

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Charles University**  
**Faculty of Science**

Studijní program: Zoologie

Studijní obor: Zoologie

Study programme: Zoology

Branch of study: Zoology

Doktorský studijní program:

Doctoral study programme:

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Doctoral thesis



**Ekologické aspekty ovlivňující mikrobiotu trávicího traktu ptáků**

**Ecological aspects affecting microbiota in the digestive tracts of birds**

**Mgr. Lucie Schmiedová**

Školitel/Supervisor: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

Konzultant/Consultant: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2022

# Abstrakt

Střeva obratlovců jsou obydlena taxonomicky i funkčně různorodým společenstvem bakterií a jiných mikroorganismů. Pokroky v sekvenačních technologiích odhalily vliv střevní mikrobioty (dále jen SM) na fyziologii, imunitu i chování hostitele. Naše současné vědomosti jsou však založené zejména na studiu modelových organismů, jejichž SM se od volně žijících obratlovců významně liší. Předložená práce je proto zaměřena na studium SM pomocí sekvenování druhé generace u volně žijících pěvců (Passeriformes) a srovnává jejich SM s ostatními obratlovci, zejména s nejvíce studovanými savci. Na vnitrodruhové i mezidruhové úrovni se předložená práce věnuje faktorům, které složení SM ovlivňují, mezi něž patří například vnitřní regulační mechanismy hostitele (například genotyp, imunitní systém či fyziologie hostitele), sociální kontakty či environmentální faktory (včetně potravy). Dále se tato práce zabývá stabilitou SM v čase a změnami SM během ontogeneze.

Z výsledků této práce vyplývá, že u pěvců jsou v SM dominantní bakteriální kmeny Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Tenericutes, Bacteroidetes a Chlamydia, což naznačuje složení SM odlišné od SM savců. Mezidruhová variabilita ve složení SM pěvců je ovlivněna zejména fylogenezí hostitele, efekt geografické vzdálenosti mezi lokalitami sběru vzorků je méně výrazný. Zatímco u savců jsou ekologické znaky hostitele v čele s potravou významným faktorem ovlivňujícím složení SM, u pěvců mají ekologické faktory společně s potravou nesrovnatelně menší vliv na mezidruhovou i vnitrodruhovou variabilitu ve složení SM. U vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) data naznačují vliv sociálních kontaktů u sociálních párů či velmi slabý transgenerační přenos SM od sociální matky na mláďata. Zároveň jsme pozorovali rozdílnou SM mláďat a dospělců, ale u mláďat v hnízdě jsme nepozorovali dramatické změny SM s věkem, které jsou známé od savců. Detekovali jsme ovšem část SM, která se zdá být stabilní v čase, a tedy vhodná pro další podrobnější studium. Výsledky této práce ukazují důležitost studia SM u dalších skupin obratlovců, nežli jsou savci. Pěvci mají nejen jiné taxonomické složení SM, ale zdá se, že i faktory ovlivňující složení SM jsou jiné než u savců.

# Abstract

Vertebrate intestines are inhabited by taxonomically and functionally diverse communities of bacteria and other microorganisms. While recent advances in sequencing technology have revealed the influence of gut microbiota (hereinafter GM) on the physiology, immunity and behaviour of the host; our current knowledge is based mainly on the study of model organisms that will have a different GM composition than that of wild vertebrates. The work presented here focuses on the study of wild songbird (Passeriformes) GM using next generation sequencing, and compares their GM with that of other vertebrates, including mammals, which have been studied far more than birds. This work focuses mainly on factors that affect GM composition at the inter- and intra-specific levels, including intrinsic regulatory mechanisms of the host (such as genetic, immunological and/or physiological mechanisms), social contacts and environmental factors (including diet). In addition, the stability of GM over time and any changes during ontogeny were also assessed.

The results indicate that songbird GM is dominated by the bacterial phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Tenericutes, Bacteroidetes and Chlamydia, a community that differs from that of mammals. At the interspecies level, GM composition is mainly influenced by phylogeny and less so by sampling site. While ecological factors, and especially diet, are important GM predictors in mammals, the effect of ecological factors, including diet, have a much smaller effect on inter- and intraspecific variability in songbird GM composition. Our data from barn swallows (*Hirundo rustica*) suggest an effect of social GM transmission among adults forming social pairs, as well as trans-generational transmission from a social mother to her own nestlings. At the same time, we observed differing GM in adults and nestlings, with no dramatic change in GM with nestling age, a process previously recognised in mammals. Part of the GM detected appears to remain stable over time, and is therefore suitable for further detailed study. To conclude, our studies demonstrate that songbird GM differs from that of mammals and that the factors influencing GM composition appear to differ from those in mammals, thereby highlighting the importance of studying multiple vertebrate groups (not just mammals) when assessing the effects on GM composition.

# Úvod

Společenstvo symbiotických bakterií v trávicím traktu, může co do počtu buněk převyšovat nebo být srovnatelné s počtem buněk svého hostitele [1]. Zároveň však počet genů, které toto společenstvo obsahuje, může být až o dva řády vyšší než počet genů v genomu hostitele [2]. Je dobře známo, že střevní mikrobiota (dále jen SM) a hostitel spolu vzájemně interagují na mnoha úrovních a tyto interakce přináší hostiteli celou řadu důležitých výhod. SM pomáhá hostiteli trávit pro něj jinak nestravitelné složky potravy (review v [3]), syntetizovány některé vitamíny (review v [4]), SM dále ovlivňuje správný vývoj a funkci trávicího traktu [5], pomáhá s ochranou proti patogenům (review v [6]), stimuluje a podporuje vývoj imunitního systému hostitele a ovlivňuje jeho specifitu (review v [7]) a podílí se také na funkci mozku a chování [8]. Na druhou stranu, odchýlení SM od normálního stavu může být pro hostitele škodlivé nebo dokonce fatální [9–11]. Není proto překvapivé, že se v průběhu evoluce vyvinula celá řada genetických, fyziologických, morfologických anebo behaviorálních znaků, kterými hostitel může optimalizovat složení SM ke svému prospěchu [12–14]. Tyto interakce mezi hostitelem a jeho SM mohou hrát rovněž důležitou roli v mnoha mikroevolučních procesech, včetně evoluce výběru partnera [15, 16], evoluce sociálního chování [12, 17] a speciace [9, 10, 18].

Většina našich poznatků o SM je založena na studiu laboratorních savců a lidí. SM laboratorních zvířat i zvířat žijících v zajetí je odlišná od volně žijících zvířat [19, 20]. Proto výzkum založený na jedincích ze zajetí nemusí nutně odrážet přirozené interakce mezi SM a jejím hostitelem, které se formovaly během vzájemné koevoluce. V rámci skupiny obratlovců jsou nejvíce studováni volně žijící savci, u kterých jsou Firmicutes a Bacteroidetes obvykle dominantně se vyskytující kmeny [21, 22], zatímco složení SM ostatních obratlovců se zdá být daleko variabilnější [23–26], ale zároveň méně prozkoumané. Vzhledem k omezeným znalostem o SM volně žijících ptáků (třída Aves) jsem se rozhodla zaměřit na tuto skupinu obratlovců, a to konkrétně na řád pěvců (Passeriformes).

Všichni ptáci jsou stejně jako savci teplokrevní živočichové. Na rozdíl od většiny savců, kteří jsou živorodí (krom podtřídy vejcorodých; Prototheria), jsou všichni ptáci vejcorodí. Další podstatný rozdíl, který může ovlivňovat SM, je skutečnost, že většina savců má oddělenou trávicí, vylučovací a rozmnožovací soustavu, ale u ptáků všechny tyto soustavy ústí do kloaky a jsou tedy propojeny. Podstatné rozdíly ale existují i na úrovni fyziologie trávení potravy a vstřebávání živin [27, 28].

Pěvci jsou monofyletický a nejpočetnější řád ptáků, který zahrnuje okolo 6000 druhů, což je přibližně 60 % všech ptačích druhů. Pěvci se od ostatních ptáků oddělili přibližně před 47 miliony let [29]. I přes relativně nedávnou diverzifikaci jsou pěvci různorodou skupinou, zejména co se týče ekologie a životních strategií. Z těchto důvodů je lze považovat za důležitou modelovou skupinu v evolučních a ekologických studiích. Oproti řadě jiných ptačích taxonů se u pěvců nachází pouze rudimentární slepá střeva. Vyvinutá slepá střeva mají důležitou roli v bakteriální fermentaci potravy. Vzhledem k tomu, že se tato práce věnuje studiu volně žijících pěvců, nebyl většinou možný odběr vzorků různých částí střev, a proto jsem se převážně zaměřila na mikrobiotu v trusu. Sběr trusu je běžně využíván jako neinvazivní metoda pro analýzy střevní mikrobioty zejména tlustého střeva [30, 31]. Z mých nepublikovaných dat navíc vyplývá, že u ptáků mikrobiota trusu poměrně věrně odráží střevní mikrobiotu (Schmiedová *et al.* nepublikované výsledky).

Tato práce je převážně zaměřena na složení SM a faktory, které mohou složení SM ovlivnit u volně žijících pěvců, a to jak na mezidruhové, tak i vnitrodruhové úrovni. Hlavními faktory, které mohou mít vliv na SM, jsou vnitřní regulační mechanismy hostitele, zejména geneticky podmíněná variabilita v imunitním systému [32, 33] a sociální kontakty, kdy u ptáků se mohou bakterie přenášet během kopulace, při krmení mláďat rodiči nebo v rámci fyzického kontaktu mezi jedinci ze stejné kolonie, populace nebo dokonce mezi různými druhy [34–37]. V neposlední řadě jsou zdrojem variability SM environmentální faktory, které zahrnují zejména potravu a obývané prostředí [34, 38].

## Metodika

První publikace zahrnutá do této disertace je založena na 454 sekvenční platformě, protože v té době byla pro nás nejdostupnější. Všechny ostatní publikace jsou založeny na sekvenování pomocí Illumina Miseq platformy. Pomocí Illumina Miseq sekvenujeme předem naamplifikovanou specifickou oblast genu pro 16S rRNA, která se běžně používá v obdobných studiích zabývajících se SM [25, 39].

## Cíle

- I. Jaké je složení SM u pěvců a jak se liší od ostatních obratlovců (zejména savců)?**  
[Publikace A–I]
- II. Jaká je variabilita SM u pěvců na mezidruhové úrovni a jaké jsou hlavní faktory, které tuto variabilitu ovlivňují?** Využila jsem velký komparační datový soubor (319

vzorků, 51 druhů), abych zjistila, do jaké míry ovlivňuje variabilitu SM fylogeneze hostitele, ekologie (včetně životních strategií) a lokalita sběru vzorků. **[Publikace A]** Poté jsem tento datový soubor nasbíraný v mírném pásu (ČR) rozšířila o vzorky z tropické oblasti (Kamerunu, 205 vzorků, 47 druhů), aby bylo možno porovnat SM mezi druhy z tropické a temperátní klimatické zóny. U populace z mírného pásu jsem si navíc kladla otázku, zda je SM ovlivněna migrací. Navíc u dvou druhů trans-saharských migrantů jsem přímo srovnávala jejich SM v tropech během období sucha (zimoviště) a v temperátu během hnízdní sezony (hnízdiště). **[Publikace B]** U slavíků obecného a tmavého (*Luscinia megarhynchos* a *L. luscinia*) jsem testovala souvislost mezi reprodukční bariérou a mezidruhovou divergencí SM. **[Publikace C]**

- III. Jaké jsou hlavní faktory ovlivňující vnitrodruhovou variabilitu SM?** U populace vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) jsem se zaměřila na srovnání SM mezi různými lokalitami a mezi hnízdními sezonami. **[Publikace D]** U tohoto druhu jsem také studovala, jestli je SM ovlivněna potravou jedince. **[Publikace E]** Dále jsem pomocí stimulace zánětlivé reakce u mláďat vlaštovky testovala souvislost SM s imunitním systémem. **[Publikace F]**
- IV. Jaký je potenciaální vliv sociálního přenosu na podobnost SM mezi jedinci?** Studovala jsem podobnost kloakální mikrobioty mezi hnízdními páry na vnitrodruhovém datovém souboru u vlaštovky obecné. **[Publikace G]** Navíc jsem u vlaštovky obecné také analyzovala podobnost mikrobioty v trusu mezi mláďaty a jejich sociálními rodiči a také mezi mláďaty pocházejícími ze stejného hnízda. **[Publikace D]**
- V. Je SM stabilní v čase a rezistentní vůči environmentálním změnám?** U vlaštovky obecné jsem studovala změny v čase u opakovaně vzorkovaných mláďat a dospělců. **[Publikace D]** Dále jsem studovala vliv hnízdního prostředí na složení SM u mláďat kukaček obecných (*Cuculus canorus*) vychovávaných dvěma různými druhy rákosníků (rákosníka velkého *Acrocephalus arundinaceus* a obecného *A. scirpaceus*) jako sociálními rodiči. **[Publikace H]**
- VI. Jak se mění SM během ontogeneze?** U populace vlaštovky obecné jsem porovnávala SM mezi dospělci a mláďaty, jakož i změny SM s věkem mláďat. **[Publikace D]**
- VII. Jak se mění mikrobiota napříč trávicím traktem?** U slavíků obecného a tmavého jsem porovnávala mikrobiotu mezi třemi částmi tenkého střeva. **[Publikace C]**

U sýkory koňadry (*Parus major*) jsem srovnávala mikrobiotu proximální (výtěr zobáku) a distální (trus) části trávicího traktu. **[Publikace I]** U kukačky obecné jsme srovnávali trus a zastrašující sekret, který je pravděpodobně původem ze slepého střeva. **[Publikace H]**

## Publikace, které jsou součástí disertační práce

**Publikace A:** Kropáčková, L., Těšický, M., Albrecht, T., Kubovčíak, J., Čížková, D., Tomášek, O., Martin, F.-P.J., Bobek, L., Králová, T., Procházka, P. & Kreisinger, J. (2017) Co-diversification of gastrointestinal microbiota and phylogeny in passerines is not explained by ecological divergence. *Mol Ecol* 26, 5292–5304. doi:10.1111/mec.14144

**Publikace B:** Schmiedová, L., Kreisinger, J., Kubovčíak, J., Těšický, M., Martin, F.-P.J., Tomášek, O., Kauzálková, T. Sedláček, O. & Albrecht, T. Gut microbiota differentiation between tropical and temperate passerine birds and due to migration strategy. *Rukopis před odesláním do časopisu ISME Journal*

**Publikace C:** Sottas, C., Schmiedová, L., Kreisinger, J., Albrecht, T., Reif, J., Osiejuk, T. S., & Reifová, R. (2021). Gut microbiota in two recently diverged passerine species: Evaluating the effects of species identity, habitat use and geographic distance. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 41. doi: 10.1186/s12862-021-01773-1

**Publikace D:** Kreisinger, J., Kropáčková, L., Petrželková, A., Adámková, M., Tomášek, O., Martin, J.-F., Michálková, R. & Albrecht, T. (2017). Temporal stability and the effect of transgenerational transfer on faecal microbiota structure in a long distance migratory bird. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00050

**Publikace E:** Schmiedová, L., Tomášek, O., Pinkasová, H., Albrecht, T. & Kreisinger, J. Variation in diet composition and its relation to gut microbiota in a passerine bird, the barn swallow. *V recenzním řízení v časopise Scientific Reports*

**Publikace F:** Kreisinger, J., Schmiedová, L., Petrželková, A., Michálková, R., Tomášek, O., Martin, J.-F., & Albrecht, T. (2018) Fecal microbiota associated with phytohaemagglutinin-induced immune response in nestlings of a passerine bird. *Ecology and Evolution*, 8(19), 9793-9802. doi: 10.1002/ece3.4454

**Publikace G:** Kreisinger, J., Čížková, D., Kropáčková, L., & Albrecht, T. (2015). Cloacal microbiome structure in a long-distance migratory bird assessed using deep 16sRNA pyrosequencing. *PLoS ONE* 10, e0137401. doi:10.1371/journal.pone.0137401



**Publikace H:** Schmiedová, L., Kreisinger, J., Požgayová, M., Honza, M., Martin, J.-F. & Procházka, P. (2020) Gut microbiota in a host-brood parasite system: insights from common cuckoos raised by two warbler species. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9). doi: 10.1093/femsec/fiaa143

**Publikace I:** Kropáčková, L., Pechmanová, H., Vinkler, M., Svobodová, J., Velova, H., Těšický, M., Martin, F.-P.J. & Kreisinger, J. (2017) Variation between the oral and faecal microbiota in a free-living passerine bird, the great tit (*Parus major*). *PLOS ONE* 12, e0179945. doi:10.1371/journal.pone.0179945

## Výsledky a Diskuze

U pěvců v SM dominují bakteriální kmeny Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Tenericutes, Bacteroidetes a Chlamydia **[Publikace A]**. Podobné výsledky byly získány ve většině mých publikací **[Publikace A-I]**. Nicméně u mláďat kukačky obecné bylo složení SM mírně odlišné zejména kvůli většímu výskytu kmene Bacteroidetes **[Publikace H]**. Obecně jsou výsledky složení SM u pěvců a kukačky v souladu i s ostatními publikacemi, které studovaly SM u ptáků [25, 40–42]. Potvrzuje se, že pěvčí SM je velmi odlišná ve srovnání s daleko více studovanými savci [21]. Bakteriální kmeny Firmicutes, Proteobacteria a Bacteroidetes jsou v různé míře zastoupené i u ostatních skupin obratlovců, např. u plazů [43–45], obojživníků [46–48] i u ryb [49–51].

### Vliv klimatické zony na SM

Napříč širokou škálou taxonů byl popsán pokles diverzity s rostoucí zeměpisnou šířkou ([52], ale [53]), včetně parazitů a patogenů asociovaných se zvířecími hostiteli [54]. Diverzita SM byla dosud studovaná pouze velmi málo, přičemž relevantní data jsou jenom z výzkumu lidské populace ([38, 55–57], ale [58]). Zatímco u lidí byla pozorována větší alfa diverzita SM v tropech [38, 56], tak u pěvců jsme nenašli podporu pro větší alfa diverzitu v tropech ve srovnání s teplotou **[Publikace B]**. U pěvců v tropech byla pozorována vysoká variabilita ve složení SM mezi obdobími sucha a obdobími dešťů. Jedinci z teploty se více lišili ve složení SM od jedinců odebíraných během tropického období dešťů než od jedinců odebíraných během tropického období sucha **[Publikace B]**.

### Vliv migrace na složení SM

U pěvců z mírného pásu jsme se zajímali o rozdíl SM mezi druhy migrujícími během zimního období do tropických oblastí Afriky (trans-saharský migrant) a rezidentními druhy



(zůstávajícími po celý rok na jednom místě) nebo těmi, kteří migrují pouze na krátkou vzdálenost (maximálně do Středomoří). Kvůli vystavení různému prostředí během migrace jsem očekávala vyšší alfa diverzitu u trans-saharských migrantů než u ostatních temperátních druhů. Tato predikce se však nepotvrdila [**Publikace B**]. Vzhledem k předchozím studiím [59–61] jsme očekávali, že během hnízdního období se trans-saharští migranti nebudou ve složení SM lišit od rezidentů a nebo migrantů na krátkou vzdálenost. Na získaných datech jsme pozorovali rozdíly ve složení SM mezi trans-saharskými migranty a rezidenty společně s migranty do Středomoří. Zároveň se však složení SM trans-saharských migrantů liší i od tropických druhů z obou sezon [**Publikace B**]. Navíc u dvou druhů trans-saharských migrantů, pěnice slavíkové (*Sylvia borin*) a budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*), se složení SM významně lišilo mezi hnízdištěm a zimovištěm, přičemž tyto změny víceméně odrážely změny ve složení SM pozorované i mezi ostatními temperátními druhy pěvců a tropickými pěvci z období sucha [**Publikace B**]. Stejně jako naše výsledky i předchozí studie detekovaly fluktuaci SM v souvislosti s migrací [59–62].

### **Vliv geografické vzdálenosti na SM**

Naše výsledky na datovém souboru pěvců z mírného pásu ukazují na jistou míru korelace mezi rozdíly ve složení SM a geografickou vzdáleností mezi lokalitami [**Publikace A**]. Podobně i na vnitrodruhové úrovni mezi populacemi vlaštovky obecné jsme zjistili významné, avšak slabé rozdíly mezi vzorkovanými lokalitami [**Publikace D**]. I na základě dalších studií se ukazuje, že prostorová segregace hraje u ptáků určitou roli, nicméně její význam se liší mezi jednotlivými studiemi. Zatímco naše publikace zaznamenaly pouze menší význam prostorové segregace, což je v souladu s výsledky dalších studií [25, 63–65], výsledky jiných publikací pokládají prostorovou segregaci za nejvýznamnější testovaný faktor [42, 66, 67]. Podobně rozporuplné výsledky byly zaznamenány i u savců. Ve většině publikací byla prostorová segregace důležitým faktorem [68–70], ale v jiné publikaci nebyl efekt prostorové segregace pozorován [71]. Naše výsledky ukazují, že i při poměrně velké vzdálenosti mezi studovanými populacemi z tropů a temperátu (okolo 5000 km) se může SM do určité míry překrývat [**Publikace B**], a proto pravděpodobně geografická vzdálenost není nejdůležitějším faktorem.

### **Vliv ekologických faktorů na SM**

U pěvců jsme na mezidruhové úrovni nepozorovali významný vliv ekologických znaků a životních strategií na složení SM, které zahrnovaly i složení potravy [**Publikace A**]. V jiné

studii provedené na ptácích pozorovali rovněž pouze slabý efekt některých ekologických faktorů [25]. Zajímavé je, že u tropických pěvců byla pozorována korelace mezi potravou a SM, která ale nebyla pozorována u temperátních druhů **[Publikace B]**. Tento rozdíl mezi pěvci z tropů a z temperátu by mohl být důsledkem větší potravní specializace tropických pěvců [72]. Na rozdíl od ptačích studií je u savců ekologie hostitele, a zejména pak složení potravy, naprosto klíčová [21, 73, 74].

Na vnitrodruhové úrovni u vlaštovky obecné jsme pozorovali signifikantní, i když pouze slabou korelaci mezi složením SM a potravou **[Publikace E]**. V souhrnu tyto výsledky naznačují, že potrava vysvětluje určitou, i když relativně omezenou část variability složení SM u pěvců. Na rozdíl od ptáků byla u savců potrava často hlavním faktorem vysvětlujícím variabilitu SM [21, 73, 75].

### **Vliv fylogenetické příbuznosti a příslušnosti k druhu na SM**

Z našich výsledků vyplývá, že podstatně větší vliv než ekologie a geografie má na složení SM u temperátních pěvců jejich fylogenetická příbuznost **[Publikace A]**. Efekt fylogeneze se potvrdil i v datovém souboru rozšířenému o tropické pěvce **[Publikace B]**. Při analýzách SM napříč obratlovci je potrava důležitá společně s fylogenezí [74, 76].

Jako první jsme se také pokusili posoudit potenciální roli SM při speciaci u ptáků. Konkrétně jsme srovnávali SM ze sympatrie a alopatrie u dvou blízce příbuzných druhů slavíků (slavíka tmavého a obecného), kteří příležitostně v sekundární kontaktní zóně hybridizují. Souvislost SM při tvorbě reprodukční bariéry zde nebyla prokázána **[Publikace C]**.

### **Změny SM během ontogeneze a stabilita SM v čase**

U lidí probíhají dynamické změny SM během ontogeneze, které jsou spojené zejména s kojením a jeho ukončením [77, 78]. Překvapivě jsme u vlaštovky obecné nenalezli významné změny SM asociované se stářím mlád'at **[Publikace D]**. Byl zde pozorován slabý nárůst alfa diverzity se stářím mlád'at, ale taxonomické složení se signifikantně neměnilo.

Na druhou stranu jsme objevili signifikantně rozdílné složení SM mezi mlád'aty a dospělci **[Publikace D]**, které nemohou být vysvětleny rozdíly v potravě, která je v naší populaci u mlád'at a rodičů stejná **[Publikace E]**. Rozdíly u vlaštovky obecné mezi mlád'aty v hnízdě a dospělci byly pozorovány také v italské populaci [79], avšak SM mlád'at vylétlých z hnízda se již nelišila od SM dospělců [80]. Tyto výsledky naznačují, že SM mlád'at se pravděpodobně mění s vylétnutím mlád'at z hnízda a poté se více podobá SM dospělců.

Dále jsme u mláďat i dospělců vlaštovky obecné objevili sice signifikantní, i když s velmi malým efektem, stabilitu složení SM v čase v rámci jedince [**Publikace D**]. V případě dospělců vlaštovky obecné je sice celkové složení SM v čase málo stabilní, nicméně část SM se vyznačuje značnou stabilitou. Na rozdíl od pěvců je SM u lidí v dospělosti stabilní i v horizontu několika let [81]. Naproti tomu u volně žijících savců je podobně jako u pěvců u dospělců obvykle pozorováno kolísání mikrobioty v čase [71, 82, 83], i když existují i výjimky [84].

