

Skierniewice, 24 maja 2023 r.

Dr hab. Agnieszka Marasek-Ciołakowska, prof. IO  
Zakład Biologii Stosowanej  
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy  
Ul. Konstytucji 3 Maja 1/3  
96-100 Skierniewice

**Wpłynęło dnia:**

**26. 05. 2023**

**Dziekanat Wydziału  
Biotechnologii i Ogrodnictwa URK**

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

**Podstawa opracowania recenzji**

Rada Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie uchwałą nr RD 27/2023 z dnia 06.04.2023 r. powołała mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr inż. Dariusza Kadłuczki – pismo z dnia 06.04.2023 podpisane przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo prof. dr hab. Marcina Rapacza. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem naukowym dr hab. Ewy Grzebelus, prof. URK.

**Źródło finansowania badań**

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu badawczego PRELUDIUM 18 pod tytułem „Powiązania ewolucyjne w rodzaju *Daucus*: cytogenetyczna i morfo-anatomiczna analiza porównawcza dzikich krewniaków marchwi” finansowego ze środków Narodowego Centrum Nauki (UMO-2019/35/N/NZ9/00959) w latach 2020–2023 oraz 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 finansowanej ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Tytuł projektu: „Porównawcza analiza dystrybucji chromosomowej sekwencji repetytywnych u wybranych gatunków podrodziny Apioideae”. Pan mgr inż. Dariusz Kadłuczka był kierownikiem obu w/w projektów.

**Ocena formalna pracy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dariusza Kadłuczki składa się z 3 oryginalnych angielskojęzycznych publikacji naukowych. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopismach posiadających współczynnik wpływu (IF), tj. BMC Genomics (IF<sub>2021</sub> 4,558), BMC Plant Biology (IF<sub>2021</sub> 5,260) i Agriculture (IF<sub>2021</sub> 3,408). Sumaryczny IF publikacji wynosi 13,226, natomiast suma punktów przyznawanych za publikację przez Ministerstwo Edukacji i Nauki równa się 380 (według komunikatu MEiN z dnia 21 grudnia 2021 r.). Prace zostały opublikowane w latach 2021-2022, są to publikacje z otwartym dostępem (ang. Open access). W każdej z trzech prac doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch również autorem korespondencyjnym.

Praca doktorska pana mgr inż. Dariusza Kadłuczki została przedstawiona w formie manuskryptu. Oprócz kopii opublikowanych artykułów naukowych wchodzących w skład

rozprawy, doktorant przedstawił opracowanie, na które składają się następujące rozdziały: informacje o dorobku naukowym, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, hipotezy i cele badawcze, materiał i metody, streszczenie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, podsumowanie i wnioski, spis literatury oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, których podany jest ich indywidualny wkład w powstanie każdej z prac. Według załączonych oświadczeń współautorów, udział Doktoranta w powstaniu prac jest dominujący. We wszystkich publikacjach Autor współuczestniczył w opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii i przeprowadzeniu badań, wizualizacji, interpretacji i dyskusji wyników, sformułowaniu wniosków, w przygotowaniu manuskryptów oraz w pozyskaniu finansowania na badania i publikację artykułu. Pod względem formalnym nie mam zastrzeżeń do struktury i zawartości pracy. Doktorant nie zamieścił w manuskrypcie materiałów suplementarnych, które towarzyszyły pracy opublikowanej w BMC Genomics, jednak ze względu na otwarty dostęp do publikacji, nie uważam tego za duże niedopatrzenie.

### **Merytoryczna ocena pracy**

W rozdziale zatytułowanym „Wprowadzenie” został omówiony przedmiot pracy. W pierwszym podrozdziale Doktorant przedstawił charakterystykę marchwi uprawnej, skalę jej produkcji, historię uprawy, wartości odżywcze i prozdrowotne oraz informację na temat nieuprawianych gatunków. Następnie, Autor przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący systematyki rodzaju *Daucus* i podkreślił, że powiązania taksonomiczne i filogenetyczne pomiędzy gatunkami tego rodzaju nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione, a systematyka *Daucus* pozostaje przedmiotem dyskusji. W kolejnym podpunkcie Wprowadzenia Doktorant scharakteryzował genom marchwi uprawnej, liczbę chromosomów u gatunków należących do rodzaju *Daucus* oraz przybliżył wiedzę na temat cytogenetycznych badań genomu marchwi z zastosowaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Bardzo szczegółowo zostały opisane rodzaje sekwencji wykorzystane jako sondy do mapowania chromosomów. O ile w badaniach nad genomem marchwi uprawnej stosowano jako sondy do hybrydyzacji różne rodzaje sekwencji powtarzalnych oraz sekwencje o pojedynczej lub niskiej liczbie kopii, które umożliwiły opracowanie markerów charakterystycznych dla poszczególnych chromosomów, badania cytogenetyczne z użyciem FISH u nieuprawnych gatunków rodzaju *Daucus* są nieliczne. Przegląd piśmiennictwa Doktorant zakończył informacją dotyczącą zawartości jądrowego DNA w rodzaju *Daucus*, natomiast prawie całkowicie pominął informacje na temat analiz palinologicznych i karpologicznych, które są również istotnym elementem rozprawy.

