



Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Prof. dr hab. Barbara Naganowska
Instytut Genetyki Roślin PAN

Poznań, 12 maja 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. DARIUSZA KADŁUCZKI
pt. „Analiza porównawcza dzikich taksonów z rodzaju *Daucus* L. na podstawie danych
cytogenetycznych oraz wybranych cech morfologicznych i anatomicznych”**

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Dariusza Kadłuczki przedstawiona do recenzji została wykonana w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Ewa Grzebelus, prof. URK.

Badania zostały przeprowadzone w ramach realizacji projektu badawczego NCN PRELUDIUM 18 pt. „Powiązania ewolucyjne w rodzaju *Daucus*: cytogenetyczna i morfoanatomiczna analiza porównawcza dzikich krewniaków marchwi”, którego kierownikiem był Doktorant. Ponadto zostały częściowo sfinansowane ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

Podstawą rozprawy są trzy artykuły naukowe, których współautorem jest Doktorant. Celem recenzji jest zatem ocena formalna rozprawy oraz ocena wartości i spójności przeprowadzonych badań, ponieważ poszczególne prace zostały już zrecenzowane w ramach procesu zatwierdzania do druku.

Przeprowadzone badania dotyczyły rodzaju *Daucus*, zawierającego m.in. podgatunek *D. carota* subsp. *sativus* Hoffm. (marchew uprawną, jedną z najważniejszych roślin użytkowych, o zsekwencjonowanym genomie), a ponadto około 40 gatunków dzikich, zróżnicowanych pod względem genetycznym i morfologicznym, wśród których są gatunki ostatnio włączone do rodzaju na podstawie wyników analiz molekularnych. Takson ten może więc być bardzo dobrym modelem do badań porównawczych, a równocześnie do prac o znaczeniu potencjalnie praktycznym. Wartość gospodarcza marchwi uprawnej jest doceniana w kraju i na świecie. Wiadomo też, że dla skutecznego prowadzenia programów hodowlanych potrzebna jest zarówno wiedza o genomie gatunku użytkowego, jak znajomość dzikich gatunków pokrewnych; otwiera to możliwości korzystania z ich puli genowej

do poszerzenia zmienności genetycznej odmian uprawnych, zubożonej w procesie udomowienia. Rosnące znaczenie ma też identyfikacja zasobów genowych roślin.

Mimo, że przedstawiciele rodzaju *Daucus* byli przedmiotem licznych badań, dane morfologiczne i cytogenetyczne, a także taksonomiczne i filogenetyczne dotyczące tego taksonu są nadal niepełne. Badania podjęte przez Doktoranta były zatem niewątpliwie uzasadnione. Warto też podkreślić, że problematyka rozprawy mieści się w obszarze badań zespołu Katedry, który ma już znaczące dokonania w tym zakresie.

Na całość rozprawy przedstawionej do recenzji składają się trzy wykazy i dziewięć rozdziałów. **Wykazy** dotyczą: publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, pozostałego dorobku naukowego Doktoranta i stosowanych w pracy skrótów. Kolejne **rozdziały** obejmują: streszczenia w języku polskim i angielskim, obszernie wprowadzenie podzielone na kilka podrozdziałów, hipotezy i cele badawcze, materiały i metody, następnie streszczenia trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy, podsumowanie i wnioski, literaturę oraz kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów.

W wykazie pierwszym zostały wymienione trzy **publikacje** stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej. Odniosę się do nich przy omawianiu rozdziału zawierającego streszczenia tych prac.

W wykazie drugim Doktorant zawarł informacje dotyczące **pozostałego dorobku naukowego**, w tym publikacji poza rozprawą, doniesień konferencyjnych, udziału w projektach badawczych, doświadczeń naukowych zdobytych za granicą, a także podał liczbowe zestawienie dorobku naukowego. Ponieważ jednak podanie takich informacji nie jest wymagane przepisami, nie będę się do nich odnosić w recenzji.

Wykaz **skrótów** jest niewątpliwie pomocny, choć wobec tak niewielkiej liczby zawartych w nim nazw być może prostsze byłoby podanie wyjaśnień w nawiasach w samym tekście.

Obydwa **streszczenia** pracy są napisane w sposób zwięzły, poprawny, jasno informują o zawartości rozprawy.

