

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Identification and characterization of changes in soybean miRNA biosynthesis in response to low temperature stress.” - cykl 3 publikacji,

Autorem rozprawy jest pan mgr Jakub Kuczyński ubiegający się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Recenzja wykonana na zlecenie Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje wyniki badań realizowanych w Zakładzie Biosyntezy Białek Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Tomasz Twardowski, a promotorem pomocniczym dr hab. Agata Tyczewska, profesor ICHB PAN. Autor rozprawy wskazuje, że przedstawione badania wykonano m.in. dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki (OPUS).

Rozprawa doktorska została przedstawiona jako cykl trzech artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem:

Tyczewska A, Gracz J, Kuczyński J, Twardowski T

Deciphering the soybean molecular stress response via high-throughput approaches
Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(4): 631-643 (IF 2016 = 1.159)

Kuczyński J, Twardowski T, Nawracała J, Gracz-Bernaciak J, Tyczewska A

Chilling stress tolerance of two soya bean cultivars: Phenotypic and molecular responses
Journal of Agronomy and Crop Science, 2020, 206: 759-772 (IF 2020 = 3.473)

Kuczyński J, Gracz-Bernaciak J, Twardowski T, Karłowski WM, Tyczewska A

Cold stress-induced miRNA and degradome changes in four soybean varieties differing in chilling resistance.

Journal of Agronomy and Crop Science, 2022, 208: 777-794 (IF 2022 = 3.5)

Powyższe artykuły zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych tj. dwa z nich w Journal of Agronomy and Crop Science (IF: 3,473 i 3,5 ; 140 pkt. wg. listy czasopism MEiN), i jeden artykuł w Acta Biochimica Polonica (IF 2016 = 1.159 i 40 pkt.). W dwóch publikacjach eksperymentalnych Pan Jakub Kuczyński jest pierwszym autorem. Opublikowane informacje o roli poszczególnych autorów wskazują, że Doktorant pełnił główną rolę w doborze metod, wykonaniu badań, opracowaniu i przedstawieniu wyników i napisaniu pierwszej wersji manuskryptów. W przypadku publikacji trzeciej (w Acta Biochimica Polonica), która ma charakter przeglądowy, brak jest opisu roli współautorów w artykule. Oświadczenia mgr J. Kuczyńskiego i współautorów tego artykułu wskazują, że Autor rozprawy brał aktywny udział w analizie literatury dotyczącej miRNA i tworzeniu manuskryptu.

Rozprawa obejmuje przegląd literatury, cel badań, materiał i metody, omówienie cyklu publikacji, podsumowanie i wnioski i zajmuje łącznie 29 stron. Ponadto, rozprawę uzupełniają streszczenia w j. polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów i spis 54 pozycji cytowanej w rozprawie literatury naukowej i opublikowanych głównie w ostatnich latach, a także adresy wykorzystanych stron internetowych. Dołączone zostały wydruki w/w artykułów wraz z materiałami uzupełniającymi (supplementary materials) i oświadczenia współautorów.

Podjęta przez Doktoranta tematyka jest bardzo ciekawa i wpisuje się w główne nurty badawcze Zespołu zajmującego się molekularną odpowiedzią roślin uprawnych na warunki stresu środowiskowego. Praca dotyczy soi, która do niedawna znana była w Polsce głównie jako źródło sosu sojowego i to też jako składnika egzotycznych potraw. Soja jest natomiast niezwykle wartościową rośliną jadalną i jako roślina strączkowa stanowi istotny element gospodarki rolniczej. Jej walorem jest też możliwość uprawy na olbrzymich obszarach obu Ameryk co w dużej mierze przekłada się na produkcję mięsa na całym świecie ponieważ soja jest niezastąpionym elementem pasz ze względu na unikatowy skład i wartość odżywczą jej białka.

Stworzenie spójnej teorii wyjaśniającej jak rozmaite stresy wpływają na rozwój naszej cywilizacji wydaje się niemożliwe. Problematyka, którą zajmuje się Kandydat ma jednak kapitalne znaczenie dla rozwoju nie tylko jak można by sądzić, nauk podstawowych, lecz także zastosowań osiągnięć współczesnej biologii molekularnej w doskonaleniu odmian roślin uprawnych poprzez hodowlę roślin. Hodowla roślin liczy sobie ok 10 tys. lat, ale dopiero pod koniec XIX wieku opisano na czym polega zapłodnienie u zwierząt, a potem również u roślin. Stanowiło to podstawę do wprowadzenia nowoczesnych i skutecznych metod hodowli roślin, także soi.

