

Oponentský posudek na diplomovou práci:

Objasnění druhových hranic v sekci *Restricti* rodu *Aspergillus* na základě multigenové fylogeneze a analýzy fenotypu

Předložená práce má za cíl pečlivou a moderními přístupy podpořenou revizi druhové příslušnosti hub rodu *Aspergillus*. Pro dosažení cíle byl použit celý konglomerát metod od DNA taxonomie, přes mikro/makro morfologii až po fyziologické testy.

Práce mi přišla velice zajímavá a především jsem ocenil dvě věci. Za prvé to, že autor se neomezil jen na analýzu sekvenčních dat, ale především se snažil své výstupy konfrontovat s fenotypovými vlastnostmi zkoumaných organismů. Tato multidisciplinarita mi přijde skutečně velice atraktivní a zdařilá a je velmi žádoucí, byť jen vzácně používaná v dnešním redukcionalistickém světě. Za druhé jsem velmi ocenil, jaký prokázal autor přehled v metodách DNA taxonomie a analytických nástrojů druhové delimitace s použitím multilokusových dat.

V podstatě bych měl docela málo připomínek, protože pokud se jedná o výsledky a jejich interpretaci jako podklad k diplomové práci, myslím si, že jde o velmi zdařilé dílo. Jelikož si ale myslím, že autor bude svou práci chtít publikovat, budu mít v následujícím textu vícero komentářů a kritických poznámek, které snad poslouží k hladšímu průběhu recenzního řízení.

Úvod:

Autor napsal krátké shrnutí o druhových konceptech a jejich aplikovatelnosti a došel k závěru, že v podstatě všechny všechny by se v zásadě měly shodovat a lišit spíše v tom, ve které fázi speciace se podle nich již jedná o jasné druhy. K tomu bych měl tu výhradu, že za prvé bych doporučil citovat nějaké více zacílené Review, než Frankhan et al. 2012, který se problematikou zabývá spíše z ochránářského hlediska a hlavně bych navrhol velmi zdůraznit, že existuje řada situací, kdy některé koncepty vůbec aplikovatelné nejsou (například biologický koncept na asexuální organismy – tolik řešeno právě u hub). Hlavně podle mne vůbec neexistuje důvod se domnívat, že pojem „druh“ musí mít nějaký univerzální význam (Dubois 2011). Já patřím mezi ty, kteří jsou přesvědčeni, že druhy jsou objektivní a nikoli jen subjektivní jednotky. Ale nemyslím, že vzhledem k rozmanitosti forem živé hmoty je nutné předpokládat, že hypoteticky správně určené druhy musí být nutně analogické u všech taxonů. Fyzikové se například domnívají, že dříve či později se dostaneme do fáze, kdy budeme jednou teorií schopni popsat všechny síly vesmíru a současné rozdělení makro-mikro světa jen vyplývá z naší neznalosti univerzální podstaty. Otázkou je, zda v biologii a konkrétně v definici druhu můžeme (a máme) doufat v něco podobného. Různé organismy mají velmi různé vlastnosti a pojem druh u nich tedy bude patrně odrážet jiná kritéria.

Sama podstata použitých metod založených na koalescenci to jen podtrhuje – použití koalescenčních metod kriticky závisí na vstupních předpokladech modelu (neutralita znaku je jedním z nich). Jak ale toto aplikovat na organismy, které většinu své existence tráví například v asexuální fázi a celý jejich genom tvoří jednu vazebnou skupinu? Takové genomy se chovají zcela jinak, než rekombinující genomy nás, obyčejných sexuálů. Příklad vlivu celogeonomové vazby je třeba zde (Bazin et al. 2006). Další jistou slabinou je, že autor se málo věnuje otázce mezidruhového genového toku. V současnosti se ví, že ekologické druhy mohou docela jasně vymezeně existovat i za docela intenzivního genového toku (Seehausen et al. 2014) a jejich existence může být i jen dočasná (speciace/despeciace). Proto, některé druhové koncepty takové situace ze své podstaty ani nemohou zachytit existenci těchto druhů a jiné ano.

Proto bych byl v těchto závěrech poněkud opatrnější.

Metody:

Doporučil bych více místa věnovat popisu toho, jak autor vybral modely sekvenční evoluce, což je zcela klíčový parametr pro jakoukoliv aplikaci ML nebo BI metod. Především, mohl by vysvětlit, jak bral v potaz potenciální rozdíly v mutování jednotlivých pozic v kodonech?

Autor několikrát odkazuje na neexistující kapitulu 2.3.3. Asi se jedná o překlep.

2.5.4.1 Autor píše, že zkoušel různé kombinace apriorně nastavovaných hodnot parametrů tau a Theta. Podle mne chtěl spíše říct, různé hodnoty distribuce jejich priorní density, protože program sám si odhaduje ML distribuci a tedy hodnoty parametrů iteruje. Čili, myslím, že se nenastavují hodnoty Tau a Theta samy o sobě, ale spíše hodnoty popisující jejich gama nebo beta rozdělení (což jsou nejobvyklejší používané distribuce). Nebylo by ale vhodnější pro tuto validaci druhů pro alespoň několik párů druhů spočítat ony parametry a tyto hodnoty použít jako priors?

Obecně, ač mi autorův přístup přijde velmi racionální a robustní, bych jako metodu první volby alespoň pro několik druhových párů radil zkusit přístup z publikace (Birky & Barraclough 2009), která je velmi intuitivní a celkem jasně může ukázat ty skupiny, kde se dá očekávat nějaký problém. To jen pro autorovu informaci, může to pomoci při a priori testech a třeba i ukázat, kde se může dít něco zajímavého. Metoda je to sice „ruční“, ale šikovná k použití na omezeném datasetu a explicitně počítá s populační velikostí studovaných taxonů. To jen tak pro lepší orientaci v datech.

Morfologie: přišlo mi, že je celkem málo popsáno, jak byla morfolgická data použita pro delimitaci druhů a jejich validaci. Doporučil bych použít nějakou statistiku k tomu přímo určenou. Například Canonical Variance Analysis je přímo vhodná k maximalizaci meziskupinových rozdílů, což by podle mne bylo právě zde vhodné k nalezení hledaných mezidruhových rozdílů.

Hlavně by ale asi stálo za to použít nějaký přístup k validaci morfospecies, podobný tomu, co autor použil pro molekulární data. Je například možno definovat pomocí metody CVA jednotlivé klastry a poté udělat něco na způsob „assignment test“, který nám řekne, s jakou pravděpodobností by nově přidáný jedinec známého druhu byl metodou zařazen do daného klastru. Podle mne by toto ještě stálo za dodělání a vhodně by to doplnilo autorovy závěry.

Fyziologie: Velice oceňuji, že se do toho autor pustil. Pokud mají mít druhy nějaký smysl, měly by se lišit. Ale není mi jasné, jaký statistický přístup autor použil pro testování významnosti rozdílů mezi druhy, kromě toho, že na analýzu použil knihovnu ggplot2 v R. Dal by se použít třeba Kolmogorov-Smirnov test shody dvou rozdělení na analýzu toho, zda se data dvou sesterských druhů liší? Nebo nějaký jiný vhodný test?

Výsledky:

Velmi hezky popsány a prezentovány, vše bylo jasné, až na výše zmíněné nejasnosti u morfologie a osmotického testu.

Diskuse a interpretace dat:

Mám v zásadě tři dvě závažnější připomínky.

