mozku se pohybovala v rozmezí od 0,52 g u křepelky čínské (*Coturnix chinensis*) do 9,02 g u hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*). Rozdíly ve velikosti těla jsou tedy více jak 80-tinásobné, zatímco rozdíly ve hmotnosti mozku „pouze“ 17-tinásobné. Absolutní počty neuronů v mozku se pohybují v rozmezí od 80 milionů u křepelky čínské (*Coturnix chinensis*) do 653 milionů u hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*), rozdíly v počtu neuronů jsou tedy jen osminásobné (Tab. 3). Vztah mezi hmotností mozku a počtem neuronů může být vysvětlen funkcí  $M_{BR} = 1,583 \times 10^{-11} \times N_{BR}^{1,331}$  (Tab č. 4). Jelikož škálovací koeficient (směrnice regresní přímky) je výrazně vyšší než 1,0 (95 % konfidenčního intervalu (CI) = 1,168 – 1,516), jakýkoli nárůst počtu neuronů je doprovázen ještě výraznějším nárůstem hmotnosti struktury. Například 10-ti násobné zvýšení počtu neuronů by vedlo ke 21,4x většímu mozku. Obrázek č. 6 A porovnává škálování hmotnosti mozku a absolutního počtu neuronů mezi hrabavými ptáky, pěvci a papoušky. Alometrické přímky těchto tří skupin se ve sklonu téměř neliší (Likelihood ratio statistic (LRS)<sub>2,37</sub> = 3,384, p = 0,184), ovšem přímka hrabavých ptáků má signifikantně vyšší intercept (hrabaví ptáci versus pěvci: LRS<sub>1,28</sub> = 107,31, p = 2x10<sup>-16</sup>; hrabaví ptáci versus papoušci: LRS<sub>1,26</sub> = 84,36, p = 2x10<sup>-16</sup>), což poukazuje na přítomnost taxonomických rozdílů v hustotě neuronů: hrabaví ptáci mají signifikantně nižší neuronální hustoty než pěvci a papoušci. Mozek hrabavého ptáka tedy obsahuje přibližně dvakrát méně neuronů než stejně velký mozek pěvce či papouška.

Relativní velikost mozku je odvozena z alometrického vztahu mezi hmotností těla a hmotností mozku. Pro 15 námi zkoumaných druhů hrabavých ptáků lze vztah mezi velikostí mozku a velikostí těla vysvětlit mocninnou funkcí  $M_{BR} = 0,047 \times M_{BO}^{0,616}$  ( $r^2 = 0,964$ ,  $P < 10^{-10}$ ). Koeficient škálování je nejen signifikantně nižší než 1,0 (CI = 0,518 - 0,600), ale také signifikantně nižší než u pěvců a papoušků (hrabaví ptáci versus pěvci: LRS<sub>2,28</sub> = 3,57, p = 0,058, hrabaví ptáci versus papoušci: LRS<sub>2,26</sub> = 8,01, p = 0,005). Rozdíly v relativní velikosti mozku mezi hrabavými ptáky a pěvci a papoušky se zvětšují s rostoucí velikostí těla. A vzhledem k tomu, že mají hrabaví ptáci menší mozky a nižší průměrnou hustotu neuronů než pěvci a papoušci podobných velikostí, jejich mozky obsahují výrazně menší absolutní počty neuronů. Například bažant obecný (*Phasianus colchicus*) je o něco málo větší (těžší) než ara ararauna (*Ara ararauna*), ovšem neuronů má ve svém mozku desetkrát méně. Podobně

například kur bankivský (*Gallus gallus*) má 50krát větší (těžší) tělo než sýkora koňadra (*Parus major*), ale oba druhy mají přibližně stejný počet neuronů v mozku.

Hoko žlutolaločnatý (*Crax daubentoni*) je zajímavým případem. Ačkoli je zástupcem bazální čeledi hokovitých (*Cracidae* – zahrnující kromě hoků ještě čačalaky a guany), ze všech zkoumaných druhů byla právě u hoka pozorována jak největší hmotnost mozku, tak i absolutní počet neuronů (obr. č. 6 A; tab. č. 1). Mozky hokovitých ptáků mají tendenci dosahovat větších rozměrů než mozky ostatních hrabavých ptáků. Relativní velikost mozku hokovitých ptáků (spočtená jako residuální hmotnost mozku z regrese pro všechny hrabavé) je výrazně vyšší než u ostatních hrabavých ptáků ( $t_{1,70} = 4,745$ ,  $p = 0,0006$ ; obr. č. 6 D).



Obr. č. 6: Pravidla buněčného škálování pro mozky hrabavých ptáků srovnaná s tímž pro pěvce a papoušky.

(A) Vztah mezi počtem neuronů a hmotností mozku. Hrabaví ptáci mají hmotnost mozku výrazně vyšší pro daný počet neuronů než pěvci a papoušci. Jinak řečeno mozky hrabavých ptáků mají mnohem méně neuronů než stejně velké mozky pěvců a papoušků.

(B) Vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku mezi třemi taxony ptáků. Hrabaví ptáci mají relativně, tj. vůči hmotnosti těla, výrazně menší mozky než pěvci a papoušci.

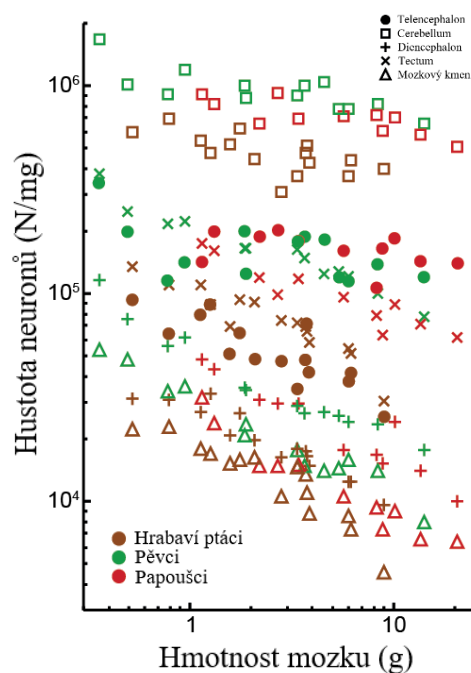
(C) Vztah mezi hmotností těla a počtem neuronů. Hrabaví ptáci mají tendenci mít výrazně méně neuronů než pěvci nebo papoušci o stejné hmotnosti těla.

(D) Vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku mezi třemi taxony ptáků. Pověšněte si, že hokoví ptáci mají relativně větší mozky než průměrný hrabavý pták.

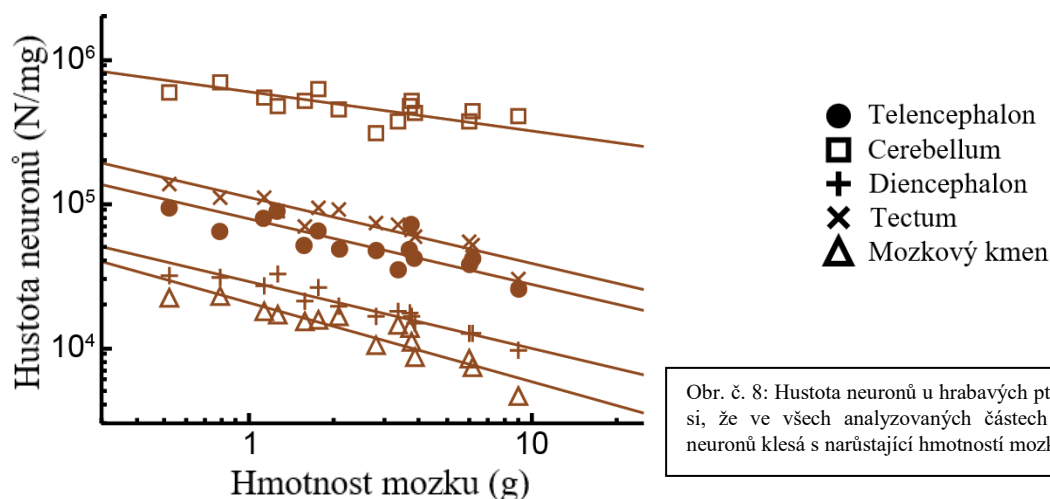
### 3. 2. Hustoty neuronů

U hrabavých ptáků se hustoty neuronů v různých částech mozku výrazně liší a s rostoucí velikostí jakékoli struktury hustota neuronů rychle klesá. Exponent škálování se pohybuje v rozmezí od -0,271 do -0,548; hodnoty  $r^2$  mezi 0,471 a 0,905,  $p \leq 0,005$  ve všech případech (obr. č. 8). Stejně jako u ostatních ptačích skupin (Olkowicz et. al. 2016), u hrabavých ptáků dosahuje nejvyšších hustot neuronů cerebellum (mozeček;  $310 - 660 \times 10^3$  N/mg) a nejnižších hustot neuronů mozkový kmen ( $4 - 28 \times 10^3$  N/mg).

Zajímavostí je, že míra poklesu neuronálních hustot s narůstající velikostí mozku má tendenci negativně korelovat s celkovou neuronální hustotou v dané části mozku (exponenty škálování: cerebellum, -0,271; tectum opticum, -0,457; telencephalon, -0,454; diencephalon, -0,463; mozkový kmen, -0,548). Hustoty neuronů ve všech částech mozku jsou u hrabavých ptáků signifikantně nižší než u pěvců a papoušků (Obr. č. 7). S výjimkou koncového mozku se sklon alometrických přímk všech částí mozku mezi různými ptačími taxony téměř neliší ( $p > 0,224$  ve všech případech), ovšem alometrické přímky hrabavých ptáků mají mnohem nižší intercept ( $p < 0,005$  ve všech případech). V těchto částech jsou hustoty neuronů u hrabavých ptáků 1,3 – 2,2-krát nižší než u pěvců a papoušků. V případě koncového mozku jsou tyto rozdíly ještě výraznější, protože alometrická přímka hrabavých ptáků má nejen nižší intercept, ale také její sklon je nižší (hrabaví ptáci versus pěvci:  $LRS_{2,28} = 4,36$ ,  $p = 0,037$ ; hrabaví ptáci versus papoušci:  $LRS_{2,26} =$



Obr. č. 7: Srovnání hustoty neuronů hrabavých ptáků s pěvci a papoušky.

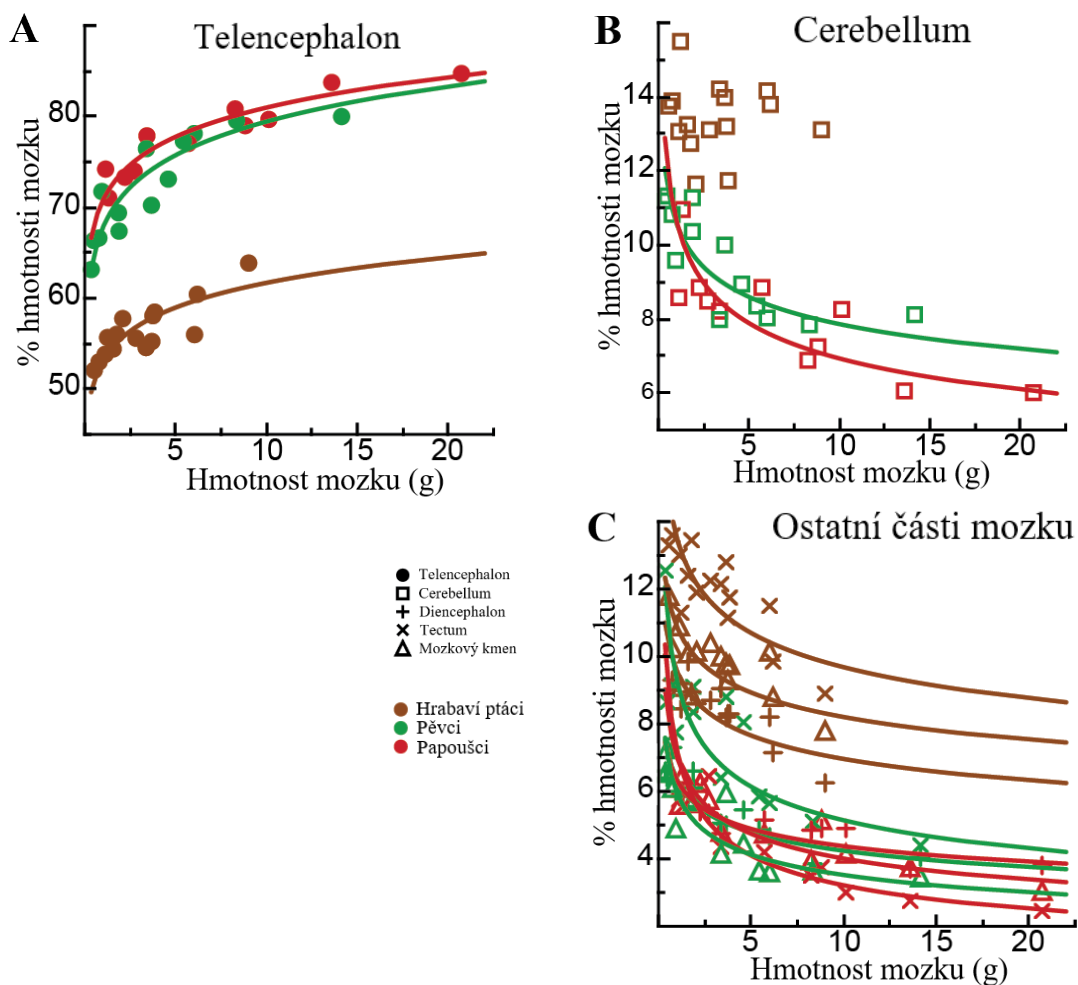


Obr. č. 8: Hustota neuronů u hrabavých ptáků. Pověšimněte si, že ve všech analyzovaných částech mozku hustota neuronů klesá s narůstající hmotností mozku.

14,29,  $p = 0,0002$ ). Hustoty neuronů v koncovém mozku jsou u hrabavých ptáků 2,3 – 4,9-krát nižší než u pěvců a papoušků.

### 3. 3. Relativní distribuce hmotností a neuronů

S rostoucí celkovou hmotností mozku roste podíl hmotnosti koncového mozku, a to na úkor ostatních částí mozku kromě mozečku, v rozsahu od 52 % do 64 % celkové hmotnosti mozku (obr. č. 9 A). Ovšem relativní velikost koncového mozku je u hrabavých ptáků mnohem menší než u pěvců a papoušků (pěvci: 63 % až 80 %, papoušci: 71 % až 85 %). Relativní velikost



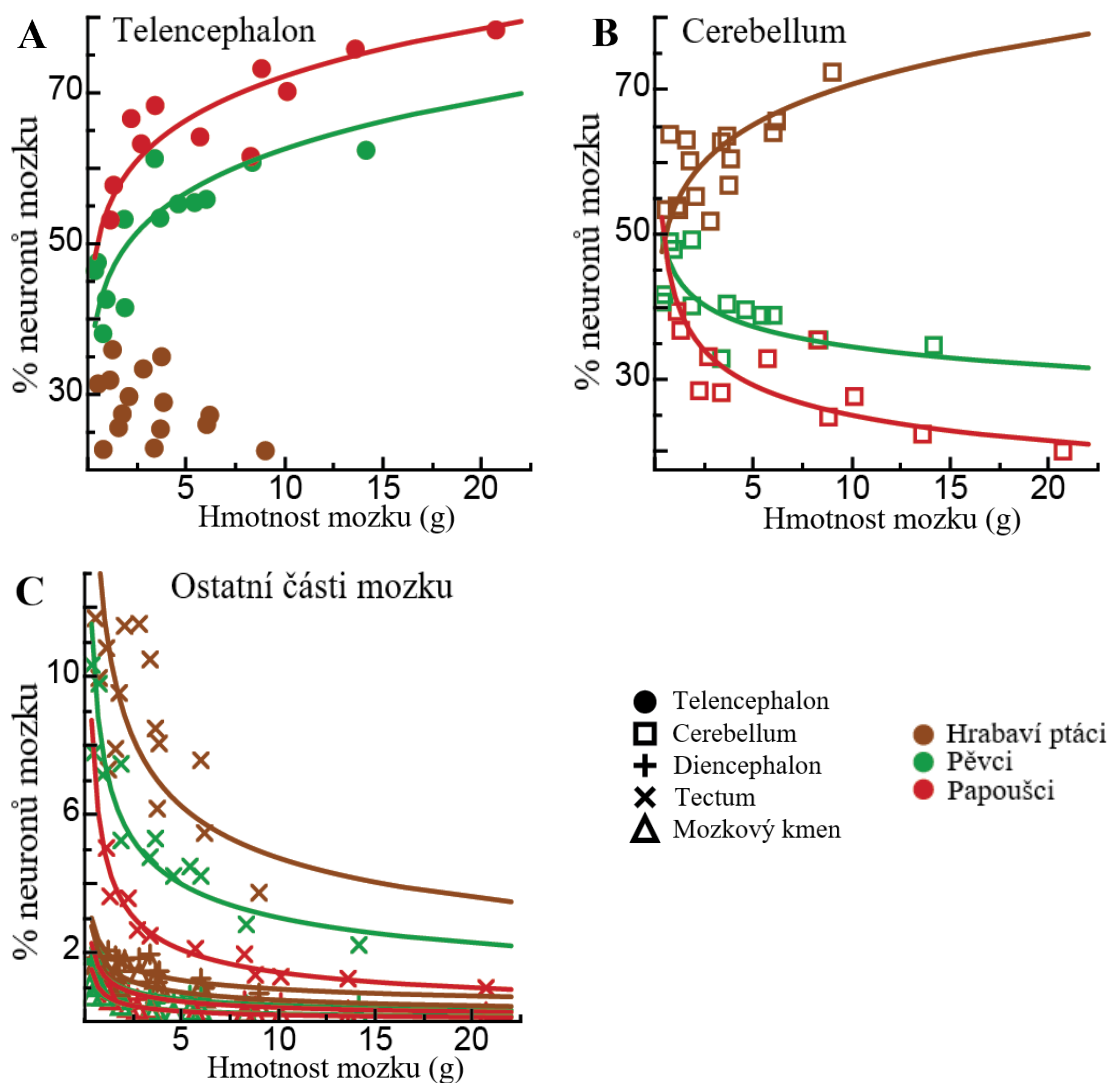
Obr. č. 9: Relativní (procentuální) velikost analyzovaných částí mozku, srovnání mezi hrabavými ptáky, pěvci a papoušky.