Uprawa soi w Polsce liczy sobie ponad 100-lat, a atrakcyjność jej wahała się znacznie w tym okresie. W latach osiemdziesiątych wytworzono odmiany soi charakteryzujące się odpowiednią wczesnością dla warunków Polski, plenne i przystosowane do zmechanizowanej uprawy. Polepszające się warunki klimatyczne, dobre wyniki plonowania u rolników, rozwój rolnictwa ekologicznego i zainteresowanie produkcją białka roślinnego spowodowały wzrost zainteresowania tym gatunkiem zarówno ze strony hodowli jak i uprawy. Liczba odmian soi zgłaszanych do rejestru w COBORU znacznie wzrosła w ostatnich latach. W ciągu ostatnich trzech lat zarejestrowano 18 odmian.

Uprawa soi tak jak i inne uprawy są dziś silnie zależne od posunięć polityczno -finansowych w Unii Europejskiej. Nowe założenia Wspólnej Polityki Rolnej powodują znaczne obniżenie podstawowych płatności obszarowych. Żeby zachować wcześniejszy poziom wsparcia, trzeba spełnić nowe, dodatkowe wymagania w zakresie tzw. warunkowości i ekoschematów. Rolnicy oczekujący większego wsparcia muszą m.in. spełnić wymóg uprawy roślin mających pozytywny wpływ na bilans glebowej materii organicznej. Pod tym względem uprawa roślin bobowatych jest też bardzo korzystna dla gleby i roślin następczych. To wszystko jednak nie wystarczy, aby zacząć je uprawiać, gdy pod wielkim znakiem zapytania ciągle stoi opłacalność. Kalkulacja wskazuje na koszty uprawy powyżej 4000 zł i możliwość uzyskania dochodu ok. 2100 zł przy plonie na poziomie ok. 25 kwintali z hektara. Przy czym plon ten w warunkach Polski może wahać się w różnych latach. To dochód z hektara porównywalny z tym dla rzepaku (ok. 2500 zł.) i ponad 2 razy wyższy niż u zbóż (pszenica 820 zł, przy 6 t/ha), ale zboża mogą plonować dozo wyżej (ostatnio często ok 10t z hektara). No i produkcja rzepaku i zbóż jest niezawodna.

Doktorant pisze w swojej rozprawie: „Przeprowadzenie doświadczeń w dwóch sezonach wegetacyjnych pozwoliło na porównanie reakcji soi na różne warunki w odniesieniu do warunków produkcji w interesującym nas regionie (Polska). Rośliny obu odmian uprawiane w sezonie 2017 wykazywały zmniejszony wzrost wegetatywny w porównaniu do roślin kontrolnych”. Otóż w przypadku soi stabilność plonowania może zostać zachwiana nie co dwa lata, ale co np. 5 lat i to wystarczy, aby rolnicy nie podejmowali ryzyka uprawy tego gatunku w Polsce. Poziom i stabilność plonowania odmian soi o różnej wczesności w zróżnicowanych warunkach agro-klimatycznych badali Boros i in. 2019¹. Wniosek z tych badań nie jest budujący. Stwierdzili oni, że wszystkie badane odmiany można zaliczyć do odmian nieprzewidywalnych.

Mimo tych przeciwności zaletą soi jest ciągle to, że nieprzerwanie istnieje na nią zapotrzebowanie. W pracy z roku 2016 Doktorant i współautorzy podają, że w Europie uprawiano soję na powierzchni 400 tys. ha., co pokrywało zapotrzebowanie na soję tylko w 3%. W międzyczasie nastąpił szybki przyrost powierzchni uprawy do 1,1 mln ha w bieżącym roku zwłaszcza w Niemczech. Oznacza to jednak, że w całej Europie uprawia się tyle soi ile kukurydzy lub rzepaku tylko w Polsce. Ciągle jest to więc kropla w morzu potrzeb ponieważ do Europy importuje się co roku z obu Ameryk ok. 35 mln ton soi, głównie transgenicznej, Taki import gwarantuje utrzymanie poziomu produkcji zwierzęcej. Importuje ją też Polska mimo ustawy z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach, która ustanawia zakaz wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt pasz genetycznie zmodyfikowanych. Ustawa ta pozostaje martwa w zakresie stosowania soi transgenicznej w paszach od roku 2006.