W drugim podrozdziale „Wprowadzenia” Doktorant przedstawił uzasadnienie wyboru tematu badawczego. Podkreślił, że klasyfikacja rodzaju *Daucus* jest ciągle uaktualniana. Pomimo że wiele gatunków należących do różnych rodzajów rodziny Apiaceae zostało poddanych analizom palinologicznym i badaniom karpologicznym, w literaturze wciąż brakuje takich danych dla nieuprawnych przedstawicieli *Daucus* lub są one niewystarczające. Podobnie istnieje potrzeba weryfikacji liczby chromosomów, wielkości genomu oraz ustalenia markerów cytogenetycznych umożliwiających identyfikację chromosomów u jego nieuprawnych przedstawicieli. Tak więc podjęcie badań ukierunkowanych na dostarczenie nowych danych z zakresu cytogenetyki, morfologii pyłku oraz morfologii i anatomii owoców u nieuprawnych gatunków rodzaju *Daucus* uważam za wysoce uzasadnione.

Bibliografia wykorzystana we „Wprowadzeniu” jest bogata, zacytowano 115 prac angielskojęzycznych, co potwierdza bardzo dobrą znajomość przez Doktoranta literatury związanej z problematyką badawczą rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „Hipotezy i cele badawcze” Autor przedstawia trzy hipotezy badawcze będące podstawą podjętej tematyki oraz trzy główne cele pracy badawczej umożliwiające weryfikację postawionych hipotez.

Kolejny rozdział „Materiały i metody” Doktorant zawiera czytelny schemat planu badawczego i metod wykorzystanych w badaniach oraz tabelaryczne zestawienie taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych stanowiących materiał badawczy w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład dysertacji. Metodyka badań została szczegółowo opisana w publikacjach stanowiących przedmiot rozprawy i jej opis pominięto z polskojęzycznego opracowania, co uważam za uzasadnione.

W następnym rozdziale „Streszczenia załączonych publikacji – najważniejsze wyniki” Doktorant przedstawił zwięzły opis uzyskanych wyników. W rozdziale tym znalazła się również informacja na temat liczby analizowanych taksonów w poszczególnych publikacjach, co moim zdaniem nie było konieczne, ponieważ materiał badawczy został wymieniony w rozdziale „Materiał i metody”. W streszczeniu publikacji brakuje mi natomiast informacji czy wyniki prac wchodzących w skład rozprawy wpłynęły na poznanie zależności między- i wewnątrzgatunkowych między taksonami *Daucus*, na co wskazują tytuły pracy 1 i 2. Podczas publicznej obrony proszę o interpretację otrzymanych wyników w kontekście aktualnej filogenezy w rodzaju *Daucus*, która nie została przedstawiona w polskojęzycznym streszczeniu publikacji 2 i 3.

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski” Doktorant przedstawił zwięzłe podsumowanie rezultatów oraz wyciągnął siedem wniosków. Wnioski są poprawne i odpowiadają na sformułowane wcześniej hipotezy badawcze i postawione cele. W polskojęzycznym opracowaniu brak dyskusji, która integrowałaby wyniki otrzymane w trzech publikacjach.

Prace składające się na rozprawę doktorską są tematycznie powiązane i tworzą spójną całość. Napisane są zrozumiale, mają jasno sformułowane cele, szczegółowo opisaną metodykę badań i wyniki oraz klarownie przeprowadzoną dyskusję.

W pierwszej pracy „Using carrot centromeric repeats to study karyotype relationships in the genus *Daucus* (Apiaceae)”, opublikowanej w BMC Genomics, Autor weryfikuje hipotezę, że sekwencje powtarzalne CentDc, zidentyfikowane w genomie marchwi uprawnej, występują również u spokrewnionych gatunków nieuprawnych i mogą służyć jako centromerowo specyficzne markery cytogenetyczne. W celu weryfikacji tej hipotezy Doktorant wykonał porównawcze mapowanie cytogenetyczne sekwencji powtarzalnej CentDc u wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych. Materiał do analiz FISH stanowiły 34 obiekty reprezentujące 22 taksony, w tym 28 obiektów rodzaju *Daucus* oraz 6 obiektów gatunków spokrewnionych. Autor wykazał, że w 20 obiektach, reprezentujące 11 taksonów, sygnały sondy CentDc były obecne w regionach centromerowych wszystkich chromosomów, a zatem mogą być wykorzystywane jako markery cytogenetyczne specyficzne dla centromeru.