## Závěr

Většina variability SM u pěvců zůstává stále nevysvětlená i přes celou řadu výše popsaných a testovaných parametrů [**Publikace A-I**]. Stejně tak tomu je i v případě ostatních publikací uskutečněných na ptácích [42, 79, 85]. Podle komparativní studie, která zahrnuje savce i ptáky, fylogeneze u ptáků vysvětluje méně variability než fylogeneze u savců a zároveň je variabilita složení SM u ptáků vyšší než u savců [76]. Zajímavé je pozorování konvergence mezi ptačí a netopýří SM [76], která by mohla být spojena s adaptacemi k letu. Létající ptáci i savci mají například redukovanou délku střeva, kratší retenční dobu, po kterou prochází potrava trávicím traktem a mají lepší střevní paracelulární absorpci (což znamená, že více živin je vstřebáváno hostitelem, a tedy to může snižovat důležitost symbiotických bakterií, [27]). Toto je jen část z možných vysvětlení této konvergence a další výzkum je žádoucí. Velká variabilita ve složení SM ptáků v porovnání se savci je pozorovatelná i v našich publikacích, kde došlo ke stejnému nebo velmi podobnému laboratornímu zpracování vzorků [**Publikace A-I**] (savci viz [31, 86–88]). Velké množství nevysvětlené variability společně s velkou variabilitou mezi jedinci a poměrně slabou stabilitou SM u ptáků by mohlo být způsobeno výraznou fluktuací mikrobioty, která trávicím traktem pouze prochází pravděpodobně společně s potravou, ale trávicí trakt trvale neosídluje, což potvrzuje i přítomnost symbiotických bakterií hmyzu detekovaných ve SM různých pěvců [**Publikace A-I**]. Zda bakterie trávicím traktem pouze prochází nebo jsou-li v něm aktivní, nelze používanými metodami zatím odlišit. Z našich dat se zdá, že v trávicím traktu je část SM stabilní, a proto by se měl další výzkum zaměřit na studium souvislosti mezi fenotypem hostitele a těmito konkrétními bakteriálními taxony. Zároveň je třeba se zaměřit na stabilitu SM i u dalších skupin ptáků, aby se potvrdilo, zda námi pozorované bakteriální taxony jsou stabilní napříč ptáky/pěvci. Každopádně lze konstatovat, že výsledky studií realizovaných na savcích nejsou obecně aplikovatelné na ptáky a pravděpodobně ani ostatní obratlovce a je

tedy důležité věnovat se také studiu složení SM u dalších skupin obratlovců. Navíc by se kromě studia bakterií mohl budoucí výzkum věnovat více i jiným složkám mikrobioty jako jsou houby, viry a jejich vzájemným interakcím.

# Introduction

In terms of cell number, the community of symbiotic bacteria resident in a host's gastrointestinal tract may be comparable to, or even exceed, the total number of cells of the host itself [1]. At the same time, the number of genes contained in this community may be up to two orders of magnitude higher than that in the host's genome [2]. It is now well known that interactions between a host and its gut microbiota (GM) provide important benefits at many levels. For example, a host's GM helps it digest otherwise indigestible dietary components [3], synthesise some vitamins (see review in [4]), ensures the proper development and functioning of the digestive tract [5], helps protect against pathogens (see review in [6]), stimulates and supports the development of the host's immune system and influences its specificity (see review in [7]) and contributes to the host's brain functioning and behaviour [8]. On the other hand, GMs that deviate from 'normal' can be detrimental, or even fatal, to the host ([9, 10]; also see the review of [11]). It is not surprising, therefore, that genetic, physiological, morphological and behavioural traits have evolved that allow the host to optimise GM composition to its advantage [12–14]. Such interactions between the host and its GM can also play an important role in many microevolutionary processes, including the evolution of partner choice [15, 16], social behaviour [12, 17] and speciation [9, 10, 18].

Most of the knowledge gained on GM to date has been based on laboratory studies of mammals (including humans); however, the GM of both laboratory and captive animals differs from that of wild animals [19, 20]. As such, research based on captive animals will not necessarily reflect natural interactions between a host and its GM that will have developed through co-evolution. Within wild vertebrates, the most commonly studied hosts have been mammals. Firmicutes and Bacteroidetes frequently represent the dominant GM bacterial strains in mammals [21, 22]. GM composition in other, lesser studied, vertebrates, however, appears to be more variable [23–26].

In this work, I focus on wild birds (class Aves), a little studied group regarding GM, and specifically on the order Passeriformes (songbirds). Songbirds are the most numerous bird order, comprising about 6,000 species, which is about 60% of all known bird species. They are monophyletic and separated from other birds around 47 million years ago [29]. Despite their relatively recent diversification, songbirds are a highly diverse group, especially in terms of their ecology and life-histories. For these reasons, they are considered an important model group in evolutionary and ecological studies.

While most mammals have separate digestive, excretory and reproductive systems, all these systems flow into the cloaca in birds and thus are interconnected. Furthermore, birds show significant differences regarding the physiology of food digestion and nutrient absorption [27, 28]. For example, developed caeca play an important role in the bacterial fermentation of food; however, in contrast to many other bird taxa, songbirds have only rudimentary caeca. As this work focuses on wild songbirds, it was rarely possible to obtain samples from different parts of a bird's intestine; hence, I focus mainly on microbiota in the faeces. Collection of faeces is a commonly used, non-invasive method for analysing GM, particularly in relation to the large intestine [30, 31]. Furthermore, my own unpublished data indicate that bird faecal microbiota provide a faithful reflection of the bird's GM (Schmiedová *et al.* unpublished results).

I focus mainly on the composition of wild songbird GM and factors that may affect its composition, both at the inter- and intraspecific level. The main factors affecting GM are likely to be the host's intrinsic regulatory mechanisms, especially genetically determined variability in the immune system [32, 33], and social contact, with bacteria being transmitted during copulation, during the feeding of young or during physical contact between individuals from the same colony or population, or even between different species [34–37]. Last, but not least, environmental factors, particularly diet and habitat, have also been shown to be important sources of GM variability [34, 38].

## Methods

The first publication included in this dissertation is based on the 454 sequencing platform, the most accessible at that time, while all other publications are based on the Illumina Miseq sequencing platform. Using Illumina Miseq, we sequence a pre-amplified region of the 16S rRNA gene commonly used in similar GM studies [25, 39].

## Aims

- I. To identify GM composition in songbirds and assess how it differs from that of other vertebrates, with particular emphasis on mammals [Publications A-I]**
- II. To assess songbird GM variability at the interspecies level, and the main factors that influence any such variability.** I used a large comparative dataset (319 samples, 51 species) of temperate zone (Czech Republic) songbirds to determine the extent to which GM variability affects host phylogeny, ecology (including life-history traits)

and geographic variation. **[Publication A]**. I then extended this dataset using samples from the tropical zone (Cameroon; 205 samples, 47 species) to compare GM between species from the two climatic zones. For the temperate population, I hypothesised that GM may be affected by migration. In addition, I directly compared the GM of two trans-Saharan migrant species in the tropical zone during the dry season (wintering grounds) and in the temperate zone during the breeding season (breeding grounds) **[Publication B]**. I also tested the relationship between reproductive barrier and interspecific GM divergence in common nightingales (*Luscinia megarhynchos*) and thrush nightingales (*L. luscinia*) **[Publication C]**.

- III. To assess the main factors influencing intraspecific GM variability.** I compared the GM of different barn swallow (*Hirundo rustica*) populations in different localities and between different nesting seasons **[Publication D]**. Using the same species, I also assessed whether GM is affected by an individual's diet **[Publication E]**. By stimulating the inflammatory response in nestlings, I also tested whether there was a connection between GM and the immune system **[Publication F]**.
- IV. To assess the potential effect of social transmission on GM similarity between individuals.** Using the barn swallow intraspecific dataset, I assessed cloacal microbiota similarity between breeding pairs **[Publication G]** and the similarity of faecal microbiota between nestlings and their social parents and between nestlings coming from the same nest **[Publication D]**.
- V. To assess whether songbird GM is resistant to environmental change and/or remains stable over time.** I assessed whether songbird GM changed over time by repeatedly sampling barn swallow nestlings and adults **[Publication D]**. I also studied the influence of the nest environment on GM composition in common cuckoo (*Cuculus canorus*) nestlings raised by two different species of reed warbler (the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus* and the Eurasian reed warbler *A. scirpaceus*) as social parents **[Publication H]**.
- VI. To assess whether songbird GM changes during ontogeny.** Using the barn swallow dataset, I compared adult and nestling GM and ascertained any changes in GM with nestling age **[Publication D]**.
- VII. To identify potential differences in GM across the digestive tract.** I compared GM in three different parts of the small intestine of common and thrush nightingales



[**Publication C**], the proximal (oral swab) and distal (faeces) parts of the great tit (*Parus major*) digestive tract [**Publication I**], and the faeces and deterrent secretion (which is putatively produced in caeca) in the common cuckoo [**Publication H**].