(A) Koncový mozek. Povšimněte si, že relativní velikost koncového mozku roste u všech tří taxonů s velikostí mozku, u hrabavých ptáků je však tento trend méně výrazný než u pěvců a papoušků.

(B) Mozeček. Zatímco u pěvců a papoušků relativní velikost mozečku s velikostí mozku klesá, u hrabavých ptáků nedochází k signifikantním změnám.

(C) Ostatní části mozku. Diencephalon, tectum opticum a mozkový kmen jsou u hrabavých ptáků relativně větší než u pěvců a papoušků. Relativní velikost těchto částí mozku klesá se zvětšující se hmotností mozku u všech třech taxonů.

ostatních částí mozku je naopak vyšší u hrabavých ptáků. Cerebellum, tectum opticum, mezimozek a mozkový kmen zaujímají 12-16 %, 10-14 %, 7-10 % a 9-12 % celkové hmotnosti mozku (obr. č. 9 B a 9 C). Na rozdíl od pěvců a papoušků, u hrabavých ptáků relativní velikost mozečku neklesá s velikostí mozku. Relativní velikosti jednotlivých částí mozku se tedy mezi třemi námi studovanými ptačími taxony výrazně liší. Rozdíly v relativní distribuci neuronů ještě mnohem výraznější (tabulka č. 2; obr. č. 10 A, B a C). Mozek hrabavých ptáků je, podobně



Obr. č. 10: Relativní distribuce neuronů, srovnání mezi hrabavými ptáky, pěvci a papoušky.

(A) Procento všech neuronů mozku vyskytující se v koncovém mozku v závislosti na velikosti mozku. Procento neuronů alokovaných do koncevního mozku je u hrabavých ptáků podstatně nižší než u pěvců a papoušků. Navíc, zatímco u pěvců a papoušků relativní počet neuronů v koncevního mozku roste s velikostí mozku, u hrabavých ptáků je procento neuronů v koncevního mozku nezávislé.

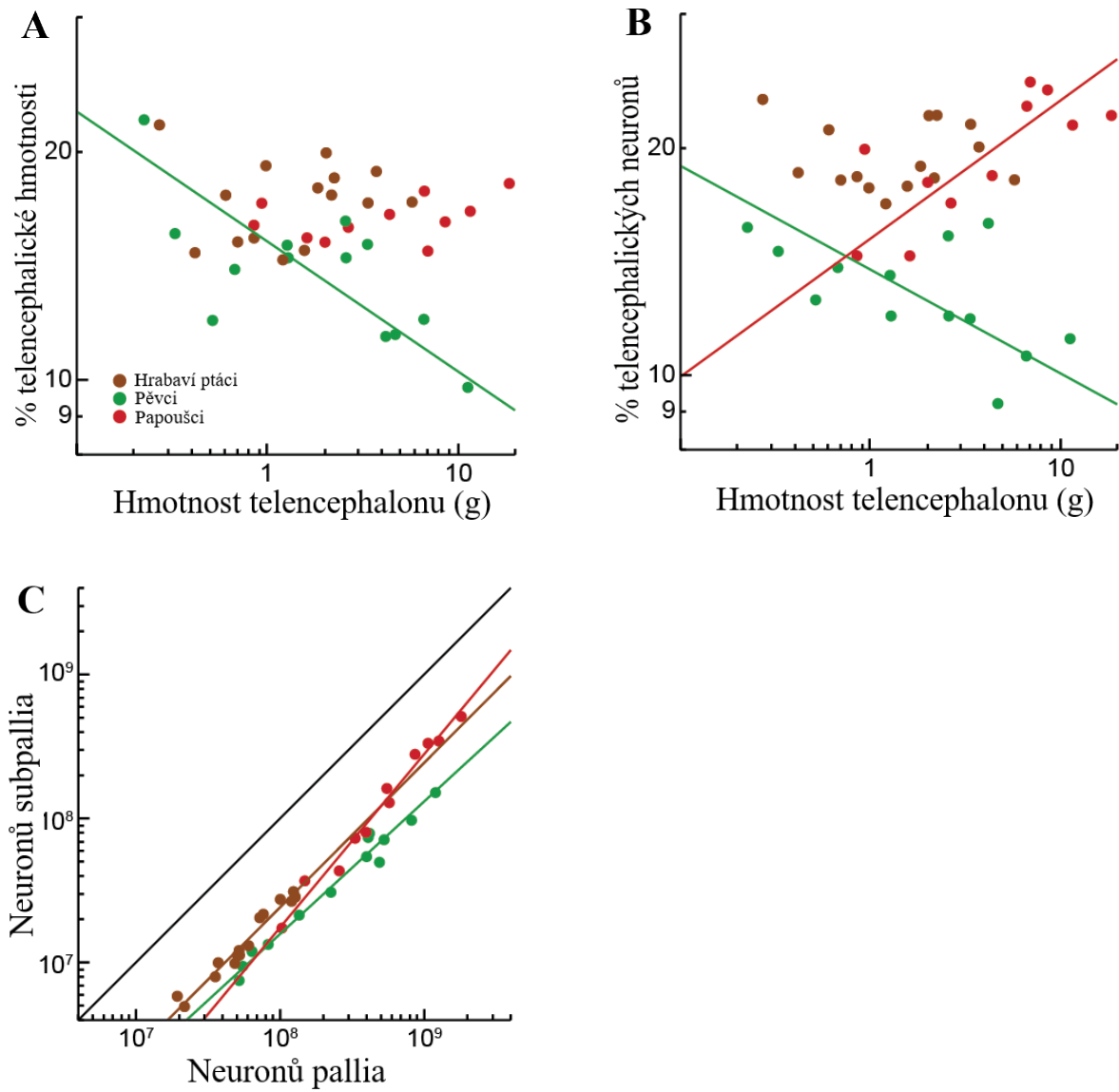
(B) Procento všech neuronů mozku vyskytující se v mozečku v závislosti na velikosti mozku. Povšimněte si, že zatímco u pěvců a papoušků relativní počet neuronů v mozečku klesá s velikostí mozku, u hrabavých ptáků naopak roste.

(C) Procento všech neuronů mozku vyskytující se v ostatních částech mozku je vyšší u hrabavých ptáků než u pěvců a papoušků, u všech tří taxonů procento neuronů obsažené v těchto částech mozku klesá s velikostí mozku.

jako u savců, charakterizován malým procentuálním podílem neuronů v koncovém mozku a vysokým procentuálním podílem neuronů v mozečku. V tomto ohledu se hrabaví ptáci výrazně odlišují od pěvců a papoušků, jejichž mozky jsou charakterizovány výrazně větším podílem neuronů v koncovém mozku. Navíc, s velikostí mozku se u hrabavých ptáků podíl neuronů v mozečku zvětšuje, zatímco podíl neuronů v koncovém mozku má tendenci klesat, u pěvců a papoušků jsou tyto trendy opačné. Mozeček hrabavých ptáků tedy obsahuje 52 – 72 % všech neuronů mozku, zatímco koncový mozek pouze 23 – 36 % všech neuronů mozku. Celkově tedy koncový mozek hrabavých ptáků obsahuje mnohem menší absolutní počty neuronů než koncový mozek pěvců či papoušků se stejně velkými mozky. S rostoucí velikostí mozku se však tento rozdíl zvětšuje. Například koncový mozek křepelky čínské (*Coturnix chinensis*) obsahuje přibližně 2,6-krát méně neuronů než koncový mozek zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*), koncový mozek krocana divokého (*Meleagris gallopavo*) obsahuje přibližně 4-krát méně neuronů než koncový mozek kavky obecné (*Corvus monedula*) a koncový mozek hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*) obsahuje téměř 8-krát méně neuronů než koncový mozek papouška šedého (*Psittacus erithacus*).

### 3. 4. Subpallium

Subpallium (skládající se ze striata, pallida a septa) zaujímá 13 – 18 % celkové hmotnosti koncového mozku a obsahuje 14 – 19 % všech neuronů koncového mozku (tabulky č. 2 a 3, obr. č. 11 A a 11 B). S velikostí koncového mozku nekoreluje relativní velikost subpallia a ani procentuální podíl neuronů v něm obsažených. Počet neuronů subpallia škáluje téměř lineárně s počtem neuronů pallia (škálovací koeficient =  $1,004 \pm 0,13$ ; obr. č. 11 C). Nárůst počtu neuronů je tedy proporcionalní v obou strukturách – na jeden neuron v subpalliu přibude přibližně 5,1 neuronu v palliu). Takto fixní poměr mezi neurony obou částí je pravděpodobně taxonově-specifický, neboť u papoušků při zvětšujícím se mozku narůstají počty neuronů subpallia rychleji než počty neuronů pallia (škálovací koeficient =  $1,19 \pm 0,13$ ), kdežto u pěvců je trend opačný (škálovací koeficient =  $0,91 \pm 0,1$ ).



Obr. č. 11: Subpallium.

(A) Procentuální zastoupení hmotnosti subpallia v koncovém mozku v závislosti na velikosti (Hmotnosti) koncového mozku.

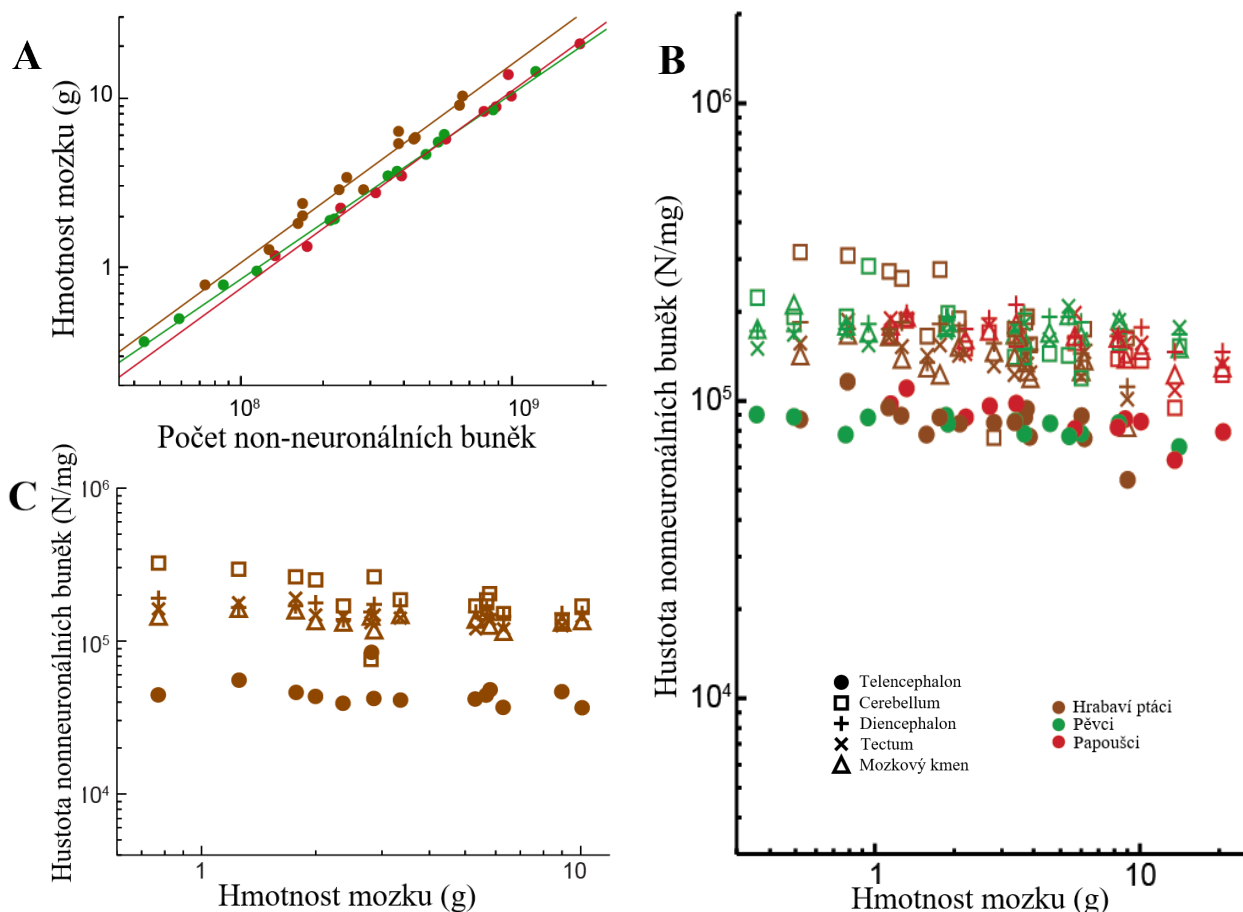
(B) Procento všech neuronů koncového mozku vyskytujících se v subpalliu v závislosti na velikosti (Hmotnosti) koncového mozku.

(C) Poměr neuronů subpallia oproti neuronům pallia.

### 3. 5. Pravidla škálování nonneuronálních buněk

I když se škálovací pravidla pro nonneuronální buňky mnohdy statisticky liší (výsledky statistik neuvádím), jsou, na rozdíl od škálovacích pravidel pro neurony, velmi podobné napříč analyzovanými částmi mozku a ptačími taxony (obr. č. 12 A, B). Hustoty nonneuronálních buněk zůstávají podobné ve všech částech mozku, s výjimkou koncového mozku, kde jsou hustoty nonneuronálních buněk výrazně nižší (hrabaví ptáci:  $t_{2,13} = 11,132$ ,  $p < 10^{-13}$ ; pěvci:  $t_{2,11} = 24,199$ ,  $p < 10^{-15}$ ; papoušci:  $t_{2,9} = 13,777$ ,  $p < 10^{-14}$ ). Nižší hustoty nonneuronálních buněk v koncovém mozku nebyly zaznamenány u savců (Herculano-Houzel et al., 2014; Dos Santos et al., 2017), tento znak se tedy zdá být specifickým pro ptáky.

U hrabavých ptáků se zvětšující se absolutní velikostí mozku nepatrně klesají hustoty nonneuronálních buněk ve všech zkoumaných částech mozku (obr. č. 12 C,  $p < 0,014$  ve všech



Obr. č. 12: Počty a hustoty nonneuronálních buněk.

(A) Vztah mezi počtem nonneuronálních buněk a velikostí mozku. Pověšimně si, že, ačkoli je hustota nonneuronálních buněk poněkud nižší u hrabavých ptáků než u pěvců a papoušků, tyto rozdíly jsou podstatně menší než totéž u neuronů.

