



prof. dr hab. Piotr Świątek

Katowice 8-05-2018

Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt

Uniwersytet Śląski w Katowicach

ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice

piotr.swiatek@us.edu.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Michała Kobiałki “Endosymbiotyczne mikroorganizmy
piewików z podrodziny Deltocephalinae (Hemiptera, Cicadomorpha: Cicadellidae).**

Charakterystyka molekularna, ultrastruktura oraz transowarialny przekaz”

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska pana mgr. Michała Kobiałki wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Szklarzewicz (promotor) i dr Anny Michalik (promotor pomocniczy) oparta jest o pięć oryginalnych artykułów naukowych, w których Doktorant jest pierwszym autorem i ma postać opracowania pod w/w tytułem, w którego skład wchodzi Streszczenie (polsko- i anglojęzyczne), Wstęp, Wykaz artykułów naukowych, Dyskusja, Literatura i Załączniki. Streszczenie, Wstęp i Dyskusja stanowią syntetyczne omówienie pięciu prac badawczych, które wraz z oświadczeniami wszystkich współautorów zamieszczone są w „Załącznikach”. Prace te zostały opublikowane w latach 2015-2018 w pięciu różnych periodykach naukowych o różnej randze: *Polish Journal of Entomology* (brak IF, lista B MNiSW), *Protoplasma* (IF=2,658), *Microbial Ecology* (IF=3,752), *Folia Biologica (Kraków)* (IF=0,636) i *Arthropod Structure and Evolution* (IF=1,690). Wszystkie prace są wieloautorskie (od 3 do 5 autorów), we wszystkich p. M. Kobiałka jest pierwszym autorem a prof.



Szklarzewicz autorem korespondencyjnym. Zawarte w „Załącznikach” oświadczenia wskazują jednoznacznie na wiodącą rolę Doktoranta w prowadzeniu tych badań. Z oświadczeń wynika, iż mgr M. Kobiąłka brał udział w formułowaniu koncepcji badań, zbierał owady oraz preparował i utrwał poszczególne tkanki/komórki, zajmował się badaniami ultrastrukturalnymi i molekularnymi, analizował i interpretował wyniki oraz brał udział w czymś co określono w oświadczeniach jako „przygotowanie” publikacji – zapewne był odpowiedzialny za przygotowanie tablic, schematów, drzew filogenetycznych i współuczestniczył także w samym pisaniu prac (np. tak wynika z oświadczeń autorów w publikacji Kobiąłka i in, 2018b (*Folia biologica*)). Procentowy wkład doktoranta w powstanie publikacji oceniono na 60% (prace Kobiąłka i in, 2015; 2016), 65% (praca Kobiąłka i in, 2018a) i 70% (Kobiąłka i in, 2018b; 2018c). Wkład pozostałych współautorów oceniono znacznie niżej i jednostkowo nie przekracza on 16%. Nie można mieć więc wątpliwości, iż p. M. Kobiąłka realizował i upubliczniał ocenianie badania.

Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

Cykl oryginalnych prac badawczych prezentowany przez p. M. Kobiąłkę dotyczy relacji pomiędzy pluskwiakami różnoskrzydłymi z podrodziny Deltocephalinae (Cicadellidae) z ich symbiontami. Prace te wpisują się w nurt zainteresowań zespołu prof. Szklarzewicz, która od wielu lat wraz ze swoimi wychowankami prowadzi badania ultrastrukturalne pluskwiaków koncentrując się na analizie żeńskich układów rozrodczych oraz na lokalizacji oraz transmisji endosymbiontów. Warsztat badawczy prezentowany w cyklu prac wskazuje, iż do tradycyjnych dla tego zespołu badań elektronowo-mikroskopowych dołożono analizy wybranych sekwencji DNA (16S rDNA w przypadku bakterii i 18S rDNA lub 28S rDNA w przypadku grzybów) oraz metodę detekcji endosymbiontów