## Papers included in the dissertation

**Publication A:** Kropáčková, L., Těšický, M., Albrecht, T., Kubovčíak, J., Čížková, D., Tomášek, O., Martin, F.-P.J., Bobek, L., Králová, T., Procházka, P. & Kreisinger, J. (2017) Co-diversification of gastrointestinal microbiota and phylogeny in passerines is not explained by ecological divergence. *Mol Ecol* 26, 5292–5304. doi:10.1111/mec.14144

**Publication B:** Schmiedová, L., Kreisinger, J., Kubovčíak, J., Těšický, M., Martin, F.-P.J., Tomášek, O., Kauzálková, T. Sedláček, O. & Albrecht, T. Gut microbiota differentiation between tropical and temperate passerine birds and due to migration strategy. *Draft before submission to The ISME Journal*

**Publication C:** Sottas, C., Schmiedová, L., Kreisinger, J., Albrecht, T., Reif, J., Osiejuk, T. S., & Reifová, R. (2021). Gut microbiota in two recently diverged passerine species: Evaluating the effects of species identity, habitat use and geographic distance. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 41. doi: 10.1186/s12862-021-01773-1

**Publication D:** Kreisinger, J., Kropáčková, L., Petrželková, A., Adámková, M., Tomášek, O., Martin, J.-F., Michálková, R. & Albrecht, T. (2017). Temporal stability and the effect of transgenerational transfer on faecal microbiota structure in a long distance migratory bird. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00050

**Publication E:** Schmiedová, L., Tomášek, O., Pinkasová, H., Albrecht, T. & Kreisinger, J. Variation in diet composition and its relation to gut microbiota in a passerine bird, the barn swallow. *In review in Scientific Reports*

**Publication F:** Kreisinger, J., Schmiedová, L., Petrželková, A., Michálková, R., Tomášek, O., Martin, J.-F., & Albrecht, T. (2018) Fecal microbiota associated with phytohaemagglutinin-induced immune response in nestlings of a passerine bird. *Ecology and Evolution*, 8(19), 9793-9802. doi: 10.1002/ece3.4454

**Publication G:** Kreisinger, J., Čížková, D., Kropáčková, L., & Albrecht, T. (2015). Cloacal microbiome structure in a long-distance migratory bird assessed using deep 16sRNA pyrosequencing. *PLoS ONE* 10, e0137401. doi:10.1371/journal.pone.0137401

**Publication H: Schmiedová, L.,** Kreisinger, J., Požgayová, M., Honza, M., Martin, J.-F. & Procházka, P. (2020) Gut microbiota in a host-brood parasite system: insights from common cuckoos raised by two warbler species. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9). doi: 10.1093/femsec/fiaa143

**Publication I: Kropáčková, L.,** Pechmanová, H., Vinkler, M., Svobodová, J., Velova, H., Těšický, M., Martin, F.-P.J. & Kreisinger, J. (2017) Variation between the oral and faecal microbiota in a free-living passerine bird, the great tit (*Parus major*). *PLOS ONE* 12, e0179945. doi:10.1371/journal.pone.0179945

## Results and Discussion

The bacterial phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Tenericutes, Bacteroidetes and Chlamydia tend to predominate in songbird GM [**Publication A**], with similar results being obtained in most of my studies [**Publications A-I**]. In cuckoo nestlings, however, GM composition differed slightly, mainly due to a higher incidence of the phylum Bacteroidetes [**Publication H**]. In general, the results for GM composition in songbirds and cuckoos were consistent with previous studies of bird GM [25, 40–42]. Overall, we confirmed that songbird GM differs greatly from that of the far more studied mammals [21]. The bacterial phyla Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes are also found to a greater or lesser degree in other vertebrate groups, such as reptiles [43–45], amphibians [46–48] and fish [49–51].

### Influence of climatic zone on GM

Across a wide range of taxa, a decline in diversity has been described with increasing latitude ([52]; but see also [53]), including that of parasites and pathogens associated with animal hosts [54]. Up until now, GM Diversity has been little studied, with almost all relevant data coming from human populations ([38, 55–57], but see also [58]). While greater alpha diversity has been observed in humans in the tropics [38, 56], we failed to find support for greater alpha diversity in tropical songbirds when compared with temperate birds [**Publication B**]. We observed high variability in GM composition between the dry and rainy seasons in tropical songbirds. Temperate songbird GM showed greater divergence from GM of individuals from the tropical rainy season than in comparison with GM of individuals from the tropical dry season [**Publication B**].

## **Influence of migration on GM composition**

For temperate songbirds, we were particularly interested in differences in GM composition between species that migrated during winter to tropical Africa (trans-Saharan migrant) and those characterised as resident (staying in one place all year round) or those that only migrated over a short distance (maximum to the Mediterranean). As birds would be exposed to different environments during migration, I hypothesised that there would be higher alpha diversity in trans-Saharan migrants than in other temperate species; however, this prediction was not confirmed [**Publication B**]. Based on the results of previous studies [59–61], we also hypothesised that there would be no difference in GM composition between trans-Saharan migrants and residents with short-distance migrants during the nesting season. Based on the data obtained, however, we observed differences in GM composition between the two groups. At the same time, trans-Saharan migrant GM composition also differed from that of tropical species in both seasons [**Publication B**]. Furthermore, in two trans-Saharan migrant species, the garden warbler (*Sylvia borin*) and willow warbler (*Phylloscopus trochilus*), GM composition differed significantly between breeding and wintering grounds, more-or-less reflecting changes in GM composition observed between other temperate songbirds and tropical songbirds in the dry season [**Publication B**]. Previous studies have also detected migration-related GM fluctuations [59–62].

## **Influence of geographical distance on GM**

Our results for the temperate songbird dataset indicate a degree of correlation between differences in GM composition and geographical distance between localities [**Publication A**]. Similarly, at the intraspecific level, we found weak but significant differences in GM between barn swallow populations in different localities [**Publication D**]. Previous studies have also indicated that spatial segregation plays a role in bird GM composition, though its significance varies between studies. While some studies found that spatial segregation only plays a minor role in GM composition (as in our own study) [25, 63–65], others consider spatial segregation to be the most important factor tested [42, 66, 67]. Inconsistent results have also been reported in mammals, with spatial segregation an important factor in most publications [e.g. 68–70] but no effect of segregation observed in the study of Baxter et al. [71]. Our own results indicate that, even with a relatively large distance between populations from the tropics and the temperate zone (ca. 5000 km), GM may still overlap to some extent [**Publication B**],

suggesting that geographical distance is unlikely to be the most important factor affecting GM.

### **Influence of ecological factors on GM**

We found no significant effect of ecological traits or life-histories (including diet) on songbird GM composition at the interspecies level [**Publication A**]. Hird et al. [25], however, observed a weak effect of some ecological factors on GM. Interestingly, we observed a correlation between diet and GM in tropical songbirds but not temperate species [**Publication B**]. This difference between tropical and temperate songbirds could be due to greater dietary specialisation in tropical songbirds [72]. In contrast to avian studies, host ecology, and especially diet composition, has been found to be crucial in mammals [21, 73, 74].

In barn swallows, we observed a weak, though significant, correlation between the GM composition and diet at the intraspecific level [**Publication E**]. Taken together, these results suggest that, while diet is often a major factor explaining GM variability in mammals [21, 73, 75], it has a low impact on songbird GM composition.

### **Influence of phylogenetic relationships and species affiliation on GM**

Our results indicated that phylogenetic relationships had a significantly greater influence on the GM composition of temperate songbirds than ecology or geography [**Publication A**]. The effect of phylogeny was also confirmed in the dataset that included tropical songbirds [**Publication B**]. These results concur with previous studies that recognised phylogeny (alongside diet) as an important factor affecting GM composition across vertebrates [74, 76].

Our study was the first to assess the potential role of GM in bird speciation. Specifically, we compared the GM of two closely related species (common and thrush nightingales) from sympatric and allopatric populations that occasionally hybridise in their secondary contact zone. In doing so, we found no evidence that GM was connected with the formation of a reproductive barrier [**Publication C**].

### **Changes in GM during ontogenesis and GM stability over time**

Human GM undergo dynamic changes during ontogenesis, mainly associated with breastfeeding and its termination [77, 78]. Surprisingly, however, we observed no significant changes in GM associated with age in barn swallow nestlings [**Publication D**], with only a slight increase in alpha diversity with age and no significant change in taxonomic composition. There was, however, a significant difference in GM composition between

nestlings and adults [**Publication D**] that was not explained by any difference in diet, which was the same in nestlings and adults in our population [**Publication E**]. Differences in barn swallow nestling and adult GM were also observed in an Italian population [79], with the differences no longer being observable once the birds reached the fledgling stage [80].