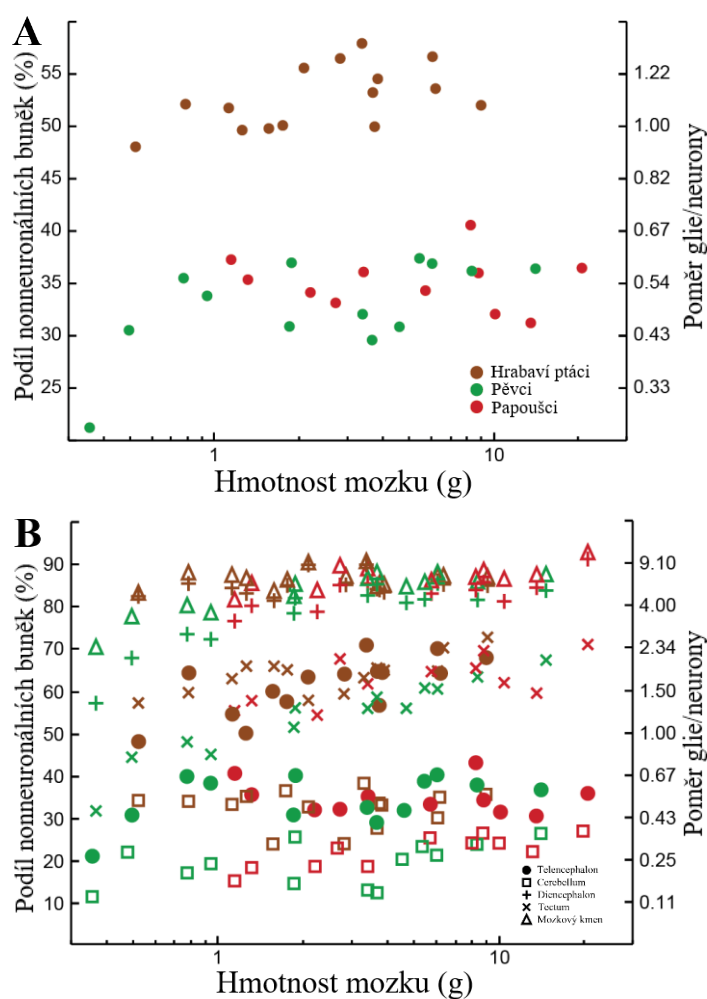
(B) Vztah mezi velikostí mozku a hustotou nonneuronálních buněk ve zkoumaných částech mozku hrabavých ptáků

(C) Srovnání hustot nonneuronálních buněk mezi hrabavými ptáky, pěvci a papoušky.

případech), míra tohoto poklesu je nejvýraznější v mozečku (škálovací koeficient pro cerebellum = -0,462, u ostatních struktur dosahuje hodnot od -0,166 do -0,211).

### 3. 6. Poměr neuronů a nonneuronálních buněk (glií)

Zatímco u pěvců a papoušků výrazně převládají neurony nad nonneurálními buňkami, u hrabavých ptáků jsou počty nonneuronálních buněk přibližně vyrovnané anebo mírně vyšší než počty neuronů (obr. č. 13 A). Procentuální zastoupení nonneuronálních buněk se pohybuje od 48% do 58%, tudíž poměr gliové buňky/neurony (za předpokladu, že všechny nonneuronální



Obr. č. 13: Poměr gliových buněk a neuronů, srovnání mezi hrabavými ptáky, pěvci a papoušky.

A – Poměr nonneuronálních buněk na neurony v celém mozku v závislosti na velikosti mozku.

B – Poměr nonneuronálních buněk na neuronů v jednotlivých částech mozku v závislosti na velikosti celého mozku u hrabavých ptáků, pěvců a papoušků.

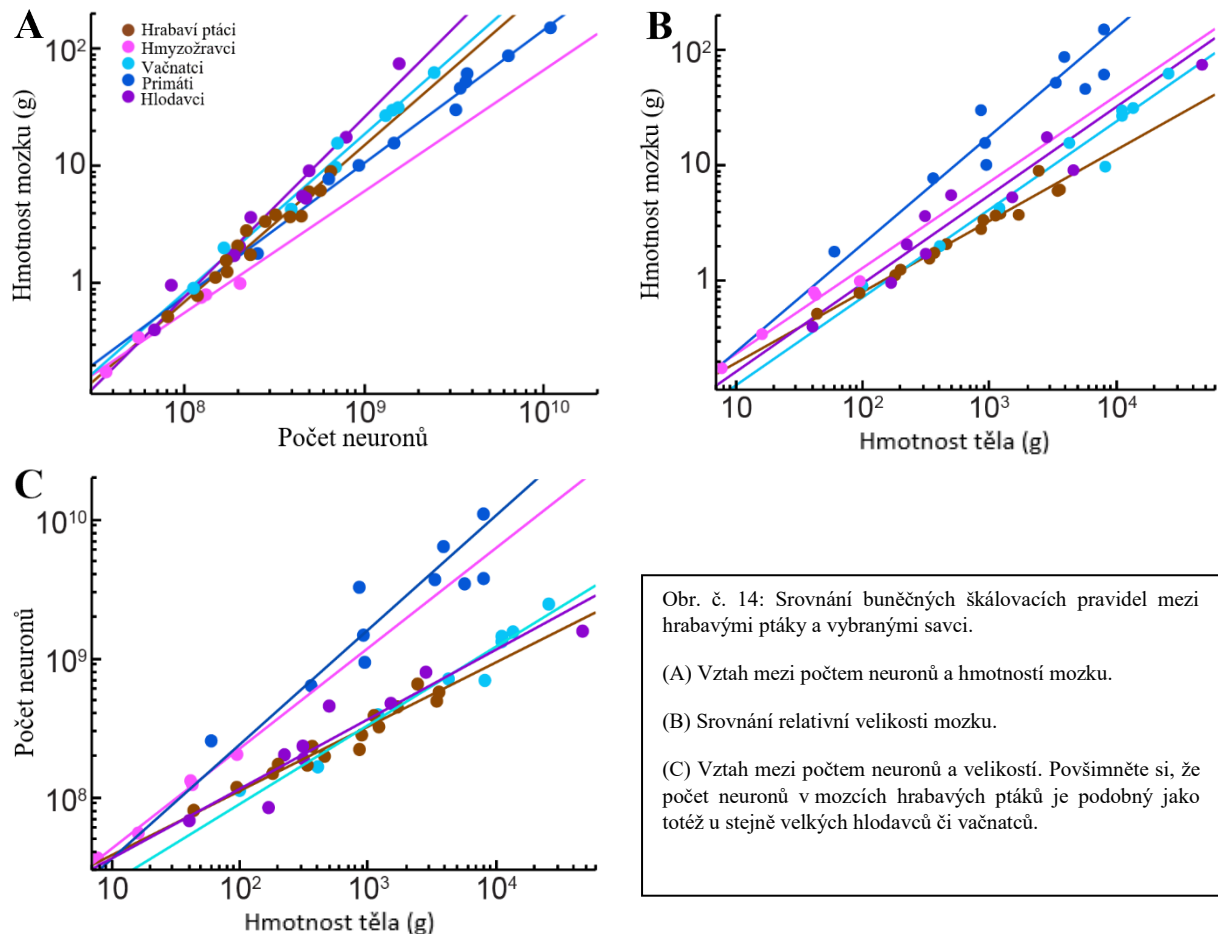
buňky jsou buňky gliové) pro celý mozek by se pohyboval v rozmezí od 0,92 do 1,38. Nonneuronální buňky ale nejsou v mozku rozptýleny rovnoměrně, nejméně jich je v mozečku (20 – 35 %), ve všech ostatních analyzovaných částech mozku nonneuronální buňky převládají nad neurony: tvoří 48 – 71 % všech buněk v koncovém mozku, 84 – 92 % všech buněk v mezimozku, 54 – 77 % všech buněk v tectum opticum a 86 – 95 % všech buněk v mozkovém kmeni (obr č. 13 B). Při porovnání s pěvci a papoušky jsou podíly nonneuronálních buněk u hrabavých ptáků vyšší ve všech strukturách mozku. Tyto rozdíly jsou nejvýraznější v koncovém mozku, ve kterém je u hrabavých ptáků převaha nonneuronálních buněk, zatímco u pěvců a papoušků naopak v koncovém mozku převládají neurony (v koncovém mozku pěvců tvoří gliové buňky 21 – 37 % všech buněk, u papoušků 31 – 41 % všech buněk). Takže převaha nonneuronálních buněk v mozku u hrabavých ptáků se dá vysvětlit relativně nízkými hustotami neuronů ve všech strukturách mozku, s výjimkou mozečku.

### 3. 7. Porovnání se savci

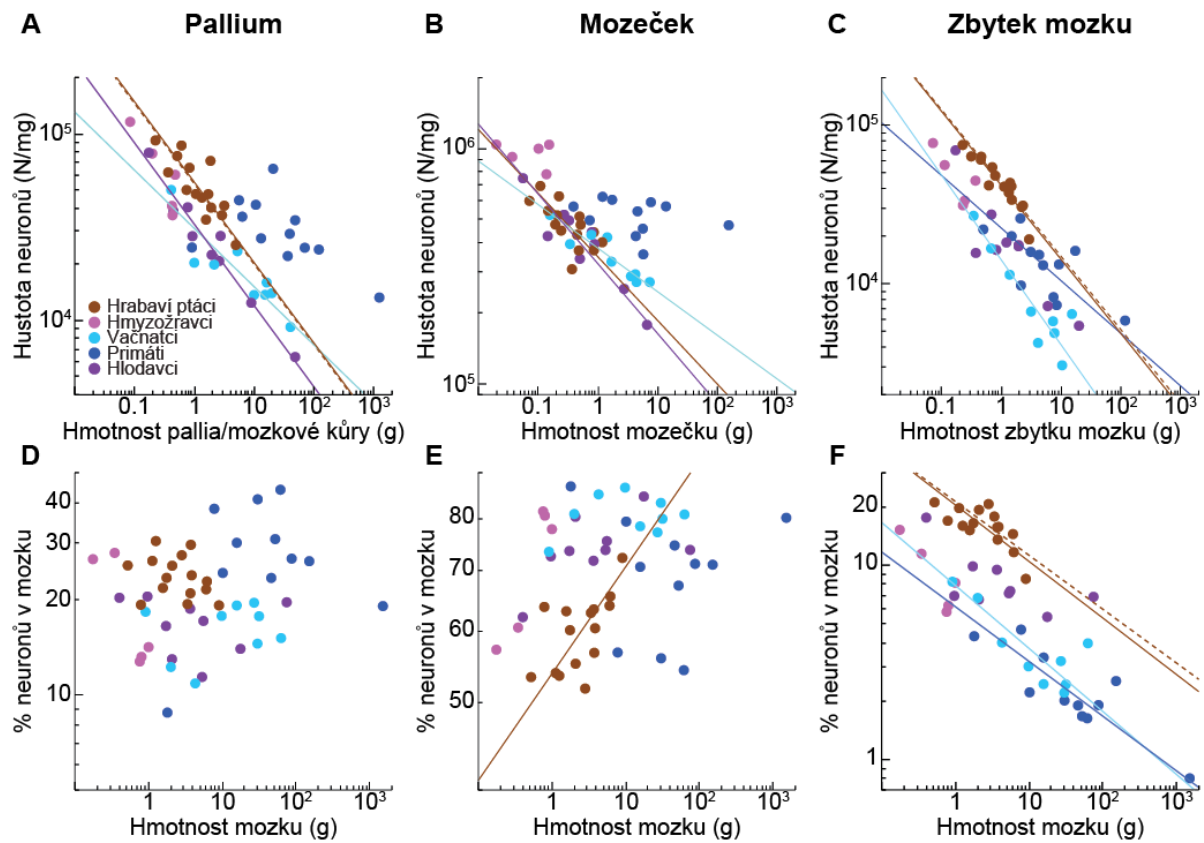
Mozky hrabavých ptáků mají tendenci obsahovat méně neuronů než přibližně stejně velké mozky primátů, ale více neuronů než přibližně stejně velké mozky hlodavců či vačnatců (obr č. 14 A). Ovšem ve srovnání se savci jsou mozky hrabavých ptáků vzhledem k velikosti jejich těl malé (obr č. 14 B). Ve výsledku obsahují mozky hrabavých ptáků menší absolutní počty neuronů než hmyzožravci a primáti podobné tělesné velikosti, ale přibližně stejné absolutní počty neuronů jako stejně velcí hlodavci nebo vačnatci (obr č. 14 C). Například křepelka čínská (*Coturnix chinensis*) má podobnou velikost těla a absolutní počet neuronů jako myš domácí (*Mus musculus*). Na druhou stranu hoko žlutolaločnatý (*Crax daubentoni*) je téměř 7-krát větší než kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*), ale oba druhy mají přibližně stejný absolutní počet neuronů.

V absolutních číslech jsou hustoty neuronů v palliu hrabavých ptáků vyšší než hustoty neuronů pozorované v palliu primátů, hlodavců a vačnatců (analýza variance (ANOVA) následovaná Tukeyho post hoc testy,  $p \leq 0,042$  ve všech případech). Ovšem srovnáváme-li stejně velká pallia, hustoty neuronů hrabavých ptáků jsou vyšší než hustoty neuronů u hlodavců a vačnatců, ale nižší než hustoty neuronů u primátů. Pallium hrabavých ptáků obsahuje 19 – 30 % všech neuronů mozku (obr č. 15). Toto procento je podobné primátům a hmyzožravcům (9 – 44 % pro primáty, 13 – 28 % pro hmyzožravce), a je vyšší než u hlodavců a vačnatců (11 – 19 % pro hlodavce, 11 – 20 % pro vačnatce). Hrabaví ptáci mají tudíž větší podíly

palliálních neuronů než hlodavci a vačnatci. Například orebice rudá (*Alectoris rufa*) má podobný absolutní počet neuronů jako potkani (*Rattus norvegicus*), ale v palliu má orebice o 60% více neuronů.



Hustoty neuronů mozečku jsou u hrabavých ptáků podobné těm u savců s výjimkou hmyzožravců. U hmyzožravců jsou hustoty neuronů v cerebellu vyšší ( $t_{1,19} = 8,679$ ,  $p < 10^{-5}$ ). Stejně jako u savců i u hrabavých ptáků obsahuje mozeček většinu neuronů mozku (obr. č. 15). Avšak i přesto, že se na rozdíl od savců početní převaha neuronů v cerebellu s narůstající velikostí signifikantně zvětšuje, nedosahují hrabaví ptáci tak extrémních hodnot jako mnozí savci. Hustoty neuronů stejně jako podíly neuronů ve zbylých strukturách mozku (subpallium, diencephalon, tectum a mozkový kmen) jsou u hrabavých ptáků vyšší než u savců.



Obr. č. 15: Hustoty neuronů a relativní distribuce neuronů, srovnání mezi hrabavými ptáky a vybranými savci.

(A – C) Neuronální hustoty v palliu (A), mozečku (B) a zbytku mozku (C). Povšimněte si, že hustoty neuronů v palliu hrabavých ptáků jsou nižší než u primátů, ale vyšší než u hlodavců a hmyzožravců, hustoty v mozečku hrabavých ptáků a savců jsou srovnatelné a hustoty neuronů ve zbytku mozku jsou vyšší u hrabavých ptáků než u savců.

(D – F) Procentuální podíl neuronů vyskytujících se v palliu (D), mozečku (E) a zbytku mozku (F). Povšimněte si, že procento neuronů vyskytujících se ve zbytku mozku je vyšší u hrabavých ptáků než u savců.

## 4. DISKUZE

### 4.1 Pravidla buněčného škálování mozku u hrabavých ptáků

V této diplomové práci jsem analyzoval buněčné složení mozků u 15 druhů hrabavých ptáků. Pravidla buněčného škálování pro mozky hrabavých ptáků se v mnohém odlišují od téhož pro mozky ptáků korunových skupin. Ve srovnání s pěvci a papoušky jsou mozky hrabavých ptáků relativně (vůči tělu) malé, mají proporcčně menší koncový mozek a nízké neuronální hustoty. Mozek hrabavého ptáka obsahuje přibližně pouze polovinu neuronů oproti stejně velkému mozku papouška nebo pěvce. Naopak škálování nonneuronálních buněk je konzervované v rámci těchto ptačích skupin. Mé výsledky tedy demonstrují, že buněčná škálovací pravidla jsou, podobně jako u savců, taxonově specifická.

#### 4.1.1 Škálování hustoty neuronů

Jako u ostatních ptáků (Olkowicz et al., 2016) a savců (Herculano-Houzel et al., 2015), hustoty neuronů se výrazně liší v jednotlivých analyzovaných strukturách mozku. V mozečku je například hustota neuronů až 30krát větší než v mozkovém kmeni (obr. č. 7). S rostoucí velikostí mozku klesají hustoty neuronů ve všech částech mozku. Nicméně pokles neuronů není ve všech částech mozku rovnoměrný. Nejvýraznější pokles hustoty neuronů byl pozorován v mozkovém kmeni, který obsahoval též nejnižší hustoty neuronů, zatímco mozeček, který dosahoval nejvyšších hustot neuronů měl s rostoucí velikostí mozku pokles hustoty neuronů jen mírný. Za zmínku stojí též relativně nízká hustota neuronů v koncovém mozku. Ta je u hrabavých ptáků nižší než hustota neuronů v tectum opticum.