dzięki hybrydyzacji *in situ* sondami połączonymi z fluorochromem (metoda FISH). Zastosowana metodyka badań umożliwiła autorom detekcję morfologiczną i molekularną mikroorganizmów, badanie ich pokrewieństw z innymi znanymi mikroorganizmami a także odniesienie się (na tle własnych wyników i dostępnej literatury) do koewolucji układu gospodarz-symbiotyczne mikroorganizmy. Jako obiekt badań wybrano dużą grupę, bo aż 21 gatunków piewików z podrodziny Deltocephalinae, czyli najliczniejszej gatunkowo podrodziny piewików. Do badań zbierano gatunki pospolite, powszechnie występujące w faunie Polski. Ponieważ coraz więcej grup owadów badanych jest pod względem występowania i identyfikacji mikroorganizmów a przedstawiciele Deltocephalinae nie byli do tej pory intensywnie badani wybór grupy badawczej był słuszny. Szczegółowe cele badań i hipotezy badawcze zostały zaprezentowane we Wstępie rozprawy i należy stwierdzić, iż były one ambitne – oprócz takich oczywistych zadań jak analiza histologiczna i ultrastrukturalna endosymbiontów zaplanowano również określenie ich przynależności systematycznej oraz określenie wzajemnych pokrewieństw wykrytych symbiontów oraz na podstawie filogenezy endosymbiontów wnioskowanie na temat wzajemnych pokrewieństw ich gospodarzy.

O wysokiej wartości naukowej badań współprowadzonych przez mgr. M. Kobiąlkę świadczy fakt, iż ukazały się one drukiem w recenzowanych periodykach naukowych. Trudno prowadzić teraz szczegółową recenzję prac, które już były recenzowane przez specjalistów i korygowane przed ostatecznym wydaniem. Skupię się więc krótko na każdej z prac punktując najważniejsze osiągnięcia. Pierwsza praca (Kobiąłka i in, 2015) ukazała się w *Polish Journal of Entomology* – i jest to jedyny periodyk w cyklu prac, który nie posiada współczynnika wpływu. Ponieważ praca metodycznie i merytorycznie nie odstaje od pozostałych nie wiadomo dlaczego nie została opublikowana w czasopiśmie indeksowanym na liście JCR. W pracy wykazano, iż u piewika *Deltocephalus pulicaris* występują dwa gatunki endosymbiontów *Sulcia muelleri* i *Nasuia deltocephalinicola*. Bakterie te



zajmują osobne bakteriocydy i są przekazywane transowarialnie do następnego pokolenia. Sam przekaz odbywa się w sposób typowy dla Cicadomorpha tj. poprzez cytoplazmę komórek folikularnych bakterie dostają się do przestrzeni perioocytarnej oocytów witellogenicznych gdzie formują tzw. kulę symbiotyczną. Taki układ dwóch bakterii symbiotycznych *Sulcia* i *Nasuia* jest typowy dla większości analizowanych Cicadomorpha. W pracy oprócz doskonałej jakości elektronogramów i drzew filogenetycznych badanych bakterii umieszczono także wartościowy schemat owarioli badanego gatunku piewika z zaznaczonym sposobem transmisji endosymbiontów. Wyniki następnych badań dotyczyły piewika *Macrosteles laevis* i zostały opublikowane w czasopiśmie o dużej renomie – *Protoplasma* (Kobiałka i in, 2016). Stosując podobny jak uprzednio aparat badawczy Autorzy wykazali, iż u tego pluskwiaka także występują bakterie z rodzajów *Sulcia* i *Nasuia* (w oddzielnych bakteriocytach), przy czym - i to jest sytuacja wyjątkowa – w obrębie wielu bakterii *Sulcia* zaobserwowano inne bakterie, zidentyfikowane jako bakterie należące do rodzaju *Arsenophorus*. Wszystkie 3 typy bakterii są przekazywane transowarialnie, przy czym bakterie *Arsenophorus* w obrębie bakterii *Sulcia*. Wedle Autorów występowanie *Arsenophorus* wewnątrz innych bakterii ma je chronić przed systemem immunologicznym owada i może świadczyć o niedługiej koewolucji tej bakterii z gospodarzem. Praca zawiera doskonałą jakościowo dokumentację fotograficzną, drzewa filogenetyczne i schemat. Warto tu podkreślić, iż praca ta została doceniona przez specjalistów i wg bazy Web of Science była do tej pory cytowana 13 razy (stan na dzień 7.05.2018) co dla pracy zajmującej się układem nie-modelowym i, która została opublikowana online 3 lata temu jest wynikiem bardzo dobrym. W kolejnej pracy analizowano skład mikroorganizmów 4 gatunków piewików, u których oprócz symbiotycznych bakterii z rodzaju *Sulcia* wykryto także symbionty drożdżopodobne z typu Ascomycota, a praca (Kobiałka i in, 2018a) ukazała się także w renomowanym czasopiśmie *Microbial Ecology*. U trzech badanych gatunków piewików grzyby



