



Bydgoszcz, 26 lipca 2019

dr hab. Andrzej Oleksa, prof. UKW
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Al. Powstańców Wielkopolskich 10
85-090 Bydgoszcz
e-mail: olek@ukw.edu.pl

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Tytuł: **Ewolucyjne i ekologiczne interakcje między wybranymi taksonami chrząszczy, a endosymbiotycznymi bakteriami**

Autor: **mgr Michał Kolasa**

Promotor: **Dr hab. Łukasz Kajtoch**

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Michała Kolasy podejmuje temat ekologicznych i ewolucyjnych interakcji endosymbiotycznych, wewnątrzkomórkowych bakterii z grupy tzw. „male-killers” z ich owadzimi gospodarzami. Określenie „male-killers” wiąże się z faktem, że bakterie te przenoszą się między pokoleniami swoich żywicieli wraz z cytoplazmą komórki jajowej, przez co organizm samca jest dla nich ewolucyjnym ślepym zaułkiem. Z tego powodu bakterie wyewoluowały sposoby na manipulację ekspresją płci u swoich gospodarzy, stąd endosymbionty typu „male-killers” mogą być bardzo ważnym czynnikiem w ewolucji swoich gospodarzy. Poznanie bakteryjnych endosymbiontów może mieć duże znaczenie dla zrozumienia mechanizmów ewolucji, co – w połączeniu z rozwojem technik molekularnych – powoduje że badania im poświęcone nabierają w ostatnich latach tempa, min. dzięki pracom prowadzonym przez doktoranta w ramach zespołu badawczego kierowanego przez dr hab. Łukasza Kajtocha. Badania których efektem jest niniejsza rozprawa doktorska były finansowane częściowo z grantów promotora oraz – co należy bardzo docenić – z grantu pozyskanego przez samego doktoranta w ramach programu NCN „Etiuda”.



Przedstawiona do mojej oceny rozprawa ma układ typowy dla osiągnięć naukowych opartych na zbiorze opublikowanych artykułów, a zatem składa się z wprowadzenia (napisanego w języku polskim), do którego dodano same artykuły wraz z materiałami uzupełniającymi.

Podstawą rozprawy jest cykl sześciu publikacji naukowych:

- I. **Kolasa M.**, Kubisz D., Gutowski J. M., Ścibior R., Mazur M. A., Holecová M., Kajtoch Ł (2018) Infection by endosymbiotic „male-killing” bacteria in Coleoptera. *Folia Biologica*, 66 (4), 165-177
- II. Kajtoch, Ł., **Kolasa, M.**, Kubisz, D., Gutowski, J. M., Ścibior, R., Mazur, M. A., Holecová, M.(2019). Using host species traits to understand the Wolbachia infection distribution across terrestrial beetles. *Scientific Reports*, 9(1), 847
- III. **Kolasa, M.**, Montagna, M., Mereghetti, V., Kubisz, D., Mazur, M. A., Kajtoch, Ł. (2017). Preliminary evidence of the horizontal transmission of Wolbachia between *Crioceris* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and their *Asparagus* host plants. *European Journal of Entomology*, 114, 446-454
- IV. **Kolasa, M.**, Kubisz, D., Mazur, M. A., Ścibior, R., Kajtoch, Ł. (2018). Wolbachia prevalence and diversity in selected riverine predatory beetles (Bembidiini and Paederini). *Bulletin of Insectology*, 71, 193-200
- V. Kotásková, N., **Kolasa, M.**, Kajtoch, Ł. (2018). Contrasting patterns of molecular diversity and Wolbachia infection in bisexual and parthenogenetic *Strophosoma* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Entomological Science*, 21(4), 385-395
- VI. **Kolasa, M.**, Ścibior, R., Mazur, M. A., Kubisz, D., Dudek, K., Kajtoch, Ł. (2019). How hosts taxonomy, trophic, and endosymbionts shape microbiome diversity in beetles. *Microbial Ecology*, doi: 10.1007/s00248-019-01358-y

Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu są wieloautorskie i przygotowane przez zespoły od trzech do siedmiu autorów. Mgr Michał Kolasa jest pierwszym autorem w czterech spośród sześciu artykułów, przy czym we wszystkich pracach jego udział w powstaniu publikacji jest wiodący i deklarowany na 50 - 60% (nawiasem mówiąc, nie całkiem rozumiem dlaczego w pracy V doktorant jest drugim autorem, skoro jego wkład przekracza wkład pierwszej autorki, 50% wobec 40%). W niemal wszystkich przypadkach wkład doktoranta polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu prac laboratoryjnych, opracowaniu



bioinformatycznym wyników, ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu. Można więc śmiało powiedzieć, że mgr Kolasa brał udział we wszystkich etapach badań i że to on miał decydujący wpływ na sposób w jaki je zaprojektowano, przeprowadzono i przedstawiono w publikacjach.

Publikacje będące podstawą rozprawy zostały opublikowane w czasopismach naukowych o ugruntowanej renomie, co oznacza, że dorobek przedstawiony do mojej recenzji już był poddany merytorycznej ocenie redaktorów czasopism oraz recenzentów prezentujących uznany, wysoki poziom naukowy. Wskaźnik oddziaływania czasopism, w których opublikowano artykuły, mieści się w przedziale od 0.523 do 4.122 przy średniej 1.906, co jest wartością bardzo dobrą jak na prace z zakresu entomologii. Wszystkie też prace doczekały się cytowań w renomowanych czasopismach, co dowodzi, że zostały dostrzeżone przez społeczność badaczy. Fakty te dowodzą, że publikacje doktoranta wchodzące w skład rozprawy zostały już wielokrotnie poddane krytycznej ocenie innych badaczy i co więcej, oparły się tej ocenie z sukcesem, co jest najlepszym dowodem ich jakości. Publikacje te są na tyle dojrzałym produktem badań, że znalezienie ich słabych stron jest raczej trudnym zadaniem dla recenzenta rozprawy.

Sześć prac wchodzących w skład cyklu, mimo, że są spójne tematycznie, bo wszystkie dotyczą tematyki występowania u chrząszczy endosymbiotycznych bakterii, to równocześnie są zarazem dość różnorodne, gdyż posługują się różnymi narzędziami molekularnymi do rozwiązania zróżnicowanych celów badawczych. Do celów tych autor zaliczył:

- I. Określenie rozpowszechnienia infekcji bakteriami endosymbiotycznymi z grupy „male killers” wśród lądowych chrząszczy.
- II. Określenie, czy między bakterią *Wolbachia* a wybranymi przedstawicielami chrząszczy zachodzi koewolucja.
- III. Prześledzenie korelacji między nosicielstwem bakterii *Wolbachia* przez gatunki chrząszczy a cechami biologicznymi i ekologicznymi taksonów zainfekowanych i niezainfekowanych.
- IV. Przeanalizowanie potencjalnych dróg horyzontalnego przenoszenia infekcji bakterią *Wolbachia*.



- V. Zbadanie, czy infekcja bakterią endosymbiotyczną (*Wolbachia*) była czynnikiem indukującym powstanie partenogenezy u chrząszczy.
- VI. Wskazanie czynników jakie kształtują mikrobiotę chrząszczy oraz określenie roli bakterii endosymbiotycznych w kształtowaniu mikrobiomu.

Wszystkie te cele zostały osiągnięte, co zaliczam do istotnych i oryginalnych elementów rozprawy, decydujących o jej wysokiej wartości merytorycznej.

