



MASARYK UNIVERSITY
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BOTANY AND ZOOLOGY

Review of the PhD thesis "Physical Mapping and Evolution of Banana Genome (*Musa* spp.) submitted by
Jana Čížková

Brno, 23rd August 2013

Petr Bureš, Department of Botany & Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37
Brno; bures@sci.muni.cz

I. General comments

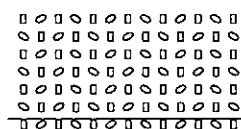
The thesis of Jana Čížková examines genome structure and karyotype evolution of banana genus (*Musa*); it addresses three main topics: (i) identification/description of phylogenetical relationships among wild species, hybrids and cultivars in the genus *Musa*; (ii) analysis of sequence variation in ITS-part of rDNA gene; (iii) identification of cytogenetic markers (locations of particular satellites) enabling identification of particular chromosomes of banana karyotypes.

The methods used in the thesis are based particularly on: (i) molecular analyses (ITS), (ii) flow cytometry (estimation of nuclear DNA content), and (iii) cytogenetic analyses (chromosome counting, FISH). The material examined in the thesis was based on samples obtained from ITC collection.

The thesis consists of (i) three original papers (two published papers in PLoS ONE and one paper-manuscript in preparation to be submitted), (ii) one published book chapter and (iii) a comprehensive general introduction, where objectives, material and methods, summary of results, and future perspectives are presented; the thesis is completed by (iv) six conference abstracts/posters. The candidate is the first author of two papers and all conference presentations. In the other two parts of the thesis, she has substantially contributed to their preparation. The thesis is well written, clear to read, and nearly free of typographical and other minor errors.

Thesis of Jana Čížková constitutes, in my opinion, a very valuable addition to the study of phylogeny and cytogenetics of the genus *Musa*. The candidate has demonstrated creative capacities and very good skills in molecular and karyological methods as well as in results presentation. I recommend warmly to accept this thesis for the doctor degree in the field of Botany after its successful defense.

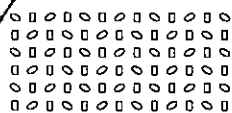
Disertace Jany Čížkové představuje podle mého názoru velmi hodnotný přínos k výzkumu fylogeneze a cytogenetiky rodu *Musa*. Kandidátka prokázala tvůrčí schopnosti a značné dovednosti jak v metodách molekulárních tak cytogenetických, jakožto i při prezentaci výsledků. Vše ji proto doporučuji k obhajobě a považuji ji za splňující požadavky k udělení doktorské hodnosti v oboru Botanika.



MASARYK UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
Phone: +420 549 49 1411 • Fax: +420 541 211 214 • www.sci.muni.cz
VAT CZ00216224 • IBAN CZ43 0100 0000 0000 8563 6621

Department's phone: +420532146114, Department's fax: +420532146312

E-mail: vslezak@sci.muni.cz, helesic@sci.muni.cz

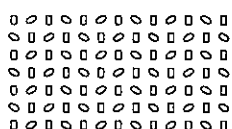


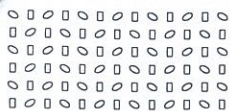
II. Questions for defense/discussion

1. In the paper 4.1.3 Molecular and Cytogenetic Characterization of Wild Musa Species Newly Introduced to ITC Collection (Čížková et al. in prep.), there are nuclear DNA content as well as chromosome numbers of various taxa mentioned in Table 2. When both these parameters are compared, the negative correlation between $2n$ and $2C$ becomes to apparent (Spearman's $\rho = -0.86$; $p = 0.000002$). – **(1a) How you can explain this inverted trend "the less chromosomes, the more DNA in somatic cells"?** (i. e., Which processes in karyotype evolution can be responsible for such a trend?)
2. Most of cultivated bananas are seed sterile diploid, triploid or tetraploid clones. – **(2a) Is the hybrid (seed) sterility common feature in banana natural interspecific hybrids?** – **(2b) Are some of them fertile (at least in male function)?** – **(2c) What genetic background is responsible for seed sterility in bananas?** – **(2d) Which one of scenarios can be expected in formation of triploid banana hybrids?** [i. e., (i) Hybridization between diploid and tetraploid parents or (ii) homoploid hybridization between diploid parents followed by triploidization of F1.]
3. In the same paper you documented incomplete concerted evolution of ITS sequences, i. e., the presence of conserved sequences of both parents in most of banana hybrids. – **(3) Can you estimate the age of these hybrids and if so, can be concerted evolution expected in them?**
4. One of the topics of your study was to reconstruct the phylogeny in *Musa* (not "to reconstruct phylogenetic analysis - as mentioned on page 139"). Although in banana "phylogeny", true evolutionary processes have actually combined with intentional or inadvertent breeding, the potential patterns and questions which can be addressed remains similar to classical phylogenetic study. One of the frequently debated questions in phylogenetic studies is the recurrent hybrid speciation. The really detail study presented in the paper 4.1.1. "The ITS1-5.8S-ITS2 Sequence Region in the Musaceae: Structure, Diversity and Use in Molecular Phylogeny" (Hřibová et al. 2011) revealed really huge amount of ITS data for numerous taxa in the genus *Musa*. – **(4) Is there any evidence for independent hybrid events resulted to the formation of the same hybrid cultivar or for recurrent hybrid speciation?**
5. "While the function of centromeres is conserved, the DNA sequence is highly diverged and variable in length" as it is mentioned at p. 26. – **(5) How this seemingly paradoxical pattern is usually explained?**