- 1) V celém textu zazněla slova hybridizace, křížení, horizontální genový tok, jen sporadicky a přitom se ví, že právě tyto procesy mohou zcela ošálit výstupy metod založených na mezidruhové koalescenci (Solís-Lemus *et al.* 2016). Rozhodně bych radil tomuto tématu zvláště u hub věnovat mnohem větší prostor. Radím také otestovat, zda případné inkongruence mezi single-locus stromy nemohou pocházet právě z těchto procesů, a to nějakou vhodnou metodou, například (Joly *et al.* 2009; Choleva *et al.* 2014). V podstatě tyto metody vychází z programů, které autor i tak použil na počítání parametrů Tau a Theta, takže by se to dalo doplnit snadno.
- 2) Tvrzení autora, že geografický původ vzorků nehraje významnou roli, mně nepřijde podložené. Naopak, geografický původ mi přijde, že docela dobře vysvětluje klastrování linií ve stromu na obrázku 24. Může autor provést nějaký alespoň permutační test, aby nezávislost na geografii testoval? Toto je docela intenzívně debatovaná problematika u mikroskopických organismů (Fontaneto 2011) a stálo by to za hlubší analýzu.
- 3) Ačkoliv souhlasím s tím, jak autor tvořil druhový strom, přeci jen bych doporučoval nějakou obšírnější debatu o tom, co objevená topologie znamená pro poznání studované skupiny. Nejsem specialista na fylogenezi hub, ale předpokládám, že asi autor našel, či alespoň potvrdil řadu vzorů a domněnek, které o fylogenezi studované skupiny panovaly. Proto, jen ať to zmíní řekne, jak se teď ne/změní poznání.

Přes výše zmíněné poznámky a doporučení práci považuji za mimořádně zdařilou a velmi doporučuji k obhajobě na výbornou.

Doplňující otázky na autora jsou:

- 1) Zmiňujete se jen velmi vágně o možnosti mezidruhového křížení, či toku genů, přitom ale se jedná o čím dále tím více oceňovaný proces v evoluci prakticky všech organismů. Co je známo o jeho existenci u hub obecně a Vaší skupiny zvláště? Jak byste odhadl možnost, že Vaše výsledky jsou tímto procesem ovlivněny a jak byste jeho efekt otestoval a posoudil?
- 2) V práci jste použil různé metody, některé založené na Maximum Likelihood, jiné na Bayesiánské statistice. Popište prosím krátce základní ne/podobnosti obou konceptů a řekněte, jak se má testovat vliv prior distribuce na posteriorní pravděpodobnost.
- 3) Zmínil jste, že různé druhové koncepty mohou (alespoň v některých případech) odrážet pouze různá stadia téhož procesu. Můžete ale uvést opačné případy, kdy se různé koncepty u téhož taxonu spíše nemohou uplatnit? Například situaci, kdy na základě ekologického konceptu je možné druhy jasně vymezit, ale na základě fylogenetického nikoliv?

Vzhledem k tomu, že s největší pravděpodobností nebudu moci být přítomen obhajobě Vaší práce, prosím, zašlete mi, máte-li zájem, odpovědi na janko@iapg.cas.cz.

Děkuji za možnost tuto inspirující a velice zajímavou práci oponovat, bylo mi potěšením a mnoho nového jsem se dozvěděl.

S přáním úspěchu

Mgr. Karel Janko, Ph.D.

Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science*, **312**, 570–572.

Birky CW, Barraclough TG (2009) Asexual Speciation. In: *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis* (eds Schön I, Martens K, Dijk P van), pp. 201–216. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.

Choleva L, Musilova Z, Kohoutova-Sediva A *et al.* (2014) Distinguishing between Incomplete Lineage Sorting and Genomic Introgressions: Complete Fixation of Allospecific Mitochondrial DNA in a Sexually Reproducing Fish (Cobitis; Teleostei), despite Clonal Reproduction of Hybrids. *PLoS ONE*, **9**, e80641.

Dubois A (2011) Species and “strange species” in zoology: Do we need a “unified concept of species”? *Comptes Rendus Palevol*, **10**, 77–94.

Fontaneto D (Ed.) (2011) *Biogeography of Microscopic Organisms: Is Everything Small Everywhere?* Cambridge University Press, New York.

Joly S, McLenachan PA, Lockhart PJ (2009) A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. *The American Naturalist*, **174**, E54-70.

Seehausen O, Butlin RK, Keller I *et al.* (2014) Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics*, **15**, 176–192.

Solís-Lemus C, Yang M, Ané C (2016) Inconsistency of Species Tree Methods under Gene Flow. *Systematic Biology*, **65**, 843–851.