

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Aleše Horáka Genetic structure of *Triturus cristatus* complex in Central Europe

Předem bych se chtěl omluvit za některé nedostatky tohoto posudku, kterých si jistě všimnete. Celé je to způsobeno tím, že jsem tento posudek musel vypracovat v krátké době a to prosím pěkně zrovna v době, kdy bych se měl, alespoň podle svého lékaře, udržovat v klidu a pohodě a léčit se z nedávného úrazu kolene, což mne stojí spolu s intenzívní rehabilitací velké úsilí. Vzhledem k těmto důvodům jsem například nebyl schopen prostudovat literaturu týkající se studovaného komplexu a tak se omezím jen na připomínky týkající se použitých metod a obecných fylogeografických závěrů. Tím však vůbec nechci naznačit, že bych podezíval Aleše z nějakých omylů, ale jen to, že se jisté části práce nemohu fundovaně vyjádřit.

Na celé práci jsem hned na začátku seznal, že je napsána výbornou angličtinou, a je velmi čtivá. To se mi líbilo. Úvod je napsán, řeklo by se, dosti svižně a bez zbytečných peripetií uvede čtenáře do studované problematiky.

Práce je dále členěna do dvou celků odpovídajícím dvěma submitovaným manuskriptům. K prvnímu mám následující připomínky seřazené v pořadí podle textu:

Hned v prvním řádku píše autor, že Pleistocénní glaciace hrály ovlivnily HLAVNĚ evropskou a severoamerickou biotu. K tomu bych rád jen tak okrajově podotkl, že podobný efekt byl popsán u organismů z prakticky celé planety a podle mého názoru jediný důvod, proč se ukázaly HLAVNĚ u evropských a severoamerických organismů je ten, že v těchto oblastech je také nejvyšší výskyt laboratoří, které se danou problematikou zabývají, takže to HLAVNĚ tam asi nemusí být.

V závěru úvodu se píše že se jedná o „first large-scale intrapopulation survey on ... crested newts“. Právě tady mi přijde, že je hlavní slabina tohoto manuskriptu, poněvadž vzhledem k celkovému areálu tohoto komplexu, tak jak jej autor ukazuje ve všeobecném úvodu, se zase o až tak „large-scale survey“ nejedná. Vůbec netvrdím, že tato část práce nebyla zajímavá a že se závěry nesouhlasím, ale připadá mi, že pokud by Lukáš investoval více úsilí do shánění materiálu i jinde po Evropě, mohly by být závěry studie mnohem pevnější a konkrétnější. Sám to nakonec v diskusi připouští a mne by zajímalo, proč nebylo shromážděno více vzorků z jiných částí areálu. Anebo bych rád věděl, z jakého důvodu se práce zaměřila jen na zmíněnou oblast, poněvadž z manuskriptu to není patrné.

U studovaných jedinců bylo osekvenováno 379 bp cyochromu b, ale v následujícím manuskriptu jsem se dočetl, že jich sekvenoval přes 500. Proč došlo k analýze kratšího fragmentu v první studii?

Napadlo mne, že by manuskript vylepšilo, kdyby v obrázku s mapou byly naznačeny areály studovaných druhů tak, jak je to uděláno v obecném úvodu.

Dále mám pár připomínek k metodice historické demografie a její interpretaci:

Autor použil dva tradiční přístupy, tj. Mismatch Distribution se související statistikou Raggedness index a dále Tajima's D koeficient. Bylo ukázáno, že obě metody jsou relativně konzervativní, tj. často nezamítnou nulovou hypotézu konstantní populace i v případě populační expanze (Ramos-Onsins SE, Rozas J: **Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth**. *Mol. Biol. Evol.* 2002, 19:2092–2100), takže bych doporučil užít ještě jinou, citlivější metodu, jako např. tamtéž zmíněné Fu' Fs, R2 index nebo nějakou moderní metodu založenou na Maximum Likelihood (např. Kuhner MK, Yamato J, Felsenstein J: **Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent**. *Genetics* 1998, 149 : 429 –434). Dále si nejsem jist, jestli je metoda least squares na detekci sudden population growth u Mismatch Distribution správně užita. Nechci polemizovat s věhlasnými tvůrci ARLEQUINU, ale má výhrada je následující: nulová hypotéza by měla být ta jednodušší, tedy ptáme-li se, zda se z dat dá odvodit populační růst, pak bychom jako nulovou hypotézu měli brát nejjednodušší model konstantní populace a snažit se jej našimi daty vyvrátit. Použijeme-li metodu SSD na testování, zda se naše data výrazně odlišují od sudden growth modelu, pak vlastně pořád netestujeme, zda náhodou nepocházejí z neutrální populace!! Sám jsem udělal tu zkušenost, že u druhu, který se jevil ve všech ostatních metodách