Natomiast, unikalny wzór hybrydyzacji powtórzeń CentDc Autor zaobserwował u pięciu gatunków (*D. aureus*, *D. conchitae*, *D. glochidiatus*, *D. involucratus*, and *D. muricatus*), co oznacza, że sonda CentDc może być stosowana jako marker do identyfikacji tych gatunków. Ponadto, Doktorant potwierdził u wszystkich analizowanych genotypów liczbę chromosomów, która była zgodna z danymi w literaturze, natomiast u *D. conchitae*, liczba chromosomów somatycznych została ustalona po raz pierwszy. Dla 16 wybranych taksonów, w których sygnały CentDc obserwowano w regionach centromerowych, przeprowadzone zostały szczegółowe analizy kariomorfologiczne oraz analiza zależności pomiędzy tymi taksonami uwzględniająca cechy kariotypu.

Druga praca pt. „Combining genome size and pollen morphology data to study species relationships in the genus *Daucus* (Apiaceae)”, opublikowana w BMC Plant Biology, dotyczyła określenia zawartości jądrowego DNA w genomach wybranych taksonów rodzaju *Daucus* i gatunków spokrewnionych za pomocą cytometrii przepływowej oraz scharakteryzowania morfologii pyłku przy użyciu mikroskopii świetlnej i skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Materiał badawczy stanowiło 17 taksonów (gatunki i podgatunki), w tym 12 nieuprawnych taksonów *Daucus*, dwa obiekty marchwi uprawnej i cztery gatunki spokrewnione. Należy podkreślić, że cytometryczne pomiary zawartości DNA zostały wykonane po raz pierwszy dla 11 taksonów, natomiast morfologia pyłku została scharakteryzowana po raz pierwszy dla 13 taksonów. Autor analizował między innymi barwność pyłu, cechy morfometryczne (długość osi biegunowej i osiowej) oraz status jądra. Dla 11 taksonów została przeprowadzona analiza morfologii pyłku przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej. Uzyskane wyniki umożliwiły Doktorantowi sprawdzenie czy istnieje korelacja pomiędzy rozmiarem genomu a cechami pyłku oraz ocenić wartość taksonomiczną danych cytogenomicznych i palinologicznych. Autor potwierdził hipotezę, że gatunki rodzaju *Daucus* różnią się między sobą pod względem zawartości jądrowego DNA, oraz że wielkość genomu i cechy palinologiczne mogą pomóc w identyfikacji gatunków w tym rodzaju.

W trzeciej pracy pt. „Comparative fruit morphology and anatomy of wild relatives of carrot (*Daucus*, Apiaceae)”, opublikowanej w Agriculture, Doktorant przedstawia szczegółową analizę porównawczą skulptury i anatomii owoców taksonów *Daucus* z użyciem mikroskopii świetlnej i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Szczegółowym celem pracy była ocena przydatności cech fenotypowych owoców w weryfikacji taksonomicznej gatunku. Materiał badawczy stanowiły owoce tych samych obiektów, które wykorzystano w Publikacji nr 2. Wyniki badań karpologicznych ujawniły, że analizowane taksony odznaczają się polimorfizmem dotyczącym wielkości, kształtu i masy owoców, a także rzeźbą powierzchni owoców. Analiza anatomiczna dostarczyła istotnych informacji o kształcie owocni. Autor wykazał, że wszystkie możliwe do zarejestrowania cechy owoców ocenione porównawczo mają znaczenie diagnostyczne. Jednakże pomimo występowania znacznych różnic w cechach morfo-anatomicznych owoców, różnice te nie były wystarczające do odróżnienia wszystkich badanych taksonów. Wyłącznie na podstawie cech owoców najłatwiej rozpoznawalnym taksonem był *D. aureus*, który charakteryzował się kilkoma unikalnymi cechami, tj. całkowicie guzowatą powierzchnią owocu, brakiem kanałów wydzielniczych i układem wiązek przewodzących w mezokarpie. Natomiast niektóre taksony *Daucus* (*D. syrticus*, *D. conchitae*,

*D. involucratus*, *D. pusillus* i marchew uprawna) były do siebie bardzo podobne pod względem morfologicznym i anatomicznym; w związku z tym na podstawie analizowanych cech nie można ich jednoznacznie rozróżnić. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy umożliwiły Doktorantowi potwierdzenie hipotezy, że gatunki rodzaju *Daucus* różnią się między sobą morfologią i anatomia owoców oraz że cechy morfologiczno-anatomiczne owoców mogą pomóc w identyfikacji gatunków tego rodzaju.

### **Uwagi do pracy**

W polskojęzycznym opracowaniu, w wykazie skrótów (str. 10) powinno znaleźć się wyjaśnienie skrótów UPGMA - metoda średnich połączeń (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) oraz PCoA – analiza głównych współrzędnych (ang. Principal Coordinate Analysis).

