

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: mgr Michał Kobiałka

Tytuł rozprawy doktorskiej: Endosymbiotyczne mikroorganizmy piewików z podrodziny Deltoccephalinae (Hemiptera, Cicadomorpha: Cicadellidae). Charakterystyka molekularna, ultrastruktura oraz transowarialny przekaz.

Promotor: Prof. dr hab. Teresa Szklarzewicz

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): dr Anna Michalik

Recenzent: prof. dr hab. Anna Maryńska-Nadachowska

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

W ciele owadów powszechnie występują endosymbiotyczne mikroorganizmy. Umiejscowione są one w różnych miejscach ich ciała: w bakteriocytach, w komórkach ciała tłuszczowego, w komórkach jelita, a pozakomórkowo w hemolimfie. W ocenianej pracy doktorant przeprowadził analizy molekularne endosymbiontów oraz opisał ultrastrukturę i sposób ich przekazywania następnym pokoleniom u 21 gatunków piewików z 7 plemion podrodziny Deltoccephalinae (Hemiptera, Cicadomorpha, Cicadellidae). Badania tego typu mają duże znaczenie poznawcze i walor innowacyjności pozwalając z jednej strony na określenie pokrewieństw pomiędzy symbiontami, a z drugiej strony są bardzo przydatne w badaniach filogenezy owadów gospodarzy w oparciu o filogenezę ich endosymbiontów.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Wyniki opublikowane w kolejnych artykułach pozwoliły na kompleksowe i dogłębne poznanie systemów symbiotycznych u ponad dwudziestu przedstawicieli podrodziny Deltoccephalinae. Przeprowadzone przez doktoranta analizy mikroskopowe i molekularne wykazały, że badane piewiki charakteryzują się obecnością wyjątkowo różnorodnych, dotąd niespotykanych u pluskwiaków systemów symbiotycznych. Mikroorganizmy tworzą rozmaite warianty tych systemów. Badane owady mogą posiadać system symbiotyczny „*Sulcia + Nasuia*”, „*Sulcia + Nasuia + Arsenophonus*”, „*Sulcia + Sodalis*”, „*Sulcia + Nasuia + Arsenophonus + Sodalis*” oraz „*Sulcia + mikroorganizmy drożdżopodobne*”. Gatunki piewików różnią się również rozmieszczeniem endosymbiontów: w bakteriocytach, komórkach ciała tłuszczowego, w komórkach jelita, wewnątrz innych bakterii oraz pozakomórkowo w hemolimfie. Świadczy to o ich wzajemnej konkurencji i eliminowaniu z systemu w toku ewolucji. Badania Pana Michała Kobiałka potwierdzają hipotezę o nieustannym zastępowaniu jednych symbiontów przez inne w różnych liniach rozwojowych piewików z grupy Auchenorrhyncha. Pomimo wykazania obecności różnych systemów symbiotycznych w podrodzinie Deltoccephalinae mechanizm przekazu endosymbiontów z pokolenia na pokolenie jest wspólny dla wszystkich ich przedstawicieli, przebiega on wertykalnie, na drodze transowarialnej.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Wyniki uzyskane w rozprawie doktorant przedstawił w pięciu publikacjach stanowiących spójną i logicznie ułożoną całość. Każda z prac sukcesywnie publikowanych zawiera kolejny etap badań autora i uzupełnia wiedzę o endosymbiotycznych organizmach, za każdym razem u innych gatunków Deltoccephalinae. Dotychczasowe badania histologiczne i molekularne wykazywały, że u większości przedstawicieli badanej podrodziny piewików pierwotny system symbiotyczny, odziedziczony po wspólnym przodku, jest tworzony przez bakterie *Sulcia* i betaproteobakterie *Nasuia*, zasiedlające własne bakteriocyty. Badania przeprowadzone przez Pana Michała Kobiątkę przy zastosowaniu technik mikroskopowych i analiz molekularnych, potwierdziły występowanie układu symbiotycznego „*Sulcia* + *Nasuia*” u 12 z 21 przebadanych gatunków piewików. Autor rozprawy wykazał jednak, że oprócz wspomnianego układu symbiotycznego spotyka się u niektórych gatunków 4 inne układy symbiotyczne utworzone dodatkowo z gammaproteobakterii z rodzaju *Arsenophonus* i *Sodalis* oraz drożdżopodobnych symbiontów z grupy Ascomycota. Autor w przekonujący sposób wyjaśnił przyczynę dość nietypowego umiejscowienia niektórych bakterii w cytoplazmie innych bakterii jako sposobu na uniknięcie rozpoznania i ich eliminacji przez układ immunologiczny owada-gospodarza. Obecność układu symbiotycznego z czterema bakteriami Autor interpretuje jako przejściowy etap zastępowania pierwotnego endosymbionta przez nowe mikroorganizmy, które stosunkowo niedawno zainfekowały gospodarza. Ponadto u niektórych przedstawicieli piewików z rodzaju *Balclutha* stwierdzono obecność jedynie bakterii *Sulcia* z gammaproteobakteriami *Sodalis*, co wskazuje, że owady te prawdopodobnie utraciły w trakcie ewolucji betaproteobakterie z rodzaju *Nasuia*. Jednocześnie w jądrach komórek bakteriocytozów i komórek nabłonka bakteriomu autor zidentyfikował techniką FISH przedstawicieli rodzaju *Wolbachia* i jest to pierwsza udokumentowana obserwacja obecności tej bakterii w jądrach komórkowych. Kolejnym ważnym odkryciem doktoranta jest stwierdzenie występowania w ciele czterech gatunków piewików oprócz bakterii *Sulcia*, symbiontów drożdżopodobnych z typu Ascomycota. Doktorant przeprowadzając analizę zmienności genetycznej sekwencji 16S rDNA bakterii wyciągnął wnioski dotyczące pokrewieństw bakterii i innych symbiontów oraz pluskwiaków-żywcicieli. Wyniki pracy Pana Michała Kobiątki potwierdziły hipotezę o długotrwałej koewolucji endosymbiontów i ich gospodarzy. Ponadto doktorant udowodnił, że mechanizm przekazywania endosymbiontów z pokolenia na pokolenie u Deltoccephalinae pomimo różnych systemów symbiotycznych przebiega na drodze transowarialnej u wszystkich zbadanych gatunków i jest wspólny dla Auchenorrhyncha.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Praca doktorska składa się z podsumowania wyników prowadzonych badań (38 str. w polskim języku) oraz pięciu oryginalnych artykułów w języku angielskim opublikowanych w latach 2015-2018 w recenzowanych czasopismach. We wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem, a jego udział w powstaniu publikacji waha się w poszczególnych pracach od 60% do 70%. Doktorant dołączył oświadczenia współautorów o ich procentowym wkładzie w powstanie publikacji. Pierwszy artykuł został opublikowany w *Polish Journal of Entomology*, a pozostałe w renomowanych czasopismach z listy JCR: *Protoplasma* (IF: 2,870), *Microbial Ecology* (IF: 3,630), *Folia Biologica (Kraków)* (IF: 0,581) i *Arthropod Structure & Development* (IF: 1,546). Do rozprawy został dołączony materiał uzupełniający w postaci Tabeli S1 zawierającej zestawienie badanych gatunków, Tabeli S2 z listą użytych starterów i