jako že neprodělal populační růst a i jeho Mismatch Distribution bylo výrazně bimodální, SSD stále nenaznačovalo signifikantní odchylku od modelu populační expanze. Navíc, sám autor zde zjistil, že Tajima D nebylo signifikantní (jak se lze dočíst v Results, bohužel hodnoty nejsou ukázány), tudíž správně nemůže tvrdit, že data ukazují na populační expanzi.

Raggedness index má pak tu vlastnost, že jeho hodnota závisí nejen na tvaru mismatch distribution a populační historii, ale i na počtu mutací v genealogii, takže samotná velikost tohoto koeficientu nám ještě nic moc neříká. Abychom tento index mohli použít, myslím, že potřebujeme nejprve testovat, zda pro danou míru polymorfismu v populaci, jsou naše hodnoty signifikantně malé (tedy naznačující populační růst), či nikoliv. Takovýto test se dá udělat např. v DNAsp. Opět jsem zažil to, že druh podle jiných metod neexpandující měl Raggedness index shodný s populačním růstem podle SSD. Když jsem však testoval, zda skutečně je signifikantně malý, pak mi vyšlo, že není možno zamítnout nulovou hypotézu konstantní populace. Možná je to vzhledem k užití ARLEQUIN jen můj názor, ale podle mne je správné se nejprve ptát, zda naše data signifikantně zamítají nulovou hypotézu a pak uvažovat o alternativním vysvětlení, ale použijeme-li SSD statistiku, pak se vlastně ptáme, zda naše data jsou konzistentní s alternativní hypotézou, aniž bychom testovali, zda pořád ještě nemohou pocházet z neutrální populace o konstantní velikosti.

Z těchto důvodů se mi zdá, že se demografické interpretace plně neopírají o data a že by bylo dobré je podpořit správným testem. Od oka se mi podle tvaru genealogie taky zdá, že *T. cristatus* evidentně prodělal bottleneck, nebo aspoň populační expanzi, ale uvítal bych rigidnější test. Konkrétní návrhy jsem uvedl výše. Ale jak říkám, tak, jako to udělal autor, se to v literatuře dělá často, tak třeba je to jen můj názor (i když, jak jinak, jsem přesvědčen, že je určitě správný...).

V Diskusi autor píše, že *T. karelinii* a *T. carnifex* jsou ancestrální. Ale není mi úplně jasné, jak to myslí. Znamená to, že se severní druhy vyvinuly z nich? A jestli ne a severní druhy s výše jmenovanými pouze sdílejí společného předka, tak jsou pak ancestrální k čemu? Podle topologie stromu se *T. karelinii* dělí na dvě monofyletické skupiny (jmenovány jako poddruhy) a celkově se jedná o parafyletický taxon. Takto by to mohlo naznačovat, že je předkem ostatních druhů z komplexu. Mně ale není jasné, zda by o tomto druhu nešlo uvažovat jako o dvou druzích.

Autor píše, že *T. cristatus* má SIGNIFIKANTNĚ slabší populační strukturu, než *T. dobrogicus*. Jak tuto signifikanci testoval? Z tabulky je pouze patrné, že tam je méně signifikantních hodnot, ale mělo by se dát určit, že hodnoty F_{st} u *T. cristatus* jsou skutečně signifikantně nižší než u *T. dobrogicus*, což ale testováno není. Navíc autor v diskusi píše, že podle AMOVy největší podíl genetické variability je ve vnitropopulačních srovnáních, což je konzistentní s populační expanzí. Ale tabulka 2 (autor chybně odkazuje na tabulku 3) ukazuje, že u obou druhů pochází největší podíl diversity ze srovnání MEZI populacemi v rámci skupin. A tento výsledek se mi už nezdá plně konzistentní s populační expanzí.

Jinak k manuskriptu nemám dalších výhrad, ale k interpretacím nemohu zaujmout stanovisko, dokud neuslyším odpovědi na výše uvedené otázky.