Powyższe dywagacje miały za zadanie wskazanie na rolę soi we współczesnej gospodarce rolnej i żywnościowej, a przez to na wagę badań podjętych przez Pana Jakuba Kuczyńskiego. Możliwych aspektów badawczych dotyczących uprawy soi w nowych dla niej szerokościach geograficznych jest niezwykle wiele, ale planując badania zawsze próbujemy pogodzić to co pożądane z tym co możliwe.

Rozdział pracy pt. „Wprowadzenie” obejmuje pięć podrozdziałów. Doktorant omawia problematykę uprawy soi na świecie i w Europie, następnie zajmuje się stresem chłodu u roślin, a następnie naświetla rolę miRNA w regulacji procesów fizjologicznych u roślin. Aby móc dostosowywać się do zmieniających się warunków środowiska, rośliny muszą posiadać wewnętrzne systemy reagowania na stresy i unikania ich skutków poprzez plastyczność fenotypową. Okazuje się, że mikroRNA są postrzegane jako kluczowe regulatory genów w komórce. W podrozdziale „miRNA w stresie zimna” opisane są badania nad sposobem ekspresji i akumulacji miRNA, które dostarczają danych, niezbędnych do zrozumienia systemów, które pomagają chronić przed różnymi rodzajami stresu.

Okazuje się, że soja wykazuje szczególną wrażliwość na warunki klimatu umiarkowanego co przekłada się na terminy jej dojrzewania i określane jest mianem wczesności. Aby umożliwić uprawę soi w północnych regionach o krótszych sezonach wegetacyjnych, prowadzi się hodowlę odmian, które mogą wytrzymać niskie temperatury, szczególnie we wczesnych stadiach rozwoju, kiedy soja jest najbardziej podatna na zimno.

Z tych i innych względów jest to dobry model do badań, które zostały przeprowadzone w ramach opisywanych prac, w których wykorzystywane są techniki fenotypowania i biologii molekularnej. Cząsteczki miRNA, których rolę badań Doktorant biorą udział w istotnych procesach decydujących o rozwoju i funkcjonowania organizmu.

¹ BOROS L., WAWER A., BORUCKA K. Poziom i stabilność plonowania odmian soi o różnej wczesności w zróżnicowanych warunkach agro-klimatycznych. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 2019, Nr 285, s. 283-284

Tolerancja chłodu i aklimatyzacja realizują się poprzez działanie licznych czynników transkrypcyjnych, miRNA i genów. Zbadanie odmian soi o różnych poziomach odporności na stres chłodu stało się jednym z celów przedstawionej pracy doktorskiej. Innym celem było określenie zmian w biosyntezie miRNA soi w odpowiedzi na stres niskiej temperatury.

Jak się dowiadujemy z podrozdziału „Cele” Doktorant realizował swoje zamierzenia poprzez:
1. określenie wpływu stresu zimna na fenotyp soi w warunkach polowych i laboratoryjnych,
2. identyfikację miRNA zaangażowanych w odpowiedź soi na stres zimna, 3. identyfikację genów docelowych miRNA zaangażowanych w odpowiedź soi na stres zimna.

W badaniach wykorzystano cztery genotypy (Augusta, Fiskeby V, Toyomusume i G. soja), które różnią się wrażliwością na stres chłodu. Genotypy do badań zostały wybrane w sposób celowy z uwzględnieniem ich różnej wrażliwości na stres chłodu o czym informuje rozdział „Materiały i Metody”

Kolejny rozdział jest krótkim omówieniem załączonych publikacji.

W przypadku pierwszego artykułu wieloautorskiego Doktorant jest współautorem. Dokonano w nim przeglądu literatury na temat stresów abiotycznych, jak i biotycznych, które dotyczą roślin uprawnych. Przedstawiono tu dostępne dane na temat odporności soi na stres. Przedstawiono też możliwe podejścia do badań biochemicznych w powiązaniu z odpowiedzią roślin na stres. Ponadto omówiono najnowsze osiągnięcia w badaniach wpływu stresów abiotycznych, takich jak susza, zalewanie, stres zimna i niedobór składników odżywczych, a także stresów biotycznych związanych z wirusami, grzybami i nicieniami.