We observed significant stability (though with low effect size) in individual GM composition over time in both adult and nestling barn swallows [**Publication D**]. Overall GM composition in adults was relatively unstable over time, though part of the GM did show considerable stability. With just a few exceptions [see 84], GM fluctuations over time are commonly observed in adult wild mammals [71, 82, 83]. In adult humans, however, the GM usually remains stable over several years [81].

## Conclusions

While a relatively wide range of parameters have been tested in both these [**Publications A-I**] and other bird studies [e.g. 42, 79, 85], most of the GM variability observed in songbirds remains unexplained. In a comparative study involving both mammals and birds, GM variability was higher in birds than mammals, yet phylogeny explained less of the variability in birds than it did in mammals [76]. The same authors also noted an interesting convergence between avian and bat GM [76], possibly associated with the adaptations for flight. For example, both birds and bats have a reduced intestinal length, shorter retention time in the digestive tract and better intestinal paracellular absorption, meaning that more nutrients are absorbed by the host, thus reducing the importance of symbiotic bacteria [27]. However, this only offers a partial explanation for the convergence and further research is desirable. In the studies outlined here, we observed higher variability in bird GM than in mammals, despite the same, or very similar, laboratory processing methods being used [**Publications A-I**] (for mammals see [31, 86–88]). The high amount of unexplained variability, high inter-individual variability and relatively poor GM stability could be caused by significant fluctuations in microbiota that pass through the digestive tract together with the bird's food without permanently colonising the digestive tract. Indeed, strong evidence for this is provided by the finding of symbiotic insect bacteria in the GM of various songbirds [**Publications A-I**]. Whether these bacteria pass straight through or play an active role while they are within the digestive tract could not be confirmed by the methods used. Nevertheless, our data shows that a portion of the observed GM does remain stable within the digestive tract, and we suggest that future research should focus on the relationship between host phenotype and these

specific bacterial taxa. At the same time, there is a need for further studies on GM stability in other bird groups to confirm whether the stable bacterial taxa we observed remain stable across all birds/songbirds. In light of our results, it is clear that studies performed on mammals are not generally applicable to birds (and probably other vertebrates), emphasising the importance of further GM composition studies on other vertebrate groups. Furthermore, additional studies are required on the roles and interactions of other microbiota components, such as fungi and viruses.

## Použitá literatura/References

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* 2016; **164**: 337–340.
2. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; **464**: 59–65.
3. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018; **361**.
4. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017; **474**: 1823–1836.
5. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS ONE* 2011; **6**: e17996.
6. Ubeda C, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Leiner I, Equinda M, et al. Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *J Exp Med* 2012; **209**: 1445–1456.
7. Ost KS, Round JL. Communication between the microbiota and mammalian immunity. *Annu Rev Microbiol* 2018; **72**: 399–422.
8. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* 2018; **1693**: 128–133.
9. Brucker RM, Bordenstein SR. The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science* 2013; **341**: 667–669.
10. Wang J, Kalyan S, Steck N, Turner LM, Harr B, Künzel S, et al. Analysis of intestinal microbiota in hybrid house mice reveals evolutionary divergence in a vertebrate hologenome. *Nat Commun* 2015; **6**: 6440.
11. Das B, Nair GB. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *J Biosci* 2019; **44**: 117.
12. Lombardo MP. Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behav Ecol Sociobiol* 2008; **62**: 479–497.
13. Ohbayashi T, Futahashi R, Terashima M, Barrière Q, Lamouche F, Takeshita K, et al. Comparative cytology, physiology and transcriptomics of *Burkholderia insecticola* in symbiosis with the bean bug *Riptortus pedestris* and in culture. *ISME J* 2019; **13**: 1469–1483.
14. Suzuki TA, Phifer-Rixey M, Mack KL, Sheehan MJ, Lin D, Bi K, et al. Host genetic determinants of the gut microbiota of wild mice. *Molecular Ecology* 2019; **28**: 3197–3207.
15. Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 2010; **107**: 20051–20056.

16. Beltran-Bech S, Richard F-J. Impact of infection on mate choice. *Anim Behav* 2014; **90**: 159–170.
17. Archie EA, Tung J. Social behavior and the microbiome. *Curr Opin Behav Sci* 2015; **6**: 28–34.
18. Brucker RM, Bordenstein SR. Speciation by symbiosis. *Trends Ecol Evol* 2012; **27**: 443–451.
19. Xenoulis PG, Gray PL, Brightsmith D, Palculict B, Hoppes S, Steiner JM, et al. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Vet Microbiol* 2010; **146**: 320–325.
20. Kreisinger J, Čížková D, Vohánka J, Piálek J. Gastrointestinal microbiota of wild and inbred individuals of two house mouse subspecies assessed using high-throughput parallel pyrosequencing. *Mol Ecol* 2014; **23**: 5048–5060.
21. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; **320**: 1647–1651.
22. Nishida AH, Ochman H. Rates of gut microbiome divergence in mammals. *Mol Ecol* 2018; **27**: 1884–1897.
23. Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight R, et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol Ecol* 2012; **21**: 3363–3378.
24. Waite DW, Taylor MW. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Front Microbiol* 2014; **5**: 223.
25. Hird SM, Sánchez C, Carstens BC, Brumfield RT. Comparative gut microbiota of 59 neotropical bird species. *Front Microbiol* 2015; 1403.
26. Kohl KD, Brun A, Magallanes M, Brinkerhoff J, Laspiur A, Acosta JC, et al. Gut microbial ecology of lizards: insights into diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions and transmission. *Mol Ecol* 2017; **26**: 1175–1189.
27. Caviedes-Vidal E, McWhorter TJ, Lavin SR, Chediack JG, Tracy CR, Karasov WH. The digestive adaptation of flying vertebrates: high intestinal paracellular absorption compensates for smaller guts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 19132–19137.
28. McWhorter TJ, Caviedes-Vidal E, Karasov WH. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009; **84**: 533–565.
29. Oliveros CH, Field DJ, Ksepka DT, Barker FK, Aleixo A, Andersen MJ, et al. Earth history and the passerine superradiation. *PNAS* 2019; **116**: 7916–7925.
30. Berlow M, Kohl KD, Derryberry EP. Evaluation of non-lethal gut microbiome sampling methods in a passerine bird. *Ibis* 2020; **162**: 911–923.
31. Čížková D, Ďureje Ľ, Piálek J, Kreisinger J. Experimental validation of small mammal gut microbiota sampling from faeces and from the caecum after death. *Heredity* 2021; **127**: 141–150.
32. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *PNAS* 2010; **107**: 18933–18938.
33. Bolnick DI, Snowberg LK, Caporaso JG, Lauber C, Knight R, Stutz WE. Major Histocompatibility Complex class IIb polymorphism influences gut microbiota composition and diversity. *Mol Ecol* 2014; **23**: 4831–4845.
34. Lucas FS, Heeb P. Environmental factors shape cloacal bacterial assemblages in great tit *Parus major* and blue tit *P. caeruleus* nestlings. *J Avian Biol* 2005; **36**: 510–516.
35. White J, Mirleau P, Danchin E, Mulard H, Hatch SA, Heeb P, et al. Sexually transmitted bacteria affect female cloacal assemblages in a wild bird. *Ecol Lett* 2010; **13**: 1515–1524.
36. Kulkarni S, Heeb P. Social and sexual behaviours aid transmission of bacteria in birds. *Behav Processes* 2007; **74**: 88–92.



