



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

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

dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN
Zakład Mikrobiomiki Roślin
Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Poznań, dnia 5 grudnia 2023 roku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego**
pt: "**Identification and characterization of changes in soybean miRNA biosynthesis in response to low temperature stress**",
wykonanej pod kierunkiem **prof. dr hab. Tomasza Twardowskiego**
oraz **prof. ICHB PAN, dr hab. Agaty Tyczewskiej**.

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, Pani dr Joanny Banasiak, w którym to zostałam poinformowana, że w dniu 27 września 2023 r. Rada Naukowa IChB PAN powołała moją osobę na recenzenta rozprawy doktorskiej pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego pt. "Identification and characterization of changes in soybean miRNA biosynthesis in response to low temperature stress". Promotorem pracy jest prof. dr hab. Tomasz Twardowski, a promotorem pomocniczym jest dr hab. Agata Tyczewska. Przewód doktorski pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego został otwarty w dniu 11 maja 2017 r. w dziedzinie - nauki ścisłe i przyrodnicze i dyscyplinie - nauki biologiczne

OCENA FORMALNA

Na przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego, zatytułowaną: „Identification and characterization of changes in soybean miRNA biosynthesis in response to low temperature stress”, składa się **jedna praca przeglądowa i dwie prace oryginalne**, opublikowane w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej o łącznym wskaźniku Impact factor równym 8,132:

1. 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.
2. **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.
3. **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.

W pracy przeglądowej opublikowanej w Acta Biochimica Polonica Doktorant jest trzecim w kolejności autorem, a w dwóch pracach oryginalnych opublikowanych w Journal of Agronomy and Crop Science jest pierwszym autorem. Z dołączonych oświadczeń współautorów powyższych publikacji, oraz z danych zamieszczonych w rozdziale AUTHOR CONTRIBUTIONS prac opublikowanych w Journal of Agronomy and Crop Science wynika, że Doktorant brał udział w prowadzeniu doświadczeń i analizie wyników eksperymentalnych, odpowiedzialny był też za opracowanie graficzne uzyskanych danych, przygotowanie pierwotnych wersji manuskryptów i dalsze ich edytowanie. **Na tej podstawie można sądzić, iż wkład Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego w prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej jest znaczący.** Szkoda jednak, iż Doktorant nie wskazał szczegółowo, które z doświadczeń realizował oraz jakie analizy i za pomocą jakich technik, czy podejść badawczych prowadził. Zamieszczenie tej informacji dałoby lepszy pogląd zarówno na stopień zaangażowania Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego w prowadzone badania, ale także na zdobyte w trakcie realizacji pracy doktorskiej umiejętności i zakres opanowanych metod oraz technik badawczych.

Oprócz trzech powyżej wymienionych prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Pan mgr Jakub Kuczyński przedstawił dodatkową dokumentację sporządzoną głównie w języku angielskim i zawierającą następujące dane:

- strona tytułowa
- podziękowania
- źródło finansowania badań
- spis treści
- lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej
- streszczenie w języku polskim
- streszczenie w języku angielskim
- wprowadzenie w tematykę badawczą
- cele badań
- opis materiału roślinnego użytego w badaniach
- krótki opis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej
- wnioski
- wykaz stosowanych skrótów
- spis literatury
- oświadczenia współautorów w języku polskim
- kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji jest kompletna, uporządkowana i czytelna, a zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

OCENA MERYTORYCZNA

Tematyka badawcza niniejszej pracy doktorskiej dotyczy zagadnień związanych z ważną ekonomicznie rośliną strączkowej jaką jest soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. Ta charakteryzująca się wysokimi wartościami odżywczymi roślina, o dużym potencjale gospodarczym, rolniczym i środowiskowym, uprawiana jest głównie w Ameryce Północnej i Południowej oraz w Chinach. W Europie producentami soi są przede wszystkim takie kraje jak: Francja, Włochy, Rumunia, Chorwacja i Ukraina. Natomiast ogólny poziom produkcji soi w Europie jest znacząco niski z uwagi na niesprzyjające wzrostowi i plonowaniu tej rośliny warunki pogodowe i klimat. Dotychczasowe zabiegi badaczy, hodowców i ostatecznie