#### 4.1.2 Relativní distribuce podílu hmotností jednotlivých částí mozku

S rostoucí velikostí mozku u hrabavých ptáků se mírně zvětšuje procentuální podíl hmotnosti koncového mozku (obr. č. 9 A). Jinými slovy, čím větší je hmotnost celého mozku, tím větší podíl z toho zaujímá koncový mozek, což vede ke snižování procentuálního podílu hmotnosti ostatních částí mozku s výjimkou mozečku (Obr. č. 9 C). Mozeček si svůj procentuální podíl hmotnosti zachovává, přesněji řečeno, nepozorujeme signifikantní změny relativní velikosti (obr. č. 9 B).

### 4.1.3 Relativní distribuce neuronů

Ačkoli se u hrabavých ptáků, s narůstající velikostí mozku, zvětšuje hmotnostní podíl koncového mozku a hmotnostní podíl mozečku stagnuje, podíly neuronů se chovají jinak. V mezimozku, tectum opticum a mozkovém kmeni procentuální podíly neuronů podle očekávání klesají se zvětšující se velikostí mozku (obr. č. 10 C). Nicméně proporčně se zvětšující koncový mozek hrabavých ptáků nepromítá do zvýšeného podílu neuronů v něm obsažených. Naopak, podíl neuronů koncového mozku má tendenci se snižovat, tento trend však není signifikantní (obr. č. 10 A). K nárůstu podílu neuronů dochází v mozečku (obr. č. 10 B). Mozeček je tedy částí mozku, kde přibývá nejvíce neuronů se zvětšující se velikostí mozku či těla, kdežto velikostně se nejvíce zvětšuje koncový mozek. Omezená alokace neuronů do koncového mozku tedy ultimátně vede k nižším absolutním počtům neuronů v palliu koncového mozku, což pravděpodobně limituje kognitivní schopnosti hrabavých ptáků. Za zmínku rovněž stojí výrazný pokles procentuálního podílu neuronů v tectum opticum. Tectum opticum má nicméně u hrabavých ptáků mírně vyšší hustoty neuronů než koncový mozek.

### 4.1.4 Relativní distribuce nonneuronálních buněk v mozku

Nonneuronální buňky nervové soustavy představují též důležitou skupinu buněk různých typů (buňky endotelové a gliové). Valnou většinu nonneuronálních buněk tvoří právě buňky gliové, o kterých se dříve uvažovalo jako pouze o jakémisi pojivu držícím jednotlivé neurony a jejich výběžky na správném místě (Virchow, 1858), ovšem v průběhu času se stále odhalují nové a rozmanité funkce které vykonávají, od vytváření myelinových pochev u oligodendrocytů, tvorbě hematoencefalické bariéry u astrocytů, ochranných funkcí u mikroglíí a mnoho dalších, až po spoluúčasti na procesní výkonnosti mozku (Allen & Barres, 2009). Přítomnost gliových buněk je pro funkci neuronů esenciální, nicméně roli pochopitelně hraje nejen samotná přítomnost gliových buněk, ale také jejich množství či relativní podíl.

## 4.2 Porovnání hrabavých ptáků s pěvci a papoušky

Výsledky předešlých studií ukázaly, že mozky pěvců a papoušků jsou sestaveny „prostorově úsporným způsobem“ (Olkowicz et al., 2016). Tato práce je zatím jediným publikovaným datasetem popisujícím kvantitativně buněčné složení ptačího mozku. Proto v této diplomové práci porovnávám vlastnosti mozku hrabavých ptáků zejména s výsledky uveřejněnými ve výše zmíněné studii. Tyto výsledky výrazně změnil pohled na ptačí mozek, o kterém se dříve smýšlelo jako o malém a nevykonném orgánu, kde převážnou část údajně tvořily bazální ganglia. Určitou dobu též převládal názor, že bazální ganglia jsou neurálním korelátém instinktivního chování. Až s postupem času přibývalo důkazů, že tomu tak není (Jarvis et. al., 2005). Díky výsledkům Olkowicz a spol. (2016) začal pojem „ptačí mozek“ (termín „bird brain“ se v anglickém jazyce tradičně používá jako označení pro osobu s nízkou úrovní inteligence) s velkou rychlostí ztrácet hanlivý význam a začalo se o něm smýšlet jako o efektivním orgánu s vysokou hustotou neuronů a nonneuronálních buněk, který je v mnoha ohledech srovnatelný s mozkem primátů, a v poměru výpočtení výkon/velikost jej dokonce předčí.

Nicméně výsledky této diplomové práce ukazují, že ne každý ptačí mozek je tak efektivně uspořádán a nevykazuje tak vysoké denzity a absolutní počty neuronů jako mozky pěvců a papoušků. Zatímco pěvci (Passeriformes) a papoušci (Psittaciformes) představují korunové ptačí taxony, hrabaví ptáci (Galliformes) představují jeden z bazálních taxonů. Spolu s vrubozobými ptáky (Anseriformes) představují skupinu Galloanseres vyskytující se na bázi neognathních ptáků. Vzhledem k tomu, že počty neuronů a gliových buněk u běžců (Paleognathae) nebyly zatím zkoumány, hrabaví ptáci dosahují nejnižších známých hodnot. Navzdory bazálnímu umístění hrabavých ptáků a jejich nízkým počtům neuronů a gliových buněk není jisté, zda se jedná o minimální hodnoty v rámci neognathních ptáků. Napříč ptačím fylogenetickým stromem se vyskytují taxony s různou mírou encefalizace bez náznaku kontinuálního přechodu od nejnižších počtů neuronů po nejvyšší. Různá míra encefalizace pravděpodobně indikuje různě silné selekční tlaky na zvýšení kognitivních schopností a je taxonově specifická. Totéž platí i o hustotě neuronů a je dosti pravděpodobné, že zvýšená míra encefalizace bude korelovat i se zvýšenou hustotou neuronů. Avšak pro formální test takovéto závislosti zatím nemáme dostatek dat. V rámci jednotlivých taxonů pak může encefalizace korelovat s různými ekologickými charakteristikami, například sezónními výkyvy klimatických podmínek a produktivity prostředí (Sayol et al., 2016). Druhy s většími mozky jsou rovněž úspěšnější v pronikání do sezónně proměnlivých a neprediktabilních prostředí

(Fristoe et al., 2017). Předběžná data o buněčném složení mozku měkkozobých (Columbiformes) ukazují, že mozky měkkozobých ptáků obsahují mírně více neuronů než mozky hrabavých ptáků (Marhounová et. al., nepublikovaná data).

#### 4.2.1 Porovnání buněčného složení mozku

Při následujícím srovnání jsou použita data publikovaná v práci Olkowicz et al. (2016). Největším zkoumaným mozkem hrabavého ptáka je mozek hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*) o hmotnosti 9,02 g čítajícím necelých 653 milionů neuronů, tento mozek můžeme velikostně přirovnat k nepatrně menšímu mozku žaka šedého (*Psittacus erithacus*) o hmotnosti 8,83 g nebo mozku havrana polního (*Corvus frugilegius*) o hmotnosti 8,357 g. V obou případech obsahují mozky pěvce a papouška více než dvojnásobek neuronů oproti hokovi, v případě žaka 1,566 miliard neuronů a v případě havrana 1,509 miliard neuronů. Budeme-li porovnávat podle počtu neuronů, mozek hoka čítající 653 milionů neuronů by byl srovnatelný s mozkem rosely pestré (*Platycercus eximius*) čítajícím 642 milionů neuronů nebo s mozkem straky modré (*Cyanopica cyanus*) čítajícím 741 milionů neuronů. Tyto tři mozky se srovnatelnými počty neuronů se ovšem výrazně liší ve velikosti, zatímco hoko žlutolaločnatý má mozek o hmotnosti 9,02 g, mozky papouška a pěvce s podobnými počty neuronů jsou přibližně třikrát menší. Mozek rosely váží 2,72 g, mozek straky modré váží 3,39 g. Už jen toto jednoduché porovnání ukazuje, že mozky hrabavých ptáků budou mít oproti pěvcům a papouškům mnohem nižší hustoty neuronů. Jen pro zajímavost největším zkoumaným mozkem papouška je mozek ary ararauny (*Ara ararauna*) s hmotností 20,73 g (více jak dvojnásobek hmotnosti mozku hoka) a počtem neuronů 3,136 miliard (téměř pětikrát více neuronů než mozek hoka) a největším zkoumaným mozkem pěvce je mozek krkavce velkého (*Corvus corax*) o hmotnosti 14,14 g a 2,171 miliardy neurony.

Absolutní počty neuronů jsou tedy u hrabavých ptáků podstatně nižší než u pěvců a papoušků (obr. č. 6 A). Oproti pěvcům a papouškům jsou hrabaví ptáci také mnohem méně encefalizovaní, tj. mají velká těla a malé mozky (obr. č. 6 B). Budeme-li porovnávat počty neuronů na základě velikosti těla, odlišnosti mezi hrabavými ptáky na jedné straně a pěvci s papoušky na straně druhé se jen prohloubí (obr. č. 6 C). Navzdory malé relativní velikosti mozku, jsou hustoty neuronů u hrabavých ptáků nižší než u pěvců a papoušků, a to ve všech částech mozku (obr. č. 8). Tyto rozdíly jsou však nejvýraznější v koncovém mozku. Pěvci a papoušci mají v koncovém mozku velmi vysoké hustoty neuronů a ty navíc signifikantně

neklesají s velikostí mozku. U hrabavých ptáků jsou hustoty v koncovém mozku výrazně nižší a klesají s velikostí mozku. Nejvýraznější rozdíl v absolutních počtech neuronů proto pozorujeme u velkých ptáků.

#### 4.2.2 Porovnání relativní distribuce hmotnosti a neuronů

Zajímavé rozdíly se ukáží při porovnání relativní distribuce hmotnosti mozku a neuronů do různých částí mozku. U hrabavých ptáků se při zvětšování mozku zvětšuje relativní velikost koncového mozku na úkor ostatních částí, vyjma mozečku, jehož relativní velikost zůstává zachována. U pěvců a papoušků se hmotnostní podíly koncového mozku, mezimozku, mozkového kmene a tectum opticum chovají podobně, tj. relativní velikost koncového mozku se zvětšuje (obr. č. 9), kdežto relativní velikost ostatních částí klesá, na rozdíl od hrabavých ptáků, se však relativně zmenšuje i mozeček (obr. č. 9 B). Jakkoli se u všech třech taxonů zvětšuje s velikostí mozku disproporčně mozek koncový, u hrabavých tento trend nikdy není tak výrazný jako u pěvců a papoušků.

Navzdory zvětšujícímu se hmotnostnímu podílu koncového mozku je u hrabavých ptáků většina neuronů alokována do mozečku (obr. č. 10 B). Tento zdánlivý paradox je dán velkým rozdílem neuronálních hustot v mozečku a v koncovém mozku. Nízké hustoty neuronů v koncovém mozku a vysoké hustoty neuronů v mozečku u hrabavých ptáků způsobí, že i když se relativní velikost koncového mozku zvýší nejvíce, mozeček je schopen díky své vysoké hustotě neuronů koncový mozek předčít v počtech neuronů už jen při drobném zvětšení své velikosti. U pěvců a papoušků se neuronální hustoty mezi těmito částmi mozku tak propastně neliší, a proto procentuální podíly neuronů v koncovém mozku rostou s tím, jak zvětšují svůj relativní podíl, ve zbytku mozku naopak relativní podíl neuronů klesá (obr. č. 9 vs 10).

Koncový mozek představuje u ptáků největší část mozku, hrabavé ptáky nevyjímaje, u pěvců a papoušků současně obsahuje i většinu neuronů. U hrabavých ptáků se v koncovém mozku nachází pouze třetina všech neuronů. Většina neuronů mozku je umístěna (stejně jako u savců) v mozečku, který zaujímá pouze 10 % celkové hmotnosti mozku, ale obsahuje kolem 60 % všech neuronů.

### 4.2.3 Subpallium

Koncový mozek se dělí na dvě části, dorzálně uložené pallium a ventrálně uložené subpallium. V minulosti se uvažovalo, že ptačí koncový mozek se skládá z velké většiny ze subpallia, nicméně moderní výsledky ukazují, že převážnou část koncového mozku tvoří pallium, a jen malá část je subpallium (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005). Obecně je nejvíce studováno pallium, neboť je to struktura homologická kůře savců a obecně se soudí, že zabezpečuje většinu vyšších kognitivních funkcí. Subpallium ale také obsahuje řadu neurálních systémů, jejichž funkce jsou esenciální pro přežití jednotlivce a druhu (Kuenzel et al., 2011). Subpallium u hrabavých ptáků zaujímá 13 – 18 % hmotnosti koncového mozku, kdežto u papoušků 15 – 18 % a u pěvců 10 – 16 % (22 % pokud zahrneme i králíčka obecného, *Regulus regulus*). Zatímco u hrabavých ptáků a papoušků velikost subpallia nekoreluje s velikostí koncového mozku, u pěvců se s velikostí koncového mozku relativně zmenšuje (obr. č. 11 A).

Zaměříme-li se na počty neuronů a jejich relativní distribuci, dostaneme se k zajímavým výsledkům. Vzhledem k tomu, že hustota neuronů v palliu a subpalliu je téměř stejná, je vztah mezi počtem neuronů v subpalliu a počtem neuronů v palliu lineární (obr. č. 11 C), u hrabavých ptáků tedy na jeden neuron v subpalliu přibude pět neuronů v palliu. Jinak je tomu u papoušků a u pěvců (obr. č. 11 B), u papoušků narůstá počet neuronů v subpalliu rychleji než počet neuronů v palliu. U pěvců je tento trend opačný, se zvětšující se velikostí koncového mozku u pěvců klesá procentuální podíl neuronů koncového mozku v subpalliu. Vzhledem k tomu, že u hrabavých ptáků je vztah mezi počtem neuronů v palliu a subpalliu lineární, není překvapivé, že procentuální podíl neuronů v koncovém mozku se s rostoucí hmotností koncového mozku nemění. Škálování palliálních a subpalliálních neuronů se tedy zdá být taxonově-specifické.

#### 4.2.4 Porovnání nonneuronálních buněk

Pravidla škálování nonneuronálních buněk jsou si mezi pěvci, papoušky a hrabavými ptáky velmi podobná (obr. č. 12 A a B). Zdá se tedy, že tato pravidla budou univerzální pro všechny ptačí řády. Také studované savčí skupiny jako jsou hlodavci, hmyzožravci, afrotheria, sudokopytníci nebo primáti včetně člověka (Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2007; Herculano-Houzel et al., 2011; Azevedo et al., 2009; Sarko et al., 2009; Gabi et al., 2010; Neves et al., 2014; Kazu et al., 2014) mají tato pravidla vzájemně podobná, a dokonce i podobná těm ptačím. Jediným výrazným rozdílem je nižší hustota nonneuronálních buněk v koncovém mozku u ptáků (Olkowicz et al., 2016; Herculano-Houzel & Dos Santos, 2018).

Na rozdíl od počtů neuronů, počty nonneuronálních buněk jsou přímo úměrné velikosti mozku. Malé rozdíly mezi ptačími řády zde přeci jen jsou, mozek hrabavého ptáka má více nonneuronálních buněk než stejně velký mozek pěvce či papouška. Co se hustot nonneuronálních buněk týče, nejsou mezi pěvci, papoušky a hrabavými ptáky téměř žádné rozdíly, ovšem mezi jednotlivými částmi mozku už ano. Zatímco mozeček, mezimozek, tectum opticum a mozkový kmen mají podobné hustoty nonneuronálních buněk, koncový mozek má hustoty nonneuronálních buněk výrazně nižší. U hrabavých ptáků hustoty nonneuronálních buněk s rostoucí velikostí mozku klesají ve všech částech mozku, ovšem nijak výrazně.

