

L. dz. DA.520.5.2019

06.11.2019, Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej mgr **Adrien Quiles**

pt. „**Evolutionary histories of symbioses between microsporidia and their amphipod hosts :  
contribution of studying two hosts over their geographic ranges**”

wykonanej na Université de Bourgogne Franche-Comté (Francja) i

Uniwersytecie Łódzkim (Polska)

pod kierunkiem **Dr Thierry Rigaud, Dr Rémi Wattier i Dr hab. Karolina Bąceli**

w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk  
biologicznych w dyscyplinie biologia

#### OCENA FORMALNA

Do wykonania oceny zostałem powołany decyzją Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętą na posiedzeniu w dniu 29.10.2019 r. o czym zostałem poinformowany pismem Przewodniczącego Komisji Prof. dr hab. Andrzej Kruka z dnia 30.10.2018 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera opublikowany już artykuł (1) oraz dwa nieopublikowane manuskrypty (2 i 3), scalone rozdziałami “General Background” i General conclusions and perspectives”.

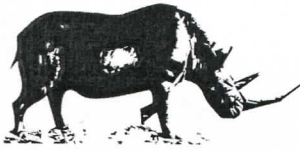
1) Quiles, A., Bacela-Spychalska, K., Teixeira, M., Lambin N., Grabowski M., Rigaud T., Wattier, R. A. (2019). Microsporidian infections in the species complex *Gammarus roeselii* (Amphipoda) over its geographical range: Evidence for both host-parasite co-diversification and recent host shifts. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–20.

2) Exploring host-parasite association between *Gammarus balcanicus* species complex and the diversity of its microsporidian parasites.

3) *Nosema granulosis* (microsporidia) Infecting *Gammarus balcanicus* and *G. roeselii* (amphipoda): a preliminary re-assessment of host-parasite relationship based on RPB1 gene.

W rozprawie ujęte są także: i) spisy literatury; ii) abstrakty (w trzech językach: francuskim, polskim i angielskim).

Rozprawa ma zatem standardowy układ z wyjątkiem spisów literatury przygotowanych odrębnie dla każdego rozdziału, co jednak jest logicznym rozwiązaniem. Wykorzystane piśmiennictwo zawiera pozycje

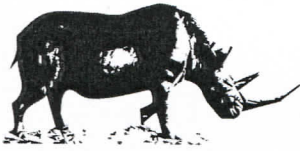


zarówno podstawowe dla podjętej tematyki badawczej jak i najnowsze artykuły naukowe, wszystkie cytowane publikacje zostały użyte w sposób uzasadniony i prawidłowy. Struktura rozprawy jest spójna, a całość jest napisana bardzo dobrze, zarówno pod względem stylu, języka jak i kwestii merytorycznych.

Wkład doktoranta w powstanie opublikowanej pracy jest wysoki (35% wg oświadczenia) co przekłada się na fakt iż jest jej autorem pierwszym oraz korespondencyjnym. Jedyne artykuły w rozprawie zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu (*Parasites & Vectors*, 5 letni IF= 3.342), które jest dobrze rozpoznawane w środowisku naukowym.

