

27. 04. 2023

Dziękuję Wydziału  
Biotechnologii i Ogrodnictwa URK



**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN**  
**PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**  
**PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE**  
**NATIONAL RESEARCH INSTITUTE**

tel. centrala: +(4822)7334500, e-mail: postbox@ihar.edu.pl  
<http://www.ihar.edu.pl>, REGON 000079480, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008  
Nr konta: PEKAO I/O Błonie, 54 1240 2164 1111 0000 3561 7204

**Dr hab. Michał Kwiatek**  
**Zastępca Dyrektora ds. naukowych**  
e-mail: m.kwiatek@ihar.edu.pl  
tel. +(48 22) 725 45 03

Radzików, dnia 20 kwietnia 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Dariusza Kadłuczki pt.:**  
**„Analiza porównawcza dzikich taksonów z rodzaju *Daucus* L. na podstawie**  
**danych cytogenetycznych oraz wybranych cech morfologicznych**  
**i anatomicznych”**

Praca doktorska, której dotyczy niniejsza recenzja, została wykonana w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii, na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Ewa Grzebelus, prof. URK. Recenzję pracy wykonano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie nr RD-27/2023 z dnia 06 kwietnia 2023 r., zawierającej informację o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi zbiór opatrzonych komentarzem trzech artykułów naukowych, opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej, które są spójne tematycznie i stanowią podstawę dysertacji, co dopuszcza artykuł 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574.

Prezentowane badania zostały zrealizowane w ramach realizacji projektu badawczego PRELUDIUM 18 pod tytułem „Powiązania ewolucyjne w rodzaju *Daucus*: cytogenetyczna i morfoanatomiczna analiza porównawcza dzikich krewniaków marchwi”, w latach 2020-2023, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (UMO-2019/35/N/NZ9/00959), którego kierownikiem był Doktorant. Ponadto, badania te częściowo sfinansowano ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji celowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w latach 2018–2019. Projekt pt.: „Porównawcza analiza dystrybucji chromosomowej sekwencji repetytywnych u wybranych gatunków podrodziny *Apioideae*”, kierowany był także przez mgr inż. Dariusza Kadłuczkę.

Trzy prace naukowe będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, tj.:

- P1. Kadłuczka D., Grzebelus E. 2021. Using carrot centromeric repeats to study karyotype relationships in the genus *Daucus* (*Apiaceae*). BMC Genomics, 22, 508.
- P2. Kadłuczka D., Sliwiska E., Grzebelus E. 2022. Combining genome size and pollen morphology data to study species relationships in the genus *Daucus* (*Apiaceae*). BMC Plant Biology, 22, 382.



P3. Kadluczka D., Grzebelus E. 2022. Comparative fruit morphology and anatomy of wild relatives of carrot (*Daucus*, *Apiaceae*). *Agriculture*, 12, 2104.

zostały opublikowane w latach 2021-2022 a ich sumaryczny wskaźnik wpływu Impact Factor wg Journal of Citation Reports wynosi 13,226 punktów. Co więcej, Doktorant jest współautorem czterech innych publikacji, w tym pierwszym autorem jednej z nich. Pan magister wykazał także współautorstwo siedmiu doniesień konferencyjnych. Zgodnie z zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej recenzent powinien dokonać analizy merytorycznej osiągnięć naukowych kandydata, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, zapoznać się z publikacjami i stwierdzić, czy rezultaty jego aktywności naukowej wniosły istotny wkład do nauki. Recenzent powinien być zdolny do dokonania takiej oceny merytorycznej bez konieczności analizy bibliometrycznej. Dlatego też w tym miejscu pragnę podkreślić, że dokonałem oceny wartości merytorycznej uzyskanych wyników oraz manuskryptu pracy doktorskiej Pana mgr. Dariusza Kadłuczki, natomiast powyższe przytoczenie wskaźników bibliometrycznych dla czasopism, w których te prace zostały opublikowane ma charakter jedynie informacyjny. Wszak sam dr Eugene Garfield, twórca współczynnika Impact Factor, stwierdził, że ten czynnik nie jest wyznacznikiem indywidualnej oceny naukowca, lecz to jest tylko narzędziem do porównywania czasopism w obrębie jednej dyscypliny.