#### 4.2.5 Poměry neuronů a gliových buněk

Vzhledem k tomu, že hustoty nonneuronálních buněk jsou si podobné mezi pěvci, papoušky a hrabavými ptáky, zatímco hustoty neuronů se mezi hrabavými ptáky a korunovými taxony ptáků výrazně liší, je pochopitelné, že i poměry mezi neurony a nonneuronálními buňkami se budou lišit (obr. č. 13). Poměr nonneuronálních buněk vůči neuronům se u pěvců pohybuje od 21 % do 37 %, u papoušků od 31 % do 41 %. U těchto skupin ptáků je tedy mnohem více neuronů než nonneuronálních buněk. Vzhledem k nízkým hustotám neuronů jsou poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům u hrabavých ptáků výrazně vyšší než u pěvců a papoušků. U hrabavých ptáků jsou počty neuronů a gliových buněk vyrovnané nebo počet gliových buněk mírně převažuje nad počtem neuronů (48 – 58 %).

Ovšem je třeba podotknout, že poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům nejsou stejné ve všech částech mozku. Stejně jako u pěvců a papoušků, i u hrabavých ptáků jsou nejnižší poměry v mozečku (20 – 35 %) kdežto nejvyšší v mozkovém kmeni (86 – 95 %) a mezimozku

(84 – 92 %). Tectum opticum má poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům poněkud vyšší než pěvci a papoušci (54 – 77 %). Nejdůležitějším rozdílem mezi hrabavými ptáky a korunovými taxony jsou poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům v koncovém mozku, hrabaví ptáci mají signifikantně vyšší poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům v koncovém mozku (48 – 71 %; u pěvců a papoušků je to pouze 21 – 43 %). S rostoucí velikostí mozku poměr gliových buněk vůči neuronům mírně roste, a to ve všech částech mozku a u všech tří ptačích skupin.

#### 4.2.6 Porovnání kognitivních schopností

V oblasti kognitivní etologie se pro studium kognitivních schopností tradičně využívala relativní velikost mozku (van Horik & Madden, 2016). Poslední dobou však neustále přibývá názorů, že mnohem spolehlivějším proxy pro stanovení úrovně kognitivních schopností je počet a hustota neuronů, a také jejich umístění v mozku živočicha (Roth & Dicke, 2005; Herculano-Houzel, 2011; Olkowitz et al., 2016; Herculano-Houzel, 2017). V této části diplomové práce porovnávám kognitivní schopnosti hrabavých ptáků s kognitivními schopnostmi pěvců a papoušků s ohledem na jejich počty neuronů. Názorně jsme ukázali, že pěvci a papoušci mají výrazně vyšší počty neuronů než hrabaví ptáci, zejména v koncovém mozku, předpokládáme tedy, že výsledky kognitivních testů budou u pěvců a papoušků mnohem lepší než ty u hrabavých ptáků.

Co se kognitivních schopností týče, pozoruhodných výsledků v kognitivních testech dosahují právě papoušci a krkavcovití ptáci (Corvidae – čeled' z řádu pěvců), srovnatelné s primáty či dokonce lepší (Emery, 2006). Například vrány novokaledonské (*Corvus moneduloides*) jsou schopné výroby a použití dvou typů jednoduchých nástrojů (Hunt, 1996; Weir et al., 2002), papoušek nestor kea (*Nestor notabilis*) i vrána novokaledonská jsou schopni se naučit využívání dalších typů nástrojů (Auersperg et al., 2011), u vrány novokaledonské byla popsána i diverzifikace a evoluce výroby a užívání nástrojů (Hunt & Gray, 2003). Další slavnou vlastností vran novokaledonských je jejich chápání relativně komplexních pravidel hydrostatiky, kdy vrány házely kamínky do nádoby s kapalinou, aby zvýšily její hladinu (Jelbert et al., 2014). Dokonce krkavcovití ptáci, kteří běžně nástroje nevyrábějí a nevyužívají (např. sojky obecné (*Garrulus glandarius*)), jsou schopní v zajetí s nástroji dosáhnout zručnosti vrány novokaledonské či šimpanzů (Bird & Emery, 2009; Cheke et al., 2011). Kakaduové Goffinovi (*Cacatua goffini*) vykazují schopnost volby a plánování mezi množstvím a kvalitou potravy

(Auersperg et al., 2013), mnozí krkavcovití ptáci jsou schopní ukrýt potravu a později ji spolehlivě nalézt a pozřít (Balda & Kamil, 1989) či dokonce mají přehled o trvanlivosti ukryté potravy a podle ní plánují pořadí, ve kterém budou své jednotlivé úkryty navštěvovat, jak bylo pozorováno u sojky křovinné (*Aphelocoma coerulescens*) (Clayton & Dickinson, 1998). Straky obecné (*Pica pica*) se rozeznávají v zrcadle (Prior et al., 2008). Krkavec velký (*Corvus corax*) či sojka západní (*Aphelocoma californica*) jsou schopni odhadnout úmysly a vědomosti svých kompetitorů a podle jejich přítomnosti plánovat své další kroky (Bugnyar & Heinrich, 2005; Dally et al., 2006; Raby et al., 2007). Významnou schopností náročnou na úroveň kognitivních schopností je socialita a vědomá spolupráce, které jsou schopni například havrani (*Corvus frugilegus*) (Seed et al., 2008). Vrány a krkavci dokáží odhadnout mentální stav ostatních jedinců a v případě potřeby poskytnout utěšení či usmíření po aktivní agresi (Seed et al., 2007; Fraser & Bugnyar, 2010; Fraser & Bugnyar, 2011). Samci sojky obecné (*Garrulus glandarius*) jsou zase schopni odhadnout a předpokládat potravní preferenci svých samičích partnerek podle jejich chování a dostupnosti potravy (Ostojic et al., 2013). V případě zpozorování mrtvého jedince stejného druhu začnou sojky západní (*Aphelocoma californica*) postupně zpívat v žalostném orchestru (Iglesias et al., 2012), nicméně toto chování je spíše varovné a má pravděpodobně antipredační funkci. Z ostatních pěvců je například špaček obecný (*Sturnus vulgaris*) schopný podle přítomnosti, chování a orientace potencionálního predátora odhadnout míru hrozícího nebezpečí (Carter et al., 2008). Lemčici velcí (*Chlamydera nuchalis*) zase chápou zákony perspektivy a při stavbě loubí plně využívají perspektivy a optických iluzí pro zvýšení své úspěšnosti v pohlavním výběru (Kelley & Endler, 2012). Drozdi a vrány žijící v městských oblastech jsou schopni zapamatovat si a rozeznávat od sebe jednotlivé lidi (Levey et al., 2009; Marzluff et al., 2012). Zcela nových úrovní kognitivních schopností dosahují papoušci šedí (*Psittacus erithacus*), schopní se naučit a užívat anglického jazyka na úrovni mladého dítěte (Pepperberg, 2002).

Ačkoli se z tohoto výčtu zdá být inteligence pěvců a papoušků bezchybná, není tomu tak. V relativně jednoduchém testu „trap tube“ (trubička s odměnou uvnitř, odměnu je nutné s využitím nástroje vyšťouchnout a současně zabránit tomu, aby odměna spadla do otvoru uprostřed trubičky, při čemž by došlo k její trvalé ztrátě) byli krkavcovití ptáci a papoušci s podobnými relativními velikostmi mozku úspěšní, ale testovaní arové, kakaduové a nestoři kea byli neúspěšní (Liedtke et al., 2011), ovšem není jasné do jaké míry se jednalo o limity kognitivních schopností, neboť v experimentu bylo popsáno, že ptáci ztratili motivaci již v okamžiku umístění odměny do „trap tube“ aparátu.

Z výše uvedeného výčtu dovedností a studií lze usoudit, že ptačí inteligence je intenzivně zkoumanou oblastí s pěvcí a papoušky jako hlavními modelovými organismy. Bohužel studiu kognitivních schopností hrabavých ptáků nebyla věnována ani zdaleka taková péče, jako tomu bylo u pěvců a papoušků. Vysvětlení je jednoduché, hrabaví ptáci obecně nevykazují chování, které by naznačovalo přítomnost vyšší úrovně kognitivních schopností. Převážná většina experimentů zkoumajících kognitivní schopnost hrabavých ptáků byla navíc provedena na domestikovaném kuru domácím (*Gallus gallus domesticus*), pro jejich snadnou dostupnost a nízkou náročnost na chov a manipulaci je navíc většina experimentů prováděna na kuřatech. Nicméně přece jen hrabaví ptáci nejsou těmi jednoduchými tvory, za které je lidstvo dříve pokládalo (Hazel et al., 2015; Marino, 2017). I přesto, že nepatří mezi nejinteligentnější ptáky, stále dokáží vyřešit širokou škálu kognitivních úloh. Například někteří bažanti obecní (*Phasianus colchicus*) jsou schopni naučit se pracovat s aparaturou „Petri dish“, kde pro získání odměny museli bažanti buď uchopit páčku či ucho a nadzdvihnout víko Petriho misky (van Horik J. O. & Madden J. R., 2016), přičemž při opakování pokusu byli bažanti schopni svůj postup zefektivnit a zkrátit tak čas potřebný k získání odměny.

Hrabaví ptáci stejně jako ostatní ptáci jsou živočichové spoléhající především na zrak. Proto není překvapivé, že v oblasti vizuální kognice a prostorové orientace dosahují hrabaví ptáci (kuřata) dobrých výsledků. V oblasti amodální percepce, si kuřata jasně uvědomují, že částečně ukrytý předmět je stále celistvý (Regolin & Vallortigara, 1995a; Vallortigara, 2006), recentní studie též ukázala, že kuřata (a holubi) vnímají některé optické iluze odlišně než lidé (Nakamura et al., 2014). Co se stálosti objektu („object permanence“) týče, kuřata už nedosahují tak dobrých výsledků jak většina pěvců a papoušků. Zatímco krkavcovití a papoušci dosáhli nejvyššího 6. stupně Piagetovy stupnice, kuřata dosáhla pouze 4. stupně, tj. uvědomují si, že objekt mimo zorné pole stále existuje a jsou schopni jej nalézt (Regolin et al., 1995b; Regolin et al., 1995c; Vallortigara & Regolin, 2002), tyto studie dále naznačují, že kuřata vykazují vyšší úspěšnost v případě přítomnosti sociálního partnera (shrnující článek Marino L., 2017; Regolin et al., 1995c).

Schopnost vnímání času u hrabavých ptáků nebyla téměř studována, existuje jediná práce zabývající se vnímáním času u kuřat (Taylor et al., 2002). V aparátu, který vydával potravu každých 6 minut po prvním klovnutí se kuřata velmi rychle naučila čekat a odhadnout uplynutí této doby. Obdobně se ukázalo, že kuřata jsou schopná také sebekontroly (odložená gratifikace), kdy jsou schopné odmítnout okamžitou odměnu v očekávání hodnotnější odměny (Abeyesinghe et al., 2005). Logické uvažování je dovednost, kterou by jen málokdo hledal u

kuřat, nicméně určitou úroveň logického myšlení ovládají. Při prvním setkání si kuřata vytvářejí hierarchický žebříček v podobě dominance, když jedinec A je dominantní nad jedincem B a jedinec B je dominantní nad jedincem C, jedinci A a C jsou schopni si za pomoci logiky sestavit hierarchický žebříček a zabránit tak zbytečným konfliktům (Hogue et al., 1996). Velmi málo prací se věnuje epizodické paměti u hrabavých ptáků, jedna ze studií popisuje schopnost kuřat udržet si v paměti zpozorovaný objekt až po dobu tří minut, kdežto v komplexnějším prostředí se doba paměti zkracuje na jednu minutu (Vallortigara et al., 1998).

Velká pozornost byla věnována rovněž výzkumu v oblasti numerické kompetence, testovány byly též různé druhy ptáků a nejlepších výsledků opět dosahují pěvci a papoušci. Mnoho živočichů je schopno vnímat malé počty pozorovaných objektů (obvykle do čtyř) okamžitě, avšak pouze hrstka z nich je schopna se naučit extenzivním tréninkem vnímat vyšší počty (Nieder, 2005). Například lejsčík dlouhonohý (*Petroica australis longipes*) dokáže vnímat množství moučných červů až do 64, ovšem významnou roli hraje též poměr počtů červů (rozeznat a vybrat správně mezi 4 a 8 je snazší než si vybrat správně mezi 5 a 6) a dokonce ovládá jednoduché sčítání a odčítání a kategorizování (Garland & Low, 2014). Chybovost se s narůstajícími počty a snižujícími poměry zvyšuje až do míry kompletní náhodnosti (Hunt et al., 2008; Garland et al., 2012). Známým příkladem numerické kompetence u papoušků je Alex, žako šedý (*Psittacus erthacus*), který byl schopen nejen samostatně odpovídat na otázky „kolik?“ ale také rozdělovat prezentované objekty do skupin podle barev či tvarů (Pepperberg, 1994).

Z hrabavých ptáků byla v oblasti numerické kompetence testována pouze domestikovaná kuřata (*Gallus gallus domesticus*) (Rugani et al., 2008). Podle výsledků Rugani a spol. (2008) jsou kuřata omezena svým tzv. „systémem malých počtů“. Jak dospělí jedinci kura (Rugani et al., 2008) tak čerstvě vylíhlá kuřata (Rugani et al., 2009; Rugani et al., 2013) jsou schopná naučit se a rozeznat rozdíl v počtech až do 3 (1 z 20 kuřat do 4), vyšší počty už musely obsahovat další nenumerické vlastnosti (např. poloha, tvar, vzdálenost), aby došlo k nenáhodnému výběru. Nicméně kuřata stále preferují jiné formy výběru objektu (např. velikost, tvar, barva) před numerickým přístupem (Rugani et al., 2010); při dosažení většího počtu objektů se kuřata obrací na tzv. „sumaci“ ostatních vlastností, jako jsou absolutní velikost plochy či absolutní velikost objemu všech objektů (Rugani et al., 2011).

Dalším specifickým odvětvím numerické kompetence je schopnost výběru objektu čistě na poloze či pořadí (v řadě 10 identických tlačítek chci vybrat třetí), tohoto výběru jsou schopné už pěti denní kuřata, která dokázala s vysokou přesností a spolehlivostí vybrat správná tlačítka

na základě pořadí v řadě až 10 tlačítek. Navíc s rostoucím počtem tlačítek nebyl u kuřat upozorován pokles úspěšnosti, lze tedy očekávat, že co se pořadí týče, mohou být kuřata úspěšná i při větších řadách (Rugani et al., 2007), ovšem mějme na paměti, že v tomto případě roli nepochybně hrají i další nenumerné faktory, zejména poloha nebo vzdálenost od konce řady.

Existuje také velké množství empirických důkazů demonstrujících pozitivní korelaci mezi složitějšími kognitivními schopnostmi a sociální komplexitou (shrnující článek Marino, 2017). Tato korelace byla již popsána například u primátů (Dunbar, 1998), psů (Bensky et al., 2013), kytovců (Whitehead & Rendell, 2015), domestikovaných prasat (Marino & Colvin, 2015) a také u ptáků (Burish et al., 2004). Ani hrabaví ptáci nejsou v oblasti sociální kognice nijak zaostalí, naopak v dynamických sociálních vztazích jsou schopni demonstrovat flexibilní a často i strategické chování.

Důležitou součástí sociální skupiny a současně její výhodou je tzv. „sociální učení“, neboli učení skrze pozorování ostatních jedinců stejného druhu. Různé formy sociálního učení (imitace, emulace a další; Zentall, 2012) byly popsány například u šimpanzů (*Pan troglodytes*) (např. Yamamoto et al., 2013) nebo krkavce velkého (*Corvus corax*) (Bugnyar & Kotrschal, 2002). I hrabaví ptáci jsou schopní do nemalé míry sociálního učení. Křepelky japonské (*Coturnix japonica*) demonstrovaly schopnost imitovat pohlavního chování (Köksal & Domjan, 1998). Dále i kuřata, jakožto prekociální zvířata čerstvě po vylíhnutí mají tendenci klovat do různých objektů, v tomto případě se jedná o přímé učení a poznávání svého okolí (Daisley et al., 2009). Ovšem v okolí se mohou vyskytovat předměty nejedlé či přímo jedovaté, je proto výhodné v těchto případech přejít od přímého učení k učení sociálnímu a skutečně kuřata byla schopná se pouze na základě pozorování reakcí ostatních kuřat naučit o jedlosti či nejedlosti potenciální potravy (Daisley et al., 2009).

Jednou ze základních prerekvizit složitější sociální kognice je schopnost rozeznávání individuálních jedinců, ať už za pomoci sluchu, čichu či zraku. Vizualního rozeznání jedince je schopna celá řada zvířat, mezi ptáky např. strnadci bělohrdlí (*Zonotrichia albicollis*) (Whitefield, 1987), andulky vlnkované (*Melospittacus undulatus*) (Brown & Dooling, 1992) nebo výše zmínění havrani polní (*Corvus frugilegus*) (Bird & Emery, 2008), holubi (*Columba livia*) (Nakamura et al., 2003), ale také kuřata (*Gallus gallus domesticus*), bez něhož by nebyla schopná sledovat a udržovat si hierarchický řád skupiny (Marino, 2017).