#### OCENA SZCZEGÓŁOWA

Rozdział ("General Background") jest bardzo ważnym wstępem do rozprawy i bardzo ułatwia odbiór kolejnych rozdziałów. Część ta wyczerpująco wyjaśnia wszystkie główne podstawy tematu, konieczne do zrozumienia badanych grup organizmów, ich relacji i molekularnych podstaw ich badań. Ciekawym uzupełnieniem tego rozdziału są liczne grafiki, nie będące autorstwa doktoranta, a zaczerpnięte z kilku publikacji (z zachowaniem odpowiedniego cytowania źródeł). Rozdział wstępny zwięźle ale wyczerpująco wyjaśnia: i) ko-ewolucyjne wzorce i procesy zachodzące między różnymi organizmami z naciskiem na pasożytnictwo; ii) taksonomię, systematykę i filogenetykę mikrosporydiów oraz ewolucyjne i ekologiczne zależności z ich gospodarzami; iii) rozmieszczenie, filogenezę i ekologię obunogów z grupy Gammaridae, szczególnie rodzaju *Gammarus*; iv) związków między mikrosporydiami i ich gospodarzami, szczególnie z grupy obunogów. W tej ostatniej części przedstawiona jest Tabela 1, która jest ważnym podsumowaniem aktualnej wiedzy nt. mikrosporydiów infekujących obunogi. Tabela ta, sama w sobie jest istotnym wkładem w dziedzinę, która mogłaby być podstawą osobnego artykułu-rewizji. Wstęp kończy się przedstawieniem celów doktoratu. W skrócie, badania te miały na celu obszerne scharakteryzowanie zróżnicowania różnorodności mikrosporydiów infekujących dwa kompleksy gatunkowe obunogów: *Gammarus roeselii* i *Gammarus balcanicus* w całym ich zasięgu geograficznym oraz wśród silnie dywergentnych molekularnych operacyjnych jednostek taksonomicznych gospodarzy. Główne pytanie podjęte przez Pana Quiles dotyczyło sprawdzenia czy biogeograficzna historia gospodarzy (wybranych gatunków *Gammarus*) wpływała na zróżnicowanie mikrosporydiów. Rozprawa zawiera rozwiązanie kilku kwestii: i) wyjaśnienie wzorców i specyficzności infekcji; ii) poznania ekologicznych i ewolucyjnych scenariuszy, które doprowadziły do obserwowanych wzorców infekcji; iii) zbadanie nierównowagi w rozpowszechnieniu mikrosporydiów w samcach i samicach gospodarzy; iv) porównanie zróżnicowania mikrosporydiów w oparciu o dwa markery molekularne dla lepszego zrozumienia filogenezy i ekologicznych interakcji z gospodarzami. Cele zostały sformułowane w sposób prawidłowy oraz są przedstawione w sposób umożliwiający naukowe rozstrzygnięcie podjętych problemów badawczych.



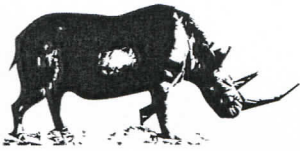
Istotne jest podkreślenie, że badania te były możliwe dzięki wcześniejszym pracom Mamos et al. (2016) i Grabowski et al. (2017a, b), którzy opracowali filogenezę i filogeografię wybranych gatunków *Gammarus*.

Metody zastosowane w rozprawie – bazujące na analizie sekwencji wybranych markerów genetycznych z zastosowaniem metod filogenetycznych, filogeograficznych i z zakresu ewolucji i ekologii molekularnej, zostały dobrane adekwatnie do celów rozprawy oraz opisane w sposób klarowny i merytoryczny.

Kolejne trzy rozdziały zawierają zasadnicze części rozprawy: artykuł naukowy i dwa manuskrypty. Ogólne założenia rozdziałów I i II są bardzo podobne ponieważ oba opisują zróżnicowanie mikrosporydiów i odkrywają relacje z ich gospodarzami należącymi do dwóch kompleksów gatunkowych w rodzaju *Gammarus*: *G. roeselii* (rozdział I) i *Gammarus balcanicus* (rozdział II). Także wstęp i metody użyte w tych badaniach są bardzo podobne, jednak wyniki i dyskusje w tych badaniach są niezależne. W skrócie, oba tematy wykorzystują dane genetyczne (markerem jest gen dokujący małą podjednostkę rybosomalnego RNA) uzyskane z mikrosporydiów zasiedlających osobniki *Gammarus* w całym zasięgu obu gatunków-gospodarzy.

Rozdział I informuje o stwierdzeniu 24 haplogrup mikrosporydiów (zgrupowanych w 18 taksonach o randze gatunków), wśród których 10 gatunków stwierdzonych rzadko i nie były one specyficzne gatunkowo. Inne stwierdzone rodzaje mikrosporydiów były rozpowszechnione i liczne: *Nosema* (1 gatunek), *Cucumispora* (3 gatunki) i *Dictyocoela* (3 gatunki). Podsumowując, mikrosporydia infekujące *G. roeselii* wskazywały na dwa scenariusze związków gospodarzy z pasożytami: i) dawne związki związane z wertykalnym przekazywaniem pasożytów między gospodarzami i prawdopodobnym wspólnym różnicowaniem z gospodarzami jak w przypadku: *N. granulosis* i *D. roeselum*; ii) zmiany gospodarzy z horyzontalnym przenoszeniem pasożytów z lokalnych obunogów po polodowcowej ekspansji gatunków *Gammarus* jak w przypadku *D. muelleri* i trzech gatunków *Cucumispora*.