rolników nad poprawą jakości plonowania i podniesienia poziomu uprawy soi w Europie są jednak niewystarczające, zwłaszcza w obliczu nasilających się zmian pogodowych i klimatycznych, a w konsekwencji pojawiających się stresów biotycznych i abiotycznych. Jednym z takich czynników stresowych, które limitują produkcję soi w Europie jest stres związany z niskimi temperaturami. Ten właśnie aspekt wpływu stresu chłodu na rośliny soi stał się tłem rozważań naukowych Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego. W szczególności Doktorant skoncentrował się na poznaniu roli małych cząsteczek RNA (microRNA) w odpowiedzi roślin soi na wspomniany czynnik stresu. Wiedza ta może posłużyć do opracowania nowoczesnych technologii uzyskiwania odmian soi tolerujących niskie temperatury i o podniesionych parametrach plonowania. W konsekwencji prowadzone przez Doktoranta badania mogą przyczynić się do wzrostu poziomu produkcji soi w Europie i pokrycia zapotrzebowania rynku europejskiego na soję i produkty jej pochodne. Stąd też tematyka badawcza podjęta przez Pana mgr. Jakuba Kuczyńskiego w ramach pracy doktorskiej jest w mojej ocenie niezwykle aktualna i ważna z perspektywy kilku dziedzin życia, głównie tych związanych z rolnictwem i bezpieczeństwem żywnościowym, albowiem wpisuje się w europejskie i światowe trendy nowoczesnego rolnictwa oraz strategię zarządzania uprawami. Podstawą innowacyjności prezentowanych badań jest natomiast zdobycie wiedzy na temat roli microRNA w odpowiedzi soi na warunki stresu chłodu i poznanie mechanizmów reakcji odpornościowych tej rośliny uprawnej z udziałem microRNA.

Pan mgr Jakub Kuczyński w ramach pracy doktorskiej zdefiniował jeden główny cel badawczy, którym było określenie zmian w biosyntezie miRNA u soi w odpowiedzi na stres niskiej temperatury i zaplanował trzy zadania badawcze: i) określenie wpływu stresu chłodu na fenotyp soi w warunkach polowych i laboratoryjnych; ii) identyfikacja miRNA zaangażowanych w odpowiedź soi na stres chłodu; iii) identyfikacja genów docelowych dla miRNA zaangażowanych w odpowiedź soi na stres chłodu. Szkoda, jednak, że Doktorant nie sformułował hipotezy badawczej.

W publikacji nr 1 (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) Pan mgr Jakub Kuczyński przedstawił dotychczasowy stan wiedzy w zakresie wykorzystania wysokoprzepustowych technik stosowanych do analizy molekularnych mechanizmów odpowiedzi soi na stres biotyczny i abiotyczny. Praca ta jest swego rodzaju wstępem teoretycznym do tematyki ocenianej pracy doktorskiej i zawiera przegląd literatury w zakresie analiz transkryptomicznych (mRNA i miRNA) oraz proteomicznych wykorzystywanych do badania reakcji soi na stres suszy, okresowego zalewania, chłodu, zasolenia, niedoboru fosforu, a także odporności na choroby wywołane przez *F. oxysporum*, niczenie, czy SMV – wirusa mozaiki soi. Praca jest bardzo interesująca, szczególnie i w sposób wyczerpujący przedstawia dotychczasowe osiągnięcia w w/w tematyce. Szkoda jednak, że Autorzy, w tym Doktorant nie pokusili się o omówienie zagadnień związanych z analizami metabolomicznymi, które również bazują na wysokoprzepustowych metodach spektrometrii mas. Warto również mieć na uwadze, iż praca ta została opublikowana w 2016 roku i zawiera dane literaturowe z zakresu lat 1988 – 2016. W związku z niezwykle dużym postępem w pracach badawczych, a także rozwojem nowych technologii i metod analitycznych, okres od 2016 do 2023 roku jest stosunkowo długi. Jak obecnie kształtuje się wiedza w poruszanej tematyce niniejszej publikacji? Proszę o komentarz.

W publikacji nr 2 (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) materiał roślinny do badań stanowiły dwie odmiany soi uprawnej (Augusta, i Fiskeby V) odporne na stres niskich temperatur. Celem pracy było porównanie parametrów fenotypowych (morfo-fizjologicznych i związanych z plonowaniem roślin) oraz wzorców ekspresji miRNA u obu odmian soi poddanych stresowi chłodu, w 3 różnych fazach rozwoju i wzrastających w warunkach

kontrolowanych oraz polowych. W pracy wykazano, że stres chłodu ma wpływ na wzrost i rozwój obydwu badanych odmian soi, przy czym reakcja tych odmian była nieco różna – odmiana Augusta wykazała ogólnie wyższy stopień tolerancji na stres chłodu. Analiza profili ekspresji wybranych miRNA (miR169, miR319, miR397, miR398) udokumentowała udział tych molekuł w odpowiedzi soi na stres niskich temperatur, a dodatkowa analiza ekspresji genów docelowych wraz z analizą ekspresji miRNA potwierdziła odmienną reakcję obu odmian na stres niskich temperatur.

Pytania, uwagi i komentarze:

- proszę o wyjaśnienie dlaczego w niniejszej pracy zastosowano wyłącznie odmiany uznane za odporne na stres niskich temperatur i nie wprowadzono genotypów wrażliwych?
- jak mogłyby kształtować się wyniki analizy profili ekspresji miRNA i ich genów docelowych u roślin wzrastających w warunkach polowych, w stosunku do tych wzrastających w fitotronie i poddanych kontrolowanemu stresowi niskich temperatur?
- czy podjęto próbę korelacji wyników z obserwacji fenotypowych z danymi ekspresji miRNA?
- proszę o uzupełnienie ile powtórzeń technicznych/biologicznych (liczba osobników) zastosowano w analizach morfo-fizjologicznych i molekularnych?; co stanowiło próbę w reakcji ddPCR (liczba osobników)?