III. Brief comments/which cannot be answered

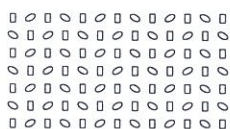
6. There are three rather contradict statements in the Thesis: (i) "This genus (*Musa*), comprising approximately 65 species" (p. 15) – (ii) "The family Musaceae contains approximately 65 species" (p. 50) – (iii) "Except for *M. acuminata*, *M. balbisiana* and their hybrids, the genus *Musa* contains about 50 species. (p. 131). – **(6) Only one of them can be really true.**
7. As a taxon with the smallest genome is mentioned *Genlisea margaretae* (p. 22). – Actually, this is not true, as the determination was later corrected by Greilhuber and Leitch to *Genlisea aurea* (p. 323 in I.J. Leitch et al. (eds.), Plant Genome Diversity Volume 2, Springer-Verlag, Wien, 2013).
8. In the same paper, there is mentioned (in abstract) that "Both Sanger sequencing of amplified ITS regions and whole genome 454 sequencing lead to similar phylogenetic inferences". – **(8) Did you really analyzed an influence of sequencing type on the topology of phylogenetic tree expecting the difference?** In the text of paper, reduced intra-individual sequence variability is really discussed, when Sanger's sequencing is compared with 454 method. In my opinion, such a reduction of intra-individual sequence variability seems





to be rather influenced by different size of sequence datasets (obtained from Sanger or 454 sequencing) in respective samples (Maybe, I have overlooked something?)

doc. RNDr. Petr Bureš, Ph.D.





Biofizikální ústav Akademie věd České republiky

RNDr. Jiří Šíroký, CSc.

Oddělení vývojové genetiky rostlin

Královopolská 135, 612 65 Brno

tel. 541517194, fax: 541240500, e-mail: siroky@ibp.cz

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Jany Čížkové Physical mapping and evolution of banana genome (*Musa spp.*)

V předložené disertaci se Mgr. Čížková zabývá tematikou mapování a evoluce banánovníku. Tato rostlina je po citrusech druhou nejvýznamnější ovocnou plodinou na světě a je rovněž důležitou složkou potravy zejména obyvatel nejméně rozvinutých zemí světa, a rovněž plodinou velmi důležitou z hlediska komerčního. Proto jsou jakékoli znalosti o genomovém uspořádání rodu a příslušných druhů nanejvýš potřebné pro šlechtění, ochranu banánovníků vůči chorobám a škůdcům a konečně i zajímavé z hlediska genomiky allopolyploidů i autopolyploidů.

V první části disertace se Mgr. Čížková zabývá analýzou ITS oblastí ribozomálních genů a možnými implikacemi těchto analýz pro fylogenetiku banánovníku. Dále se věnuje cytogenetickému mapování DNA satelitů, jakožto potenciálním markerům pro zpřesnění chromozomových map. V další části se disertantka zabývá genetickou diverzitou planě rostoucích banánovníků, v čemž spatřuje nástroj pro další zpřesňování evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy banánovníků. Tato jednotlivá témata zpracovává Mgr. Čížková formou ucelených článků publikovaných v PLOS One a v jednom rukopise publikace. Součástí disertace je rovněž spoluúcast na kapitole v monografii Physical mapping technologies for identification and characterization of mutated genes to crop quality, IAEA, Vídeň 2011.

Úvodní literární přehled je vtipně, ale i kriticky zaměřen na všechna témata, metodiky i problematiky, jimiž se později disertantka experimentálně zabývá. Pro čtenáře nepoučeného tak disertace poskytuje zevrubný úvod do studované problematiky, pro poučeného pak zajímavé čtení o genomice banánovníku a všem, co s ní souvisí.

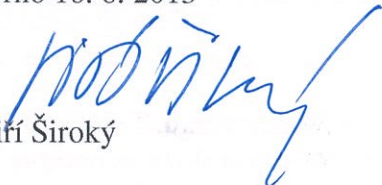
V první části autoři detailně studují oblast rRNA genů ITS1-5.8S - ITS2 v úctyhodné kolekci 78 různých diploidních druhů a triploidních hybridů čeledi Musaceae. Odhlédneme-li od zajímavých fylogenetických výstupů, jedním z hlavních nálezů je značná konzervativnost obou intragenových mezerů vnitrodruhových hybridů. Zde bych se rád otázel, proč u některých hybridů dochází ke genové konverzi spíše než u druhých. Jaké mechanismy se při tom mohou uplatňovat?