Rozdział II informuje o stwierdzeniu 55 haplogrup mikrosporydiów (zgrupowanych w 17 taksonach o randze gatunków), wśród których 12 gatunków stwierdzonych rzadko i nie były one specyficzne gatunkowo. Inne stwierdzone rodzaje mikrosporydiów były rozpowszechnione i liczne: *Nosema* (1 gatunek), i *Dictyocoela* (3 gatunki). Podsumowując, mikrosporydia infekujące *G. balcanicus* wykazały podobne wzorce jak te stwierdzone u *G. roeselii*: i) dawne różnicowanie się w gospodarzach *N. granulosis*, *D. muelleri* i *D. roeselum*; ii) taksony rozpowszechnione w różnych gospodarzach dzięki horyzontalnej transmisji (*D. duebenum* i *D. berillonum*). Dodatkowo, ten rozdział prezentuje szczegóły infekcji mikrosporydiów w płciach gospodarzy dowodząc nadreprezentacji zainfekowanych samców w niektórych populacjach.



ISEZ PAN

# Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk

ul. Sławkowska 17 • 31-016 Kraków

Ostatni rozdział (III) jest odmienny ponieważ omawia infekcję przez tylko jeden gatunek *Nosema granulosis* w zasięgu *Gammarus balcanicus* i *G. roeselii*. Badania te różnią się od poprzednich zastosowanymi metodami tj. użyciem bardziej polimorficznego genu (RPB1), który występuje pojedynczo w genomie. Cele tego rozdziału zawierają opracowanie szczegółów filogenezy i filogeografii mikrosporydiów infekujących wybranych gospodarzy z rodzaju *Gammarus* i opisują scenariusze historii ewolucyjnych układu gospodarz-pasożyt w celu wyjaśnienia zbieżności geograficznego zróżnicowania obu grup organizmów. Chociaż sukces amplifikacji genu RPB1 był znacznie niższy niż SSU (można było przebadac jedynie 56% zainfekowanych osobników) to umożliwiło to lepsze zrozumienie ewolucji *N. granulosis* i interakcji z gospodarzami. W skrócie, mikrosporydia zainfekowały gospodarzy z rodzaju *Gammarus* na początku procesu ich różnicowania i te linie były następnie transmitowane wertykalnie, natomiast inne linie pasożytów najwyraźniej były przekazywane horyzontalnie.

Rozdział "General conclusions and perspectives" zwięźle podsumowuje uzyskane wyniki i wnioski nt. filogeografii i eko-ewolucyjnych interakcji mikrosporydiów z ich gospodarzami-obunogami. Warty podkreślenia jest to, że w tym rozdziale Pan Quiles krytycznie prezentuje swoje badania, podsumowując możliwe problemy z analizami i ograniczenia wnioskowania w oparciu o niepełne dane. Ważnym rozszerzeniem tego rozdziału są perspektywy dalszych badań, wliczając w to użycie większej liczby loci i badań całych genomów.

W mojej opinii wszystkie części rozprawy są przykładami rozważnie zaprojektowanych, bardzo dobrze przeprowadzonych i zwięźle zakończonych projektów naukowych. Badania nad relacjami między mikrosporydiami i obunogami są istotnym wkładem w naukę, szczególnie w systematykę i filogenezę obu grup taksonomicznych, a także ewolucję i ekologię molekularną układu gospodarz-pasożyt. Według mojej wiedzy, jest to pierwsze tak kompleksowe opracowanie tematyki, które będzie mieć znaczący wpływ na przyszłe badania w dziedzinie i powiązanych tematach badawczych. Moim zdaniem najważniejszym rezultatem rozprawy jest rozdział ostatni (III), który znacząco rozszerza aktualny stan wiedzy na temat zróżnicowania mikrosporydiów infekujących obunogi z grupy Gammaridae. Rozdział ten powinien być dobrym punktem startowym do dalszych, bardziej złożonych na temat filogenezy, filogeografii i eko-ewolucyjnych relacji tej grupy endopasożytów. Spodziewam się, że oba manuskrypty (rozdziały II i III) będą wkrótce opublikowane i dostępne szerokiemu gronu naukowców.