Wprowadzenie to bardzo interesujący rozdział, obejmujący wyczerpujące omówienie stanu wiedzy na temat gatunków z rodzaju *Daucus*, ich występowania, znaczenia oraz powiązań taksonomicznych i filogenetycznych; zwłaszcza obszernie został omówiony genom i badania cytogenetyczne. Ponadto we wprowadzeniu znalazło się przekonujące uzasadnienie podjęcia prac badawczych. Autor zacytował bogatą literaturę, uzupełnił też rozdział przejrzystym wykresem dotyczącym produkcji marchwi (i rzepy) na świecie. Na podstawie wprowadzenia można wnioskować o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do realizacji badań.

W rozdziale **Hipotezy i cele badawcze** zostały sformułowane trzy hipotezy:

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*.

Dla ich zweryfikowania przedstawiono trzy cele badawcze:

1. Porównawcze mapowanie cytogenetyczne sekwencji powtarzalnej CentDe (zidentyfikowanej w genomie marchwi uprawnej) u wybranych taksonów (gatunków i podgatunków) rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych (Publikacja 1).
2. Określenie zawartości jądrowego DNA w genomach wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych (Publikacja 2).
3. Analiza porównawcza morfologii pyłku oraz morfologii i anatomii owoców u wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych (Publikacje 2 i 3).

Rozdział **Materiały i metody** otwiera plan badawczy, przedstawiony w formie schematu, zawierającego dwa zadania wstępne i cztery niezależne zadania badawcze. Zadania wstępne to pozyskanie i przygotowanie materiału roślinnego. Odpowiadają one poszczególnym publikacjom składającym się na rozprawę, przy czym zadania 2. i 3. zrealizowane zostały w ramach publikacji P2. Dodatkowe ramki w schemacie informują o zastosowanych narzędziach badawczych. Badania podsumowuje ramka dotycząca integracji i interpretacji uzyskanych danych, a zwieńczeniem całości prac jest określenie sumy uzyskanej wiedzy i jej znaczenia. Schemat jest pomysłowym, przejrzystym przedstawieniem koncepcji Autora.

W omawianym rozdziale znajduje się ponadto tabela zawierająca wykaz taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych stanowiących materiał badawczy. Doktorant nie zamieścił szczegółowego omówienia zastosowanych metod, wychodząc ze słusznego założenia, że są one w wyczerpujący sposób opisane w poszczególnych publikacjach.

Kolejny rozdział zawiera **streszczenia trzech artykułów** stanowiących podstawę omawianej rozprawy doktorskiej i omówienie **najważniejszych wyników**. Przedstawione publikacje, których współautorem jest Pan mgr inż. Dariusz Kadłuczka, stanowią cykl spójny tematycznie. Doktorant jest we wszystkich pracach autorem pierwszym, w dwóch z nich – także korespondencyjnym, równorzędnie z Promotorką. Na podstawie oświadczeń wszystkich współautorów, gdzie znajdujemy opis charakteru i zakresu wykonanych prac, można z przekonaniem stwierdzić, że udział Kandydata w powstaniu wszystkich publikacji był dominujący. Zwłaszcza znaczny okazał się w publikacji P3, choć tu nie był On autorem korespondencyjnym. Należy podkreślić, że prace tworzące rozprawę to artykuły dvojga (P1 i P3) lub trojga autorów (P2), co tym bardziej wskazuje na duży udział Doktoranta. Omawiane publikacje ukazały się odpowiednio w *BMC Genomics*, *BMC Plant Biology* i *Agriculture*, a więc w uznanych czasopismach z obszaru biologii molekularnej, z listy JCR. Są to tytuły o dobrej renomie i znaczących wskaźnikach bibliometrycznych.

Publikacja 1 (P1): Kadłuczka D.*, Grzebelus E.* 2021. Using carrot centromeric repeats to study karyotype relationships in the genus *Daucus* (Apiaceae). *BMC Genomics*, 22, 508.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07853-2>; MEiN₂₀₂₁ 140; IF₂₀₂₁ 4,558

Rodzaj *Daucus*, interesujący ze względu na znaczne zróżnicowanie genetyczne i morfologiczne, mający jednocześnie znaczenie gospodarcze, nie został jeszcze dobrze poznany pod względem cech kariomorfologicznych. Prace ograniczały się dotychczas do badań marchwi uprawnej i kilku gatunków dzikich. W publikacji P1 przeprowadzono

cytogenetyczną lokalizację powtarzalnej sekwencji centromerowej CentDc z genomu marchwi uprawnej w chromosomach 34 wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych, z użyciem metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Warto zwrócić uwagę, że wykorzystano tę samą sondę, którą zastosowano we wcześniejszych badaniach zespołu Katedry (prace Nowickiej i in. 2012, 2016), co zapewnia spójność wyników.