Pomimo skrótości, rozdział ten dostarcza niezbędnych informacji do zrozumienia jakie wyniki zostały uzyskane i opublikowane w dwóch dalszych artykułach składających się na przedłożoną rozprawę.

W drugim artykule opublikowanym w *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2020 opisano badania, które zostały tak zaplanowane aby uzyskać informacje o stopiu tolerancji na wychłodzenie odmian soi. Fenotypowanie odmian Augusta i Fiskeby V przeprowadzono w warunkach polowych, ale także w fitotronach poprzez pomiar tempa wzrostu, wydajności kwitnienia, liczby nasion i strąków na roślinę oraz wskaźnika tolerancji na wychłodzenie trzech grup roślin poddanych stresowi w różnych fazach wzrostu. Obie odmiany wykazywały różne reakcje fenotypowe na chłodzenie w każdej z trzech badanych faz wzrostu. Jednocześnie obie odmiany utrzymały zdolność do wytwarzania nasion mimo stresu na poziomie porównywalnym do roślin kontrolnych, co podkreśla ich zdolność do tolerowania chłodu. Dwa lata badań polowych jeszcze raz wykazały, że soja reaguje obniżeniem plonu nasion na stresogenne warunki pogodowe w trakcie sezonu wegetacyjnego. Dotyczyło to masy nasion z rośliny jak i masy 1000 nasion.

Zróżnicowana ekspresja wybranych miRNA w odpowiedzi na stres niskiej temperatury została wykryta głównie w korzeniach i trójlistkach roślin traktowanych odpowiednio w stadium VE (wschodzące siewki), i R1 (początek kwitnienia). Ponadto zidentyfikowano i zbadano geny, które mogły być celem analizowanych miRNA. Analiza profili ekspresji miRNA i genów docelowych dodatkowo wyjaśniła różnice między dwiema odmianami i potwierdziła, że miRNA mogą odgrywać rolę w odpowiedzi soi na stres chłodu.

W Trzecim artykule opublikowanym w *Journal of Agronomy and Crop Science*, w roku 2022, opisano badania, których celem była identyfikacja miRNA związanych ze stresem zimna i ich genów docelowych w oparciu o porównanie czterech odmian soi o różnej odporności na chłód. Kilka miRNA, miało podobne wzorce ekspresji w genotypach Augusta, Fiskeby V i G. soja, w przeciwieństwie do wrażliwej na zimno odmiany Toyomusume, co świadczy o ich związku z tolerancją na niskie temperatury. Analiza degradomu, a także adnotacje baz danych, pozwoliły przypisać potencjalne geny docelowe do miRNA. Stwierdzono, że wiele z tych genów jest związanych z mechanizmami odpowiedzi roślin na stres abiotyczny, takimi

jak wychwytywanie reaktywnych form tlenu (ROS), biosynteza flawonoidów i regulacja potencjału osmotycznego.

Analiza poziomów ekspresji wybranych genów reagujących na chłód w korzeniach i liściach czterech odmian soi wykazała zmiany spowodowane stresem chłodu. Zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w homeostazę redoks i transport elektronów, które mogą być w pewnym stopniu odpowiedzialne za zwiększoną lub zmniejszoną podatność na stresy abiotyczne.

Autorom udało się za pomocą sekwencjonowania o wysokiej przepustowości zidentyfikować miRNA reagujące na chłód w czterech odmianach soi różniących się odpornością na stres chłodu. Znalaziono przypuszczalne geny docelowe związane z tolerancją na stres i zbadano ich udział w stresie chłodzenia. Wydaje się, że przedstawione wyniki badań wyjaśniają ważną rolę miRNA w odpowiedzi soi na stres chłodu.

Na koniec zobowiązany jestem wskazać, że w rozprawie znalazło się kilka błędów rzeczowych jak to że G. soja to nie odmiana (str. 14), że w artykule nr 22 nie pisze się o wieku ryżu czy sorgo jak podaje Autor na stronie 10, dotyczy to też kukurydzy. Te same dane liczbowe dotyczące produkcji soi w Europie oraz jej importu są podawane dwa razy w tym samym akapicie na stronach 8 i 9.