37. Hernandez J, Escallón C, Medina D, Vernasco BJ, Walke JB, Belden LK, et al. Cloacal bacterial communities of tree swallows (*Tachycineta bicolor*): Similarity within a population, but not between pair-bonded social partners. *PLOS ONE* 2020; **15**: e0228982.
38. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 14691–14696.
39. Suzuki TA, Nachman MW. Spatial heterogeneity of gut microbial composition along the gastrointestinal tract in natural populations of house mice. *PLOS ONE* 2016; **11**: e0163720.
40. Bodawatta KH, Sam K, Jønsson KA, Poulsen M. Comparative analyses of the digestive tract microbiota of New Guinean passerine birds. *Front Microbiol* 2018; **9**.
41. Grond K, Sandercock BK, Jumpponen A, Zeglin LH. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *J Avian Biol* 2018; **49**: e01788.
42. Grond K, Santo Domingo JW, Lanctot RB, Jumpponen A, Bentzen RL, Boldenow ML, et al. Composition and drivers of gut microbial communities in Arctic-breeding shorebirds. *Front Microbiol* 2019; **10**.
43. Arizza V, Vecchioni L, Caracappa S, Sciruba G, Berlinghieri F, Gentile A, et al. New insights into the gut microbiome in loggerhead sea turtles *Caretta caretta* stranded on the Mediterranean coast. *PLoS One* 2019; **14**.
44. Qin Z, Wang S, Guo D, Zhu J, Chen H, Bai L, et al. Comparative analysis of intestinal bacteria among venom secretion and non-secretion snakes. *Sci Rep* 2019; **9**: 1–9.
45. Tang K-Y, Wang Z-W, Wan Q-H, Fang S-G. Metagenomics reveals seasonal functional adaptation of the gut microbiome to host feeding and fasting in the Chinese alligator. *Front Microbiol* 2019; **10**.
46. Shu Y, Hong P, Yu Q, Wang G, Zhang J, Donde OO, et al. High-throughput sequencing analysis reveals correlations between host phylogeny, gut microbiota, and habitat of wild frogs from a mountainous area. *COPE* 2019; **107**: 131–137.
47. Zhang M, Gaughan S, Chang Q, Chen H, Lu G, Wang X, et al. Age-related changes in the gut microbiota of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *MicrobiologyOpen* 2019; **8**: e00778.
48. Xu LL, Chen H, Zhang M, Zhu W, Chang Q, Lu G, et al. Changes in the community structure of the symbiotic microbes of wild amphibians from the eastern edge of the Tibetan Plateau. *Microbiologyopen* 2020; **9**.
49. Singh A, Faber-Hammond JJ, O'Rourke CF, Renn SCP. Gut microbial diversity increases with social rank in the African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Amim Behav* 2019; **152**: 79–91.
50. Dulski T, Kozłowski K, Ciesielski S. Habitat and seasonality shape the structure of tench (*Tinca tinca* L.) gut microbiome. *Sci Rep* 2020; **10**: 1–11.
51. Gao Y-M, Zou K-S, Zhou L, Huang X-D, Li Y-Y, Gao X-Y, et al. Deep insights into gut microbiota in four carnivorous coral reef fishes from the South China Sea. *Microorganisms* 2020; **8**: 426.
52. McCoy ED, Connor EF. Latitudinal gradients in the species diversity of North American mammals. *Evolution* 1980; **34**: 193–203.
53. Owen DF, Owen J. Species diversity in temperate and tropical Ichneumonidae. *Nature* 1974; **249**: 583–584.
54. Guernier V, Hochberg ME, Guégan J-F. Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLOS Biology* 2004; **2**: e141.
55. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; **486**: 222–227.

56. Lee SC, Tang MS, Lim YAL, Choy SH, Kurtz ZD, Cox LM, et al. Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLOS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e2880.
57. Suzuki TA, Worobey M. Geographical variation of human gut microbial composition. *Biol Lett* 2014; **10**: 20131037.
58. Suzuki TA, Martins FM, Phifer-Rixey M, Nachman MW. The gut microbiota and Bergmann's rule in wild house mice. *Mol Ecol* 2020; **29**: 2300–2311.
59. Lewis WB, Moore FR, Wang S. Changes in gut microbiota of migratory passerines during stopover after crossing an ecological barrier. *The Auk* 2016; **134**: 137–145.
60. Lewis WB, Moore FR, Wang S. Characterization of the gut microbiota of migratory passerines during stopover along the northern coast of the Gulf of Mexico. *J Avian Biol* 2016; **47**: 659–668.
61. Zhang F, Xiang X, Dong Y, Yan S, Song Y, Zhou L. Significant differences in the gut bacterial communities of Hooded Crane (*Grus monacha*) in different seasons at a stopover site on the flyway. *Animals* 2020; **10**: 701.
62. Wu Y, Yang Y, Cao L, Yin H, Xu M, Wang Z, et al. Habitat environments impacted the gut microbiome of long-distance migratory swan geese but central species conserved. *Sci Rep* 2018; **8**: 1–11.
63. Loo WT, Dudaniec RY, Kleindorfer S, Cavanaugh CM. An inter-island comparison of Darwin's finches reveals the impact of habitat, host phylogeny, and island on the gut microbiome. *PLOS ONE* 2019; **14**: e0226432.
64. Capunitan DC, Johnson O, Terrill RS, Hird SM. Evolutionary signal in the gut microbiomes of 74 bird species from Equatorial Guinea. *Mol Ecol* 2020; **29**: 829–847.
65. Bodawatta KH, Koane B, Maiah G, Sam K, Poulsen M, Jønsson KA. Species-specific but not phyllosymbiotic gut microbiomes of New Guinean passerine birds are shaped by diet and flight-associated gut modifications. *Proc Royal Soc B* 2021; **288**: 20210446.
66. Hird SM, Carstens BC, Cardiff SW, Dittmann DL, Brumfield RT. Sampling locality is more detectable than taxonomy or ecology in the gut microbiota of the brood-parasitic Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). *PeerJ* 2014; **2**: e321.
67. Gillingham MAF, Béchet A, Cézilly F, Wilhelm K, Rendón-Martos M, Borghesi F, et al. Offspring microbiomes differ across breeding sites in a panmictic species. *Front Microbiol* 2019; **10**.
68. Grieneisen LE, Charpentier MJE, Alberts SC, Blekhman R, Bradburd G, Tung J, et al. Genes, geology and germs: gut microbiota across a primate hybrid zone are explained by site soil properties, not host species. *Proc Royal Soc B* 2019; **286**: 20190431.
69. Gaona O, Cerqueda-García D, Moya A, Neri-Barrios X, Falcón LI. Geographical separation and physiology drive differentiation of microbial communities of two discrete populations of the bat *Leptonycteris yerbabuenae*. *Microbiologyopen* 2020; **9**: 1113–1127.
70. Grond K, Bell KC, Demboski JR, Santos M, Sullivan JM, Hird SM. No evidence for phyllosymbiosis in western chipmunk species. *FEMS Microbiol Ecol* 2020; **96**.
71. Baxter NT, Wan JJ, Schubert AM, Jenior ML, Myers P, Schloss PD. Intra- and interindividual variations mask interspecies variation in the microbiota of sympatric *Peromyscus* populations. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 396–404.
72. Wheelwright NT. Fruit-eating birds and bird-dispersed plants in the tropics and temperate zone. *Trends Ecol Evol* 1988; **3**: 270–274.
73. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011; **332**: 970–974.

74. Youngblut ND, Reischer GH, Walters W, Schuster N, Walzer C, Stalder G, et al. Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nat Commun* 2019; **10**: 2200.
75. Gomez A, Sharma AK, Mallott EK, Petrzalkova KJ, Robinson CAJ, Yeoman CJ, et al. Plasticity in the human gut microbiome defies evolutionary constraints. *mSphere* 2019; **4**: e00271-19.
76. Song SJ, Sanders JG, Delsuc F, Metcalf J, Amato K, Taylor MW, et al. Comparative analyses of vertebrate gut microbiomes reveal convergence between birds and bats. *mBio* 2020; **11**.
77. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 2015; **17**: 690–703.
78. Stewart CJ, Ajami NJ, O’Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* 2018; **562**: 583–588.
79. Ambrosini R, Corti M, Franzetti A, Caprioli M, Rubolini D, Motta VM, et al. Cloacal microbiomes and ecology of individual barn swallows. *FEMS Microbiol Ecol* 2019; **95**.
80. Musitelli F, Ambrosini R, Rubolini D, Saino N, Franzetti A, Gandolfi I. Cloacal microbiota of barn swallows from Northern Italy. *Ethol Ecol Evol* 2018; **30**: 362–372.
81. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 2013; **341**: 1237439.
82. Avelo T, Laakkonen J, Jernvall J. Population- and individual-level dynamics of the intestinal microbiota of a small primate. *Appl Environ Microbiol* 2016; **82**: 3537–3545.
83. Ren T, Grieneisen LE, Alberts SC, Archie EA, Wu M. Development, diet, and dynamism: longitudinal and cross-sectional predictors of gut microbial communities in wild baboons. *Environ Microbiol* 2016; **18**: 1312–1325.
84. Stevenson TJ, Buck CL, Duddleston KN. Temporal dynamics of the cecal gut microbiota of juvenile arctic ground squirrels: a strong litter effect across the first active season. *Appl Environ Microbiol* 2014; **80**: 4260–4268.
85. Laviad-Shitrit S, Izhaki I, Lalar M, Halpern M. Comparative analysis of intestine microbiota of four wild waterbird species. *Front Microbiol* 2019; **10**.
86. Bendová B, Piálek J, Ďureje L, Schmiedová L, Čížková D, Martin J-F, et al. How being synanthropic affects the gut bacteriome and mycobiome: comparison of two mouse species with contrasting ecologies. *BMC Microbiology* 2020; **20**: 194.
87. Matějková T, Hájková P, Stopková R, Stanko M, Martin J-F, Kreisinger J, et al. Oral and vaginal microbiota in selected field mice of the genus *Apodemus*: a wild population study. *Sci Rep* 2020; **10**: 13246.
88. Moudra A, Niederlova V, Novotny J, Schmiedova L, Kubovciak J, Matejkova T, et al. Phenotypic and Clonal Stability of Antigen-Inexperienced Memory-like T Cells across the Genetic Background, Hygienic Status, and Aging. *J Immunol* 2021; **206**: 2109–2121.