znajdowane były w ciele tłuszczowym a u *Cicadula quadrinotata* występowały one głównie w komórkach nabłonka jelita środkowego. Ponieważ nie znaleziono żadnych śladów obecności bakterii *Nasuia* autorzy sugerują, iż u tych piewików nastąpiło całkowite ich wyparcie przez grzyby. Wartą wspomnienia jest też obserwacja, iż u trzech gatunków piewików zarówno bakteria *Sulcia* jak i grzyby są transmitowane do przestrzeni okołozółtkowej oocytów a u gatunku *C. quadrinotata* obserwowano tylko przekaz bakterii. Praca jest dokumentowana wysokiej jakości mikrofotografiami oraz drzewami filogenetycznymi. Kolejna praca (Kobiałka i in, 2018b, *Folia Biologica*, Kraków) przedstawia układ aż sześciu mikroorganizmów u dwóch piewików z rodzaju *Elymana*. Warto zaznaczyć, iż do warsztatu badawczego dołożono w tej pracy technikę FISH, która umożliwia identyfikację poszczególnych typów bakterii na skrawkach histologicznych. Cztery rodzaje bakterii – *Sulcia*, *Nasuia*, *Arsenophorus* i *Sodalis* zostały stwierdzone w bakteriomach – a taki układ (dwa pierwotne endosymbionty oraz dwie różne gammaproteobakterie) nie był opisywany do tej pory u Auchenorrhyncha. Wszystkie cztery rodzaje bakterii są przekazywane transowarialnie. Według Autorów u badanych piewików można obserwować zastępowanie pierwotnych endosymbiontów przez gammaproteobakterie. U niektórych badanych osobników w jądrach komórkowych znajdowano także bakterie z rodzaju *Wolbachia* i *Rickettsia*. Praca, jak zwykle, jest poparta doskonałą dokumentacją. Ostatnia praca w cyklu, opublikowana w bardzo dobrym periodyku – *Arthropod Structure and Development*, wydaje się być najbardziej ambitną. Autorzy poddali analizom 13 gatunków piewików (analiza ultrastrukturalna, molekularna, metoda FISH) i wykazali, iż u 11 z nich występuje układ symbiontów *Sulcia* + *Nasuia*, czyli układ powszechnie występujący w podrodzinie Deltocephalinae. U dwóch gatunków z rodzaju *Balclutha* wykazano obecność bakterii *Sulcia* i gammaproteobakterii *Sodalis* i ten opis układu symbiontów jest nowością dla tej podrodziny piewików. Wszystkie obserwowane symbionty są przekazywane pionowo na następne pokolenie. Oprócz *Sulcia*, *Nasuia* i *Sodalis* w ciele niektórych



osobników z rodzaju *Balclutha* wykazano obecność bakterii *Wolbachia*. Praca ta jest także doskonale ilustrowana, a w dyskusji zwraca uwagę jej poszerzenie o dyskusję na temat filogenezy Dectocephalinae. Warto tu nadmienić, iż dokumentacja pracy znacząco wzbogaca film 3D prezentujący rozmieszczenie bakterii *Sulcia* i *Nasuia* w obrębie kuli symbiotycznej tworzącej się w czasie transmisji tych bakterii u piewika *P. alienus*.