Z oświadczeń zamieszczonych na stronach 90-96 wynika, że Pan mgr inż. Dariusz Kadłuczka brał udział zarówno w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej badań, jak i w analizie i interpretacji wyników, a także w opracowaniu pierwotnych wersji manuskryptów oraz uczestniczył w opracowaniu korekt tekstów prac po recenzjach. Był współautorem korespondencyjnym dwóch prac. Co warte podkreślenia, Doktorant zdobył fundusze na badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej z dwóch, wyżej przytoczonych źródeł.

Artykuły naukowe wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej zostały już zrecenzowane na etapie zatwierdzania publikacji do druku. Moja rola jako recenzenta niniejszej rozprawy doktorskiej sprowadza się do oceny formalnej rozprawy doktorskiej a także oceny merytorycznej badań zawartych w rozprawie oraz ich spójności a także oceny tekstu rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska Pana mgr. inż. Dariusza Kadłuczki zawiera 96 stron i jest uporządkowana według następującego podziału:

- Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz wykaz pozostałego dorobku naukowego;
- Wykaz stosowanych skrótów;
- Autoreferat rozprawy, w którego skład wchodzi następujące podrozdziały:
  - Streszczenia w języku polskim i angielskim,
  - Wprowadzenie,
  - Hipotezy i Cele pracy,
  - Materiał i metody,
  - Streszczenia prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej,
  - Podsumowanie i wnioski,
  - Literatura,
  - Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów.



Swoją recenzję chciałbym rozpocząć od oceny streszczenia pracy, które rzeczowo i wyczerpująco przedstawia treści zawarte w rozprawie doktorskiej. W tym miejscu chciałbym poruszyć temat niebędący bezpośrednio związany z niniejszą rozprawą doktorską, ale warty dyskusji szczególnie w dzisiejszych czasach, w gronie obecnych i przyszłych pokoleń ludzi nauki. Pragnę odnieść się do słów wprowadzających do pracy, mówiących, iż: cyt.: „*Aby sprostać wzrastającemu zapotrzebowaniu na żywność oraz zapewnić bezpieczeństwo żywnościowe dla stale rosnącej populacji ludności, hodowcy wymagają dostępu do nowych zasobów genetycznych, które mogłyby być wykorzystane w programach hodowlanych w celu poszerzenia zmienności genetycznej roślin uprawnych”.* Moim zdaniem pierwszy człon zdania wprowadzającego, mówiący o wzroście zapotrzebowania na żywność, to zbyt skrót myślowy, który zadomowił się na stałe w pracach naukowych dotyczących szeroko rozumianej produkcji żywności. Ma on swoje źródło w analizach, które przewidują wzrost liczby ludności do 9 mld w 2050 roku, z czego dwie trzecie będzie mieszkać w miastach, co sugeruje potrzebę zwiększenia światowej produkcji żywności o ponad 50 procent. Z drugiej strony, na co chcę zwrócić szczególną uwagę, Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) podaje, że na świecie produkuje się prawie 4 mld ton żywności, z czego co roku marnowanych jest 1 mld 300 mln ton żywności nadającej się do spożycia, czyli jedna trzecia wyprodukowanej. To nie tylko problem ekonomiczny i ekologiczny, ale przede wszystkim etyczny. To problem dystrybucji i efektywnego wykorzystania żywności (szczególnie w krajach rozwiniętych), którego przyczyną są głównej mierze zależności finansowo-polityczne. W efekcie na świecie pod względem poziomu wyżywienia można wyróżnić 3 grupy państw: państwa nadmiernego wyżywienia, państwa wystarczającego wyżywienia oraz państwa głodu i niedożywienia. Zatem bardziej skłaniałbym się ku drugiemu członowi zdania wprowadzającego do pracy, iż dostęp do nowych zasobów genetycznych jest kluczowy dla zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, gdyż w perspektywie do 2050 roku pojemność gruntów ornych prawdopodobnie nie wzrośnie znacząco. Ponadto konkurencja o ziemię spowodowana urbanizacją oznacza kurczenie się gruntów rolnych, zwłaszcza na obszarach podmiejskich. Dodatkowo mamy także do czynienia ze zmianami klimatycznymi i presją patogenów.