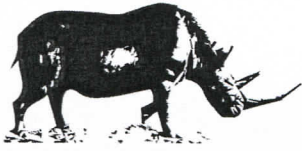
Zadaniem recenzenta jest wskazanie zarówno mocnych, jak i słabszych stron rozprawy doktorskiej. Poniżej chciałbym zwrócić uwagę na kilka aspektów badań i publikacji, które w mojej ocenie powinny być rozważone i wyjaśnione przez Doktoranta w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej i w korekcie manuskryptów przed ich publikacją.

Uwagi do "General background"

Telefon: (12) 422 19 01 • Fax: (12) 422 42 94 • E-mail: office@isez.pan.krakow.pl

REGON • 000326227 NIP • 675 000 18 86

www.isez.pan.krakow.pl



R01 – na str. 19 znajduje się informacja, że *G. balcanicus* występuje w Karpatach Wschodnich, Bałkanach i wschodnich Alpach, podczas gdy na Ryc. 10 ten kompleks jest zaznaczony także na Krymie i w Azji centralnej.

R02 – na str. 29 skrót MOTUs jest niewyjaśniony a powinien ponieważ pojawia się tu po raz pierwszy.

*Uwagi do Rozdziału I*

R03 - str. 51, część dotycząca izolacji DNA – Jestem ciekaw czy wydajność obu metod została porównana? Czy autorzy testowali to na jakichś próbkach? Ciekawi mnie czy detekcja niektórych gatunków lub haplogrup mogła być utrudniona w efekcie izolacji różnymi metodami lub w efekcie użycia DNA z poprzednich badań, które mogło być zdegradowane przez czas/warunki jakie minęły od izolacji?

R04 - str. 52, sekwencjonowanie SSU – Jestem ciekaw czy Autor znalazł osobniki gospodarzy (izolaty), które były zainfekowane przez więcej niż więcej niż jeden takson (lub haplogrupę) mikrosporydiów? Jeżeli tak – jak poradzono sobie z obecnością wielu wariantów sekwencji w chromatogramach?

Ciekawi mnie jakie mogły być powody problemów z amplifikacją dłuższych fragmentów?

Może problem wynikał z użycia tylko primera forward w sekwencjonowaniu? Zastanawia mnie dlaczego primer reverse nie został użyty celem zwiększenia długości sekwencji?

R05 - str. 53, ko-filogenetyka – Nie jestem przekonany, czy takie porównanie można zrobić “na oko” – mogłoby to prowadzić do bardzo subiektywnych wniosków. Może program Procrustean Approach to Cophylogeny (PACo) mógłby być tutaj pomocny (Balbuena PLOS ONE 8, e61048 2013) jako, że dowiedziono użyteczności tej metody w badaniach ko-specjacji bakterii i gospodarzy.

R06 – str. 61, “... are food-borne microsporidia just passing through the gut.” – Nie jestem pewny dlaczego nie można tego było rozstrzygnąć? W metodyce znajduje się informacja, że izolacja DNA była wykonana z mięśni i gonad, zatem w próbkach nie powinno być DNA z pasożytów obecnych w przewodzie pokarmowym gospodarza.

R07 – str. 62 – Skrót RPB1 powinien być wyjaśniony.

*Uwagi do Rozdziału II*

R08 – Ryc. 2 – Czechy są niepoprawnie podpisane za pomocą skrótu PL.