Materiał do badań zaprezentowanych w publikacjach stanowiły chrząszcze kilkuset gatunków zebranych na licznych stanowiskach zlokalizowanych w wielu krajach, głównie Europy Środkowo-Wschodniej. Sam zbiór tak bogatego materiału badawczego był z całą pewnością dużym wyzwaniem logistycznym i pod tym względem badania te wyróżniają się na tle wcześniejszych prac innych autorów nad określeniem rozpowszechnienia infekcji bakteriami endosymbiotycznymi u owadów, które albo badały liczne osobniki pojedynczych gatunków, albo pojedyncze osobniki większej liczby gatunków. Można więc powiedzieć, że wyniki zaprezentowane w publikacjach I i II są jedną z pierwszych prób oszacowania rozpowszechnienia bakterii z grupy male-killers bazującą na tak szerokim i reprezentatywnym materiale.

Zastosowane metody molekularne są adekwatne do przyjętych celów. Należy pochwalić rygorystyczne procedury zastosowane podczas ekstrakcji DNA w celu zapobieżenia kontaminacji materiału, co może być problemem w badaniach wszędobylskich bakterii. Dla określenia filogenetycznych relacji chrząszczy zintegrowano informację opartą na sekwencjach zarówno mitochondrialnych, jak i jądrowych, co jest bardzo ważne, bowiem obydwa rodzaje markerów mogą skutkować odmienną rekonstrukcją filogenezy. W celu wykrycia i określenia różnorodności bakterii *Rickettsia*, *Cardinium*, *Spiroplasma* i *Wolbachia* wykorzystano szereg różnorodnych starterów, w tym standardowo stosowany fragmenty genu 16S rDNA oraz fragmenty pięciu genów metabolizmu podstawowego używanych do genotypowania bakterii w tzw. systemie Multilocus Sequence Typing (MLST).

Nie mam większych zastrzeżeń jeśli chodzi o sposób opracowania wyników i metody statystyczne. Nie zgodzę się jedynie z opinią doktoranta zawartą na stronie 22: „Z uwagi na specyfikę celów i danych w PUBLIKACJI I analizy statystyczne nie były potrzebne”. Wprost przeciwnie, uważam, że praca bardzo skorzystała by na nieco lepszym opracowaniu



statystycznym. Autorzy ograniczyli się w niej do podania występowania czterech gatunków bakterii na tle listy gatunków chrząszczy oraz obliczeniu proporcji zainfekowanych gatunków. Można było przynajmniej oszacować przedziały ufności wokół oszacowanych proporcji, np. przy użyciu metody bootstrap. Bez tego na podstawie samej lektury PRACY I ciężko jest ocenić, czy poziom infekcji różni się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami. Zapewne konsekwencją tego niedociągnięcia jest niemożność zdecydowania się autora, czy infekcja *Wolbachia* na poziomie 27% jest niższa, czy taka sama jak opisywana dotąd w różnych grupach owadów, dla których wyniki mieszczą się w zakresie 20-70%. We wprowadzeniu na stronie 29 można przeczytać, że jest niższa; następnie w PRACY I (str. 52 oryginalnej pracy) jest podane, że wypada w zakresie opisywanym przez wcześniejsze prace innych autorów; wreszcie w PRACY II (str. 63 pracy) znów pada informacja, że 27% to mniej niż zakres od 20 do 70% spotykany w dotychczasowych publikacjach.

Jeśli chodzi o inne moje wątpliwości: mimo bogactwa wiedzy jaka wyniosłem z lektury rozprawy dr Kolasy, wciąż czuję się nieusatysfakcjonowany brakiem ostatecznych konkluzji co do kierunku zależności przyczynowo-skutkowych w relacjach między chrząszczami a bakteriami. Krótko mówiąc, co wynika z czego – czy cecha chrząszcza wynika z infekcji endosymbiontem czy infekcja endosymbiontem wynika z cech chrząszcza. Czasem mam wrażenie, że autor sugeruje odwrotny kierunek zależności od tego, jakiego można by się spodziewać. Np. w Streszczeniu na stronie 6 jest fragment:

(...) uzyskane dane wskazują, że niektóre kategorie cech (...) mogą być powiązane ze statusem infekcji Wolbachia, natomiast niektóre inne (...) nie mają związku z infekcją. Niemniej jednak nie można mówić o jasnym wzorcu powiązań konkretnych zespołu cech z infekcją.