Další dvě práce se soustředí na vyhledávání markerů pro identifikaci jednotlivých chromozomů u osmnácti druhů banánovníku v první práci a 21 nových přírůstků banánových genetických zdrojů Bioversity International Transit Centre ve druhé publikaci. Autoři přitom použili jakožto chromosomově specifické sondy 45S rDNA a 5S rDNA, satelitní DNA i jednokopiové sondy. Získané in situ hybridizační vzory, sekvenční údaje mezerů ITS1 a ITS2 a stanovené obsahy jaderné DNA získané cytometrií přitom posloužily jako základ pro stanovení (a doplnění) fylogenetických vztahů. Zde autoři rovněž potvrzují že sekce Eumusa a Rhodochlamys rodu Musa, v souladu s jinými autory i předchozími pozorováními a publikacemi olomoucké Laboratoře, by měly být sloučeny v jedinou sekci. Svědčí proto konečně i fakt, že obě sekce mají stejný základní počet chromozomů ($1n = x = 11$) oproti sekcím Callimusa a Australimusa (9, resp. 10). V této souvislosti bych se Mgr. Čížkové rád otázel, jaké má zkušenosti s tzv. botanickými autoritami, které někdy velmi tvrději lpí na tradiční systematice

podložené morfologickými charakteristikami. Obvykle nebývá lehké s kacířstvím proti systematice prorazit.

Závěrem si dovoluji konstatovat, že předložená práce, oslovující jak obecné biologické otázky spojené se zajímavou čeledí Musaceae, tak řešící praktické důležité výzkumné aspekty čeledi, splňuje kriteria disertační práce na výbornou. Disertantka prokázala nejen experimentální dovednosti, ale interpretací výsledků ukázala schopnost řešit vědecký problém. Práci doporučuji k obhajobě pro získání vědecko-akademické hodnosti PhD.

Brno 16. 8. 2013



Jiří Široký



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

☎ *420-387772431

fax: *420-387772431

e-mail: vcurn@seznam.cz

Oponentský posudek na disertační práci
Mgr. Jany Čížkové

**„Physical mapping and evolution of banana genome
(*Musa* spp.)“**

Předložená disertační práce je velmi kvalitně zpracovaná, psaná srozumitelně a čtivě a její úvodní část čtenáře podrobně a přitom přehledně uvádí do problematiky, která byla objektem studia disertantky. V další části jsou pak uvedeny publikované nebo k publikování připravené práce autorky disertace. Práce je po formální stránce velmi dobře zpracovaná, doplněná řadou obrázků a tabulek a členění práce pak odpovídá standardu kladenému na disertační práci.

Po obsahové stránce je disertaci obtížné cokoli vytýkat, protože úvodní část je až na drobnosti prakticky bez chyb a druhá část pak obsahuje práce publikované v prestižních časopisech. Z tohoto pohledu mám k práci dvě formální připomínky: publikované abstrakty bych uvedl v seznamu publikovaných prací autorky, ale disertaci by dle mého názoru měl tvořit literární přehled, vědecké články/monografie a v nich uvedené výsledky by bylo vhodné uvést v komentáři k publikovaným datům (druhá připomínka). Komentář k publikovaným výsledkům by pak mohl lépe zdůraznit a popsat dosažené výsledky, takto se až příliš ztrácí v dlouhém závěru.

Poznámky a připomínky:

- Obrázek 2 na str. 15 – je dílem autorky, či byl převzat z literatury? Počty chromozomů jsou uváděny poněkud neobvykle, na první pohled se může zdát, že se jedná o haploidní druhy, vhodnější způsob prezentace je uveden v textu pod obrázkem. Pro úplný přehled a dokonalost by bylo vhodné doplnit i data o velikosti genomu. Do přehledu taxonomické klasifikace by také bylo vhodné uvést nově popsané skupiny, zvláště pokud jsou zmiňované v textu disertace a na dalším obrázku. Jaké je geografické rozšíření dalších dvou rodů v rámci čeledi *Musaceae*? Na Obr. 4 by bylo vhodné sjednotit barvy pro dva popisované druhy rodu *Musa*.
- Jaké jsou reálně využitelné metody rezistentního šlechtění u banánovníku?

- V tabulce 2 by bylo vhodné sjednotit označení druhu, kultivaru...
- Popis struktury mikrosatelitu v pasážích popisující strukturu genomu rostlin a molekulární markery je odlišný.

Získané výsledky jsou zajímavé, cenné pro poznání struktury genomu banánovníku a poznání genetické diverzity této významné skupiny. Autorka disertační práce prokázala schopnost samostatné vědecké práce, interpretace získaných dat a výsledky své práce publikovala v prestižních časopisech. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Mgr. Janě Čížkové titul „doktor“.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biotechnologické centrum ZF