Ke druhému manuskriptu nemám výhrad a moc se mi líbil.

Práce je podle mého názoru přínosná jak k poznání biologie čolků, tak hlavně i z obecného hlediska mezidruhové hybridizace. Velmi oceňuji péči s jakou autor přistupoval k manipulaci se zvířaty, poněvadž mezi ostatními zoology jsem spíše zažil úplně nesmyslná jatka, kdy je pro kousek tkáně zabit celý živočich. Druhý manuskript považuji za velmi zdařilý a dozvěděl jsem se z něj spoustu zajímavých věcí a i ohledně metodik jsem se dost poučil. Naproti tomu k prvnímu manuskriptu mám poměrně dost připomínek. Sám autor správně uvádí, že od dob Nested Clade Analysis se vyskytly výtky k této metodě a obzvláště v posledních několika letech se objevil větší počet metod založených na přístupech Maximum Likelihood a Bayesiánské statistiky. Stejně to ale je i u tradičních metod zjišťování demografické historie. Podle mne ideální by bylo použít těch metod několik tak aby se jejich předpoklady a algoritmy doplňovaly, protože každá z nich má nějaké zjednodušující předpoklady a každá se opírá jen o část informace z dat. Konečně v současnosti se tyto nové přístupy začínají už rutině užívat. Také je mi líto, že se nepodařilo získat více vzorků z geograficky reprezentativnějšího území.

Jsem přesvědčen, že předložená práce Mgr. Aleše Horáka splňuje v plném rozsahu požadavky kladené na doktorskou disertační práci v příslušných zákonech a rovněž vyhovuje dodatečným kritériím stanoveným Oborovou radou doktorského studia. Doporučuji proto, aby disertace byla přijata jako náležitý podklad pro obhajobu a celé doktorské řízení.



**Posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Aleše Horáka
„Genetic structure of the *Triturus cristatus* complex in central Europe“**

Předložená práce shrnuje analýzu genetické proměnlivosti skupiny tzv. velkých čolků – druhového komplexu („superspecies“) *Triturus cristatus* ve střední Evropě, založenou na dvou studiích, v současnosti zaslaných do BIOLOGICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY a JOURNAL OF HERPETOLOGY. První z nich je zaměřena na genetickou variabilitu o tří blízkce příbuzných druhů *T. cristatus*, *T. dobrogicus* a *T. carnifex* s použitím parciálních sekvencí cytochromu *b*, druhá pak zkoumá oblasti sekundárního kontaktu a hybridizace mezi *T. cristatus* a *T. carnifex* v oblasti Salzburgu pomocí mikrosatelitů a sekvencí cytochromu *b*.

Výsledky analýz potvrzují celkově nižší genetickou variabilitu a úroveň populační diferenciace *T. cristatus* v porovnání s *T. dobrogicus*, kterou autor dává do souvislosti s epizodami pleistocénního zalednění, a také vyšší proměnlivost českých a slovenských populací *T. cristatus* v porovnání s populacemi rakouskými. Analýza hybridní zóny *cristatus/carnifex* ukázala její unimodální charakter a naopak nepotvrdila přítomnost autochtonních populací *T. c. carnifex* v Bavorsku. Je diskutován možný původ a kolonizační scénáře obou taxonů.

K předložené disertaci nemám zásadnější připomínky, je vidět, že Mgr. Horák za těch cca. 7 let měl možnost vykonat (řekněme) solidní genetické analýzy, o to více překvapí, že práce vyvolává dojem, že byla sepsána ve spěchu, o čemž svědčí mj. i nekonzistentní uvádění druhového názvu jednoho ze zkoumaných taxonů (*karelini* – *karelinii*), těch nepřesností je tam ovšem více.

Mezi další drobnosti patří např.:

str. 5: areál *T. karelinii* nemůže být kontinuální, protože ho rozděluje Bospor (ač nejsem herpetologem, přece jen si myslím, že moře je pro čolky poměrně silná geografická bariéra).

str. 7 prvního rukopisu: Table 2 má být zřejmě Table 3

Conclusions: absence výběrového páření (assortative mating) automaticky neznamená, že selekce proti hybridům není převažujícím mechanismem v hybridní zóně čolků (jakkoli to tak ve skutečnosti pravděpodobně je).

K autorovi mám následující poznámky a především otázky, které předkládám jako podnět k diskusi:

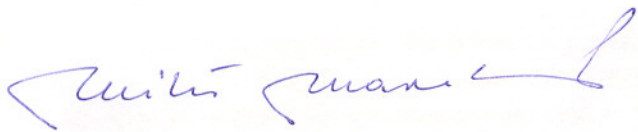
1. V obou rukopisech postrádám časový kontext. Konkrétně co se dá ze získaných dat říci např. o době divergence mezi zkoumanými taxony, kdy přibližně došlo k populační expanzi?
2. str. 5 prvního rukopisu: proč byl použit model GTR+I+G – podle ModelTestu? Co znamená „druhý model“? Pokud jde o model, který dle Akaikeho kritéria vyhodnotil jako druhý

nejvhodnější příslušný program, proč nebyl použit nejvhodnější (nebo třeba 3., 4., 5. atd. nejvhodnější)?

3. Co si autor myslí o evolučním vysvětlení morfologických rozdílů mezi druhy velkých čolků? (zde mám na mysli diskusi, do které se zapojil mj. Lumír Gvoždík)
4. Výsledky získané na základě F_{ST} je třeba brát opatrně, jednotlivé lokality jsou od sebe příliš vzdálené (tj. vysoce převyšují 20-násobek rozsahu disperze čolků).
5. Jak to v současnosti vypadá s rukopisy zaslánými do Biol. J. Linn. Soc. a J. Herpetol.?

Z uvedeného vyplývá, že práci hodnotím velmi pozitivně a doporučuji, aby ji Mgr. Horák obhajoval před příslušnou komisí a aby mu byl po úspěšném obhájení dle platných předpisů udělen titul PhD.

V Brně dne 24. září 2007



doc. RNDr. Miloš Macholán, CSc.

Laboratoř evoluční genetiky savců
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.
Veveří 97, 60200 Brno

Genetic structure of the *Triturus cristatus* complex in central Europe

Oponentský posudek disertační práce

Autor: Mgr. Aleš Horák

Oponent: Mgr. et Mgr. Josef Bryja, Ph.D.

Disertační práce Mgr. Aleše Horáka se zabývá genetickou strukturou čolků skupiny *Triturus cristatus* superspecies ve střední Evropě a jako hlavní genetický marker, který autor k analýzám využil je parciální sekvence cytB. Po možná až příliš stručné nicméně vcelku přehledné úvodní části (Introduction) následuje hlavní část disertace - dva manuskripty odeslané do redakcí mezinárodních časopisů, z nichž u jednoho je kandidát prvním autorem a u druhého pouze členem širšího týmu, a celá práce je ukončena přehledným jednostránkovým shrnutím (Conclusions). Přestože práce je svým rozsahem poměrně strohá a měla by jistě větší dopad, kdyby byla publikována již o několik let dříve (tj. před zveřejněním článků Weisrock et al. 2006 nebo Steinfartz et al. 2007), tak přináší originální informace o komplikované genetické struktuře parapatrických populací tří druhů velkých čolků ve střední Evropě. Za velmi cenné považuji jak primární informace o mtDNA struktuře střeoevropských populací v prostoru, kde dochází k setkávání a hybridizaci všech tří druhů (tj. hlavní výsledek první publikace), tak i detailní popis rakouské hybridní zóny za využití jaderných i mtDNA markerů a celkové morfologie (tj. druhá publikace, která se může stát základem pro detailnější studium mechanismů speciace jako se tomu stalo u mnoha jiných hybridních zón).

V práci jsem nicméně našel některé nejasnosti a nepřesnosti, které pravděpodobně souvisí s urychleným dopisováním práce (ale které jsou většinou poměrně lehce odstranitelné při další editaci odeslaných manuskriptů). Z těch významnějších bych uvedl tyto:

Introduction

- celý úvod je tvořen jen jednou kapitolou "1.1 *Triturus cristatus* superspecies", která se zabývá zejména distribucí a fylogenezí studovaných modelových obojživelníků. Dle mého názoru by bylo vhodné v úvodní části disertace věnovat více prostoru i obecnějším problémům, které se disertace týkají, např. problematice vlivu zalednění na vývoj fauny nebo významu a metodám studia hybridních zón
- na konci Introduction nejsou definovány žádné cíle disertace. Přestože obě publikace přinášejí kvalitní výsledky (viz výše), které jsou výstižně shrnuty v "Conclusion", tak by bylo vhodné práci "orámovat" ještě jasným vytyčením cílů.

Publikace č. 1

- str. 7 - *T. carnifex macedonicus* se významněji odlišuje od zbývajících *T. carnifex*. Jaký je důvod uvádět tento taxon jako poddruh (v práci překlep "supspecific"), když i "druhy" v tomto komplexu mezi sebou vytvářejí plodné hybridy
- str. 7 - záměna označení Table 2 a 3; chybí odkaz na Table 4
- str. 7 i dále - jaký byl klíč k vytváření geografických skupin lokalit? Kdy už např. lokalita patřila ke "Znojmo region" a kdy už k "West Moravia". Tyto informace by měly být uvedeny v Material and Methods a ne pouze ve výsledkové tabulce.
- str. 13 - v diskuzi týkající se introgrese mtDNA chybí detailnější popis možného mechanismu (např. "sex-biased dispersal")

Table 2 - legenda k této tabulce je velmi nedostatečná (a ani v textu nejsou dostatečné informace)

Table 3 - dle mého názoru je nesmyslné uvádět charakteristiky variability pro skupinu OUT (outgrup), která je složena ze zvířat různého původu a ne z jedné geografické oblasti

Publikace č. 2

str. 5 - chybí informace o odhadu času divergence na základě celkového cytB (Steinfartz et al. 2007)

str. 9 - "gene diversity" a "Ho" dále uváděná jako "observed heterozygosity" nejsou jedno a to stejné - viz Help k programu FSTAT. Která hodnota je tedy v práci uváděna?

str. 9 - HW equilibrium bylo testováno tzv. "exact probability test" v programu Genepop nebo bylo odhadováno pouze na základě hodnot Fis?

str. 9 a odpovídající části výsledků (str. 12) a diskuze (str. 18) - signifikantní deficit heterozygotů je často způsoben výskytem tzv. nulových alel v některých populacích. To obzvláště platí při použití stejných mikrosatelitů mezi různými taxony. Tento zdroj chyb však nikde není testován, přestože existují vhodné metody, jak výskyt nulových alel odhalit (např. program FreeNA, Chapuis & Estoup 2006). Pokud by se zjistilo, že frekvence nulových alel je vysoká, tak je možno datové soubory korigovat a výsledky analýz srovnat s původními daty. Možná by pak nebylo nutné provádět často složité interpretace signifikantního deficitu heterozygotů v některých populacích (str. 18).

str. 10 - nemělo by být správně, že populace byly zařazovány do klusterů pokud byla proporce jedinců ≥ 0.80 ?

str. 11, 3. ř. odspodu - je chybně uvedeno CAR, má být CRI

str. 16, 4. ř. odspodu - lépe "founder effect" než "bottleneck effect"

str. 19 - v Diskuzi chybí vysvětlit proč je introdukovaná populace *T. carnifex* morfologicky stejná s *T. cristatus*. Jaké vysvětlení má autor?

Table 3 - chybí přesné hodnoty pro symboly * a **

Table 3 - Ho a Fis by měly být hodnoceny také pouze u vzorků větších než 5 jedinců;

Hodnoty Ho a A nejsou v práci nijak detailněji analyzovány a mohly by (např. srovnání variability jednotlivých taxonů)

Závěr

Předložená disertační práce přináší primární a cenné informace o genetické struktuře a hybridizaci tří druhů čolků skupiny *Triturus cristatus* superspecies. V budoucnu by jistě bylo zajímavé ji v některých aspektech rozšířit, např. analyzovat genetickou strukturu komplikovaných jihočeských a jihomoravských populací i jadernými markery. I v současné podobě však má práce vysokou informační a vědeckou hodnotu a věřím, že oba manuskripty budou přijaty k tisku. Mgr. A. Horák prokázal, že umí zacházet s vědeckými fakty a smysluplně je interpretovat (viz také rozsáhlá publikační aktivita v oboru parazitologie) a proto navrhuji aby práce byla přijata k obhajobě a při úspěšném obhájení udělen titul "Philosophiae doctor" (Ph.D.).

Ve Studenci 26.9.2007

Mgr. et Mgr. Josef Bryja, Ph.D.