Rozdział „Wprowadzenie” prezentuje obecny stan wiedzy będącej podstawą przedmiotowej pracy badawczej. Ta część pracy napisana jest w sposób szczegółowy, a zarazem przejrzysty. Na początku Autor przedstawił rodzaj *Daucus*, argumentując znaczenie marchwi uprawnej oraz pokrewnych jej gatunków w aspektach gospodarki żywnościowej. W dalszej kolejności Doktorant opisał dotychczasową wiedzę w zakresie badań filogenetycznych nad tym taksonem oraz scharakteryzował dogłębnie genom marchwi uprawnej oraz wyniki badań cytogenetycznych, dotyczących struktury i organizacji chromosomów tego gatunku. Na uwagę oraz wysoką ocenę zasługuje szczegółowy opis dotychczasowych badań nad analizą porównawczą występowanie sekwencji powtarzalnych w genomie marchwi, a w szczególności sekwencji powtarzalnych CentDc, charakterystycznych dla rejonów centromerowych chromosomów tego gatunku. W tym miejscu Autor zreferował literaturę tematu opisującą analizy porównawcze występowania ww. sekwencji w gatunkach pokrewnych. Wprowadzenie zostało zwieńczone uzasadnieniem podjęcia tematu badawczego, co należy uznać za zaletę tego opracowania. W tym uzasadnieniu czytamy, iż pomimo opisanego wyżej szeregu badań w tym temacie, nadal istnieje potrzeba weryfikacji liczby chromosomów i wielkości genomu nieuprawnych przedstawicieli rodzaju *Daucus*. Autor trafnie zauważył, iż konieczne są dalsze badania z zakresu cytogenetyki molekularnej, zawartości jądrowego DNA i sekwencji powtarzalnych w obrębie *Daucus* w celu zrozumienia mechanizmów biorących



udział w specjacji tych gatunków i organizacji ich genomu na poziomie chromosomowym.

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił hipotezy badawcze oraz cele badań. Autor stwierdził, że cyt.: „rosnąca świadomość znaczenia dzikich krewniaków roślin uprawnych dla kształtowania współczesnego rolnictwa stały się asumptem do podjęcia badań nad dzikimi gatunkami rodzaju *Daucus*”. Biorąc powyższe pod uwagę, moim zdaniem brakuje we Wprowadzeniu podrozdziału opisującego dotychczasowe badania genetyczno-hodowlane nad wykorzystaniem gatunków pokrewnych do poszerzenia puli genetycznej marchwi uprawnej. Odnosząc się do zaprezentowanych hipotez, tj.:

- 1) Zidentyfikowane w genomie marchwi uprawnej sekwencje powtarzalne CentDc występują również w genomach jej dzikich krewniaków i są zlokalizowane w przewężeniach pierwotnych (centromerach) ich chromosomów, dzięki czemu mogą służyć jako centromerowo specyficzne markery cytogenetyczne;
- 2) Gatunki rodzaju *Daucus* różnią się między sobą pod względem zawartości jądrowego DNA, morfologii pyłku oraz morfologii i anatomii owoców;
- 3) Zawartość jądrowego DNA, cechy palinologiczne oraz cechy morfo-anatomiczne owoców mogą pomóc w identyfikacji gatunków rodzaju *Daucus*;

bardzo wysoko oceniam sformułowanie pierwszej z nich. Mam natomiast wątpliwości odnośnie konstrukcji drugiej hipotezy. Moim zdaniem oczywistym jest fakt, że gatunki należące do konkretnego rodzaju będą się różnić pod względem zawartości jądrowego DNA, morfologii, anatomii itp. Pytanie bądź hipoteza powinna dotyczyć mechanizmu lub zależności związanego z tym faktem, którego istnienie chcemy udowodnić lub odrzucić. Podobne wątpliwości budzi trzecia hipoteza. Faktem jest przecież, że cechy takie jak zawartość jądrowego DNA a w zasadzie jego wielkość, wyrażona w jednostkach wagowych lub liczbie par zasad oraz cechy morfo-anatomiczne są swoistymi markerami w analizie filogenetycznej. W tym przypadku można zadać pytanie lub sformułować hipotezę dotyczącą mechanizmów ewolucyjnych kształtujących wielkość genomu u gatunków z rodzaju *Daucus*. Do tego aspektu wrócę w dalszej części mojej recenzji.