Chciałbym także prosić Doktoranta o wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony następujących kwestii:

1. Czy Autor nie uważa, że dwuletni okres badań nad fenotypowaniem soi pod względem jej stabilności w plonie oraz odpowiedzi na stresy to okres za krótki żeby wyciągać ostateczne wnioski?
2. W pracy brakuje mi wskazania na walory odżywcze soi i wartość jej białka w porównaniu z innymi roślinami. Proszę o wyjaśnienie tego wątku.
3. Czy Pan uważa, że przy pomocy miRNA można celowo zmieniać cechy roślin, a także stosować je w terapii np. nowotworowej czy też ich rola ograniczy się tylko do diagnostyki?

Komentarz

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zajmuje się niezwykle ważnym aspektem przystosowywania się roślin do zmiennych warunków środowiskowych. Dzięki wyposażeniu organizmów w mechanizmy przystosowawcze nie musimy dziś zrzucić winy za niepowodzenia upraw i uważać się za ofiary ingerencji zmian klimatycznych. W minionych epokach zdarzało się jednak, że stresy środowiskowe przyczyniały się do upadków całych cywilizacji. Z drugiej jednak strony nie tylko organizmy żywe, ale i całe społeczeństwa charakteryzuje reakcja odpornościowa na szok. Dlatego skłaniam się do opinii, że przyczyn rozpadów cywilizacji było wiele, a krach cywilizacyjny następował raczej z przyczyn politycznych niż klimatycznych, co nie oznacza, że nie należy kontrolować i korygować zmian klimatycznych.

Podsumowanie

Stwierdzam że Doktorant wykazał się szerokim spektrum umiejętności i znajomością szeregu metod badawczych, tak z obszaru rolnictwa jak i biologii molekularnej. które skutecznie wykorzystał aby osiągnąć cel swej pracy doktorskiej. Potrafił skutecznie wykorzystać i połączyć metody fenotypowania w doświadczeniach polowych i warunkach kontrolowanych z zaawansowanymi technikami biologii molekularnej i bioinformatyki. Realizując swą pracę doktorską pokazał, że potrafi prowadzić badania i skutecznie publikować ich wyniki. Zrealizował swoje zamierzenia poprzez określenie wpływu stresu chłodu na fenotyp soi, identyfikację miRNA zaangażowanych w odpowiedź soi na stres chłodu, a także poprzez

identyfikację genów docelowych miRNA związanych z tym stresem. Uważam, że Doktorant jest świetnie przygotowany do prowadzenia prac badawczych w obszarze współczesnej biotechnologii roślin.


Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego pt. „Identification and characterization of changes in soybean miRNA biosynthesis in response to low temperature stress” spełnia kryteria określone w art. 13 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie 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), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. — Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Jakuba Kuczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Ze względu na nowatorski i obiecujący charakter badań prezentowanych w pracy doktorskiej wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie przedłożonej pracy. Żeby uzasadnić swój wniosek winienem przedstawić argumentację. W okresie ostatnich 20 lat odkryto rolę mikroRNA, które reguluje poziom translacji w komórce. Cząsteczki miRNA biorą udział w procesach kluczowych dla rozwoju i funkcjonowania organizmu, takich jak podziały komórkowe, różnicowanie i programowana śmierć komórek, ale także powstawanie nowotworów i reakcje obronne organizmu. Badania nad sposobem ekspresji i akumulacji tych miRNA dostarczyły wielu danych, które mogą pomóc nam zrozumieć mechanizmy ochrony przed różnymi rodzajami stresu. Uniwersalny charakter tych badań rozciąga się więc nie tylko na rozwiązywanie problemów badawczych i praktycznych w rolnictwie, ale też, a może przede wszystkim poszerza wiedzę, która znajdzie zastosowania w medycynie. Okazuje się, że ekspresja ponad 30% genów ludzkich jest kontrolowana przez miRNA, a na podstawie poziomu ekspresji miRNA można różnicować tkanki prawidłowe od zmienionych nowotworowo. Zaburzenia ekspresji miRNA są istotnie związane ze zmianami zachodzącymi w komórkach podczas transformacji nowotworowej, ale mogą też pełnić funkcje supresorów nowotworowych lub onkogenów. Świadomość wagi zdobywanej wiedzy o funkcji cząsteczek miRNA oraz podjęcie i przeprowadzenie z powodzeniem badań nad rolą miRNA w fizjologii tak ważnej dla wyżywienia ludzi rośliny jak soja składają się na moją opinię, że przedłożona praca doktorska zasługuje na wyróżnienie. Stąd mój wniosek.

Radzików 4.12. 2023r.


Recenzent