Další poměrně náročnější schopností sociální kognice je získávání sociální perspektivity a manipulace. Tyto vlastnosti, zpravidla přisuzované šimpanzům (*Pan troglodytes*) (Krachun & Call, 2009) nebo výše zmíněným sojkám západním (*Aphelocoma californica*) (Clayton et al., 2007), byly též pozorovány u domestikovaných kurů (*Gallus gallus domesticus*) (Smith et al., 2011). V hierarchické společnosti je submisivní samec kura schopen sledovat a odhadnout chvíle, kdy je dominantní kur zaneprázdněn, a využít situace pro lákání samic. Popřípadě je schopen až falešného hlášení o přítomnosti potravy (Gyger & Marler, 1988).

Ptačí inteligence, zejména inteligence pěvců a papoušků, je tedy na obdivuhodné úrovni, nicméně není využívána pouze pro přežívání nebo získávání potravy či partnera, ale byly popsány i případy zábavy a her. V Rusku byla zpozorována vrána, která si opakovaně nosila víčko od sklenice na zasněženou střechu a klouzala se (Emery & Clayton, 2015). Za zmínku rozhodně stojí čtveřice labutí černých (*Cygnus atratus*), které byly v Austrálii zpozorovány, jak opakovaně „serfují“ na vlnách, a to i za blízké přítomnosti lidí (Emery & Clayton, 2015). Labutě patří mezi vrubozobé ptáky (Anseriformes), skupinu sesterskou a blízce příbuznou hrabavým ptákům. Jsou-li vrubozobí ptáci schopni hry a zábavy, je možné očekávat totéž i u hrabavých ptáků?

Jak vyplývá z uvedeného přehledu, hrabaví ptáci jsou schopni v mnoha kognitivních doménách podávat překvapivé výkony a jsou tedy mnohem inteligentnější, než by většina lidí očekávala. Pěvci a papoušci v těchto disciplínách však zpravidla dosahují znatelně lepších výsledků. Tento rozdíl může být částečně vysvětlen větším zájmem výzkumníků o kognici pěvců a papoušků. Za zmínku stojí též skutečnost, že hrabaví ptáci jsou zpravidla zařazováni do relativně jednoduchých úloh a jako subjekty výzkumu jsou obvykle volena domestikovaná kuřata. Jak bude podrobněji diskutováno níže, domestikace obvykle vede k relativnímu zmenšení mozku. I v našem datasetu vykazuje kur bankivský, předek kura domácího, jisté odchylky od ostatních studovaných druhů hrabavých ptáků, především malý mozeček a nízký počet neuronů v mozečku. Nicméně zmíněné rozdíly v kognitivních schopnostech pěvců, papoušků a hrabavých ptáků dobře odpovídají mým anatomickým zjištěním.

Hrabaví ptáci jsou oproti korunovým taxonům málo encefalizovaní, mají menší koncový mozek, jejich absolutní počty neuronů jsou přibližně dvakrát nižší a hustoty neuronů též výrazně nižší. Tyto vlastnosti nepochybně limitují procesní kapacitu mozku hrabavých ptáků a ultimátně i jejich kognitivní schopnosti.

### 4.3 Porovnání se savci

V předchozí studii bylo již zjištěno, že pěvci a papoušci mají podobné počty neuronů ve svých mozcích jako mnozí primáti (Olkowicz et al., 2016). Co se absolutní velikosti týče, je mozek primáta daleko větší než mozek pěvce či papouška, avšak oba obsahují podobné množství neuronů. U ptáků vytváří aktivní let selekční tlak proti výraznému zvětšování těla a nepřímo tedy i proti výraznému zvětšování mozku. Ptáci toto omezení obešli vysokou úsporností ve stavbě mozku a vysokými hustotami malých neuronů. Mozky hrabavých ptáků se však od mozků pěvců a papoušků výrazně liší, v této kapitole popíšu, do jaké míry se podobají či liší mozkům savcům.

#### 4.3.1 Porovnání buněčného složení mozku

Ptáci a savci od sebe divergovali před více jak 300 miliony lety (Jarvis et al., 2005). Jak již bylo řečeno v úvodu, velké a komplexní mozky se vyvinuly, podobně jako intelligence, u těchto skupin nezávisle (Northcutt, 2011; Dugas-Ford et al., 2012; Shanahan et al., 2013; Briscoe et al., 2018). Není proto překvapivé, že stavba jejich mozků se v mnohém liší (viz úvod). Nicméně stavba mozku ptáků a savců je založena na obdobných organizačních principech (Shanahan et al., 2013; Jarvis et al., 2013; Calabrese & Woolley, 2015). Srovnávat počty neuronů jakožto základních výpočetních jednotek mozku se proto zdá být smysluplné. Vezměme si například největší studovaný mozek hrabavého ptáka, hoka žlutolaločnatého (*Crax daubentoni*), váha jeho mozku činí 9,02 g s počtem neuronů okolo 653 milionů. Podobně velký je mozek komby Garnettovy (*Otolemur garnettii*) o hmotnosti 10,15 g a čítající 936 milionů neuronů či mozek kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) o hmotnosti 7,78 g a čítající 636 milionů neuronů, oba z řádu primátů (Herculano-Houzel et al., 2007; Gabi et al., 2010). Z tohoto jednoduchého porovnání lze usoudit, že mozky hrabavých ptáků mají méně neuronů než stejně velké mozky primátů.

Největším mozkem hlodavce je mozek kapybary (*Hydrochoerus hydrochaeris*) o hmotnosti 76 g a čítající 1,6 miliard neuronů. Pro smysluplné porovnání s hrabavými ptáky je vhodnější použít mozek morčete (*Cavia aperea*) s hmotností mozku 3,76 g a 240 miliony neurony (Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2011), kdežto u bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) váží mozek 3,85 g a obsahuje 321 milionů neuronů. Nejmenším studovaným mozkem hlodavce byl mozek laboratorní myši (*Mus musculus*) o hmotnosti 0,42 g a obsahuje 71 milionů neuronů, přičemž podobně velký je též nejmenší studovaný mozek

hrabavého ptáka, křepelky čínské (*Coturnix chinensis*) o hmotnosti 0,52 g obsahující 80 milionů neuronů. Z tohoto porovnání vyplývá, že počty neuronů mezi hlodavci a hrabavými ptáky jsou si velmi podobné.

Pro porovnání s hmyzožravci lze uvést mozek krtka východoamerického (*Scalopus aquaticus*) jakožto hmyzožravce s největším zkoumaným mozkiem o hmotnosti 1,15 g obsahující 238 milionů neuronů (Sarko et al., 2009). Mozek hrabavého ptáka s podobnou velikostí patří křepelku virginiskému (*Colinus virginianus*) o hmotnosti 1,12 g obsahující 143 milionů neuronů. Porovnat lze ještě mozek krtka bělohlavého (*Parascalops breweri*) o hmotnosti 0,8 g obsahující 140 milionů neuronů s mozkiem křepelky obecné/polní (*Coturnix coturnix*) o hmotnosti 0,79 g obsahující 118 milionů neuronů. Mozky hrabavých ptáků mají tedy méně neuronů než stejně velké mozky hmyzožravců.

Celkově mají hrabaví ptáci menší relativní velikosti mozků než většina ostatních studovaných savců (obr. č. 14 B). Největších relativních velikostí mozku dosahují primáti, nejnižších hrabaví ptáci spolu s vačnatci (Dos Santos et al., 2017). Co se hustot neuronů týče, nejvyšších hustot neuronů dosahují překvapivě hmyzožravci (obr. č. 14 A), ovšem celkově jsou si hustoty neuronů podobné mezi těmito pěti studovanými skupinami. Rozdíly v počtech neuronů začnou být viditelnější ve chvíli, kdy vyneseme počet neuronů vůči velikosti těla (obr. č. 14 C): primáti a hmyzožravci mají podstatně více neuronů pro danou velikost těla než hlodavci, vačnatci a hrabaví ptáci.

V rámci celého mozku mají tedy hrabaví ptáci podobné hustoty neuronů jako vačnatci a hlodavci, ale také poněkud nižší než hmyzožravci a primáti. Výraznější rozdíly získáme, porovnáme-li hustoty neuronů u jednotlivých částí mozku. Níže porovnávám tři oblasti mozku, a to pallium (ptačí pallium, kůra savců), mozeček a souhrnně zbytek mozku (obr. č. 15). Hrabaví ptáci sdílí s dalšími čtyřmi studovanými skupinami savců několik vlastností. S rostoucí velikostí mozku či dané části mozku výrazně klesají hustoty neuronů (s výjimkou primátů, u kterých je pokles hustot neuronů v kůře a mozečku jen mírný, obr. č. 15 A, B a C). Srovnáme-li stejně velká pallia u hrabavých ptáků, hlodavců, vačnatců, hmyzožravců a primátů, nejvyšších hustot neuronů v palliu dosahují primáti, s hrabavými ptáky na druhém místě.

Další důležitou strukturou je mozeček, tradičně se o mozečku uvažuje jako o části mozku mající na starost motorické funkce, dnes však víme, že mozeček má mnoho dalších funkcí, včetně zapojení v kognitivních procesech (Roland, 1993; Parkins, 1997). Hustoty neuronů v mozečku jsou si mezi hrabavými ptáky, vačnatci, hlodavci a hmyzožravci podobné a s rostoucí velikostí

mozečku hustoty neuronů klesají (obr. č. 15 B). Další společnou vlastností hrabavých ptáků a savců je vysoký podíl neuronů v mozečku (obr. č. 15 E). Od savců se ale hrabaví ptáci odlišují procentuálním podílem neuronů v mozečku, se zvětšující se velikostí mozku alokují hrabaví ptáci větší relativní počty neuronů do mozečku, zatímco u savců jsou v mozečku procentuální podíly neuronů bez signifikantního trendu.

Srovnání relativní distribuce neuronů poskytuje též zajímavý náhled na rozdíly v buněčném složení mozku mezi savci a hrabavými ptáky. Zatímco vačnatci a hlodavci alokují do mozkové kůry pouze 11 – 20 % všech neuronů mozku, u hrabavých ptáků se podíl neuronů v palliu pohybuje v rozmezí 19 – 30 %, podobně jako u primátů a hmyzožravců (9 – 44 %). Výsledkem je skutečnost, že ačkoli hrabaví ptáci mohou mít stejný absolutní počet neuronů jako hlodavci a vačnatci, v palliu mají hrabaví ptáci více neuronů.

#### 4.3.2 Porovnání kognitivních schopností se savci

Co se inteligence a kognitivních schopností týče, nejlepších výsledků tradičně dosahují primáti ať už se jedná o numerickou kompetenci (Hauser et al., 2000; Hauser et al., 2003; Boysen & Berntson, 1989), užívání nástrojů pro získání potravy (Boesch & Boesch, 1982), nebo sdílení informací s dalšími jedinci (Cheney & Seyfarth, 1985). Úroveň kognitivních schopností primátů málokdy nalezne konkurenci, a v těch případech kdy k tomu dojde, se často jedná o pěvce (zejména krkavcovití) a papoušky, se kterými se často porovnávají (Emery & Clayton, 2004a; Emery & Clayton, 2004b; Lefebvre et al., 2004). Není proto překvapivé, že primáti v kognitivních testech dosahují téměř v každém případě lepších výsledků než hrabaví ptáci. Ačkoli co se numerické kompetence týče, je vhodné podotknout, že i primáti, stejně jako mnoho dalších zvířat včetně hrabavých ptáků, spoléhají na tzv. systém malých čísel, který jim umožňuje okamžitě vnímat jen malé počty objektů. Tamarini pinčí (*Saguinus oedipus*) například stejně jako kuřata nebyli schopni rozeznat a vybrat si mezi počty 3 a 4, ovšem nutno podotknout, že v případě tamarinů tomu tak bylo bez přípravy a objekty (jablka) byly po jednom ukládány a ukrývány do nádoby, kdežto kuřata procházela nejdříve fází učení a při výběru měla vždy obě varianty viditelné. Obdobný příklad představují např. šimpanzi (*Pan troglodytes*), kterým bylo prezentováno 0 – 4 jablek až do 3 různých nádob, šimpanzi byli poté schopni nejen ovládat jednoduché sčítání ale dokázali též přiřadit počty k arabským číslicím, vyšší počty nebyly testovány v tomto experimentu (Boysen & Bernston, 1989). V některých kognitivních testech se však hrabaví ptáci dokáží primátům vyrovnat, například kuřata jsou schopná

pamatovat si pozici objektu až po dobu 3 minut (Vallortigara et al., 1998), obdobně tomu tak je i u makaka vepřího (*Macaca nemestrina*), ten si však dokázal pamatovat pozici objektu až po dobu osmi minut (Wu et al., 1986).

Mnohem vhodnější je tedy porovnávání kognitivních schopností hrabavých ptáků se skupinami savců, kteří mají podobné množství neuronů v mozku. Bohužel stejně jako u hrabavých ptáků je studiu kognitivních schopností vačnatců a hmyzožravců věnována malá pozornost a studií zabývajících se jejich kognicí je poskromnu. Naopak studií zabývajících se kognicí hlodavců je opravdu mnoho. Nicméně ani zde není snadné najít přesně si odpovídající úlohy ke srovnání (ptáci obvykle nejsou testováni ve vysoce standardizovaných testech jako hlodavci).

U hlodavců (*Rattus norvegicus*) byly obdobně jako u kuřat testovány číselné řady (Davis & Bradford, 1986; Suzuki & Kobayashi, 2000), potkani v těchto experimentech měly z řady až 18-ti objektů vybrat podle pořadí. Úspěšnost potkanů byla vysoká a při zvyšování obtížnosti potkani nesnižovali svůj výkon. Obdobných výsledků dosáhla i kuřata (Rugani et al., 2007), je však komplikované tyto výsledky porovnávat, vzhledem ke skutečnosti, že ani v jednom případě nedošlo k dosažení limitů. V jiných pokusech se ukázalo, že potkani jsou též schopni určité formy sebekontroly v podobě množství vynaloženého úsilí oproti množství získané potravy či preference typu potravy (Chelonis et al., 1998; Flaherty & Checke, 1982). Obdobně (stejně jako u kuřat) jsou potkani schopni za pomoci jednoduché logiky sestavit pořadí, například hiarchického postavení ve skupině, podle vzorce  $A < B + B < C \rightarrow A < C$  (Davis, 1992).

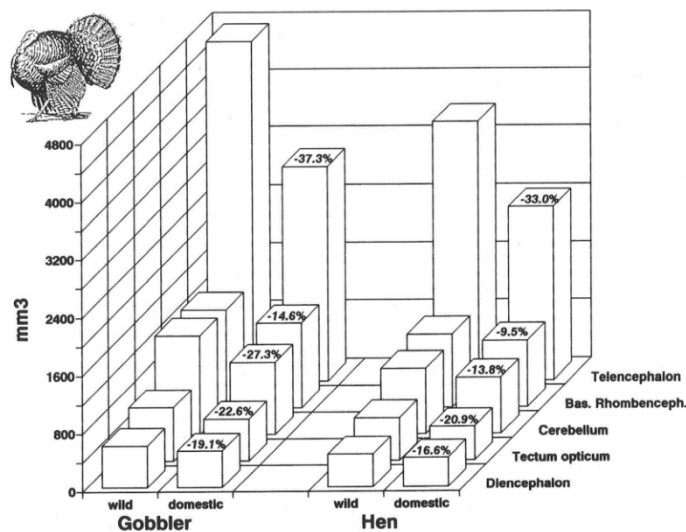
#### 4.4 Porovnání buněčného složení mozku s krokodýlem nilským

Zajímavý náhled umožňuje recentně publikovaný článek o mozku krokodýla nilského (*Crocodylus niloticus*) (Ngwenya et al., 2016). Zatím neexistují ucelená data popisující buněčné vlastnosti mozku plazů, s právě uvedenou výjimkou krokodýla nilského. Vzhledem k tomu, že byl studován pouze jeden druh, jsou možnosti srovnávání s hrabavými ptáky omezené. Krokodýli spolu s ptáky patří do monofyletické skupiny Archosauria. Hrabaví ptáci jsou spolu s vrubozobými ptáky na bázi fylogenetického stromu neognátních ptáků. U hrabavých ptáků se většina neuronů nachází v cerebellu, zatímco telencephalon obsahuje přibližně třetinu všech neuronů mozku. Hustoty neuronů u krokodýlů dosahují výrazně nižších hodnot ve srovnatelných částech mozku než u hrabavých ptáků. S narůstající velikostí těla u krokodýlů se lineárně zvětšují všechny části mozku a své hmotnostní podíly si zachovávají, s výjimkou

čichových laloků, u kterých se hmotnostní podíl zvětšuje spolu s velikostí těla. Pro porovnání s hrabavými ptáky, mozek krokodýla měl průměrně 3,24 g (min. 1,53 g; max. 6,83 g) a počet neuronů 80,5 milionů (min.  $50,3 \times 10^6$ ; max.  $136 \times 10^6$ ), přiměřeně velký mozek tetřívka obecného (*Tetrao tetrix*) o hmotnosti 3,38 g má 281 milionů neuronů (korořteř polní s mozkem o hmotnosti 1,57 g má 170 milionů neuronů; páv korunkatý s mozkem o hmotnosti 6,19 g má 571 milionů neuronů). Nejvyšší hustoty neuronů jsou v stejné jako u hrabavých ptáků v mozečku. Absolutní počty a hustoty neuronů jsou tedy u hrabavých ptáků několikanásobně vyšší než u mnohonásobně většího krokodýla (testováni byli jedinci vážící od 92 g do 90 kg). Je velmi pravděpodobné, že množství neuronů je u poikilotermních krokodýlů limitováno metabolicky. Vzhledem k jejich nízkému metabolismu a energetické náročnosti neuronů (Mink et al., 1981) může být malá relativní velikost mozku a nízká hustota neuronů přímým důsledkem metabolických omezení (další diskuze na toto téma viz Isler & Schaik, 2009).

#### 4.5 Možný vliv domestikace na velikost mozku

Jednou z deviací je případ kura bankivského (*Gallus gallus*), u něhož jsou pravidla škálování mozku poněkud odlišná od ostatních hrabavých ptáků. Mozek kura je o trochu menší, než by odpovídalo jeho tělesné velikosti. Podstatnějším rozdílem je malý mozeček, který obsahuje méně neuronů než mozeček ostatních hrabavých ptáků. Zda je možné tyto specifika přičíst domestikaci není jasné. Kur bankivský je předkem kura domácího a sám by neměl být domestikován



Obr. č. 16: Při domestikaci u krocanů divokých dochází k výraznému zmenšení absolutní velikosti mozku, a to i navzdory nízkému encefalizačnímu kvocientu divokých forem, na obrázku lze sledovat o kolik se jednotlivé struktury při domestikaci zmenšily u samců (Gobbler) a samic (Hen).

Zdroj: Ebinger & Röhrs 1995

(rozuměj šlechtěn za dosažením specifických užitkových vlastností). Nicméně je nepochybné, že zvířata použitá v mé studii jsou již po mnoho generací chována v zájmových chovech a není možno vyloučit kontaminaci jeho genofundu domestikovanými zvířaty, neboť fenotypické znaky dříve považované za indikátory genetické čistoty se mohou vyskytovat i u jedinců křížených s domesikanty (Peterson & Brisbin, 1998; Brisbin & Peterson, 2007). V případě

domestikovaných krocanů (*Meleagris gallopavo*) bylo prokázáno, že domestikace má, kupodivu pohlavně-specifický, vliv na absolutní velikost mozku (Ebinger & Röhrs, 1995). Domestikovaní krocani měli o 24 – 35 % menší mozky (obr. č. 16), a to i navzdory už tak nízkému encefalizačnímu kvocientu u divokých forem. Mozeček byl zmenšen u obou pohlaví (u krocanů o 27,3 % u krůt pouze o 13,8 %), nicméně u obou pohlaví byl nejvíce redukován koncový mozek. Obdobně výraznou změnu ve velikosti koncového mozku jsem u kura bankivského nepozoroval. Vzhledem k tomu, že do mé studie byl zařazen pouze jeden potenciální domestikant, který navíc pravděpodobně nebyl vystaven intenzivnímu selekčnímu tlaku na požadovaný fenotyp, je v tomto ohledu má práce nekonkluzivní. V budoucnu bude třeba cíleně srovnat buněčné složení mozku divokých a domestikovaných ptáků.

## 5. ZÁVĚR

S využitím metody izotropické frakční homogenizace byly stanoveny buněčné vlastnosti mozku u 15 druhů hrabavých ptáků (Galliformes). Z nich byla následně odvozena pravidla buněčného škálování. Tato pravidla spolu s absolutními počty, hustotami a poměry neuronů a gliových buněk, absolutními a relativními velikostmi mozku byly následně porovnány s dříve studovanými pěvci (Passeriformes) a papoušky (Psittaciformes), tedy korunovými skupinami Neoaves. Totéž bylo dále porovnáno i s vybranými taxony savců (primáti, hlodavci, vačnatci, hmyzožravci). Hlavní výsledky této práce lze shrnout následovně:

- 1) Hrabaví ptáci jsou obecně málo encephalizovaní, tj. velikost jejich mozku je relativně vůči velikosti těla malá.
- 2) Hmotnost mozku hrabavých ptáků roste, stejně jako u ostatních živočichů, negativně alometricky s rostoucí hmotností těla. Škálovací koeficient (směrnice regresní přímky) je nejen signifikantně nižší než 1,0 (0,558, CI = 0,518 – 0,600), ale je také signifikantně nižší než u pěvců a papoušků (~ 0,75).
- 3) Největší částí mozku je koncový mozek, s rostoucí velikostí mozku se jeho hmotnostní frakce zvětšuje na úkor ostatních částí. Tuto vlastnost mají hrabaví ptáci společnou s pěvci a papoušky, nicméně koncový mozek hrabavých ptáků nedosahuje takové relativní velikosti jako u pěvců a papoušků – tvoří 52 – 64 % hmotnosti mozku.
- 4) Vztah mezi počtem neuronů a velikostí mozku lze popsat mocninou funkcí  $M_{BR} = 1,583 \times 10^{-11} \times N_{BR}^{1,331}$ . Vzhledem k tomu, že škálovací koeficient je výrazně vyšší než 1, jakékoli navýšení počtu neuronů je doprovázeno ještě výraznějším nárůstem velikosti mozku.
- 5) Alometrické vztahy popisující vztah celkového počtu neuronů a velikosti mozku u hrabavých ptáků, pěvců a papoušků mají podobný škálovací koeficient, avšak výrazně odlišný intercept. Mozek hrabavého ptáka obsahuje zhruba polovinu neuronů jako stejně velký mozek pěvce nebo papouška.
- 6) Hustoty neuronů jsou u hrabavých ptáků 1,3 – 2,2-krát nižší, v koncovém mozku dokonce 2,3 – 4,9-krát nižší než u pěvců a papoušků. Ve všech analyzovaných částech mozku hustota neuronů klesá s velikostí mozku.
- 7) Poměr neuronů a gliových buněk je přibližně vyrovnaný, anebo mírně posunutý ve prospěch buněk gliových (gliové buňky tvoří 48 % až 58 % všech mozkových buněk).

Tím se hrabaví ptáci výrazně odlišují od pěvců a papoušků u kterých početně převažují neurony.

8) Hustoty gliových buněk jsou ve všech strukturách víceméně stejné, výjimku tvoří koncový mozek, kde jsou hustoty gliových buněk nižší. S velikostí mozku hustota gliových buněk klesá. Rozdíly v hustotách gliových buněk mezi studovanými ptačími skupinami jsou nevýrazné.

9) Mozky hrabavých ptáků obsahují méně neuronů než stejně velké mozky primátů a hmyzožravců, ale více neuronů než stejně velké mozky hlodavců a vačnatců. Nicméně v porovnání se savci mají hrabaví ptáci výrazně menší relativní velikost mozku. Ve výsledku mají hrabaví ptáci výrazně méně neuronů než stejně velcí hmyzožravci a primáti, ale podobný počet neuronů jako stejně velcí hlodavci či vačnatci.

10) Hrabaví ptáci mají v palliu 19 – 30 % všech neuronů, toto procento je podobné u primátů a hmyzožravců, ale vyšší než u hlodavců a vačnatců, kteří mají v palliu pouze 11 – 20 % všech neuronů. Hlodavci a vačnatci mohou mít tedy podobné absolutní počty neuronů v mozku, ale v palliu mají hrabaví ptáci o ~ 60 % neuronů více.

11) Stejně jako u savců, i u hrabavých ptáků obsahuje mozeček většinu mozkových neuronů. Hustoty neuronů v mozečku hrabavých ptáků jsou podobné těm u savců s výjimkou hmyzožravců, kteří mají hustoty neuronů v mozečku vyšší.

Výsledky této diplomové práce přinesly první souborná data o buněčném složení mozku bazálních ptáků. Tato data dokládají výrazné rozdíly ve stavbě mozku mezi ptačími taxony a dále utvrzují hypotézu, že velikost mozku, ať už absolutní či relativní, není spolehlivým prediktorem procesní kapacity mozku, a tím pádem ani kognitivních schopností. Za faktory determinující procesní kapacitu mozku se považují počet neuronů, hustota neuronů, poměr gliových buněk vůči neuronům a v neposlední řadě také konektivita neuronů. Bohužel v dnešní době stále neexistuje spolehlivá a efektivní metoda, která by umožnila kvantifikaci a mapování jednotlivých synapsí u většího množství druhů. Počty neuronů jsou proto prozatím nejlepším dostupným proxy pro procesní kapacitu mozku. Rozvoj 3-D superrezoluční mikroskopie je v tomto kontextu velkým příslibem do budoucna.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- Abeyesinghe, S. M., Nicol, C. J., Hartnell, S. J., & Wathes, C. M. (2005). Can domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*, show self-control? *Animal Behaviour*, *70*(1), 1-11.
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: glia—more than just brain glue. *Nature*, *457*(7230), 675.
- Auersperg, A. M., Von Bayern, A. M., 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), e20231.
- 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), 20121092.
- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., ... & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532-541.
- Balda, R. P., & Kamil, A. C. (1989). A comparative study of cache recovery by three corvid species. *Animal Behaviour*, *38*(3), 486-495.
- Bensky, M. K., Gosling, S. D., & Sinn, D. L. (2013). The world from a dog’s point of view: a review and synthesis of dog cognition research. In *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 45, pp. 209-406). Academic Press.
- 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*, *113*(9), 2532-2537.
- Bird, C. D., & Emery, N. J. (2008). Using video playback to investigate the social preferences of rooks, *Corvus frugilegus*. *Animal Behaviour*, *76*(3), 679-687.
- 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*, *106*(25), 10370-10375.
- Boesch, C., & Boesch, H. (1982). Optimisation of nut-cracking with natural hammers by wild chimpanzees. *Behaviour*, 265-286.
- Brisbin Jr, I. L., & Peterson, A. T. (2007). Playing chicken with red junglefowl: identifying phenotypic markers of genetic purity in *Gallus gallus*. *Animal Conservation*, *10*(4), 429-435.
- 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), 686-696.
- Brown, S. D., & Dooling, R. J. (1992). Perception of conspecific faces by budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): I. Natural faces. *Journal of Comparative Psychology*, *106*(3), 203.
- Bugnyar T, Kotrschal K (2002) Observational learning and the raiding of food caches in ravens, *Corvus corax*: is it ‘tactical’ deception? *Anim Behav* 64:185–195

- Bugnyar, T., & Heinrich, B. (2005). Ravens, *Corvus corax*, differentiate between knowledgeable and ignorant competitors. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1573), 1641-1646.
- Burish, M. J., Kueh, H. Y., & Wang, S. S. H. (2004). Brain architecture and social complexity in modern and ancient birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 63(2), 107-124.
- Calabrese, A., & Woolley, S. M. (2015). Coding principles of the canonical cortical microcircuit in the avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201408545.
- Carter, J., Lyons, N. J., Cole, H. L., & Goldsmith, A. R. (2008). Subtle cues of predation risk: starlings respond to a predator's direction of eye-gaze. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1644), 1709-1715.
- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 395(6699), 272.
- Clayton, N. S., Dally, J. M., & Emery, N. J. (2007). Social cognition by food-caching corvids. The western scrub-jay as a natural psychologist. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1480), 507-522.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., ... & Morton, D. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, 30(4), 293-316.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., ... & Morton, D. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, 31(1), 1-32.
- Cozzi, B., Mazzariol, S., Podestà, M., Zotti, A., & Huggenberger, S. (2016). An unparalleled sexual dimorphism of sperm whale encephalization. *International Journal of Comparative Psychology*, 29(1).
- Daisley, J. N., Mascalzoni, E., Rosa-Salva, O., Rugani, R., & Regolin, L. (2009). Lateralization of social cognition in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1519), 965-981.
- Dally, J. M., Emery, N. J., & Clayton, N. S. (2006). Food-caching western scrub-jays keep track of who was watching when. *Science*, 312(5780), 1662-1665.
- Davis, H., & Bradford, S. A. (1986). Counting behavior by rats in a simulated natural environment. *Ethology*, 73(4), 265-280.
- Davis, H. (1992). Transitive inference in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 106(4), 342.
- De Pittà, M., Brunel, N., & Volterra, A. (2016). Astrocytes: orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*, 323, 43-61.
- 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), 115-124.

- Dicke, U., & Roth, G. (2016). Neuronal factors determining high intelligence. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371(1685), 20150180.
- Dos Santos, S. E., Porfirio, J., da Cunha, F. B., Manger, P. R., Tavares, W., Pessoa, L., ... & Herculano-Houzel, S. (2017). Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as “Primitive” as Expected. *Brain, behavior and evolution*, 89(1), 48-63.
- 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*, 201204773.
- Dunbar, R. I. (1998). The social brain hypothesis. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews*, 6(5), 178-190.
- 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.
- Emery, N. J., & Clayton, N. S. (2004a). Comparing the complex cognition of birds and primates. In *Comparative vertebrate cognition* (pp. 3-55). Springer, Boston, MA.
- Emery, N. J., & Clayton, N. S. (2004b). The mentality of crows: convergent evolution of intelligence in corvids and apes. *science*, 306(5703), 1903-1907.
- Emery, N. J. (2006). Cognitive ornithology: the evolution of avian intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1465), 23-43.
- Emery, N. J., Seed, A. M., Von Bayern, A. M., & Clayton, N. S. (2007). Cognitive adaptations of social bonding in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1480), 489-505.
- Emery, N. J., & Clayton, N. S. (2015). Do birds have the capacity for fun? *Current Biology*, 25(1), R16-R20.
- Emery, N. (2016). *Bird Brain: An exploration of avian intelligence*. Princeton University Press.
- Fankhauser, G., Vernon, J. A., Frank, W. H., & Slack, W. V. (1955). Effect of size and number of brain cells on learning in larvae of the salamander, *Triturus viridescens*. *Science*, 122(3172), 692-693.
- Flaherty, C. F., & Checke, S. (1982). Anticipation of incentive gain. *Animal Learning & Behavior*, 10(2), 177-182.
- Fraser, O. N., & Bugnyar, T. (2010). Do ravens show consolation? Responses to distressed others. *PLoS One*, 5(5), e10605.
- Fraser, O. N., & Bugnyar, T. (2011). Ravens reconcile after aggressive conflicts with valuable partners. *PLoS One*, 6(3), e18118.
- Fristoe, T. S., Iwaniuk, A. N., & Botero, C. A. (2017). Big brains stabilize populations and facilitate colonization of variable habitats in birds. *Nature ecology & evolution*, 1(11), 1706.

- 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), 32-44.
- Garland, A., Low, J., & Burns, K. C. (2012). Large quantity discrimination by North Island robins (*Petroica longipes*). *Animal cognition*, 15(6), 1129-1140.
- Garland, A., & Low, J. (2014). Addition and subtraction in wild New Zealand robins. *Behavioural processes*, 109, 103-110.
- Güntürkün, O. (2005). The avian 'prefrontal cortex' and cognition. *Current opinion in neurobiology*, 15(6), 686-693.
- Güntürkün, O. (2014). Is dolphin cognition special? *Brain, behavior and evolution*, 83(3), 177-180.
- Güntürkün, O., & Bugnyar, T. (2016). Cognition without cortex. *Trends in cognitive sciences*, 20(4), 291-303.
- Gyger, M., & Marler, P. (1988). Food calling in the domestic fowl, *Gallus gallus*: the role of external referents and deception. *Animal Behaviour*, 36(2), 358-365.
- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual review of physiology*, 72, 335-355.
- Hauser, M. D., Carey, S., & Hauser, L. B. (2000). Spontaneous number representation in semi-free-ranging rhesus monkeys. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1445), 829-833.
- Hauser, M. D., Tsao, F., Garcia, P., & Spelke, E. S. (2003). Evolutionary foundations of number: spontaneous representation of numerical magnitudes by cotton-top tamarins. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1523), 1441-1446.
- Hazel, S. J., O'Dwyer, L., & Ryan, T. (2015). "Chickens are a lot smarter than I originally thought": changes in student attitudes to chickens following a chicken training class. *Animals*, 5(3), 821-837.
- Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518-2521.
- Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12138-12143.
- 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), 3562-3567.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3, 31.
- Herculano-Houzel, S. (2011). Brains matter, bodies maybe not: the case for examining neuron numbers irrespective of body size. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1225(1), 191-199.

- Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Da Silva, A. V., 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), 302-314.
- Herculano-Houzel, S., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2014). Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 77.
- Herculano-Houzel, S. (2017). What modern mammals teach about the cellular composition of early brains and mechanisms of brain evolution.
- Herculano-Houzel, S., Avelino-de-Souza, K., Neves, K., Porfirio, J., Messeder, D., Mattos Feijó, L., ... & Manger, P. R. (2014). The elephant brain in numbers. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 46.
- Herculano-Houzel, S., & Dos Santos, S. E. (2018). You Do Not Mess with the Glia. *Neuroglia*, 1(1), 193-219.
- Hogue, M. E., Beaugrand, J. P., & Laguë, P. C. (1996). Coherent use of information by hens observing their former dominant defeating or being defeated by a stranger. *Behavioural Processes*, 38(3), 241-252.
- Holmgren, N. (1922). Points of view concerning forebrain morphology in lower vertebrates. *Journal of Comparative Neurology*, 34(5), 391-459.
- Huggenberger, S. (2008). The size and complexity of dolphin brains—a paradox? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(6), 1103-1108.
- Hunt, G. R. (1996). Manufacture and use of hook-tools by New Caledonian crows. *Nature*, 379(6562), 249.
- Hunt, G. R., & Gray, R. D. (2003). Diversification and cumulative evolution in New Caledonian crow tool manufacture. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1517), 867-874.
- Hunt, S., Low, J., & Burns, K. C. (2008). Adaptive numerical competency in a food-hoarding songbird. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1649), 2373-2379.
- 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), 441-455.
- Chelonis, J. J., Logue, A. W., Sheehy, R., & Mao, J. (1998). Effects of response effort on self-control in rats. *Animal Learning & Behavior*, 26(4), 408-415.
- Cheney, D. L., & Seyfarth, R. M. (1985). Vervet monkey alarm calls: Manipulation through shared information? *Behaviour*, 94(1), 150-166.
- China, A. (2017). Is Cetacean Intelligence Special? New Perspectives on the Debate. *Entropy*, 19(10), 543.
- Isler, K., & van Schaik, C. P. (2009). The expensive brain: a framework for explaining evolutionary changes in brain size. *Journal of Human Evolution*, 57(4), 392-400.

- Iwaniuk, A. N., & Nelson, J. E. (2001). A comparative analysis of relative brain size in waterfowl (Anseriformes). *Brain, Behavior and Evolution*, 57(2), 87-97.
- Iwaniuk, A. N., Dean, K. M., & Nelson, J. E. (2005). Interspecific allometry of the brain and brain regions in parrots (Psittaciformes): comparisons with other birds and primates. *Brain, Behavior and Evolution*, 65(1), 40-59.
- Jardim-Messeder, D., Lambert, K., Noctor, S., Pestana, F. M., de Castro Leal, M. E., Bertelsen, M. F., ... & 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, 118.
- Jarvis, E. D., Güntürkün, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., ... & Striedter, G. (2005). Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 151.
- Jarvis, E. D. (2009). Evolution of the pallium in birds and reptiles. In *Encyclopedia of neuroscience* (pp. 1390-1400). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jarvis, E. D., Yu, J., Rivas, M. V., Horita, H., Feenders, G., Whitney, O., ... & Siang-Bakshi, C. (2013). Global view of the functional molecular organization of the avian cerebrum: mirror images and functional columns. *Journal of Comparative Neurology*, 521(16), 3614-3665.
- 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), e92895.
- Jerison, H. J. (1973). *Evolution of the brain and intelligence* Academic Press. [HTE].
- Department of Biochemistry and Molecular Biophysics Thomas Jessell, Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.). New York: McGraw-hill.
- Kapuściński, J., & Szer, W. (1979). Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic acids research*, 6(11), 3519-3534.
- 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*, 167(1), 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, 128.
- Kelley, L. A., & Endler, J. A. (2012). Illusions promote mating success in great bowerbirds. *Science*, 335(6066), 335-338.
- 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), 31052-31061.
- Köksal, F., & Domjan, M. (1998). Observational conditioning of sexual behavior in the domesticated quail. *Animal Learning & Behavior*, 26(4), 427-432.

- Krachun, C., & Call, J. (2009). Chimpanzees (*Pan troglodytes*) know what can be seen from where. *Animal Cognition*, *12*(2), 317.
- 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*, 67-101.
- Lefebvre, L., Reader, S. M., & Sol, D. (2004). Brains, innovations and evolution in birds and primates. *Brain, behavior and evolution*, *63*(4), 233-246.
- Levey, D. J., Londoño, G. A., Ungvari-Martin, J., Hiersoux, M. R., Jankowski, J. E., Poulsen, J. R., ... & Robinson, S. K. (2009). Urban mockingbirds quickly learn to identify individual humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pnas-0811422106.
- Liedtke, J., Werdenich, D., Gajdon, G. K., Huber, L., & Wanker, R. (2011). Big brains are not enough: performance of three parrot species in the trap-tube paradigm. *Animal cognition*, *14*(1), 143-149.
- Lorenz, K. (1950). The comparative method in studying innate behaviour patterns. *Physiological mechanisms in animal behaviour*, (17).
- MacLean, E. L., Hare, B., Nunn, C. L., Addessi, E., Amici, F., Anderson, R. C., ... & Boogert, N. J. (2014). The evolution of self-control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(20), E2140-E2148.
- Manger, P. R. (2006). An examination of cetacean brain structure with a novel hypothesis correlating thermogenesis to the evolution of a big brain. *Biological Reviews*, *81*(2), 293-338.
- Manger, P. R. (2013). Questioning the interpretations of behavioral observations of cetaceans: is there really support for a special intellectual status for this mammalian order? *Neuroscience*, *250*, 664-696.
- Marino, L. (2006). Absolute brain size: Did we throw the baby out with the bathwater? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(37), 13563-13564.
- Marino, L., Butti, C., Connor, R. C., Fordyce, R. E., Herman, L. M., Hof, P. R., ... & Pack, A. A. (2008). A claim in search of evidence: reply to Manger's thermogenesis hypothesis of cetacean brain structure. *Biological Reviews*, *83*(4), 417-440.
- Marino, L., & Colvin, C. M. (2015). Thinking pigs: A comparative review of cognition, emotion, and personality in *Sus domesticus*. *International Journal of Comparative Psychology*, *28*(1).
- Marino, L. (2017). Thinking chickens: a review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken. *Animal Cognition*, *20*(2), 127-147.
- Marois, R., & Ivanoff, J. (2005). Capacity limits of information processing in the brain. *Trends in cognitive sciences*, *9*(6), 296-305.
- 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*, 201206109.

- McCulloch, W. S., & Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The bulletin of mathematical biophysics*, 5(4), 115-133.
- Mink, J. W., Blumenshine, R. J., & Adams, D. B. (1981). Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 241(3), R203-R212.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
- Mohamed, W. (2008). The Edwin Smith Surgical Papyrus: Neuroscience in Ancient Egypt. *International Brain Research Organization History of Neuroscience [Internet]*.
- Nakamura, T., Croft, D. B., & Westbrook, R. F. (2003). Domestic pigeons (*Columba livia*) discriminate between photographs of individual pigeons. *Animal Learning & Behavior*, 31(4), 307-317.
- Nakamura, N., Watanabe, S., & Fujita, K. (2014). A reversed Ebbinghaus–Titchener illusion in bantams (*Gallus gallus domesticus*). *Animal cognition*, 17(2), 471-481.
- Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2012). Artifact versus reality—how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia*, 60(7), 1013-1023.
- Neves, K., Meireles Ferreira, F., Tovar-Moll, F., Gravett, N., Bennett, N. C., Kaswera, C., ... & Herculano-Houzel, S. (2014). Cellular scaling rules for the brain of afrotherians. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 5.
- 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), 19-38.
- 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, 39-46.
- Nieder, A. (2005). Counting on neurons: the neurobiology of numerical competence. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 177.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., & Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821), 714.
- Northcutt, R. G. (2001). Changing views of brain evolution. *Brain research bulletin*, 55(6), 663-674.
- Northcutt, R. G. (2011). Evolving large and complex brains. *Science*, 332(6032), 926-927.
- 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), 7255-7260.

- Ostojić, L., Shaw, R. C., Cheke, L. G., & Clayton, N. S. (2013). Evidence suggesting that desire-state attribution may govern food sharing in Eurasian jays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 4123-4128.
- Pakkenberg, B., & Gundersen, H. J. G. (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *Journal of Comparative Neurology*, *384*(2), 312-320.
- Parkins, E. J. (1997). Cerebellum and cerebrum in adaptive control and cognition: a review. *Biological cybernetics*, *77*(2), 79-87.
- Pepperberg, I. M. (1994). Numerical competence in an African gray parrot (*Psittacus erithacus*). *Journal of Comparative Psychology*, *108*(1), 36.
- Pepperberg, I. M. (2002). Cognitive and communicative abilities of grey parrots. *Current Directions in Psychological Science*, *11*(3), 83-87.
- Peterson, A. T., & Brisbin, I. L. (1998). Genetic endangerment of wild Red Junglefowl *Gallus gallus*? *Bird Conservation International*, *8*(4), 387-394.
- Prior, H., Schwarz, A., & Güntürkün, O. (2008). Mirror-induced behavior in the magpie (*Pica pica*): evidence of self-recognition. *PLoS biology*, *6*(8), e202.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., ... & Rubenstein, J. L. (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), 409-438.
- Quester, R., & Schröder, R. (1997). The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin. *Journal of neuroscience methods*, *75*(1), 81-89.
- Raby, C. R., Alexis, D. M., Dickinson, A., & Clayton, N. S. (2007). Planning for the future by western scrub-jays. *Nature*, *445*(7130), 919.
- Regolin, L., & Vallortigara, G. (1995a). Perception of partly occluded objects by young chicks. *Perception & Psychophysics*, *57*(7), 971-976.
- Regolin, L., Vallortigara, G., & Zanforlin, M. (1995b). Object and spatial representations in detour problems by chicks. *Animal Behaviour*, *49*(1), 195-199.
- Regolin, L., Vallortigara, G., & Zanforlin, M. (1995c). Detour behaviour in the domestic chick: Searching for a disappearing prey or a disappearing social partner. *Animal Behaviour*.
- Reiner, A., Perkel, D. J., Bruce, L. L., Butler, A. B., Csillag, A., Kuenzel, W., ... & Wild, M. (2004). Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, *473*(3), 377-414.
- Roland, P. E. (1993). Partition of the human cerebellum in sensory-motor activities, learning and cognition. *Canadian journal of neurological sciences*, *20*(S3), S75-S77.
- Roth, G., & Dicke, U. (2005). Evolution of the brain and intelligence. *Trends in cognitive sciences*, *9*(5), 250-257.

- Rugani, R., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2007). Rudimental numerical competence in 5-day-old domestic chicks (*Gallus gallus*): identification of ordinal position. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 33(1), 21.
- Rugani, R., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2008). Discrimination of small numerosities in young chicks. *Journal of experimental psychology: Animal behavior processes*, 34(3), 388.
- Rugani, R., Fontanari, L., Simoni, E., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2009). Arithmetic in newborn chicks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1666), 2451-2460.
- Rugani, R., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2010). Imprinted numbers: newborn chicks' sensitivity to number vs. continuous extent of objects they have been reared with. *Developmental science*, 13(5), 790-797.
- Rugani, R., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2011). Summation of large numerosity by newborn chicks. *Frontiers in psychology*, 2, 179.
- Rugani, R., Cavazzana, A., Vallortigara, G., & Regolin, L. (2013). One, two, three, four, or is there something more? Numerical discrimination in day-old domestic chicks. *Animal Cognition*, 16(4), 557-564.
- Sarko, D. K., Catania, K. C., Leitch, D. B., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2009). Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in neuroanatomy*, 3, 8.
- 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, 13971.
- Seed, A. M., Clayton, N. S., & Emery, N. J. (2007). Postconflict third-party affiliation in rooks, *Corvus frugilegus*. *Current Biology*, 17(2), 152-158.
- Seed, A. M., Clayton, N. S., & Emery, N. J. (2008). Cooperative problem solving in rooks (*Corvus frugilegus*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1641), 1421-1429.
- Shanahan, M., Bingman, V. P., Shimizu, T., Wild, M., & Güntürkün, O. (2013). Large-scale network organization in the avian forebrain: a connectivity matrix and theoretical analysis. *Frontiers in computational neuroscience*, 7, 89.
- Smith, C. L., Taylor, A., & Evans, C. S. (2011). Tactical multimodal signalling in birds: facultative variation in signal modality reveals sensitivity to social costs. *Animal behaviour*, 82(3), 521-527.
- Stephan, H. (1960). Methodische Studien über den quantitativen Vergleich architektonischer Struktureinheiten des Gehirns. *Z wiss Zool*, 164, 143-172.
- Stevens, J. R. (2014). Evolutionary pressures on primate intertemporal choice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140499.
- Striedter, G. F. (2005). *Principles of Brain Evolution* (Sinauer, Sunderland, MA).
- Striedter, G. F. (2015). *Neurobiology: a functional approach*. Oxford University Press.

- Suzuki, K., & Kobayashi, T. (2000). Numerical competence in rats (*Rattus norvegicus*): Davis and Bradford (1986) extended. *Journal of Comparative Psychology*, *114*(1), 73.
- Taylor, P. E., Haskell, M., Appleby, M. C., & Waran, N. K. (2002). Perception of time duration by domestic hens. *Applied Animal Behaviour Science*, *76*(1), 41-51.
- Thompson, H. B. (1899). The total number of functional cells in the cerebral cortex of man, and the percentage of the total volume of the cortex composed of nerve cell bodies, calculated from Karl Hammarberg's data; together with a comparison of the number of giant cells with the number of pyramidal fibers. *Journal of Comparative Neurology*, *9*(1), 113-140.
- Vallortigara, G., & Regolin, L. (2002). Facing an obstacle: lateralization of object and spatial cognition. *Comparative vertebrate lateralization*. Cambridge University Press, Cambridge, 383-444.
- Vallortigara, G. (2006). The cognitive chicken: visual and spatial cognition in a non-mammalian brain. *Comparative cognition: Experimental explorations of animal intelligence*, 53-70.
- Van Dongen, P. A. M. (1998). Brain size in vertebrates. In *The central nervous system of vertebrates* (pp. 2099-2134). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Van Horik, J. O., & Madden, J. R. (2016). A problem with problem solving: motivational traits, but not cognition, predict success on novel operant foraging tasks. *Animal behaviour*, *114*, 189-198.
- Vernon, J. A., & Butsch, J. (1957). Effect of tetraploidy on learning and retention in the salamander. *Science*, *125*(3256), 1033-1034.
- Virchow, R. (1858). Die Cellularpathologie in ihrer Bedeutung auf physiologische und pathologische Gewebslehre. *Hirschwald, Berlin*.
- von Fersen, L., & Delius, J. D. (1989). Long-term retention of many visual patterns by pigeons. *Ethology*, *82*(2), 141-155.
- von Waldeyer-Hartz, H. W. G. (1891). Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems.
- Weir, A. A., Chappell, J., & Kacelnik, A. (2002). Shaping of hooks in New Caledonian crows. *Science*, *297*(5583), 981-981.
- 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), 400-409.
- Whitehead, H., & Rendell, L. (2014). *The cultural lives of whales and dolphins*. University of Chicago Press.
- Whitfield, D. P. (1987). Plumage variability, status signalling and individual recognition in avian flocks. *Trends in Ecology & Evolution*, *2*(1), 13-18.
- Wu, H. M., Sackett, G. P., & Gunderson, V. M. (1986). Social stimuli as incentives for delayed response performance by infant pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Primates*, *27*(2), 229-236.

Yamamoto, S., Humle, T., & Tanaka, M. (2013). Basis for cumulative cultural evolution in chimpanzees: social learning of a more efficient tool-use technique. *PLoS One*, 8(1), e55768.

Zentall, T. R. (2012). Perspectives on observational learning in animals. *Journal of Comparative Psychology*, 126(2), 114.