Rozdział „Materiały i Metody” jest opisany w sposób wyczerpujący bez zbędnego powielania informacji z opublikowanych prac. Doktorant w sposób trafny dobrał zarówno materiał roślinny jak i metody badań. Na wyróżnienie zasługuje zestawienie materiału roślinnego w tabeli nr 1, która obrazuje jakie akcesje były analizowane w poszczególnych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, co dowodzi spójności tematyki badań, wymaganej ustawą. Ponadto jako recenzent chcę podkreślić szeroki zakres oraz wysoki stopień zaawansowania zastosowanych przez Doktoranta metod i technik badawczych w postaci cytometrii przepływowej, mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

W dalszej części pracy Autor dokonał streszczenia trzech artykułów naukowych wchodzących w skład jego rozprawy doktorskiej. W pracy P1 Doktorant wraz z Panią Promotor opublikowali wyniki badań dotyczących mapowania sekwencji powtarzalnej CentDc – zidentyfikowanej w genomie marchwi uprawnej – w chromosomach wybranych przedstawicieli taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Dodatkowym celem tej pracy było przeprowadzenie dokładnych analiz struktury i organizacji chromosomów u części z tych taksonów. W badaniach użyto sondy molekularnej o długości 36 nukleotydów, którą zaprojektowano na podstawie sekwencji konsensusowej dla podjednostek



oryginalnego powtórzenia centromerowego CentDc marchwi. **W tym miejscu chciałbym poprosić Doktoranta o rozwinięcie tej informacji i przedstawienie procesu projektowania i generowania ww. sondy i opisanie jej sekwencji nukleotydowej.** W wyniku analiz obserwowano sygnały sondy CentDc w obszarach centromerowych wszystkich chromosomów analizowanych obiektów, natomiast u gatunku *D. aureus* jedna para chromosomów zawierała – poza sygnałami centromerowymi – dodatkowe sygnały. **Jak to wyjaśnić? Czy jest to poszlaka wskazująca na możliwość rearanżacji chromosomowej w postaci translokacji? Czy próbowano w tym przypadku użyć innych sond w celu zbadania struktury tego chromosomu?** Ponadto, Autor opisuje fakt, iż w przypadku *Astrodaucus littoralis* – jedyne gatunku nienależącego do rodzaju *Daucus*, u którego wykryto obecność powtórzeń CentDc – sygnały znajdowały się na czterech parach chromosomów, jednakże nie udało się jednoznacznie określić, czy sygnały te obejmowały regiony centromerowe. **W tym miejscu chciałbym poprosić Doktoranta o doprecyzowanie i rozwinięcie tego wątku. Jak wyglądała dystrybucja sygnału sondy CentDc w chromosomach przedstawiciela gatunku *A. littoralis*?** W podsumowaniu opisu wyników opublikowanych w pracy P1, Doktorant słusznie stwierdza przydatność sekwencji, a w zasadzie sondy molekularnej bazującej na sekwencji CentDc do identyfikacji centromerów w chromosomach gatunków rodzaju *Daucus* oraz do precyzyjnych pomiarów chromosomów. **To zdanie powinno być ujęte we wnioskach niniejszej rozprawy doktorskiej.**

W publikacji P2, Doktorant wraz z współautorami przedstawili wyniki analiz zawartości jądrowego DNA w genomach wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych. W tym miejscu raz jeszcze pragnę docenić dobór metod badawczych oraz wyrazić podziw dla umiejętności i bogatego warsztatu badawczego mgr. inż. Dariusza Kadłuczki, w tym znajomości technik opartych na cytometrii przepływowej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej. W wyniku badań Autor wskazał na zróżnicowanie zawartości jądrowego DNA wśród taksonów rodzaju *Daucus*, w zakresie od 0,999 pg u marchwi uprawnej ( $2n = 18$ ) do 3,228 pg u *D. littoralis* ( $2n = 20$ ). Taksony należące do kladu *Daucus* I cechowała mniejsza wielkość genomu (1C DNA) w porównaniu z przedstawicielami kladu *Daucus* II, z wyjątkiem *D. muricatus* ( $2n = 22$ ; *Daucus* I), którego genom był dwukrotnie większy niż genom pozostałych taksonów tego kladu. **Jak wytłumaczyć fakt, że rozmiary genomu gatunków należących do kladu *Daucus* I są najmniejsze?** Z ostatnich doniesień wiemy (Ecol Evol. 2021; 11: 2660– 2668. <https://doi.org/10.1002/ece3.7222>), że rozmiar genomu jest m.in. dodatnio skorelowany z obecnością elementów ruchomych. Z literatury wiemy (Front. Genet. 9:454. doi:10.3389/fgene.2018.00454), że zmniejszenie wielkości genomu może być spowodowane wieloma czynnikami, m. in. utratą elementów ruchomych, które w wyniku rearanżacji genomu (np. inwersji) mogą znaleźć się w regionie proksymalnym chromosomu, w którym częściej dochodzi do rekombinacji. **Jak wytłumaczyć różnice w rozmiarach genomów analizowanych taksonów? Czy presja selekcyjna ma związek z redukcją rozmiarów genomów?** Wszak elementy ruchome nie są pożądane, mają negatywne przełożenie na OWT (odrębność, wyrównanie i trwałość) odmian, zatem proces hodowli pośrednio dąży do ich usunięcia lub wyciszenia.