# Curriculum vitae

## **Mgr. Lucie Schmiedová (Kropáčková)**

**Born:** 2. March, 1988, Prague, Czech Republic

**Research ID:** S-3351-2017

**ORCID ID:** <https://orcid.org/0000-0003-2180-5281>

[https://www.researchgate.net/profile/Lucie\\_Schmiedova](https://www.researchgate.net/profile/Lucie_Schmiedova)

## **Education**

Since 2012 doctoral study of Zoology, Faculty of science, Charles University,

Thesis: Ecological aspects affecting microbiota in the digestive tract of birds (Supervisor: J. Kreisinger)

2010 – 2012 master's study of Zoology, Faculty of science, Charles University,

Diploma thesis 2012: Parental conflicts and speciation in the house mouse (Supervisor: R. Reifová)

2007- 2010 bachelor's study of Biology, Faculty of science, Charles University,

Bachelor thesis 2010: Genetic conflicts and speciation (Supervisor: R. Reifová)

## **Awards**

2017 - “Vakovlk junior” the award for the best doctoral student at the Department of Zoology, Charles university

2016 - 3. best poster on Zoology days in České Budějovice

## **Professional career**

Since 2019 Research assistant, Zoology Department, Faculty of science, Charles University (part time job)

2017 2021 Research assistant, Institute of Vertebrate Biology, Czech Academy of Science (part time job)

2013-2016 Research assistant, Zoology Department, Faculty of science, Charles University (part time job)

## **Research skills and interests**

Interested in evolution and ecology of gastrointestinal microbiota in vertebrates

Experience with wet lab genetic methods (DNA extraction, PCR, qPCR, gel electrophoresis, ARISA, Illumina MiSeq sequencing etc) and analyses of microbial 16S rRNA sequencing data (bioinformatic and statistic).

Teaching practica: „Genetické metody v zoologii“, „Zoologie obratlovců“, „Morfologie živočichů“

### **Licences**

Licence for animal-handling and animal experiment planning (since 2012, extended 2014, 2021)

### **Grants**

Principal investigator of a project funded by Grant Agency of Charles University (#281315) “Effect of variability in the composition of gastrointestinal microbiota in barn swallow on of the host physiology and fitness” (2015-2017)

Co-investigator on two other projects funded by Grant Agency of Charles University: #1438417 and #646217

Co-investigator on two project funded by the Czech Science Foundation: GAČR 18-17796Y and GAČR 19-20152Y

Cooperated on four other grants funded by the Czech Science Foundation

### **Conferences and workshops**

12 conferences contributions

Poster: **Zoologické dny** Olomouc 2012, Czech Republic; **Central European Meeting on Genes, Gene Expression, and Behavior** Nové Hradky 2012, Czech Republic; **Central European Meeting on Genes, Gene Expression, and Behavior** Nové hradky 2014, Czech Republic; **Zoologické dny** Brno 2015, Czech Republic; **Zoologické dny** České Budějovice 2016, Czech Republic; **British Ecological Society** Annual Meeting Liverpool 2016, Great Britain; **Zoologické dny** Brno 2017, Czech Republic; **European Ornithologists Union** Conference Cluj Napoca 2019, Romania

Presentation: **European Ornithologists Union** Conference Badajoz 2015, Spain, **European Ornithologists Union** Conference Turku 2017, Finland; **Zoologické dny** Praha 2018, Czech Republic; **Zoologické dny** Brno 2019, Czech Republic

Workshop on next generation sequencing methods in Nové hradky 2014, Czech Republic

Foreign research visit for the purpose of libraries preparation for next-generation Illumina Miseq sequencing: Jean-Francois Martin; Montpellier-SupAgro, UMR CBGP, Montferrier-sur-Lez, France (1 week, 2018):

### **Publications**

11 publications, 136 citations, H index = 4

### ***Papers included in the dissertation***

**Kropáčková, L.,** Těšický, M., Albrecht, T., Kubovčíak, J., Čížková, D., Tomášek, O., Martin, F.-P.J., Bobek, L., Králová, T., Procházka, P. & Kreisinger, J. (2017) Co-diversification of gastrointestinal microbiota and phylogeny in passerines is not explained by ecological divergence. *Mol Ecol* 26, 5292–5304. doi:10.1111/mec.14144 **[Publikace A]**

**Schmiedová, L.,** Kreisinger, J., Kubovčíak, J., Těšický, M., Martin, F.-P.J., Tomášek, O., Kauzálová, T. Sedláček, O. & Albrecht, T. Gut microbiota differentiation between tropical and temperate passerine birds and due to migration strategy. *Draft before submission to The ISME Journal* **[Publikace B]**

Sottas, C., Schmiedová, L., Kreisinger, J., Albrecht, T., Reif, J., Osiejuk, T. S., & Reifová, R. (2021). Gut microbiota in two recently diverged passerine species: Evaluating the effects of species identity, habitat use and geographic distance. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 41. doi: 10.1186/s12862-021-01773-1 **[Publikace C]**

Kreisinger, J., **Kropáčková, L.,** Petrželková, A., Adámková, M., Tomášek, O., Martin, J.-F., Michálková, R. & Albrecht, T. (2017). Temporal stability and the effect of transgenerational transfer on faecal microbiota structure in a long distance migratory bird. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00050 **[Publikace D]**

**Schmiedová, L.,** Tomášek, O., Pinkasová, H., Albrecht, T. & Kreisinger, J. Variation in diet composition and its relation to gut microbiota in a passerine bird, the barn swallow. *In review in Scientific Reports* **[Publikace E]**

Kreisinger, J., **Schmiedová, L.,** Petrželková, A., Michálková, R., Tomášek, O., Martin, J.-F., & Albrecht, T. (2018) Fecal microbiota associated with phytohaemagglutinin-induced immune response in nestlings of a passerine bird. *Ecology and Evolution*, 8(19), 9793-9802. doi: 10.1002/ece3.4454 **[Publikace F]**

Kreisinger, J., Čížková, D., **Kropáčková, L.,** & Albrecht, T. (2015). Cloacal microbiome structure in a long-distance migratory bird assessed using deep 16sRNA pyrosequencing. *PLoS ONE* 10, e0137401. doi:10.1371/journal.pone.0137401 **[Publikace G]**

**Schmiedová, L.,** Kreisinger, J., Požgayová, M., Honza, M., Martin, J.-F. & Procházka, P. (2020) Gut microbiota in a host-brood parasite system: insights from common cuckoos raised by two warbler species. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9). doi: 10.1093/femsec/fiaa143 **[Publikace H]**



**Kropáčková, L.**, Pechmanová, H., Vinkler, M., Svobodová, J., Velova, H., Těšický, M., Martin, F.-P.J. & Kreisinger, J. (2017) Variation between the oral and faecal microbiota in a free-living passerine bird, the great tit (*Parus major*). *PLOS ONE* 12, e0179945. doi:10.1371/journal.pone.0179945 [**Publikace I**]

***Publications not included in the dissertation***

**Kropackova, L.**, Pialek, J., Gergelits, V., Forejt, J., and Reifova, R. (2015). Maternal-foetal genomic conflict and speciation: no evidence for hybrid placental dysplasia in crosses between two house mouse subspecies. *J. Evol. Biol.* 28, 688–698. doi:10.1111/jeb.12602.

Bendová, B., Piálek, J., Ďureje, L., **Schmiedová, L.**, Čížková, D., Martin, J.-F., & Kreisinger, J. (2020). How being synanthropic affects the gut bacteriome and mycobiome: comparison of two mouse species with contrasting ecologies. *BMC Microbiology*, 20(1), 194. doi: 10.1186/s12866-020-01859-8

Sottas, C., Reif, J., Kreisinger, J., **Schmiedová, L.**, Sam, K., Osiejuk, T. S., & Reifová, R. (2020). Tracing the early steps of competition-driven eco-morphological divergence in two sister species of passerines. *Evolutionary Ecology*. doi: 10.1007/s10682-020-10050-4

Moudra, A., Niederlova, V., Novotny, J., **Schmiedova, L.**, Kubovciak, J., Matejkova, T., ... Stepanek, O. (2021). Phenotypic and Clonal Stability of Antigen-Inexperienced Memory-like T Cells across the Genetic Background, Hygienic Status, and Aging. *The Journal of Immunology*, 206(9), 2109–2121. doi: 10.4049/jimmunol.2001028