sond zastosowanych w badaniach oraz Tabeli S3 z wykazem symbiontów wraz z ich numerami akcesyjnymi w banku genów (GenBank). Dodatkowo na płycie CD autor dołączył trójwymiarową prezentację kuli symbiotycznej utworzonej przez bakterie *Sulcia* i *Nasuia* znajdujące się we wpukleniu oolemy, uzyskanej po zastosowaniu hybrydyzacji *in situ* w mikroskopie konfokalnym. Styl artykułów jest zwięzły a ich układ typowy dla publikacji naukowych.

4. Uwagi krytyczne

W opublikowanych artykułach nie dostrzegłam żadnych istotnych uchybień. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane i przeszły pełny proces weryfikacji, w tym recenzje eksperckie. Nie mam żadnych zastrzeżeń formalnych i merytorycznych.

5. Ocena końcowa (uzasadnienie 25-200 słów):

Pan mgr Michał Kobiątka wykazał się świetną znajomością literatury przedmiotu rozprawy doktorskiej. Zaproponował oryginalne hipotezy badawcze, które zweryfikował w dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach. Wyniki zostały uzyskane przy zastosowaniu dobrze dobranych i różnorodnych metod. Wyciągnięte wnioski są poprawne i nowatorskie. Na podstawie zgromadzonych danych autor opublikował pięć artykułów naukowych w bardzo dobrych czasopismach, w których przygotowaniu miał wiodący udział. Wyniki przedstawione w artykułach w istotny sposób poszerzają wiedzę o endosymbiotycznych mikroorganizmach w ciele pluskwiaków, szczególnie piewików z podrodziny Deltocephalinae oraz mechanizmie ich przekazu z pokolenia na pokolenie. Rozprawa jest dobrze napisana, nie stwierdziłam żadnych błędów ani uchybień.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Kobiątki spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr Michała Kobiątkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, zgodnie z obowiązującymi przepisami, biorąc pod uwagę złożony charakter pracy, umiejętność wykorzystania wielu metod badawczych oraz wysoki poziom merytoryczny publikacji wchodzących w jej skład.

15 maj 2018

.....
data sporządzenia recenzji

A. Morawońska-Nadoclińska
.....
podpis recenzenta