Na łamach publikacji P3, Doktorant wraz z Panią Promotor przedstawili wyniki analiz cech morfologicznych i anatomicznych owoców wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych przy użyciu mikroskopii świetlnej i SEM oraz dokonali oceny ich wartości diagnostycznej. W tym miejscu pragnę podkreślić, iż tak szczegółowe opisy anatomiczne za pomocą SEM, wykonane zostały po raz pierwszy dla wybranych dzikich taksonów *Daucus*.



W rozdziale siódmym autor podsumował badania wykonane w swojej ramach rozprawy oraz przedstawił siedem wniosków, co do konstrukcji których nie mam uwag. Pragnę tylko przypomnieć o uzupełnieniu listy konkluzji o wnioski z podsumowania pracy P1, który ma dużą wartość w perspektywie przyszłych badań cytogenetycznych tego taksonu.

Z obowiązku recenzenta oceniłem jakość strony edycyjnej oraz poprawność językową pracy. W tym miejscu pragnę podkreślić wysoką staranność w opracowaniu manuskryptu, przejrzystość jego konstrukcji oraz profesjonalne przygotowanie edycyjne. Język, w jakim napisano niniejszą pracę jest poprawny, fachowy, charakteryzujący się dbałością o prawidłową składnię.

Podsumowując moją analizę merytoryczną wyników badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, stwierdzam, iż dostarczyły one nowych danych z zakresu cytogenetyki gatunków z rodzaju *Daucus*, morfologii pyłku oraz morfologii i anatomii owoców, co poszerza aktualny stan wiedzy na temat dzikich form pokrewnych marchwi uprawnej. Obserwowany szeroki zakres zmienności w analizowanych cechach dowodzi, że rodzaj *Daucus* jest doskonałym modelem do badań porównawczych. Ponadto, otrzymane wyniki mogą mieć istotne znaczenie dla interpretacji trendów ewolucyjnych w rodzaju *Daucus* oraz przyczynić się do rozwoju przyszłych programów hodowlanych marchwi. Ważne jest jednak kontynuowanie badań, które obejmą także pozostałe taksony rodzaju *Daucus*, w tym te niedawno do niego włączone, aby lepiej zrozumieć powiązania między przedstawicielami tego rodzaju w kontekście filogenetycznym. Takie badania mogą przyczynić się do dalszego pogłębienia wiedzy na temat rodzaju *Daucus* i pozwolić na pełniejsze zrozumienie jego ewolucji oraz potencjału hodowlanego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa mgr. inż. Dariusz Kudłeczki pt.: „Analiza porównawcza dzikich taksonów z rodzaju *Daucus* L. na podstawie danych cytogenetycznych oraz wybranych cech morfologicznych i anatomicznych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej i praktycznej Doktoranta, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574. Pragnę zaznaczyć, iż wymienione przeze mnie w niniejszej recenzji uwagi oraz komentarze mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wnioskuje do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr. inż. Dariusza Kadłuczki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo wysokie walory poznawcze uzyskanych wyników oraz przydatność tych danych w wyjaśnianiu powiązań taksonomicznych między gatunkami rodzaju *Daucus* oraz w prawidłowej identyfikacji zasobów genowych zgromadzonych w bankach genów wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Radzików, dnia 20 kwietnia 2023 roku