Doradzał bym raczej odwrócenie kolejności: to podatność na infekcję może mieć związek (czyli może wynikać) z ekologią chrząszcza, a nie na odwrót. Oczywiście trudno jest na podstawie samych danych o charakterze korelacyjnym stwierdzić, jaki jest kierunek oddziaływania, więc nie będę się przy tej krytyce upierał.

Inny przykład – czy np. partenogeneza spotykana u danego gatunku chrząszcza jest wynikiem infekcji, czy na odwrót – obecność bakterii utrwaliła się na skutek partenogenetycznego sposobu rozmnażania. Co jest przyczyną, a co skutkiem? Jeśli bakteria jest określana jako male-killer, to wydawałoby się, że brak samców w populacji to właśnie sprawka bakterii. PUBLIKACJA II



pokazuje dużą różnicę między poziomem infekcji chrząszczy biseksualnych i partenogenetycznych (26% względem 80%), jednak PUBLIKACJA V wskazuje, że partogeneza u jednego z badanych gatunków wynika z jego hybrydowego pochodzenia, natomiast rola *Wolbachia* w powstaniu partenogenezy nie jest dla mnie całkiem jasna. Czy jeśli poliploidyzacja związana z hybrydyzacją wystarcza do powstania nowego, partenogenetycznego gatunku, to czy hipoteza zakładająca udział *Wolbachia* w całym tym procesie nie jest zbędna?

Wreszcie – mimo, że przygotowaną rozprawę uważam za bardzo wartościową pod względem merytorycznym, muszę skrytykować doktoranta za mało staranną pod względem edycyjnym i językowym część wstępną rozprawy napisaną w języku polskim. Spotyka się liczne błędy interpunkcyjne w formie pominięcia przecinka między częściami składowymi wypowiedzeń złożonych albo wstawienie przecinka tam, gdzie jest on zbędny. Tu najlepszym przykładem jest umieszczenie zbędnego przecinka w tytule („Ewolucyjne i ekologiczne interakcje między wybranymi taksonami chrząszczy, a endosymbiotycznymi bakteriami”). Błąd jest fatalny, bo umieszczony w najbardziej eksponowanej części rozprawy. Zgodnie ze *Słownikiem języka polskiego PWN* przed spójnikiem „a” nie stawiamy przecinka, jeśli występuje między wyrazami lub wyrażeniami porównywanymi w połączeniu z wyrazem „między”, tak jak ma to miejsce w tytule rozprawy. Oczywiście problemy z praktycznym posługiwaniem się językiem polskim mają drugorzędne znaczenie z punktu widzenia wartości merytorycznej pracy i nie umniejszają jej znaczenia, gdyż zasadniczą wagę mają oryginalne publikacje napisane w języku angielskim.



Wnioski końcowe

Mgr Michał Kolasa wykazał się odpowiednią wiedzą i umiejętnościami w zakresie projektowania badań biologicznych, analiz laboratoryjnych, opracowania i statystycznej analizy danych oraz pisania publikacji naukowych. Co najważniejsze, udowodnił również, że posiadał umiejętność twórczego i analitycznego myślenia. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne, w głównej mierze mające charakter marginalny lub polemiczny, nie obniżają bardzo wysoką ogólną ocenę przedstawionej rozprawy.

Stwierdzam, że rozprawa p.t. **Ewolucyjne i ekologiczne interakcje między wybranymi taksonami chrząszczy, a endosymbiotycznymi bakteriami** spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym obowiązującą aktualnie w Polsce, wnoszę więc o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy (zwłaszcza wkład do wiedzy na temat interakcji między endosymbiontami bakteryjnymi i chrząszczami) zgłaszam wniosek o wyróżnienie jej w przyjęty przez Radę sposób.

dr hab. Andrzej Oleksa