Zmapowanie cytogenetyczne sekwencji CentDc powiodło się w genomach 26 obiektów z rodzaju *Daucus* i jednego gatunku blisko spokrewnionego. W genomach 20 obiektów (należących do 11 taksonów) badana sekwencja występowała w regionach centromerowych wszystkich chromosomów; u pozostałych taksonów *Daucus* stwierdzono występowanie różnej liczby chromosomów z sygnałami CentDc, lecz zachowana była ich lokalizacja w obszarze centromeru. Wykorzystanie sekwencji CentDc jako markera cytogenetycznego centromerów dla rodzaju *Daucus* pozwoliło w dalszej kolejności na przeprowadzenie pomiarów chromosomów u wybranych obiektów.

Wyniki badań dały podstawy do wnioskowania o ancestralnym charakterze sekwencji CentDc, a także asumpt do dalszego wyjaśniania powiązań filogenetycznych w obrębie rodzaju *Daucus* i procesów ewolucji sekwencji centromerowych roślin.

Publikacja 2 (P2): Kadluczka D.*, Sliwinska 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.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03743-1>; MEiN₂₀₂₁ 140; IF₂₀₂₁ 5,260

Pierwszą część publikacji stanowi analiza zawartości DNA jądrowego w genomach wybranych kilkunastu taksonów rodzaju *Daucus* i kilku gatunków z nimi spokrewnionych z innych rodzajów. Do badań zastosowano metodę cytometrii przepływowej. Wielkość genomu w obrębie rodzaju *Daucus* okazała się zróżnicowana 3,2-krotnie, przy czym najmniejszy był genom marchwi uprawnej; u gatunków pokrewnych zakres zmienności był mniejszy. U taksonów rodzaju *Daucus* nie stwierdzono zależności między zawartością jądrowego DNA a liczbą chromosomów. Dla 11 spośród badanych taksonów dane dotyczące wielkości genomu zostały opublikowane po raz pierwszy.

Część druga obejmuje analizę palinologiczną tych samych taksonów z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Ziarna pyłku poszczególnych taksonów okazały się zróżnicowane pod względem wielkości i kształtu. Mikroskopię świetlną wykorzystano do pomiarów osi biegunowej i równikowej; ich stosunek decydował o kształcie ziaren. Do analiz struktury sporodermy wykorzystano SEM, co umożliwiło szczegółowe obserwacje apertur i typów urzeźbienia egzyny. W ramach badań pyłku 13 taksonów było po raz pierwszy przedmiotem takich analiz.

Dodatkowym celem postawionym w publikacji było sprawdzenie, czy istnieją zależności między zawartością jądrowego DNA a cechami ziaren pyłku, znane są bowiem doniesienia dotyczące korelacji pomiędzy wielkością genomu a cechami fenotypowymi. W przypadku badanych cech i taksonów takiej zależności nie stwierdzono. Autorzy wskazali jednak na przydatność wielkości 2C DNA do rozróżniania gatunków w obrębie niektórych grup o zbliżonych parametrach ziaren pyłku. Podsumowaniem wyników w publikacji P2 jest dendrogram utworzony metodą UPGMA, ilustrujący powiązania pomiędzy badanymi

taksonami *Daucus* określone na podstawie zawartości jądrowego DNA i charakterystyki pyłku. W dyskusji omówiono możliwości wykorzystania wyników badań obydwu części pracy do szerszego wnioskowania dotyczącego taksonomicznych i filogenetycznych relacji w obrębie rodzaju *Daucus* i gatunków pokrewnych.

Interesuje mnie, czy był konkretny powód połączenia w jednej publikacji badań wielkości genomu i cech pyłku. Czy decyzja była podyktowana tylko racjami praktycznymi (umieszczenia wyników w jednej publikacji), czy też porównanie wielkości genomu z tymi właśnie cechami fenotypowymi zostało spowodowane jakąś szczególną merytoryczną przesłanką? Nie znalazłam co do tego wskazówek w pracy.

Publikacja 3 (P3): Kadluczka D., Grzebelus E.* 2022. Comparative fruit morphology and anatomy of wild relatives of carrot (*Daucus*, Apiaceae). *Agriculture*, 12, 2104.
DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture12122104>; MEiN₂₀₂₁ 100; IF₂₀₂₁ 3,408

Publikacja P3 dotyczy porównawczych badań morfologicznych i anatomicznych owoców tych samych taksonów, które stanowiły materiał roślinny w publikacji P2. Celem była ocena taksonomicznego znaczenia analizowanych cech. Są one tradycyjnie wykorzystywane w taksonomii rodziny Apiaceae, jednak (m.in. ze względu na znaczny wpływ środowiska) często okazują się niespójne z danymi molekularnymi. Zastosowano metody mikroskopii świetlnej i SEM. Publikacja zawiera zdjęcia całych owoców, zdjęcia przekrojów w mikroskopie świetlnym oraz otrzymane dzięki SEM obrazy powierzchni owoców i szczegółów jej struktury. Zaobserwowano znaczną zmienność cech pomiędzy taksonami pod względem wielkości, kształtu i wagi owoców, a także urzeźbienia ich powierzchni. Wykazano znaczenie diagnostyczne niektórych cech i omówiono możliwości ich wykorzystania w badaniach taksonomicznych.

W omawianych publikacjach wykorzystano zróżnicowane metody badawcze, w tym wymagającą dobrego przygotowania metodę cytogenetyki molekularnej FISH oraz zaawansowaną mikroskopię SEM. Należy podkreślić wysoką jakość zdjęć makro- i mikroskopowych. Wyniki każdej z publikacji zostały opracowane statystycznie.

W poszczególnych publikacjach wyniki zostały wyczerpująco przedyskutowane. Jednak w tym miejscu autoreferatu zabrakło mi choćby krótkiego akapitu zawierającego **dyskusyjne omówienie** całości rezultatów otrzymanych w ramach rozprawy.

W kolejnym rozdziale **Podsumowanie i wnioski** Autor krótko wskazał możliwości wykorzystania wyników badań. Następnie sformułował siedem wniosków. Moim zdaniem wnioski 4. i 6. mają raczej charakter przedstawienia wyników. Jest to konsekwencja sformułowania hipotezy 2. Rozumiem jednak, że porównawcza analiza grupy gatunków wymaga takiego podejścia – mimo iż na podstawie liczby chromosomów i innych cech tych gatunków można przewidywać pozytywne zweryfikowanie hipotezy. Pozostałe wnioski trafnie oddają istotę osiągnięć badawczych i wskazują, że postawione hipotezy znalazły potwierdzenie w otrzymanych wynikach.

Zestawienie **literatury** obejmuje 118 pozycji, począwszy od wczesnych, sięgających lat 1950., ważnych dla problematyki badań, a skończywszy na najnowszych z roku bieżącego.

Znajomość i dobór piśmiennictwa potwierdzają bardzo dobre przygotowanie Kandydata do pracy naukowej.

Podsumowując, recenzowaną pracę doktorską oceniam wysoko, biorąc pod uwagę osiągnięcia badawcze, rolę Doktoranta w powstaniu poszczególnych publikacji, jak też poziom opracowania rozprawy. Badania zostały przeprowadzone na obszernym materiale, z użyciem różnych metod i bardzo dobrze udokumentowane. Wyniki mają rangę wartościowej nowości naukowej. Przedstawiono też perspektywę wykorzystania uzyskanej wiedzy w dalszych badaniach taksonomicznych i ewolucyjnych rodzaju *Daucus* i rodzajów pokrewnych, jak również do identyfikacji zasobów genowych i wspomagania programów hodowlanych marchwi. Rozprawa świadczy o dojrzałości i samodzielności Doktoranta jako młodego naukowca.

Stwierdzam, że recenzowana **rozprawa Pana mgr. inż. Dariusza Kadłuczki spełnia ustawowe warunki wymagane dla rozprawy doktorskiej** [Art. 186 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm.)]. Przedstawiam zatem **wniosek do Rady dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