Mam uwagę związaną ze stosowaną przez Autora terminologią:

Wielokrotnie używane w polskojęzycznym opracowaniu wyrażenie „dzicy krewniacy” marchwi jest określeniem żargonowym, bardziej uzasadnione jest stosowanie terminu „nieuprawne gatunki spokrewnione”.

Nawiązując do tematyki badawczej będącej przedmiotem rozprawy mam następujące pytania:

1. Czy Doktorant planuje dalsze badania cytogenetyczne, palinologicznym i karpologiczne obejmujące pozostałe taksony z rodzaju *Daucus*?
2. Która z metod stosowanych w dysertacji dostarczyła najwięcej wartościowych cech diagnostycznych przydatnych do rozważań taksonomicznych w rodzaju *Daucus*?
3. Czy według Doktoranta metody molekularne, takie jak sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing), analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) oraz cytogenetyczne z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* mogą w przyszłości całkowicie zastąpić klasyczne metody palinologiczne i karpologiczne w badaniach filogenetycznych?
4. Czy Autor uważa, że barwność pyłku jest miarodajną metodą oceny żywotności pyłku? Czy podjęta została próba oceny kiełkowania ziaren pyłku na pożywce?
5. Chciałabym poznać opinie Doktoranta na temat możliwości zastosowania pyłku w analizach cytometrycznych.

### **Dorobek naukowy Doktoranta**

Na podkreślenie zasługuje ogólny dorobek naukowy Doktoranta, który jest znaczący. Oprócz prac stanowiących rozprawę doktorską, mgr inż. Dariusz Kadłuczka jest współautorem trzech publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports oraz jednej publikacji w czasopiśmie krajowym. Publikacje te zostały wydane w takich czasopismach, jak: *Plant Methods*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *Scientia Horticulturae*. W jednej publikacji jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik wpływu wszystkich publikacji Autora wynosi 23,9, a punktacja MEiN 780 pkt. Autor wygłosił też dwa referaty na konferencjach oraz był współautorem pięciu doniesień, w tym trzech jako pierwszy autor w formie plakatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorant odbył także dwa 3-miesięczne staże zagraniczne w ramach programu Erasmus + w Technische Universität Dresden, Faculty of Biology, Institute of Botany, Dresden, Niemcy oraz w National Research Council of Italy,

Institute of Biosciences and Bioresources, Portici, Włochy. Ponadto Doktorant brał udział w realizacji pięciu projektów badawczych, w tym w dwóch był kierownikiem projektu, a w pozostałych wykonawcą.

### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka badań jest bardzo istotna. Uzyskane przez pana mgr inż. Dariusza Kadłuczke wyniki znacząco pogłębiły wiedzę na temat nieuprawnych taksonów w rodzaju *Daucus*. Wyniki te oceniam bardzo wysoko ze względu na ich przydatność między innymi w badaniach filogenetycznych i cytotaksonomicznych w tym rodzaju.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe będące wynikiem badań prowadzonych przez Doktoranta uważam udokumentowanie, że: (1) sekwencje powtarzalne CentDe, występują również w genomach innych przedstawicieli rodzaju *Daucus*, a także w genomie spokrewnionego gatunku *Astrodaucus littoralis* i mogą służyć jako markery cytogenetyczne do identyfikacji niektórych gatunków w rodzaju *Daucus*; (2) połączenie wyników cytogenetyki molekularnej z tradycyjnymi pomiarami chromosomów jest bardzo pomocne w badaniach tożsamości taksonomicznej gatunku oraz w badaniach zależności między- i wewnątrzgatunkowych między taksonami *Daucus*; (3) cechy morfologiczno-anatomiczne pyłku i owoców ocenione porównawczo mają znaczenie diagnostyczne i umożliwiają identyfikacje niektórych taksonów *Daucus*.

Doktorant dysponuje wszechstronnym i bogatym warsztatem badawczym, sprawnie posługuje się różnymi metodami, na który składają się klasyczne metody cytologiczne, histologiczne, cytogenetyczne i statystyczne. Należy podkreślić, że techniki zastosowane w pracy są bardzo pracochłonne i wymagały od doktoranta opanowania zróżnicowanej metodyki.

Przedłożona do recenzji praca doktorska pt. „Analiza porównawcza dzikich taksonów z rodzaju *Daucus* L. na podstawie danych cytogenetycznych oraz wybranych cech morfologicznych i anatomicznych.” w pełni spełnia wymagania stawiane tego typu pracom przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule Naukowym w Zakresie Sztuki. Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Dariusza Kadłuczki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowej pracy, dużą liczbę oryginalnych wyników, które zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej oraz szeroki zakres metod wykorzystanych w badaniach, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

*Agnieszka Marasek-Ciołakowska*

Agnieszka Marasek-Ciołakowska