Podsumowując cykl prac należy jednoznacznie stwierdzić, iż stanowią one nowe, oryginalne badania wnoszące całkiem spory ładunek wiedzy na temat lokalizacji, charakterystyki ultrastrukturalnej i molekularnej oraz transmisji symbiotycznych mikroorganizmów zamieszkujących ciała piewików z podrodziny Dectocephalinae. Pan mgr Kobiółka wraz ze współpracownikami wykazał, iż w obrębie tej grupy piewików istnieje duża różnorodność i dynamika systemów symbiotycznych. Chociaż przeważa układ pierwotny *Sulcia* + *Nasuia* to obserwowano układy *Sulcia* + *Nasuia* + *Arsenophorus* + *Sodalis* czy *Sulcia* + *Nasuia* + *Arsenophorus* w obrębie *Sulcia* oraz *Sulcia* + drożdżopodobne grzyby. Jednocześnie Autorzy wykazali, iż pomimo wielu systemów symbiotycznych model transmisji symbiontów z pokolenia na pokolenie jest jednorodny w obrębie badanej grupy i nie wykazuje żadnych modyfikacji. Wszystkie prace są poparte znakomitą dokumentacją i, o czym nie wspomniałem, obszernymi dyskusjami bardzo szeroko odnoszącymi się do poszczególnych aspektów badań. W tym miejscu mogę już więc stwierdzić, iż przedstawiony cykl publikacji spełnia wymagania ustawowe, a w szczególności te 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). Jestem przekonany, iż prace te będą (i już są) cytowane przez specjalistów i docenione za ich bardzo dobry warsztat, osiągnięte wyniki i szeroko prowadzone dyskusje. Trudno w tym miejscu nie zauważyć także, iż przedstawiony cykl aż pięciu prac opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych periodykach w niczym nie odstaje od wartościowego osiągnięcia habilitacyjnego.



Na koniec chciałbym odnieść się do tych części pracy doktorskiej, które nie są cyklem artykułów, ponieważ napisane zostały specjalnie przez Doktoranta na potrzeby rozprawy doktorskiej. Ta część rozprawy, a szczególnie Wstęp i Dyskusja potwierdzają, iż mgr M. Kobiałka jest już specjalistą w swej dziedzinie. We Wstępie krótko zapoznaje On Czytelnika z tem prowadzonych badań, wskazuje cele badań i hipotezy badawcze, omawia zadania badawcze a w Dyskusji omawia na tle dostępnej literatury wyniki uzyskane w cyklu prac wskazując na najważniejsze osiągnięcia. Sam tekst jest pisany jasno i przejrzysto, nie zauważyłem jakiś błędów językowych wartych wspomnienia. Jedyna rzecz jakiej mi tutaj brakuje to jasne odniesienie się do tzw. „głównych hipotez badawczych” postawionych we Wstępie, a w szczególności do hipotezy ostatniej. Chciałbym więc by w czasie obrony Doktorant ustosunkował się do stwierdzenia, iż „otrzymane dane pozwolą na wyciągnięcie wniosków na temat wzajemnych pokrewieństw między poszczególnymi gatunkami Dectocephalinae”. Czy takie wnioski można wyciągnąć już teraz czy jest na to zbyt wcześnie?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Wniosuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. Michała Kobiałkę do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na kompleksowy zakres badań, stosowaną nowoczesną metodykę, osiągnięte rezultaty, które umożliwiły opublikowanie serii pięciu oryginalnych prac badawczych w dobrych i bardzo dobrych periodykach naukowych ta praca doktorska wyróżnia się bardzo pozytywnie na tle innych znanych mi tego typu opracowań i stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

Jan Piórk