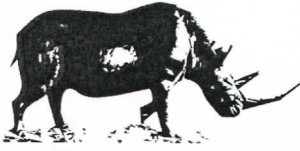
R09 – str. 75, izolacja DNA – jak w R03

R10 – str. 76-77, sekwencjonowanie SSU – jak w R04

R11 – str. 79, ko-filogenetyka - jak w R05

R12 – str. 84 – Powinno być raczej “located in Hungary, Romania and **Serbia**” jeżeli Ryc. 4 jest poprawna?

R13 – str. 85 – Powinno być raczej “each individual coming from a single population from Slovakia, Romania, **Croatia** and **Ukraine(?)**” jeżeli Ryc. 4 jest poprawna?



R14 – str. 86 – Powinno być raczej “present in 3 individuals from 1 population in **Romania** jeżeli Ryc. 4 jest poprawna?

R15 – str. 88 - Powinno być raczej “Only the last haplogroup, *N. granulosis* **b02** was restricted to 1 individual from **Montenegro**.” jeżeli Ryc. 4 jest poprawna?

*Uwagi do Rozdziału III*

R16 – str. 129 – jak w R08

R17 – str. 141, “This was a necessary strategy, instead of designing primers specific to our *N. granulosis*, since we did not know a priori the level of variation hidden behind our other SSU haplogroups.” – Wydaje mi się że wynik można było osiągnąć z użyciem mieszaniny specyficznych primerów i następnie klonowania przed sekwencjonowaniem Sangera lub sekwencjonowania NGS miksu amplikonów.

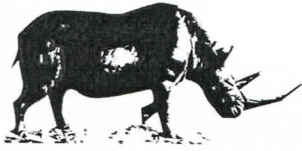
R18 – str. 145, “We were unable to discriminate if these observations are due to heterozygous individuals or to bi-infections involving two haplogroups in the same individuals.” – To mogło być wykonane z użyciem klonowania. W przypadku osobników heterozygotycznych proporcja sekwencji powinna być równa, a w przypadku infekcji podwójnej, udział obu alleli w sekwencjach powinien odbiegać od równowagi.

R19 – w całym manuskrypcie są używane dwie nazwy: *Cucumispora roeselii* lub *Cucumispora roeselum* – która jest poprawna?

Powyżej wymienione uwagi i pytania dotyczące recenzowanej rozprawy odnoszą się do mniej istotnych kwestii lub brakujących informacji, lub są raczej dyskusją nt. wykorzystanych metod w tych badaniach, niż krytycznymi uwagami i żadne z nich nie dotyczą punktów kluczowych, które wymagałyby poważniejszych zmian w rozprawie.

Pan Quiles swoją rozprawą doktorską dowiódł, iż ma rozległą wiedzę na temat prowadzonych badań naukowych. Wykazał specjalistyczną wiedzę na temat systematyki i ewolucji zarówno obunogów jak i mikrosporydiów, a także metod i narzędzi stosowanych w analizach molekularnych z zakresu filogenetyki i filogeografii. Doktorant pokazał także, że jest zdolny do projektowania nowych pomysłów badawczych. Dodatkowo, jego badania doprowadziły do opracowania bazy markerów dwóch rodzajów (SSU i RPB1) dla dużej grupy mikrosporydiów (szczególnie dla *N. granulosis*), co jest istotnym wkładem w systematykę tej grupy.


Najlepszym wyznacznikiem obecności Pana Quila w dyskursie naukowym jest to, że w jego rozprawie jest zawarty artykuł opublikowany w czasopiśmie o dużej renomie, a także to, że jest autorem dalszych trzech artykułów i jednego doniesienia konferencyjnego (jakość tych opracowań została już oceniona przez ekspertów).



WNIOSEK KOŃCOWY

Uwzględniając wysoką jakość prezentowanego artykułu i manuskryptów oraz znaczenie otrzymanych danych i wniosków, uważam, że rozprawa doktorska Pana Adrien'a Quiles **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim**, w świetle obowiązujących przepisów, a w szczególności spełniają warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst. jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), a także rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. z 2011 r., nr 196 poz. 1165) i rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r., poz. 261), w związku z art. 179 ust. 1 i 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.).

**Wnoszę do Komisji Université de Bourgogne Franche-Comté i Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Adrien'a Quiles do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

  
dr hab. Łukasz Kajtoch