W publikacji nr 3 (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) materiał roślinny stanowiły trzy odmiany soi uprawnej oraz genotyp dziki *Glycine soja* o zróżnicowanej odporności na stres chłodu. Rośliny wzrastały w warunkach kontrolowanych w fitotronach i poddawano je stresowi chłodu w dwóch różnych fazach wzrostu. W pracy tej podjęto się identyfikacji miRNA i ich genów docelowych zaangażowanych w reakcje soi na stres chłodu u 4 genotypów tych roślin, zróżnicowanych pod względem odporności na niskie temperatury. Przeprowadzono sekwencjonowanie miRNA i sekwencjonowanie degradomu, a analizę ekspresji miRNA i genów docelowych przeprowadzono metodą ddPCR oraz real-time PCR. Badania doprowadziły do identyfikacji 162 znanych już cząsteczek miRNA i 18 nowych cząsteczek miRNA, jako tych, które potencjalnie mogą być związane z odpowiedzią soi na stres niskich temperatur. Analiza degradomu umożliwiła natomiast wykrycie potencjalnych genów docelowych dla wyselekcjonowanych na podstawie analizy różnicowej miRNA. Stwierdzono na podstawie analizy GO i adnotacji do bazy KEGG, że te docelowe geny zaangażowane są w mechanizmy obronne/odpornościowe roślin na stesy abiotyczne.

Pytania, uwagi i komentarze:

- jak w formie skali kształtuje się odporność badanych genotypów na stres chłodu?
- czy badane genotypy na podstawie analiz morfo-fizjologicznych można określić jako odporne lub wrażliwe na stres niskich temperatur?
- dlaczego do analizy ekspresji genów docelowych nie zastosowano analizy ddPCR, a real-time PCR?
- czy warunki uprawy roślin w fitotronach były całkowicie sterylne?; jak przygotowano glebę do uprawy?
- czy zidentyfikowane miRNA i ich geny docelowe znane są jako te zaangażowane w inne reakcje obronne/odpornościowe roślin, np. na stesy biotyczne?; jeśli tak, to proszę podać przykłady.
- jak wykorzystałby Pan zdobytą wiedzę do opracowania nowych genotypów soi odpornych na stres niskich temperatur?
- jak można by wykorzystać zdobytą wiedzę do ochrony upraw obecnych odmian soi przed stresem chłodu?

Pan mgr Jakub Kuczyński na podstawie przeprowadzonych badań sformułował trzy wnioski. Jako najważniejsze w mojej opinii są następujące stwierdzenia:

1. Stres chłodu miał wpływ na wzrost i rozwój odmian soi Augusta i Fiskeby V, przy czym odmiana Augusta charakteryzowała się lepszymi parametrami plonowania niż odmiana

Fiskeby V, co może mieć związek z odmienną reakcją badanych genotypów na stres chłodu na poziomie molekularnym.

2. Analiza profili ekspresji miRNA i genów docelowych wykazała, że miRNA są kluczowymi regulatorami reakcji soi na stres związany z niską temperaturą.

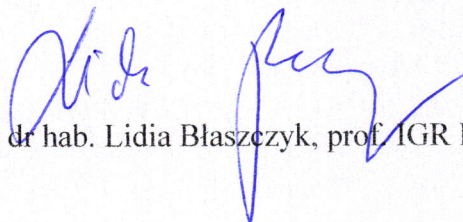
3. Analiza potencjalnych genów docelowych dla zidentyfikowanych miRNA o zróżnicowanej ekspresji wykazała, że wiele z tych genów jest powiązanych z mechanizmami reakcji roślin na stres abiotyczny, takimi jak usuwanie reaktywnych form tlenu, biosynteza flawonoidów i regulacja potencjału osmotycznego.

PODSUMOWANIE

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko i uważam, że jest ona wartościowym opracowaniem naukowym, wnoszącym nowe, istotne odkrycia pozwalające lepiej poznać rolę miRNA w odpowiedzi roślin soi na niskie temperatury. Oryginalność niniejszej pracy zawiera się w zidentyfikowaniu i potwierdzeniu udziału miRNA w regulację genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe soi na stres chłodu. Niezwykle istotnym aspektem tej pracy jest uzyskanie wiedzy, która może być wykorzystana w opracowaniu nowych technik zarówno umożliwiających wyprowadzenie odpornych odmian soi, jak również innowacyjnych podejść ochrony upraw soi przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi z wykorzystaniem miRNA. W związku z powyższym, oprócz istotnego wkładu w obecny stan wiedzy na temat mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w reakcje roślin uprawnych, w tym soi, na stres chłodu, wyniki niniejszej pracy doktorskiej mają ważne znaczenie praktyczne, głównie dla rolnictwa.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu 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. 2018 poz. 261) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr. Jakuba Kuczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, dnia 5 grudnia 2023 r.


dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN