

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Miriam Szurman-Zubrzycka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2013 – **Dyplom doktora nauk biologicznych** w zakresie biologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł pracy doktorskiej: „Identyfikacja nowych alleli genów potencjalnie związanych z rozwojem systemu korzeniowego u *Hordeum vulgare* oraz ich analiza funkcjonalna”. Promotor pracy dr.: prof. dr hab. Mirosław Małuszyński; Recenzenci pracy dr.: prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu oraz prof. dr hab. Wojciech Święcicki – Instytut Genetyki PAN w Poznaniu.

Rada Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, na wniosek Komisji, uznała rozprawę doktorską za wyróżniającą.

2008 – **Dyplom magistra** (Kierunek: Biotechnologia, Specjalność: Biotechnologia roślin i mikroorganizmów). Tytuł pracy mgr.: „Określenie poziomu metylacji DNA podczas indukcji somatycznej embriogenezy w kulturze *in vitro* *Arabidopsis thaliana*”; promotor pracy mgr.: prof. dr hab. Małgorzata Gaj. Praca wykonana w Katedrze Genetyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

2006 – **Dyplom licencjata** (Kierunek: Biotechnologia). Tytuł pracy lcj.: „Molekularne podstawy chorób nowotworowych u ludzi”. Promotor pracy lcj.: prof. dr hab. Małgorzata Gaj. Praca wykonana w Katedrze Genetyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.10.2019 - obecnie: **adiunkt – pracownik badawczo-dydaktyczny**, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach

01.10.2018 - 30.09.2019: **asystent – pracownik badawczo-dydaktyczny**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

15.10.2013 - 30.09.2018: **asystent – pracownik naukowo-dydaktyczny**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

01.03.2013 - 14.10.2013: **asystent – pracownik naukowy**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

09.01.2012 - 29.02.2012: **asystent (1/2 etatu) – pracownik naukowy**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

CYKL POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

Badanie mechanizmów molekularnych związanych z odpowiedzią na fitotoksyczne jony glinu oraz ze ścieżką DDR u jęczmienia

Artykuły przedstawiono w kolejności chronologicznej opublikowania:

1. **Szurman-Zubrzycka M**, Zbieszczek J, Marzec M, Jelonek J, Chmielewska B, Kurowska M, Krok M, Daszkowska-Golec A, Guzy-Wroblewska J, Gruszka D, Gajeczka M, Gajewska P, Stolarek M, Tylec P, Segal P, Lip S, Kudełko M, Lorek M, Gorniak-Walas M, Malolepszy A, Podsiadło N, Szyrajew K, Keisa A, Mbambo Z, Todorovska E, Gaj M, Nita Z, Orłowska-Job W, Maluszynski M and Szarejko I. 2018. *HorTILLUS* – a rich and renewable source of induced mutations for forward/reverse genetics and pre-breeding programs in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science* 9: 216. doi: 10.3389/fpls.2018.00216 – **załącznik A1**

IF=4.106; 40 pkt MNiSW (wg obecnej punktacji 100 pkt); Google Scholar - 85, Scopus - 59

Wkład w powstanie publikacji: współudział w opracowywaniu konceptu manuskryptu, udział w tworzeniu populacji TILLING i przeprowadzaniu doświadczeń (m.in. izolacja DNA z populacji M₂, przygotowanie puli, fenotypowanie roślin M₂ i linii M₃, wykonanie analiz TILLING części genów - HvGNA1, HvHPA1, HvRAA1 i HvPRT6), zintegrowanie otrzymanych wyników, napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów

2. **Szurman-Zubrzycka M**, Nawrot M, Jelonek J, Dziekanowski M, Kwasniewska J, and Szarejko I. 2019. ATR, a DNA damage signaling kinase, is involved in aluminum response in barley. *Frontiers in Plant Science* 10, 1299. doi: 10.3389/fpls.2019.01299 – **załącznik A2**

IF=4.402; 100 pkt MNiSW; Google Scholar - 16; Scopus - 15

Wkład w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu konceptu manuskryptu, udział w przeprowadzaniu doświadczeń (identyfikacja mutantów TILLING, prowadzenie doświadczeń hydroponicznych – traktowanie aluminium i analiza systemu korzeniowego, analizy cytologiczne), współudział w analizie i interpretacji wszystkich wyników, analiza statystyczna i zintegrowanie danych, napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów

3. **Szurman-Zubrzycka M**, Chwiałkowska K, Niemira M, Kwaśniewski M, Nawrot M, Gajeczka M, Larsen P, and Szarejko I. 2021. Aluminium or low pH – which is the bigger enemy of barley? Transcriptome analysis of barley root meristem under Al and low pH stress. *Frontiers in Genetics* 12, 675260. doi: 10.3389/fgene.2021.675260 – **załącznik A3**
IF=4.772; 100 pkt MNiSW, Google Scholar - 30, Scopus - 25

Wkład w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu konceptu manuskryptu, współudział w zaprojektowaniu badań, udział w przeprowadzaniu doświadczeń (przygotowanie i prowadzenie układu hydroponicznego umożliwiającego analizę niskiego pH i wpływu Al, izolacja RNA z merystemów korzeniowych i przygotowanie próbek do RNA-Seq), analiza i interpretacja wyników, zintegrowanie danych, napisanie publikacji, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów; jestem autorem korespondencyjnym tego manuskryptu

4. **Szurman-Zubrzycka M**, Jędrzejek P, and Szarejko I. 2023. How do plants cope with DNA damage? A Concise Review on the DDR Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3):2404. doi: 10.3390/ijms24032404 – **załącznik A4**
IF=4.9; 140 pkt MNiSW; Google Scholar – 40; Scopus - 30

Wkład w powstanie publikacji: opracowanie konceptu pracy przeglądowej w oparciu o najnowszą literaturę, napisanie publikacji, przygotowanie wszystkich tabel i jednej figury, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów; jestem autorem korespondencyjnym tego manuskryptu

5. Kocjan A, Kwasniewska J, and **Szurman-Zubrzycka M**. 2024. Understanding plant tolerance to aluminum: exploring mechanisms and perspectives. *Plant and Soil*. doi: 10.1007/s11104-024-06745-0 – **załącznik A5**
IF za 2023=3.9, 140 pkt MNiSW, Google Scholar - 3, Scopus – 3

Wkład w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu konceptu pracy przeglądowej, edycja i poprawa tekstu manuskryptu, udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów; jestem autorem korespondencyjnym tego manuskryptu

6. **Szurman-Zubrzycka M**, Kocjan A, Spałek E, Gajeczka M, Jędrzejek P, Nawrot M, Szarejko I, and Kwasniewska J. 2025. To divide or not to divide? NAC8 (SOG1) as a key regulator of DNA Damage Response in barley (*Hordeum vulgare* L.) *DNA repair* 146: 103810. doi: 10.1016/j.dnarep.2025.103810 – **załącznik A6**
IF za 2023=3.0; 140 pkt MNiSW; Google Scholar - 0; Scopus - 0

Wkład w powstanie publikacji: opracowanie konceptu manuskryptu i współudział w zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, udział w przeprowadzaniu doświadczeń (prowadzenie doświadczeń hydroponicznych – traktowanie aluminium, analiza roślin po traktowaniu zeocyną), analiza i interpretacja wyników, analiza statystyczna i zintegrowanie danych,

napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; jestem autorem korespondencyjnym tego manuskryptu

Łączny **Impact Factor** prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **25,08**

Łączna punktacja **MNiSW** czasopism, w których ukazały się prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: **660 (wg obecnej punktacji 720)**

Łączna **liczba cytowań** prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: Google Scholar - **174**, Scopus – **132**

Liczba cytowań została podana na podstawie danych pochodzących z portalu scholar.google.com oraz Scopus na dzień 04.03.2025. Aktualne dane dostępne są pod adresami: <https://scholar.google.pl/citations?user=Oijj-e4AAAAJ&hl=pl> oraz <https://www.scopus.com/results/authorNamesList.uri?name=name&st1=szurman&st2=miriam&origin=searchauthorlookup>

Oświadczenia współautorów znajdują się w załącznikach P1 – P6, odpowiednio dla artykułów A1 – A6

Wprowadzenie – problem fitotoksyczności glinu w kwaśnych glebach

Glin (Al) jest trzecim, po tlenie i krzemie, najpowszechniejszym występującym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej, stanowiącym około 8% jej masy. W glebach o neutralnym lub zasadowym pH glin występuje w postaci związków mineralnych, które nie są toksyczne dla roślin. Jednak w glebach o niskim pH uwalnia się z minerałów, przyjmując formę jonów Al^{3+} , które łatwo wnikają do korzeni roślin i wykazują silne działanie fitotoksyczne [1-3]. Szacuje się, że obecnie aż 50% gleb uprawnych na świecie ma kwaśny odczyn (pH poniżej 5,5), co znacznie ogranicza plonowanie wielu roślin uprawnych, głównie ze względu na fitotoksyczne działanie jonów Al^{3+} [4-6]. Pierwszym objawem toksyczności glinu jest zahamowanie wzrostu systemu korzeniowego, wynikające z ograniczenia elongacji komórek oraz spowolnienia podziałów komórkowych w merystemie wierzchołkowym korzenia. Efektem tego jest zmniejszona zdolność roślin do pobierania wody i składników odżywczych z gleby, co prowadzi do opóźnienia wzrostu oraz obniżenia plonów. Postępujące zakwaszanie gleb uprawnych, spowodowane m.in. industrializacją i nadmiernym stosowaniem niektórych nawozów, stanowi jedno z największych wyzwań współczesnego rolnictwa. Stres wywołany toksycznym działaniem jonów Al^{3+} uważany jest za główny czynnik ograniczający plonowanie na kwaśnych glebach, a także za drugi, po suszy, najważniejszy stres abiotyczny wpływający na globalną produkcję roślin uprawnych [7]. Zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na toksyczne jony glinu jest kluczowe dla opracowania strategii zwiększających tolerancję roślin uprawnych na ten stres, co w konsekwencji może przyczynić się do poprawy efektywności produkcji rolniczej.

Rośliny wykazują zróżnicowaną wrażliwość na kwaśne pH i toksyczne jony Al^{3+} . Przedmiotem moich badań jest jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), czwarte najczęściej uprawiane zboże na świecie. Jest on wykorzystywany głównie w przemyśle browarniczym do produkcji piwa oraz jako pasza dla zwierząt. Jęczmień jest najbardziej wrażliwy na toksyczne działanie jonów Al^{3+} spośród wszystkich zbóż [8, 9], co czyni go szczególnie istotnym obiektem badań nad reakcjami roślin na ten stres abiotyczny.

Swoje badania nad fitotoksycznością jonów glinu u jęczmienia rozpoczęłam w ramach międzynarodowego projektu ERA-CAPS zatytułowanego „Towards a molecular understanding of Aluminum genotoxicity for crop improvement”, w którym pełniłam rolę jednego z głównych wykonawców. Polska część projektu, finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, była realizowana we współpracy z trzema renomowanymi ośrodkami naukowymi: Uniwersytetem w Gandawie (Belgia), Uniwersytetem w Hamburgu (Niemcy) oraz Uniwersytetem Kalifornijskim (USA). Następnie kontynuowałam podjęte badania w ramach

kierowanego przeze mnie projektu Beethoven Lifel pt. „A DREAM of NAC – molecular mechanism of transcriptional adaptation to DNA stress”, który był realizowany w ramach polsko-niemieckiej współpracy z Uniwersytetem w Hamburgu. Polska część projektu została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki (kwota finansowania - 1 076 775,00 PLN).

Odpowiedź jęczmienia na glin

Toksyczność glinu ujawnia się jedynie w glebach o niskim pH, które same w sobie mogą stanowić czynnik stresowy dla roślin. W warunkach naturalnych oba te stresory – niskie pH i jony glinu – występują jednocześnie ze względu na powszechną obecność glinu w glebie. Jednak w warunkach laboratoryjnych możliwe jest odrębne przeanalizowanie wpływu każdego z tych czynników, co pozwala na precyzyjne odróżnienie efektów działania niskiego pH od wpływu Al. W celu przeprowadzenia takiej analizy zaprojektowano doświadczenia, które umożliwiły ocenę odpowiedzi jęczmienia na samo zakwaszenie środowiska (poprzez porównanie roślin uprawianych w warunkach o pH=4 z tymi uprawianymi w warunkach o pH=6) oraz na toksyczne działanie glinu w warunkach niskiego pH (poprzez porównanie roślin uprawianych w warunkach o pH=4 z dodatkiem glinu z roślinami rosnącymi w warunkach o pH=4 bez glinu). Nasze badania obejmowały zarówno analizę morfologiczną systemów korzeniowych, jak i analizę transkryptomów (RNA-seq) roślin rosnących w warunkach o optymalnym pH, w warunkach o obniżonym pH i traktowanych glinem (**Szurman-Zubrzycka i inni, 2021; zał. A3**).

Analiza morfologiczna systemu korzeniowego

Eksperyment mający na celu analizę morfologiczną korzeni przeprowadzono w warunkach hydroponicznych, gdzie rośliny uprawiano przez 7 dni w trzech wariantach pożywki Magnavaca: (1) pożywka o pH=6; (2) pożywka o pH=4 (kwasowe środowisko) oraz (3) pożywka o pH=4 z dodatkiem 10 μ M biodostępnych jonów Al^{3+} . Wyniki jednoznacznie wykazały, że jęczmień jest wysoce wrażliwy zarówno na zakwaszenie środowiska, jak i na toksyczność glinu. Samo zakwaszenie pożywki do pH=4 skutkowało 50% redukcją długości najdłuższego korzenia zarodkowego w porównaniu do warunków o pH=6. Dodatek jonów glinu do pożywki o pH=4 powodował dalsze zmniejszenie długości najdłuższego korzenia zarodkowego, również o ok. 50% w porównaniu do warunków o pH=4 bez Al. Jeszcze bardziej wyraźny wpływ zaobserwowano w przypadku korzeni bocznych. Średnia liczba korzeni bocznych przypadających na jedną roślinę spadła z 385 w warunkach o pH=6 do 152 w warunkach o pH=4 (60% redukcja) oraz do 52 w pożywce z jonami Al^{3+} (66% redukcja w

porównaniu do warunków o pH=4 bez glinu). Ponadto, długość korzeni bocznych zmniejszyła się o 50% w wyniku zakwaszenia środowiska, a dodatek glinu spowodował dalszą redukcję o 95% (w porównaniu do warunków o pH=4). Uzyskane wyniki posłużyły jako podstawa do dalszych analiz mechanizmów adaptacyjnych i odpowiedzi jęczmienia na niskie pH i jony glinu, na poziomie transkrypcyjnym.

Analiza transkryptomów (RNA-seq)

W celu analizy RNA-seq przeprowadzono dwa niezależnie doświadczenia hydroponiczne o takim samym układzie doświadczalnym jak opisano powyżej, ale o różnym czasie trwania ('short-term' - 24/48 h oraz 'long-term' – 7 dni).

Nasze wyniki wykazały, że niskie pH wywołało duże zmiany w transkryptomie merystemów korzeniowych jęczmienia, gdy siewki były uprawiane w warunkach hydroponicznych przez 48 godzin (1899 DEGs – Differentially Expressed Genes; pH=4 vs pH=6), natomiast po 7 dniach wzrostu w warunkach niskiego pH liczba genów o zróżnicowanej ekspresji znacząco się zmniejszyła (do 870 DEGs; pH=4 vs pH=6), co świadczy o, przynajmniej częściowej, adaptacji roślin do kwaśnego środowiska. Co ciekawe, odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku wpływu jonów glinu. Po 24 godzinach działania jonów glinu wiele genów charakteryzowało się zróżnicowaną ekspresją w odniesieniu do warunków o pH=4 bez Al (986 DEGs; pH=4 + Al vs pH=4), jednak ich liczba gwałtownie wzrosła do 5873 DEGs po 7 dniach ekspozycji na Al, co wskazuje, że przebudowa transkryptomu w odpowiedzi na stres związany z fitotoksycznością glinu jest procesem długotrwałym i dynamicznym. Wyniki te są zbieżne z wynikami otrzymanymi w ramach analizy mikromacierzy dla *Arabidopsis thaliana*, gdzie wykazano, że transkryptom *Arabidopsis* uległ większym zmianom po 48 godzinach niż po 6 godzinach ekspozycji na fitotoksyczne jony glinu [10].

Szczegółowa analiza DEGs w naszych doświadczeniach wykazała, że oba analizowane stresory indukują stres oksydacyjny w korzeniach jęczmienia. Wcześniejsze badania prowadzone na ryżu (*Oryza sativa*) wykazały, że w warunkach niskiego pH dochodzi do obniżenia ekspresji genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe Cu/Zn (*Cu/Zn SOD1*; *Cu/Zn SOD2*) i katalazy (*CATA*; *CATB*), a jednocześnie obserwuje się podwyższoną ekspresję genu kodującego peroksydazę askorbinianową (*APX1*), co potwierdzono mierząc aktywność enzymatyczną. Na podstawie tych wyników stwierdzono m.in., że zwiększona aktywność APX1 wiąże się z adaptacją ryżu do niskiego pH [11]. Nasze badania na jęczmieniu wykazały, że, podobnie jak u ryżu, po 7 dniach wzrostu w warunkach obniżonego pH ekspresja 4 genów kodujących białka Cu/Zn SOD zmalała w porównaniu do warunków o pH=6, natomiast, inaczej niż u ryżu, wśród

DEGs nie zidentyfikowano genów *APX1* ani *CATA*, a gen *CATB* charakteryzował się nawet zwiększoną ekspresją. Sytuacja ta może być związana z wyższą wrażliwością jęczmienia na obniżone pH w porównaniu do ryżu.

W roślinach rosnących w pożywce o pH=4 z 10 μM Al^{3+} zaobserwowano silny stres oksydacyjny - szczególnie w eksperymencie o dłuższym czasie trwania, w którym setki genów związanych ze stresem oksydacyjnym wykazywały zróżnicowaną ekspresję w porównaniu do warunków niskiego pH bez Al. Peroksydazy (PODs) to enzymy antyoksydacyjne, których podwyższona ekspresja wskazuje na działanie stresu oksydacyjnego. W naszym eksperymencie trwającym 7 dni, aż 76 genów kodujących peroksydazy wykazało zmieniony poziom ekspresji w odpowiedzi na Al. Wśród DEGs były również geny kodujące dysmutazy superoksydowe (SODs), monooksygenazy cytochromu P450, transferazy glutationowe (GSTs), tioredoksyny (TRX) i inne. Badania przeprowadzone na innych gatunkach również wskazują, że Al wywołuje stres oksydacyjny i aktywuje mechanizmy antyoksydacyjne. Analiza RNAseq przeprowadzona na kukurydzy (*Zea mays*) wykazała, że całkowita liczba genów związanych ze stresem oksydacyjnym była wyższa w genotypie wrażliwym na Al w porównaniu do genotypu tolerancyjnego na Al, co sugerowało, że aktywność tych genów była głównie wynikiem toksyczności Al, a nie aktywacji mechanizmów tolerancji na Al [12]. Bardzo wysoka liczba DEGs w tej kategorii w naszym doświadczeniu potwierdza wysoki poziom wrażliwości jęczmienia na Al w porównaniu do innych gatunków. Jako przykład interesujących genów wśród DEGs z tej kategorii można wskazać te kodujące tioredoksyny (TRX), które są tioloksydoreduktazami, pełniącymi kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy redoks [13]. We wcześniejszych badaniach wykazano, że geny kodujące TRX są indukowane przez różne czynniki oksydacyjne, a ich zwiększona ekspresja zapewnia komórce ochronę przed cytotoksycznymi efektami działania stresu oksydacyjnego [14]. Nasza analiza wykazała, że ekspresja genów kodujących różne białka TRX jest zmieniona głównie w odpowiedzi na Al (14 DEGs kodujących TRX w 7-dniowym eksperymencie; pH=4 + Al vs pH=4), podczas gdy samo obniżenie pH spowodowało zmianę ekspresji tylko dwóch genów *TRX* (pH=4 vs pH=6). Dotychczas udział TRX w tolerancji na toksyczność glinu (Al) został wykazany jedynie u *Arabidopsis*, gdzie mutant *AtTRX1* wykazywał nadwrażliwość tylko na glin (nie na niskie pH) [15]. Powyższe dane sugerują, że, podobnie jak w przypadku *Arabidopsis*, u jęczmienia tioredoksyny biorą udział w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez jony glinu.

Wśród genów o zmienionej ekspresji w odpowiedzi na glin (Al), zidentyfikowanych w ramach naszej pracy, stosunkowo liczną grupę stanowiły geny kodujące białka związane ze ścianą

komórkową. Nie jest to wynik zaskakujący, ponieważ ściana komórkowa stanowi główne miejsce wiązania dodatnio naładowanych jonów glinu. Jony te oddziałują m.in. z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi pektyn, co prowadzi do zmian właściwości ściany komórkowej, które mogą skutkować zahamowaniem wydłużania i wzrostu komórek korzeniowych [16-18]. Nasze dane z analizy RNA-Seq wskazują, że ekspresja kilku genów kodujących enzymy bezpośrednio modyfikujące pektyny ulegała zmianom, głównie w odpowiedzi na długotrwałe działanie glinu. Można zatem wnioskować, że stres indukowany obecnością jonów glinu ma większy wpływ na modyfikację pektyn w komórkach merystematycznych korzeni jęczmienia niż oddziaływanie samego niskiego pH. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami, prowadzonymi w naszym zespole, które wykazały, że traktowanie korzeni jęczmienia jonami Al^{3+} prowadziło do zmiany składu i lokalizacji epitopów pektynowych zaangażowanych w utrzymanie elastyczności ściany komórkowej i sztywności komórek [19]. W omawianym tutaj doświadczeniu RNA-seq, wśród genów o zróżnicowanej ekspresji związanych z modyfikacjami pektyn zidentyfikowano, głównie po 7 dniach traktowania Al, geny kodujące m.in. pektynoesterazy oraz liazy pektynowe. Pektynoesterazy stanowią dużą rodzinę izoenzymów katalizujących deestryfikację pektyn. Wyniki te stanowią potwierdzenie na poziomie transkrypcyjnym naszych wcześniejszych badań, w których analiza przy użyciu przeciwciał LM19 i LM20 wykazała, że nieestryfikowanych homogalakuronanów (HG) było więcej w korzeniach traktowanych Al niż w nietraktowanych [19]. Wspiera to pośrednio hipotezę, wysuniętą dla kukurydzy, że różnice w tolerancji na Al pomiędzy genotypami mogą zależeć od poziomu metylacji pektyn [20].

Kolejną dużą grupę genów o zróżnicowanej ekspresji w naszych doświadczeniach stanowiły geny kodujące czynniki transkrypcyjne (TFs), głównie z rodzin WRKY, MYB i NAC. Podobieństwa i różnice w profilach ekspresji TFs pomiędzy traktowaniem Al a niskim pH sugerują, że odpowiedź na te dwa rodzaje stresu obejmuje zarówno wspólne, jak i specyficzne mechanizmy molekularne. Aktywacja tych samych czynników transkrypcyjnych w obu przypadkach wskazuje na istnienie nakładających się ścieżek molekularnych. Jednocześnie wykrycie TFs specyficznych dla jednego rodzaju stresu świadczy o specyficzności niektórych mechanizmów regulacyjnych.

Dotychczas najlepiej opisanym czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym szczególną rolę zarówno w tolerancji na niskie pH, jak i toksyczność Al u *Arabidopsis* jest STOP1 (Sensitive TO Proton rhizotoxicity 1). AtSTOP1 reguluje wiele genów chroniących *Arabidopsis* przed toksycznością H^+ (niskiego pH) i Al. Mutanty *stop1* wykazują nadwrażliwość na oba te stresy, co wynika z obniżonej ekspresji genów kontrolowanych przez AtSTOP1, takich jak *AtALMT1*

(Aluminum-Activated Malate Transporter 1), który koduje transporter odpowiadający za wyrzut jabłczanu chelatującego jony Al do ryzosfery, oraz *AtALS3* (Aluminum-Sensitive 3), który koduje transporter ABC prawdopodobnie zaangażowany w redystrybucję Al. Ponadto *AtSTOP1* reguluje również inne geny związane z homeostazą jonową i szlakami metabolicznymi regulującymi pH [21]. *OsART1* (Aluminum Resistance Transcription factor 1), ryżowy ortolog *AtSTOP1*, bierze udział wyłącznie w odpowiedzi na Al, a nie na stres wywołany niskim pH [22]. Z kolei, *VuSTOP1*, ortolog *STOP1* u fasoli ryżowej, pełni głównie rolę w odpowiedzi na toksyczność H^+ [23]. Ekspresja *AtSTOP1* i *OsART1* ma charakter konstytutywny, co sugeruje, że te czynniki transkrypcyjne są regulowane na poziomie posttranslacyjnym. Niedawno potwierdzono, że funkcja *AtSTOP1* u *Arabidopsis* jest regulowana przez SUMOylację [24]. W odróżnieniu od tego, ekspresja *VuSTOP1* jest indukowana zarówno przez H^+ , jak i Al^{3+} [25]. Jeszcze inaczej sytuacja wygląda u pszenicy, gdzie występują trzy homoeologiczne geny *TaSTOP1* wykazujące różne wzorce ekspresji: *TaSTOP1-A* jest indukowany przez Al^{3+} , *TaSTOP1-B* wykazuje ekspresję konstytutywną, a *TaSTOP1-C* jest indukowany przez H^+ [26]. W naszym doświadczeniu wykazano natomiast, że ekspresja *HvSTOP1* u jęczmienia nie zmienia się pod wpływem Al ani niskiego pH, co sugeruje, że również w tym przypadku regulacja zachodzi na poziomie posttranslacyjnym, podobnie jak u *Arabidopsis*. Szczegółową analizę funkcjonalną geny *HvSTOP1* u jęczmienia zaplanowano w ramach niedawno przyznanego projektu OPUS, którego jestem kierownikiem.

Wśród DEGs w naszym eksperymencie zidentyfikowaliśmy też geny kodujące różne typy transporterów. Wśród genów indukowanych specyficznie tylko przez Al, znalazły się geny kodujące transportery metali z rodziny NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein). Jeden z nich jest homologiczny do *ZmNramp1* (*Nramp aluminum transporter 1*), który koduje transporter błonowy glinu u kukurydzy [27, 28]. Sugeruje się, że białka membranowe NRAT1 są zaangażowane w mechanizm odpowiedzi na Al, odpowiadając za transport glinu z zewnątrz do wnętrza komórki, co zmniejsza stężenie glinu w apoplacie. Wśród genów reagujących na oba zastosowane stresy zidentyfikowaliśmy geny kodujące transportery potasu, cynku i miedzi. Natomiast transportery magnezu były aktywowane tylko przez Al. Wśród nich znajdował się ortolog ryżowego *OsMGT1* (*Magnesium Transporter 1*), który w naszym doświadczeniu miał podwyższoną ekspresję zarówno po krótkotrwałym, jak i długotrwałym traktowaniu Al. Podobnie u ryżu, ekspresja *OsMGT1* jest szybko indukowana tylko przez Al i dodatkowo wykazano, że jest regulowana przez *OsART1* [29]. Transporter MGT1 odpowiada za pobór jonów magnezu w korzeniach. Sugeruje się, że zwiększenie wewnętrznego stężenia Mg^{2+} jest kluczowe dla nadawania tolerancji na Al [30]. Inną grupą ciekawych białek

błonowych są transportery ABC (ATP-Binding Cassette), które należą do dużej rodziny białek odpowiedzialnych za aktywny transport różnych ligandów przez błony [31]. W naszym badaniu wykazano, że wiele genów kodujących transportery ABC było indukowanych przez Al. Dwa z nich, aktywowane specyficznie tylko przez Al, są homologiczne do ryżowego *OsALSI* (*Aluminum Sensitive1*). *OsALSI* koduje transporter ABC zlokalizowany w tonoplaście i jest regulowany przez OsART1. Białko to jest odpowiedzialne za transport glinu do wakuoli, gdzie ulega sekwestracji, a ekspresja *OsALSI* u ryżu jest również specyficznie indukowana przez Al, a nie przez niskie pH [32]. Z uwagi na zwiększenie ekspresji dwóch ortologów *OsALSI* w odpowiedzi na Al w naszym doświadczeniu, można przypuszczać, że oba z nich są potencjalnie zaangażowane w wewnętrzną detoksykację glinu u jęczmienia.

Najlepiej poznane mechanizmy pomagające roślinom wyższym radzić sobie z toksycznością jonów glinu w kwaśnych glebach opierają się na procesie wydzielania kwasów organicznych (OAs – organic acids) z korzeni do ryzosfery. Uwolnione kwasy organiczne skutecznie chelatują jony Al^{3+} , neutralizując ich toksyczne działanie i zapobiegając ich wnikanii do komórek korzeniowych. Mechanizm ten, określany jako mechanizm wykluczania Al, stanowi pierwszą linię obrony roślin. Dodatkowo, kwasy organiczne mogą pełnić funkcję również wewnątrz komórki, gdzie uczestniczą w detoksykacji jonów Al^{3+} poprzez tworzenie z nimi nietoksycznych kompleksów w cytoplazmie lub w wakuolach. Ten wewnętrzny mechanizm znany jest jako mechanizm tolerancji Al. [7].

Różne gatunki roślin w odpowiedzi na Al wydzielają z korzeni różne kwasy organiczne, głównie cytrynian, jabłczan i/lub szczawian, przy czym ilość wydzielanych anionów tych związków koreluje z poziomem tolerancji danego gatunku lub odmiany na toksyczność glinu [33]. Jęczmień jest najbardziej wrażliwy na Al spośród zbóż, a w odpowiedzi na stres Al wydziela do ryzosfery cytrynian. Wykazano, że różnice w tolerancji na Al pomiędzy odmianami jęczmienia są w dużej mierze związane z wydajnością wydzielania cytrynianu do ryzosfery [34]. Zgodnie z tym, w naszym badaniu długotrwała ekspozycja na Al spowodowała istotne zwiększenie ekspresji genu kodującego syntazę cytrynianową, ale również, co zaskakujące, wzrost ekspresji genu kodującego syntazę jabłczanową. Kwasy organiczne wytwarzane przez rośliny są wydzielane do ryzosfery za pośrednictwem transporterów błonowych. W naszych badaniach gen *HvALMT1* (*Aluminum-activated Malate Transporter 1*), kodujący błonowy transporter jabłczanu, nie wykazywał zwiększonej ekspresji w odpowiedzi na Al. Może to sugerować, że jęczmień nie uwalnia jabłczanu do ryzosfery, a zwiększona ekspresja syntazy jabłczanowej po ekspozycji na Al może wskazywać, że jabłczan uczestniczy w wewnętrznej detoksykacji Al. Z kolei błonowym transporterem cytrynianu u jęczmienia jest HvAACT1

(Aluminum Activated Citrate Transporter 1). W przeciwieństwie do większości gatunków roślin, u których geny kodujące te transportery są indukowane przez Al, wykazano, że ekspresja *HvAACT1* u jęczmienia nie jest regulowana stresem Al, a odmiany jęczmienia cechujące się wyższą tolerancją na Al charakteryzowały się konstytutywnie podwyższoną ekspresją tego genu [35]. W naszych badaniach ekspresja genu *HvAACT1* również nie wzrastała pod wpływem niskiego pH ani Al, potwierdzając wcześniejsze obserwacje.

W artykule **Szurman-Zubrzycka i in. (2021)** po raz pierwszy przeprowadzono globalną analizę transkryptomu komórek merystematycznych korzeni jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) rosnących w warunkach niskiego pH oraz traktowanych glinem. Udostępniono pełną listę genów o zróżnicowanej ekspresji, która może stanowić cenne narzędzie w przyszłych badaniach nad mechanizmami toksyczności H^+ (niskiego pH) oraz Al^{3+} w tej istotnej roślinie uprawnej. Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat złożonych mechanizmów odpowiedzialnych za tolerancję na niskie pH i toksyczność Al u jęczmienia, wskazując, że w odpowiedzi na te stresy uruchamiane są zarówno wspólne, jak i specyficzne ścieżki molekularne. Fakt aktywacji różnorodnych mechanizmów sugeruje możliwość tworzenia odmian jęczmienia o wyższej tolerancji na H^+ i Al poprzez tzw. piramidowanie odpowiednich genów. Na podstawie naszych wyników możemy jednoznacznie stwierdzić, że oba czynniki – niskie pH i Al – stanowią stresory dla jęczmienia. Niemniej jednak, glin wywołuje szerszy wachlarz zmian w transkryptomie, szczególnie gdy rośliny są wystawione na ten stres przez dłuższy czas.

Fitotoksyczność jonów glinu a ścieżka DDR u roślin

Jak wspomniano powyżej, najlepiej poznane mechanizmy obronne roślin przed toksycznością jonów glinu opierają się na wykorzystaniu kwasów organicznych (OAs). W odpowiedzi na Al kwasy te są wydzielane na zewnątrz korzenia, gdzie chelatują jony glinu, uniemożliwiając ich wnikanie do komórek. OAs mogą neutralizować jony glinu również wewnątrz komórki tworząc z nimi nieszkodliwe kompleksy, które są sekwestrowane w wakuoli. Mechanizmy te zostały szczegółowo opisane w literaturze naukowej [36]. W związku z tym, postanowiliśmy skupić się na innych aspektach odpowiedzi roślin na toksyczność jonów glinu w środowisku o niskim pH. Większość jonów glinu, które wniknęły do korzenia wiąże się z ujemnie naładowanymi elementami w ścianie komórkowej, co prowadzi do jej usztywnienia i ogranicza możliwość elongacji komórek. W rezultacie, wpływa to na zahamowanie wzrostu korzenia. Natomiast pozostałe jony glinu, które przedostały się do wnętrza komórki, mogą prowadzić do uszkodzeń DNA zarówno w sposób bezpośredni – poprzez interakcje z ujemnie naładowanymi

resztami fosforanowymi w DNA – jak i pośredni, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego wynikającego z nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) [37]. Wcześniejsze prace prowadzone w naszym zespole potwierdziły, że Al powoduje zaburzenia integralności DNA oraz hamuje podziały komórkowe u jęczmienia [38]. W opisanej powyżej pracy dotyczącej RNA-seq (**A3**) również zaobserwowaliśmy, że rośliny poddane działaniu glinu doświadczają stresu oksydacyjnego, który może skutkować uszkodzeniami DNA. Ogólnie rzecz ujmując, uszkodzenia DNA aktywują tzw. ścieżkę DDR (DNA Damage Response), która inicjuje mechanizmy naprawy DNA, a jednocześnie prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w celu zapobieżenia proliferacji komórek z uszkodzonym genomem.

Pierwsze dowody na to, że aktywacja ścieżki DDR jest przynajmniej częściowo odpowiedzialna za inhibicję wzrostu korzeni wywołaną przez glin, pochodziły z badań na *Arabidopsis* [podsumowano w 39]. W tych interesujących badaniach wykorzystano mutant nadwrażliwego na glin, który akumuluje jony Al^{3+} w korzeniach, i poddano go mutagenzie supresorowej. Zidentyfikowano kilka genów, w których mutacje prowadziły do zniesienia nadwrażliwości mutantu – geny te kodowały kluczowe elementy ścieżki DDR. Wskazało to na potencjalne możliwości modulowania tolerancji na Al poprzez modyfikacje genów związanych ze ścieżką DDR. Dlatego postanowiliśmy zgłębić ten nowy obszar związany z odpowiedzią i tolerancją roślin na jony glinu.

W pracy przeglądowej (**Szurman-Zubrzycka i in., 2023; A4**) podsumowaliśmy szczegółowo dotychczasową wiedzę dotyczącą DDR u roślin. Ścieżka DDR jest wysoce konserwowana pomiędzy wszystkimi gatunkami roślin i zwierząt. Uszkodzenia DNA są rozpoznawane przez specyficzne kinazy: ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), która rozpoznaje podwójne pęknięcia DNA (DSBs – Double Strand Breaks) i ATR (ATM and Rad3-related), która rozpoznaje pojedyncze pęknięcia DNA i jest rekrutowana do jednoniciowych fragmentów DNA oraz zatrzymanych widełek replikacyjnych. Kinazy te uruchamiają przekazywanie sygnału o uszkodzeniu DNA, powodują m.in. fosforylację histonu H2AX. Fosforylowany histon H2AX (γ H2AX) jest powszechnie używanym markerem uszkodzeń DNA. U roślin, obie kinazy fosforylują i aktywują czynnik transkrypcyjny z rodziny NAC – SOG1 (Suppressor of Gamma Radiation 1), który jest głównym regulatorem ścieżki DDR. U zwierząt funkcję tę pełni supresor transformacji nowotworowej p53. Co ciekawe, SOG1 i p53 należą do zupełnie innych rodzin białek i ich sekwencje nie są homologiczne, natomiast pełnią taką samą funkcję, dlatego SOG1 nazywany jest również homologiem funkcjonalnym P53. SOG1 (inaczej NAC8) to główny czynnik transkrypcyjny DDR u roślin. Aktywowany SOG1 reguluje ekspresję setek

genów związanych z naprawą DNA (np. *RAD51*, *BRCA1*), regulacją cyklu komórkowego (np. *SMR5*, *SMR7*) oraz programowaną śmiercią komórkową - PCD (np. *PLA2A*) (Fig. 1).

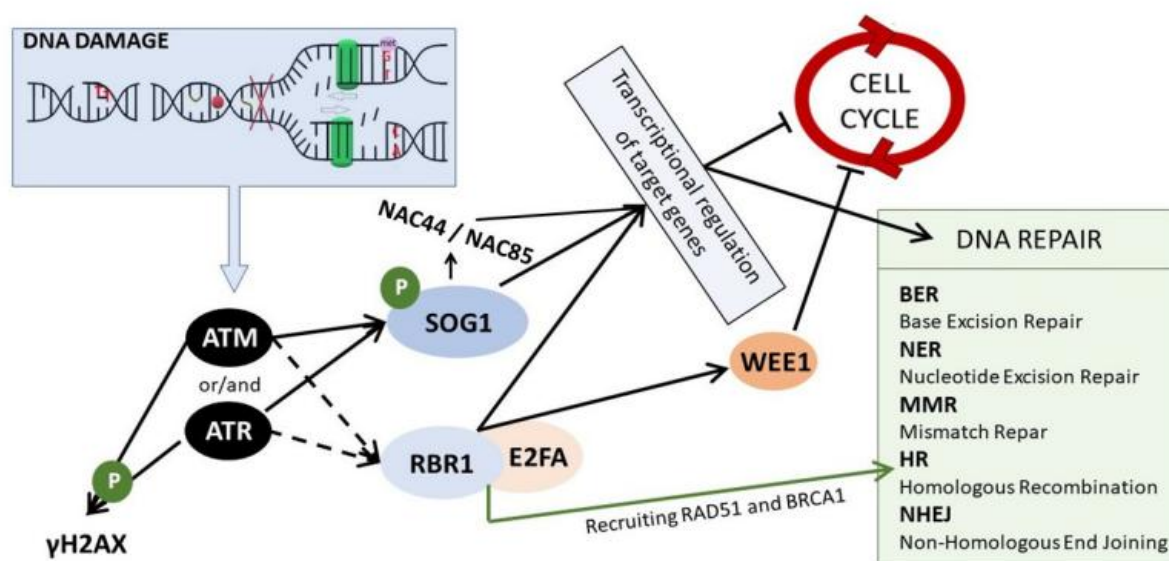


Figura 1. Schemat sygnalizacji DDR u roślin. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA aktywowane są kinazy ATM i/lub ATR. Kinaza ATM jest aktywowana w przypadku podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs), natomiast kinaza ATR w odpowiedzi na pojedyncze pęknięcia nici DNA (SSBs) oraz stres replikacyjny. Kinazy te fosforylują i aktywują czynnik transkrypcyjny SOG1, który reguluje geny odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę DNA. Regulacja ta odbywa się zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, np. poprzez inne czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC, takie jak NAC44 i NAC85. Kinazy ATM i ATR prowadzą również do fosforylacji histonu H2AX oraz indukują formowanie kompleksu RBR1/E2FA, który reguluje ekspresję genów związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego i uczestniczy w naprawie DNA na drodze HR poprzez rekrutację RAD51 i BRCA1 do uszkodzeń DNA.

W naszej pracy przeglądowej omówiliśmy bardzo szczegółowo proces przekazywania sygnału o uszkodzeniu DNA, różne mechanizmy naprawy uruchamiane przez różne typy uszkodzeń DNA (tj. BER – Base Excision Repair, NER – Nucleotide Excision Repair, MMR – Mismatch Repair, HR – Homologous Recombination i NHEJ – Non-Homologous End Joining), proces hamowania cyklu komórkowego, endoreduplikacji i, jeśli uszkodzenia nie zostaną naprawione, proces programowanej śmierci komórkowej. W pracy znajduje się zestawienie genów biorących udział we wszystkich tych procesach u roślin wraz z ich numerami akcesyjnymi dla *Arabidopsis* umożliwiającymi identyfikację ich sekwencji.

W oparciu o wiedzę dotyczącą DDR oraz wyniki uzyskane w badaniach nad mutantami supresorowymi *Arabidopsis* o zniesionej nadwrażliwości na Al, postanowiliśmy przeprowadzić analizę funkcjonalną genów *ATR* oraz *SOG1* (*NAC8*) u jęczmienia, pod kątem ich udziału w odpowiedzi na fitotoksyczne jony glinu. Nasza analiza funkcjonalna opierała się na badaniach mutantów TILLING w wybranych genach. Zanim jednak otrzymaliśmy takie mutanty

musieliśmy stworzyć platformę TILLINGową dla jęczmienia, która umożliwiła nam ich identyfikację.

Stworzenie narzędzia do analizy funkcjonalnej genów

TILLING (Targeted Induced Local Lesions IN Genomes) to strategia tzw. odwrotnej genetyki opracowana w 2000 roku [40], wykorzystywana do analizy funkcjonalnej genów. Metoda ta opiera się na klasycznej mutagenizie, najczęściej chemicznej, prowadzącej do losowego wprowadzania mutacji w różnych miejscach w genomie. Następnie, za pomocą wysokoprzepustowych technik detekcji, identyfikuje się osobniki posiadające mutacje w konkretnych genach zainteresowania. Tak wyselekcjonowane mutanty TILLING stanowią podstawę dalszych badań nad funkcją analizowanych genów.

W naszym zespole stworzyliśmy platformę TILLINGową jęczmienia, nazwaną *HorTILLUS* – (*Hordeum vulgare* – TILLING – University of Silesia). W 2018 roku opublikowaliśmy obszerną pracę prezentującą tę platformę (Szurman-Zubrzycka i in., 2018; zał. A1). Populacja *HorTILLUS* jest cały czas odnawiana i służy nam do dziś w celu identyfikacji mutacji w wielu genach. Jest wykorzystywana nie tylko przez nasz zespół, ale również, na zasadzie współpracy naukowej, jest udostępniana innym jednostkom, zarówno z kraju (np. Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu), jak i z zagranicy (np. Uniwersytet w Nottingham, czy Czeska Akademia Nauk).

Platforma ta została stworzona dla jęczmienia odm. ‘Sebastian’, po traktowaniu ziarniaków dwoma mutagenami – N-metylo-N-nitrozomocznikiem (MNU) oraz azydkiem sodu (NaN_3) (Fig. 2). Wykorzystane mutageny indukują mutacje punktowe (głównie zmiany G/C do A/T). Populację prezentowaną w pracy z 2018 roku stanowiło 9 600 roślin pokolenia M_2 (drugiego pokolenia po mutagenizie). Z każdej rośliny M_2 zebrano indywidualnie ziarniaki (które zostały odpowiednio opisane i zdeponowane w bazie nasion), wyizolowano DNA i odpowiednio zpułowano (w 8-osobnikowe pule). Takie pule służyły do identyfikacji mutacji z wykorzystaniem sekwenatora typu LI-COR. Procedura identyfikacji opierała się na reakcji PCR na pulach, umożliwiającej amplifikację analizowanego genu bądź jego fragmentu. Następnie produkty reakcji PCR były poddawane denaturacji i powolnej renaturacji, w wyniku których w pulach, w których znajdowało się DNA roślin z mutacją w obrębie analizowanego fragmentu, dochodziło do powstawania tzw. heterodupleksów (czyli dwuniciowych fragmentów - produktów reakcji PCR z pojedynczym niedopasowaniem w miejscu mutacji). Następnie wykorzystywano enzym Cel-I, który jest endonukleazą specyficznie rozpoznającą i tnącą DNA w miejscu niedopasowania. Po reakcji cięcia enzymatycznego produkty były

oczyszczane i rozdzielane w żelu poliakrylamidowym w sekwenatorze LI-COR. W pulach, w których znajdowało się DNA rośliny z mutacją w obrębie analizowanego fragmentu, poza produktem reakcji PCR, widoczne były również dodatkowe dwa produkty będące produktami cięcia enzymatycznego. W ten sposób identyfikowano 8-osobnikowe pule zawierające mutacje w określonych genach. Kolejnym etapem była identyfikacja poszczególnych osobników niosących te potencjalne mutacje. Dokonywano tego poprzez tworzenie puli dwuosobnikowych zawierających DNA każdego z 8 mutantów z każdej pozytywnej puli oraz odmiany wyjściowej 'Sebastian'. Na pulach dwuosobnikowych przeprowadzano taką samą procedurę jak na pulach 8-osobnikowych. Zidentyfikowane mutacje zawsze potwierdzano poprzez sekwencjonowanie. W omawianej pracy przedstawiliśmy nasze pierwsze wyniki wygenerowane dla 32 genów. Wykazano, że większość zidentyfikowanych mutacji to mutacje typu G/C do A/T, a średnia częstotliwość mutacji wynosi 1 / 477 kbp. Wyniki te jasno pokazały, że nasza platforma *HorTILLUS* jest bogatym źródłem indukowanych mutacji, która może być wykorzystywana do analizy funkcjonalnej wybranych genów. Ponadto każda roślina M₂ została poddana wstępnej analizie fenotypowej, a dla 3 841 roślin M₂ wyprowadzono linie M₃, które zostały scharakteryzowane pod względem wielu cech w warunkach polowych. Zidentyfikowano wiele linii o ciekawych cechach – na przykład mutanty karłowe, o kłosach sześciorzędowych (odm. 'Sebastian' jest dwurzędowa), czy wczesne (szybciej produkujące nasiona, co może być istotną cechą agronomiczną umożliwiającą zbiory przed atakiem letniej suszy). Populacja ta może zatem służyć nie tylko jako populacja TILLING wykorzystywana w genetyce odwrotnej (do identyfikacji mutacji w konkretnych genach w celu poznania ich funkcji), ale również jako źródło mutantów do wykorzystania w genetyce klasycznej (w celu znalezienia mutantów o interesujących cechach, a potem poszukiwaniu mutacji leżących u podstaw tych cech).

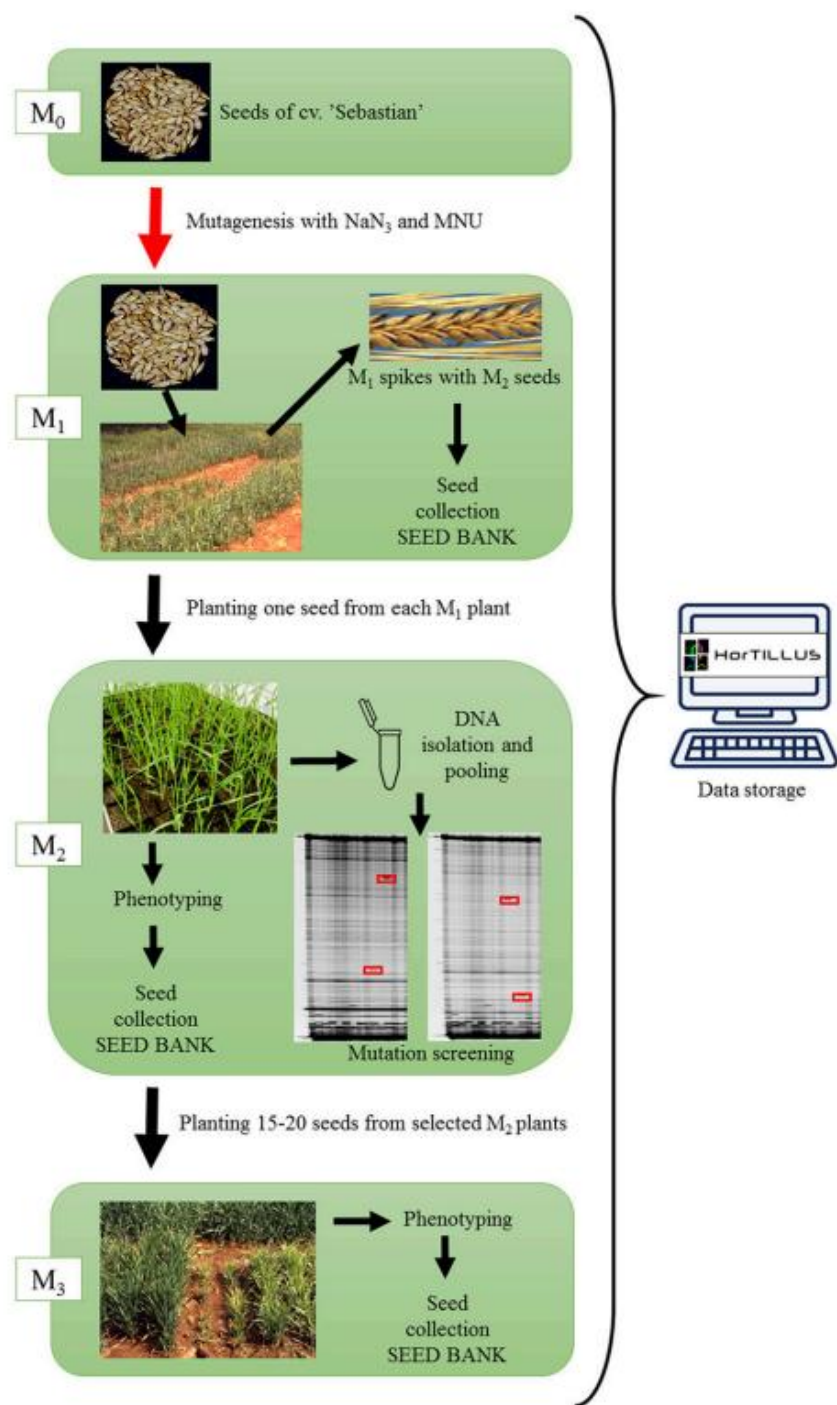


Figura 2. Schemat tworzenia populacji *HorTILLUS*.

W moich dalszych pracach związanych z AI i ścieżką DDR wykorzystałam populację *HorTILLUS* w celu identyfikacji roślin niosących mutacje w genach *HvATR* oraz *HvSOG1* (*HvNAC8*). Mutacje identyfikowałam w DNA wyizolowanym z roślin pokolenia M₂, a następnie wykorzystałam zdeponowane w banku nasion ziarniaki (pochodzące z odpowiednich roślin M₂) do rozmnożenia materiału i analiz fenotypowych.

Analiza funkcjonalna genu HvATR u jęczmienia

Gen *ATR* (*Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related*) koduje kinazę serynowo-treoninową, która rozpoznaje uszkodzenia DNA i uruchamia przekazywanie sygnału aktywujące ścieżkę DDR. W ramach naszej pracy opisanej w artykule **Szurman-Zubrzycka i inni, 2019 (zał. A2)** przeprowadziliśmy analizę funkcjonalną tego genu u jęczmienia. Z wykorzystaniem strategii TILLING i naszej populacji *HorTILLUS* zidentyfikowaliśmy, pośród 6 144 roślin M_2 , 17 mutantów w genie *HvATR*. Wśród nich były rośliny, które niosły mutacje niezmieniające sekwencji aminokwasowej białka (mutacje intronowe i ciche), jak również mutacje wpływające na zmianę kodowanego aminokwasu (mutacje missensowne). Po wstępnych analizach odpowiedzi mutantów na toksyczność glinu, do szczegółowych analiz wytypowano mutantą *hvatr.g* niosącego mutację G6054A w sekwencji genomowej, która prowadziła do substytucji aminokwasowej G1015S (glicyna w pozycji 1015 białka została zamieniona na serynę). Miejsce występowania tej mutacji znajduje się w obrębie domeny funkcjonalnej i jest wysoce konserwowane między gatunkami roślin i zwierząt.

Wykazano, że w warunkach kontrolnych, bez żadnego stresu genotoksycznego, system korzeniowy mutantą *hvatr.g* różni się znacząco od jego odmiany wyjściowej ‘Sebastian’ (WT). Po 14 dniach wzrostu w systemie semi-hydroponicznym, w którym rośliny były nawadniane pożywką Hoaglanda, przeprowadzono skanowanie oraz analizę systemu korzeniowego za pomocą oprogramowania WinRHIZO. Stwierdzono, że długość najdłuższego korzenia zarodkowego u mutantą była ponad dwukrotnie mniejsza w porównaniu do roślin typu dzikiego (*hvatr.g* – 11 cm, WT – 23 cm). Co ciekawe, mutant wytwarzał większą liczbę korzeni zarodkowych o większej średnicy w porównaniu do odmiany ‘Sebastian’. Ponadto u mutantą *hvatr.g* zaobserwowano dłuższe korzenie boczne. Podobne tendencje zaobserwowano w warunkach hydroponicznych podczas 7-dniowego eksperymentu z zastosowaniem glinu, gdzie również odnotowano znaczną redukcję długości korzeni zarodkowych u mutantą w porównaniu do roślin typu dzikiego w warunkach kontrolnych. Jednak wpływ glinu na redukcję systemu korzeniowego mutantą był mniej wyraźny niż w przypadku odmiany ‘Sebastian’. U odmiany ‘Sebastian’ wszystkie trzy analizowane dawki jonów Al^{3+} (5, 10 i 15 μM) powodowały istotną redukcję długości najdłuższego korzenia zarodkowego, wynoszącą odpowiednio 25%, 55% i 60%. Natomiast u mutantą nie odnotowano statystycznie istotnej redukcji długości najdłuższego korzenia zarodkowego pod wpływem Al^{3+} . Analiza sumarycznej długości wszystkich korzeni zarodkowych i bocznych wykazała, że najwyższa dawka glinu u roślin typu dzikiego spowodowała jej redukcję o 80%, podczas gdy u mutantą spadek ten wyniósł jedynie 30%. Dodatkowo, typowym objawem toksyczności glinu u roślin jest zwiększenie średnicy

korzeni zarodkowych pod wpływem jonów Al^{3+} , co zaobserwowano również u odmiany ‘Sebastian’. Natomiast w przypadku mutantu *hvatr:g* średnica korzeni była większa już w warunkach kontrolnych i nie ulegała dalszemu zwiększeniu pod wpływem glinu. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że mutant *hvatr:g* wykazuje tolerancję na obecność glinu w środowisku.

Aby bardziej szczegółowo zbadać to zjawisko, przeanalizowano częstotliwość podziałów komórkowych w systemie korzeniowym roślin traktowanych i nietraktowanych glinem, po 7 dniach wzrostu w warunkach hydroponicznych. W warunkach kontrolnych częstotliwość podziałów komórkowych była na podobnym poziomie u obu analizowanych genotypów i wynosiła 4,5%. Natomiast u odmiany ‘Sebastian’ traktowanie roślin $10\ \mu M\ Al^{3+}$ prowadziło do ponad dwukrotnego zmniejszenia częstotliwości podziałów komórkowych, podczas gdy u mutantu *hvatr:g* glin nie miał istotnego wpływu na ten parametr (Fig. 3A). Wnioskować z tego można, że utrzymanie tej samej częstotliwości podziałów komórkowych sprawia, iż u mutantu długość korzenia po działaniu glinu nie ulega skróceniu w porównaniu do warunków kontrolnych. Analiza cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazała, że w warunkach kontrolnych mutant *hvatr:g* charakteryzował się wyższym odsetkiem komórek w fazie G2/M (61%) oraz mniejszym w fazie S (20%) w porównaniu do roślin typu dzikiego (WT), u których w fazie G2/M znajdowało się 43% komórek, a w fazie S 32%. Traktowanie jonami Al^{3+} nie wpływało na profil cyklu komórkowego u mutantu, natomiast u odmiany ‘Sebastian’ prowadziło do zmniejszenia liczby komórek w fazie S (do 22%) oraz zwiększenia liczby komórek w fazie G2/M (do 62%) (Fig. 3B). Dodatkowo, analiza TUNEL, umożliwiająca detekcję jąder z uszkodzonym DNA, wykazała, że u odmiany ‘Sebastian’ traktowanie roślin glinem powodowało wzrost liczby jąder z uszkodzonym DNA z 2% w warunkach kontrolnych do 14% i 20% po zastosowaniu odpowiednio 5 i $10\ \mu M$ jonów Al^{3+} . Zaskakująco, u mutantu już w warunkach kontrolnych ponad 60% jąder wykazywało uszkodzenia DNA. Po ekspozycji na glin u *hvatr:g* liczba jąder z uszkodzonym DNA wzrosła o dodatkowe 10% (Fig. 3C). Podobne wyniki uzyskano dla innego mutantu w tym genie – *hvatr:i*. W badaniach na mutancie *atr* Arabidopsis również wykazano, na podstawie testu kometowego, że mutant ten charakteryzuje się wyższym poziomem uszkodzeń DNA niż WT (Col-0) w warunkach kontrolnych, jednak różnica ta nie była tak istotna jak w przypadku mutantów *atr* jęczmienia [41].

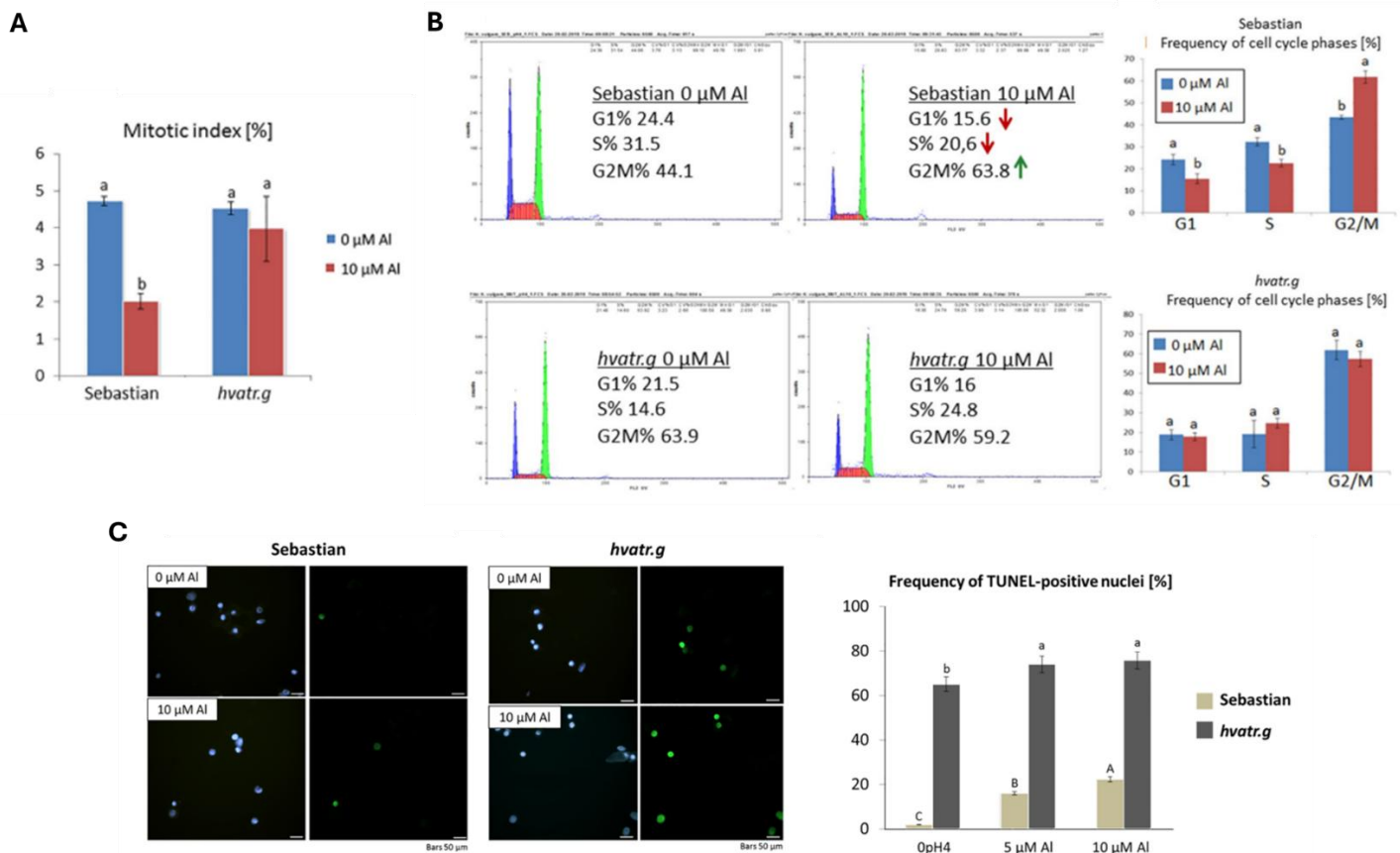


Figura 3. Wybrane wyniki obrazujące odpowiedź mutantu *hvatr.g* oraz jego odmiany wyjściowej ‘Sebastian’ na fitotoksyczne jony glinu. (A) częstotliwość podziałów komórkowych w merystemach korzeniowych w warunkach hydroponicznych bez glinu oraz z 10 μM Al^{3+} ; (B) profil cyklu komórkowego w merystemach korzeniowych w warunkach hydroponicznych bez glinu oraz z 10 μM Al^{3+} ; (C) częstotliwość jąder TUNEL-pozytywnych, świadczących o uszkodzeniach DNA, w merystemach korzeniowych w warunkach hydroponicznych bez glinu oraz z 5 i 10 μM Al^{3+} wraz z przykładowymi zdjęciami spod mikroskopu (po lewej: jądra świecące na niebiesko – filtr DAPI – wszystkie jądra widoczne w polu widzenia; po prawej: jądra świecące na zielono – filtr FITC – jądra z uszkodzonym DNA).

Nasze wyniki jasno wskazują, że ścieżka DDR jest zaburzona u mutantów *atr* jęczmienia. Mutanty te charakteryzują się zaburzoną naprawą uszkodzeń DNA, a jednocześnie wykazują fenotyp tolerancyjny na glin. Wysoka częstotliwość uszkodzeń DNA zaobserwowana u mutantów już w warunkach kontrolnych nie doprowadziła do zahamowania progresji cyklu komórkowego. Traktowanie glinem zwiększyło poziom uszkodzeń DNA, ale nie miało wpływu na aktywność mitotyczną ani na profil cyklu komórkowego u mutantu *hvatr.g*. W opisanym artykule wskazaliśmy kluczową rolę kinazy HvATR w ścieżce DDR u jęczmienia – kinaza ta jest wymagana do detekcji uszkodzeń DNA zachodzących w wyniku normalnego funkcjonowania komórki, jak również do detekcji uszkodzeń DNA wywołanych przez toksyczne jony Al^{3+} u jęczmienia. Z naszych badań wynika, że redukcja wzrostu korzeni w

odpowiedzi na glin jest przynajmniej częściowo wywołana aktywacją odpowiedzi DDR zależną od ATR, prowadzącą do zatrzymania cyklu komórkowego.

Badania te są szczególnie istotne z uwagi na fakt, że jęczmień, który jest ważną rośliną użytkową, jest bardzo wrażliwy na Al, a nasze mutanty *hvatr.g* i *hvatr.i* charakteryzują się zwiększoną tolerancją na ten stres.

Analiza funkcjonalna genu HvSOG1 (HvNAC8) u jęczmienia

Kolejnym genem zaangażowanym w szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), którego funkcję analizowaliśmy u jęczmienia, jest *SOG1* (*Suppressor Of Gamma Radiation 1*). Wyniki naszych badań zostały przedstawione w artykule **Szurman-Zubrzycka i in., 2025 (zał. A6)**. *SOG1* należy do dużej, specyficznej tylko dla roślin, rodziny czynników transkrypcyjnych NAC (NAM, ATAF, and CUC), a jego alternatywna nazwa to NAC8. Jest on głównym regulatorem ścieżki DDR uruchamiającym setki genów w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W badaniach na *Arabidopsis* wykazano, że mutacja w genie *AtSOG1* znosiła nadwrażliwość na glin u mutantu *als3*, jak również prowadziła do zwiększonej tolerancji na glin u roślin typu dzikiego [42].

Na podstawie analizy *in silico* przeprowadzonej w oparciu o sekwencję *AtSOG1(NAC8)* zidentyfikowaliśmy jęczmiennego homologa - *HvNAC8*. W celu identyfikacji mutantów jęczmienia niosących zmiany w obrębie genu *HvNAC8* ponownie wykorzystaliśmy populację *HorTILLUS* i strategię TILLING. Zidentyfikowaliśmy łącznie 27 roślin z różnymi mutacjami w tym genie, a wśród zidentyfikowanych mutacji aż 14 stanowiły mutacje zmiany sensu. Wstępna analiza bioinformatyczna z wykorzystaniem narzędzia PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, https://provean.jcvi.org/seq_submit.php) wykazała, że cztery z tych mutacji – *hvnac8.c*, *hvnac8.i*, *hvnac8.k* i *hvnac8.ac* – mogą potencjalnie wpłynąć na aktywność białka *HvNAC8*. Największy zaburzający wpływ na kodowane białko, określony przez najniższy wynik PROVEAN Score, miała mutacja *hvnac8.k*. W związku z tym mutant *hvnac8.k* został wybrany do dalszych szczegółowych analiz. Zbadano odpowiedź tego mutantu na dwa czynniki genotoksyczne: jony glinu w środowisku o niskim pH oraz zeocynę (czynnik radiomimetyczny, powodujący powstawanie podwójnych pęknięć DNA, DSBs).

Nasze wyniki jednoznacznie wskazują, że mutant *hvnac8.k* wykazuje zaburzenia w funkcjonowaniu szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Wykazano, że podobnie jak wcześniej analizowany mutant *hvatr.g*, również *hvnac8.k* akumuluje uszkodzenia DNA nawet w warunkach kontrolnych, tj. bez ekspozycji na czynniki genotoksyczne. Potwierdzono to również dla innych mutantów w genie *HvNAC8* – *hvnac8.i* i *hvnac8.ac*, co dodatkowo

podkreśla rolę szlaku DDR w utrzymaniu integralności genomu podczas normalnego wzrostu roślin. Jednak, pomimo tej akumulacji uszkodzeń w warunkach kontrolnych oraz ich nasilonej akumulacji po traktowaniu czynnikami genotoksycznymi, takimi jak jony glinu i zeocyna, komórki merystemu korzeniowego mutantu *hvnac8.k* nie wykazują aż tak dużych zakłóceń w przebiegu cyklu komórkowego jak u jego odmiany wyjściowej 'Sebastian' w odpowiedzi na badane czynniki genotoksyczne. W odpowiedzi na najwyższą badaną dawkę zeocyny u odmiany 'Sebastian' zaobserwowano 25% spadek częstotliwości podziałów komórkowych, podczas gdy u mutantu *hvnac8.k* nie stwierdzono żadnych zmian w tym parametrze. Z kolei najwyższa analizowana dawka glinu spowodowała 55% redukcję indeksu mitotycznego u WT, natomiast u mutantu redukcja ta wyniosła jedynie 25%. Wyniki te przekładają się na parametry systemu korzeniowego - po 7 dniach traktowania Al, redukcja systemu korzeniowego mutantu *hvnac8.k* była mniej znacząca niż w przypadku WT (Fig. 4A-D).

Stwierdzono, że w odpowiedzi na stres spowodowany ekspozycją na jony glinu u odmiany 'Sebastian' dochodzi do zwiększenia ekspresji genu *HvRAD51*, zaangażowanego w naprawę uszkodzeń DNA. W przypadku mutantu *hvnac8.k* nie zaobserwowano indukcji ekspresji tego genu, co może przyczyniać się do zwiększonej liczby uszkodzeń DNA. Po 7 dniach wzrostu w warunkach niskiego pH z dodatkiem 10 μ M Al, u mutantu odnotowano około 70% jąder TUNEL-pozytywnych, w porównaniu do około 20% u roślin typu dzikiego (WT) (Fig. 4E). Podobne zależności zaobserwowano w eksperymencie z użyciem zeocyny, indukującej podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs). U mutantu częstość występowania jąder TUNEL-pozytywnych oraz jąder z mikrojądrami była istotnie wyższa zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po ekspozycji na zeocynę, w porównaniu do WT. Jednocześnie u odmiany 'Sebastian' po traktowaniu zeocyną odnotowano istotny wzrost ekspresji genów *HvBRCA1* i *HvRAD51*, związanych z aktywacją szlaku rekombinacji homologicznej (HR) w procesie naprawy DNA, podczas gdy u mutantu taki wzrost nie występował. Wyniki te sugerują, że gen *HvNAC8* reguluje ekspresję genów *HvRAD51* i *HvBRCA1* u jęczmienia. Dodatkowo przeanalizowano ekspresję innego genu z rodziny NAC, *HvNAC44*, którego poziom istotnie wzrastał po działaniu zeocyny u odmiany 'Sebastian', natomiast u mutantu indukcja ta była opóźniona w czasie. Uzyskane dane wskazują, że oba czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC biorą udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane zeocyną.

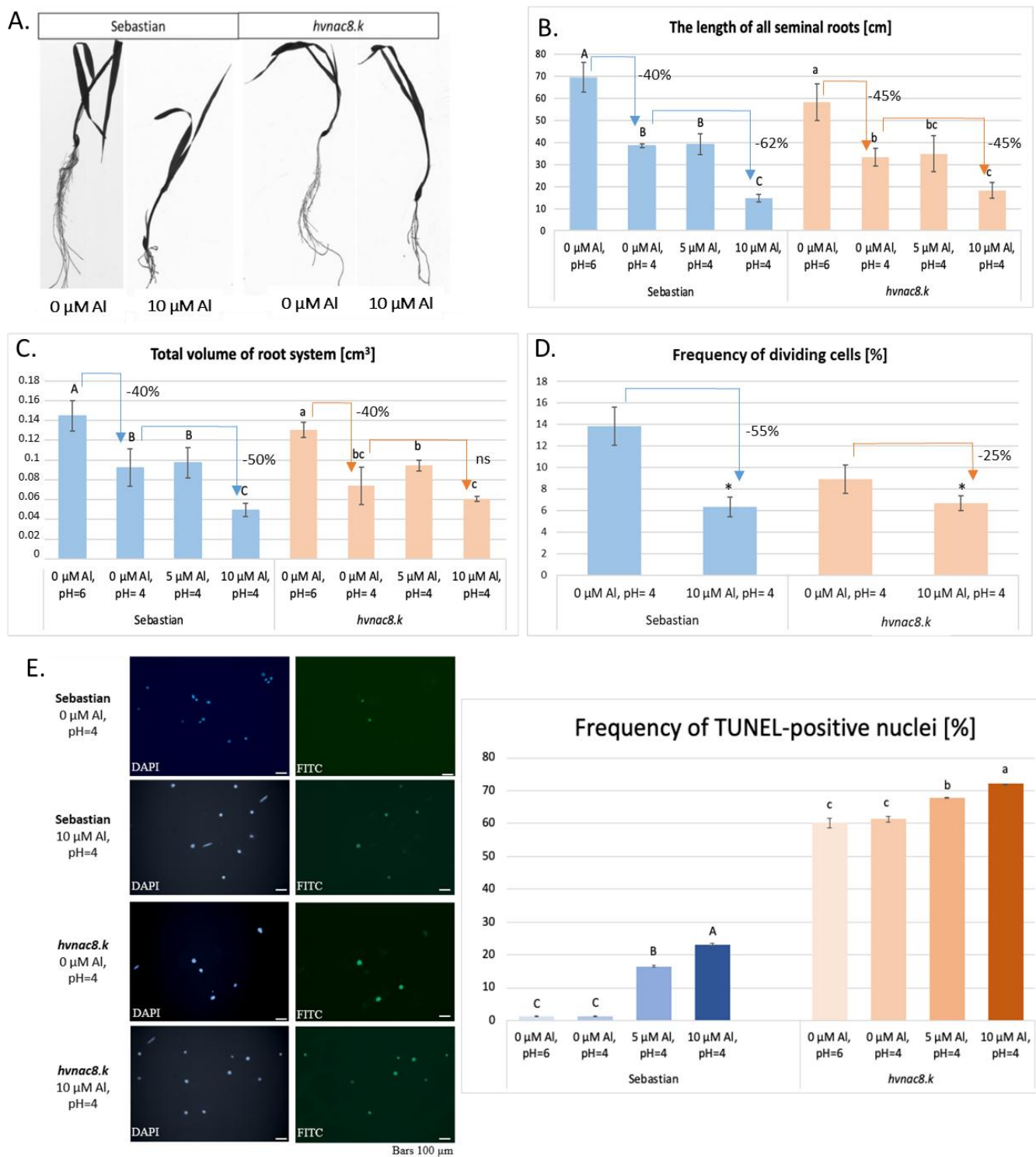


Figura 4. Odpowiedź mutantu *hvnac8.k* oraz jego odmiany wyjściowej ‘Sebastian’ na fitotoksyczne jony glinu. (A) przykładowe zdjęcia systemu korzeniowego rosnącego w warunkach hydroponicznych bez glinu (pH=4) oraz z 10 μ M Al³⁺; (B) sumaryczna długość korzeni zarodkowych siewek rosnących w warunkach kontrolnych o pH=6, pH=4 i z dodatkiem 5 i 10 μ M Al; (C) objętość całego systemu korzeniowego siewek rosnących w warunkach kontrolnych o pH=6, pH=4 i z dodatkiem 5 i 10 μ M Al; (D) częstotliwość podziałów komórkowych w merystemach korzeniowych w warunkach hydroponicznych bez glinu oraz z 10 μ M Al³⁺; (E) częstotliwość jąder TUNEL-pozytywnych, świadczących o uszkodzeniach DNA, w merystemach korzeniowych w warunkach hydroponicznych bez glinu o pH=6, o pH=4 oraz z 5 i 10 μ M Al³⁺ przy pH=4 wraz z przykładowymi zdjęciami spod mikroskopu (po lewej: jądra świecące na niebiesko – filtr DAPI – wszystkie jądra widoczne w polu widzenia; po prawej: jądra świecące na zielono – filtr FITC – jądra z uszkodzonym DNA).

Na podstawie przeprowadzonych analiz można wnioskować, że gen *HvNAC8* u jęczmienia odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA spowodowane zarówno przez czynniki endogenne, jak i egzogenne. Zestawienie wyników uzyskanych dla mutantów *hvatr:g* i *hvnac8.k* sugeruje, że modulacja szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) u jęczmienia może zwiększać tolerancję na stres wywołany obecnością jonów glinu w glebie o niskim pH, co stwarza potencjał dla zastosowań agronomicznych.

W oparciu o uzyskane wyniki oraz dostępne dane literaturowe opracowaliśmy podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat odpowiedzi roślin na fitotoksyczne jony glinu. W naszej obszernej pracy przeglądowej autorstwa **Kocjan i in., 2024 (zał. A5)**, której jestem autorem korespondencyjnym, szczegółowo omówiono wpływ jonów glinu na rośliny. Przedstawiliśmy wszystkie znane miejsca wiązania Al w komórkach roślinnych, a także szczegółowo opisaliśmy mechanizmy odpowiedzi związane z wydzielaniem kwasów organicznych na zewnątrz komórki oraz wewnątrzkomórkowe mechanizmy tolerancji na glin. Dodatkowo przeanalizowaliśmy kluczowe czynniki transkrypcyjne zaangażowane w te procesy, koncentrując się na roli czynnika transkrypcyjnego STOP1. Szczególną uwagę poświęciliśmy mechanizmom regulacji jego aktywności na poziomie potranskrypcyjnym i potranslacyjnym. W ramach dalszych badań planujemy skupić się właśnie na tym czynniku transkrypcyjnym, a jego szczegółowa analiza będzie przedmiotem naszych najbliższych prac. Otrzymaliśmy na ten cel finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (projekt OPUS, którego jestem kierownikiem), dedykowane m.in. analizie funkcjonalnej genu *HvSTOP1* u jęczmienia. W omawianej pracy przeglądowej podsumowaliśmy również najnowsze odkrycia dotyczące tolerancji roślin na glin, takie jak rola poliamin w zwiększaniu odporności na Al, czy znaczenie nowo zidentyfikowanych miRNA, które mogą odgrywać kluczową rolę w mechanizmach tolerancji. Na końcu pracy zestawiliśmy wyniki potwierdzające, że szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) odgrywa istotną rolę w reakcji roślin na jony Al^{3+} , a jego modyfikacje mogą przyczyniać się do zwiększenia tolerancji na toksyczne działanie glinu. Wnioski te mają uzasadnienie w badaniach, które stanowiły przedmiot opisywanego tutaj osiągnięcia naukowego.

Za najważniejsze spośród dotychczasowych osiągnięć uważam:

1. Stworzenie populacji *HorTILLUS*, która stanowiła materiał biologiczny większości opisywanych tutaj badań dotyczących ścieżki DDR i tolerancji na Al u jęczmienia. Populacja ta jest największą na świecie populacją TILLING jęczmienia, która jest stale odnawiana, co czyni ją ciągłym źródłem mutacji wykorzystywanym szeroko w licznych badaniach do dnia dzisiejszego.
2. Opracowanie i powszechne udostępnienie list DEGs (Differentially Expressed Genes) – (1) genów o zróżnicowanej ekspresji w warunkach niskiego pH w porównaniu do warunków optymalnego pH oraz (2) genów o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na fitotoksyczne jony glinu w porównaniu do warunków niskiego pH bez glinu u jęczmienia. Listy te umożliwiły identyfikację kluczowych genów zaangażowanych w odpowiedzi na dwa współistniejące w naturze stresy abiotyczne – niskie pH oraz jony glinu Al^{3+} . Zidentyfikowane DEGs stanowią cenne narzędzie nie tylko w kontekście moich teraźniejszych i przyszłych badań, ale także dla szerszego kręgu badaczy, umożliwiając dalsze analizy tych dwóch stresów.
3. Uzyskanie mutantów jęczmienia wykazujących tolerancję na fitotoksyczne jony glinu oraz wykazanie, na przykładzie mutantów *hvatr:g* i *hvnac8.k*, że modyfikacje szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) mogą przyczyniać się do zwiększenia tolerancji na stres związany z toksycznością glinu, co stanowi istotny krok w zrozumieniu mechanizmów adaptacyjnych roślin. Otrzymane wyniki podkreślają potencjał wykorzystania strategii modyfikacji DDR nie tylko w kontekście zwiększenia odporności na glin, lecz również w poprawie tolerancji roślin na inne czynniki środowiskowe, które indukują uszkodzenia materiału genetycznego.
4. Zebranie, podsumowanie i udostępnienie wiedzy na temat szlaku DDR oraz wpływu glinu na rośliny w postaci prac przeglądowych. Prace te mogą stanowić cenne źródło wiedzy dla badaczy zajmujących się tymi zagadnieniami.

Literatura:

- [1] Bhalerao, S., and Prabhu, D. (2013). Aluminium toxicity in plants – a review. *J. Appl. Chem.* 2,447-474
- [2] Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M., Suravajhala, P., et al. (2016). Toxicity and tolerance of aluminium in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29, 187—210. doi: 10.1007/s10534-016-9910-z
- [3] Rahman, M., Lee, S.-H., Ji, H., Kabir, A., Jones C., and Lee, K.-W. (2018). Importance of mineral nutrition for mitigating aluminium toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3073. doi: 10.3390/ijms19103073
- [4] Von Uexküll, H., and Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acidic soils. *Plant Soil* 171, 1-15. Doi: 10.1007/bf00009558

- [5] Singh, S., Tripathi, D., Singh, S., Shamra, S., Dubey, N., Chauhan, D., et al. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environ. Exp. Bot.* 137, 177-193. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.005
- [6] Barros, A., Chandnani, R., de Sousa, S., Maciel, L., Tokizawa, M., Guimaraes, C., et al. (2020). Genetic factors conditioning tolerance to multiple stresses for crops cultivated on acidic tropical soils. *Front. Plant Sci.* 11:565339. doi: 10.3389/fpls.2020.565339
- [7] Kochian, L., Piñeros, M., Liu, J., and Magalhaes, J. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminium resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 571-598. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114822
- [8] Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Sasaki, R., And Ofei-Manu, P. (2000). Comparison of the amount of citric and malic acids in Al. Media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 751-758. doi: 10.1080/00380768.2000.10409141
- [9] Wang, J., Raman, H., Zhang, G., Mendham, N., and Zhou, M. (2006). Aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 769-787. doi: 10.1631/jzus.2006.B0769
- [10] Kumari, M., Taylor, G. J., and Deyholds, M. K. (2008). Transcriptome responses to aluminium stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 279, 339-357. doi: 10.1007/s00438-007-0316-z
- [11] Zhang, Y., Zhu, D., Zhang, Y., Chen, H., Xiang, J., and Lin, X. (2015). Low pH-induced changes of antioxidant enzyme and ATPase activities in the roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *PLoS One* 10:e0116971. doi: 10.1371/journal.pone.0116971
- [12] Maron, L., Kirst, M., Mao, C., Milner, M., Menossi, M., and Kochian, L. (2008). Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytol.* 179, 116-128. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02440.x
- [13] Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J., and Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1124-1160. doi: 10.1089/ars.2011.4327
- [14] Nishinaka, Y., Masutani, H., Nakamura, H., and Yodoi, J. (2001). Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Repoty.* 6, 289-295. doi: 10.1179/135100001101536427
- [15] Nakano, Y., Kusunoki, K., Hoekenga, O., Tanaka, K., Iuchi, S., Sakata, Y., et al. (2020). Genome-wide association study and genomic prediction elucidate the distinct genetic architecture of aluminium and proton tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 11:405. doi: 10.3389/fpls.2020.00405
- [16] Kochian, L. (1995). Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 46, 237-260. doi: 10.1146/annurev.pp.46.060195.001321
- [17] Zheng, S., and Yang, J. (2005). Target sites of aluminium phytotoxicity. *Biol. Plant.* 49, 321-331. doi: 10.1007/s10535-005-0001-1
- [18] Silva, S. (2012). Aluminium toxicity targets in plants. *J. Bot.* 2012:219462. doi: 10.1155/2012/219462
- [19] Jaskowiak, J., Kwasniewska, J., Milewska-Hendel, A., Kurczynska, E., Szurman-Zubrzycka, M., and Szarejko, I. (2019). Aluminum alters the histology and pectin cell wall composition of barley roots. *Int. J. Mol. Sci.* 20:3039. doi: 10.3390/ijms20123039
- [20] Eticha, D., Stass, A., and Horst, W. (2005). Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant Cell Environ.* 28, 1410-1420. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01375.x
- [21] Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., et al. (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* 150, 281-294. doi: 10.1104/pp.108.134700
- [22] Yamaji, N., Huang, C., and Nagao, S. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulated multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21, 3339-3349. doi: 10.1105/tpc.109.070771
- [23] Fan, W., Lou, H., Gong, Y., Liu, M., Cao, M., Liu, Y., et al. (2015). Characterization of an inducible C2H2-type zinc finger transcription factor VuSTOP1 in rice bean (*Vigna umbellata*) reveals differential regulation between low pH and aluminum tolerance mechanisms. *New Phytol.* 208, 456-468. doi: 10.1111/nph.13456
- [24] Fang, Q., Zhang, J., Zhang, Y., Fan, N., van den Burg, H., and Huang, C. (2020). Regulation of aluminium resistance in *Arabidopsis* involves the SUMOylation of the zinc finger transcription factor STOP1. *Plant Cell* 32, 3921-3938. doi: 10.1105/tpc.20.00687

- [25] Fan, W., Lou, H., Yang, J., and Zheng, S. (2016). The roles of STOP1-like transcription factors in aluminum and proton tolerance. *Plant Signal. Behav.* 11:e1131371. doi: 10.1080/15592324.2015.1131371
- [26] Garcia-Oliveira, A., Benito, C., Prieto, P., de Andrade Menezes, R., Rodrigues-Pousada, C., Guedes-Pinto, H., et al. (2013). Molecular characterization of TaSTOP1 homoeologues and their response to aluminium and proton (H⁺) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.* 13:134. doi: 10.1186/1471-2229-13-134
- [27] Guimaraes, C., Simoes, C., Pastina, M., Maron, L., Magalhaes, J., Vasconcellos, R., et al. (2014). Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics* 15:153. doi: 10.1186/1471-2164-15-153
- [28] Matonyei, T., Barros, B., Guimaraes, R., Ouma, E., Cheprot, R., Apolinário, L., et al. (2020). Aluminum tolerance mechanisms in Kenyan maize germplasm are independent from the citrate transporter ZmMATE1. *Sci. Rep.* 10:7320. doi: 10.1038/s41598-020-64107-z
- [29] Chen, Z. C., Yamaji, N., and Motoyama, R. (2012). Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.* 159, 16224-11633. doi: 10.1104/pp.112.199778
- [30] Rengel, Z., Bose, J., Chen, Q., and Tripathi, B. (2015). Magnesium alleviates plant toxicity of aluminium and heavy metals. *Crop Pasture Sci.* 66, 1298-1307. doi: 10.1071/CP15284
- [31] Linton, K. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology* 22, 122-130. doi: 10.1152/physiol.00046.2006
- [32] Huang, C., Yamaji, N., Chen, Z., and Ma, F. (2012). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.* 69, 857-867. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04837.x
- [33] Yang, J., Fan, W., and Zheng, S. (2019). Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. *J. Zhejinag Univ. Sci. B* 20, 513-527. doi: 10.1631/jzus.B1900188
- [34] Zhao, Z., Ma, J., Sato, K., and Takeda, K. (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 217, 794-800. doi: 10.1007/s00425-003-1043-2
- [35] Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., et al. (2007). An aluminium-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48, 1081-1091. doi: 10.1093/pcp/pcm091
- [36] Ma, J., Ryan, P. and Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci.* 6, 273-278. doi: 10.1016/S1360-1385(01)01961-6
- [37] Rahman, R., and Upadhyaya, H. (2021). Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review. *J. Plant Biol.* 64, 101-121. doi: 10.1007/s12374-020-09280-4
- [38] Jaskowiak, J., Tkaczyk, O., Słota, M., Kwasniewska, J., and Szarejko, I. (2018). Analysis of aluminium toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. *PLoS One* 13:e0193156. doi: 10.1371/journal.pone.0193156
- [39] Eekhout, T., Larsen, P., and De Veylder, L. (2017). Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. *Trends Plant Sci.* 22, 102-105. doi: 10.1016/j.tplants.2016.12.003
- [40] McCallum, C., Comai, L., Greene, E., and Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* 18, 455-457. doi: 10.1038/74542
- [41] Rounds, M., and Larsen, P. (2008). Aluminum-dependent root-growth inhibition in *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell-cycle arrest. *Curr. Biol.* 18, 1495-1500. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.050
- [42] Sjogren, C., Bolari, S., and Larsen, P. (2015). Aluminum-dependent terminal differentiation of the *Arabidopsis* root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *The Plant Cell* 27, 2501-2515. doi: 10.1105/tpc.15.00172

POZOSTAŁA AKTYWNOŚĆ NAUKOWA - POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA

Strategia TILLING i różne metody identyfikacji mutacji

W ramach swojej dotychczasowej aktywności naukowej przygotowałam wraz ze współpracownikami cykl artykułów przeglądowych i rozdziałów w książkach przybliżających strategię TILLING oraz przedstawiających protokoły różnych metod indukcji i detekcji mutacji:

1. Kurowska M, Daszkowska-Golec A, Gruszka D, Marzec M, **Szurman M**, Szarejko I, and Maluszynski M. 2011. TILLING – a shortcut in functional genomics. *Journal of Applied Genetics* 52, 371-390. doi: 10.1007/s13353-011-0061-1 - **załącznik B1**
IF=1.664; 20 pkt MNiSW (wg obecnej punktacji 140 pkt); Google Scholar – 281; Scopus - 182

2. Szarejko I, **Szurman-Zubrzycka M**, Nawrot M, Marzec M, Gruszka D, Kurowska M, Chmielewska B, Zbieszczek J, Jelonek J, and Maluszynski M. 2017. Creation of a TILLING population in barley after chemical mutagenesis with sodium azide and MNU. In: *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*, Springer, eds. Jankowicz-Cieslak, Tai, Kumlehn, Till, pp. 91-111. doi: 10.1007/978-3-319-45021-6_6 - **załącznik B2**
Rozdział w książce; 20 pkt MNiSW; Google Scholar – 42; Scopus - 25

3. **Szurman-Zubrzycka M**, Chmielewska B, Gajewska P, and Szarejko I. 2017. Mutation detection by analysis of DNA heteroduplexes in TILLING populations of diploid species. In: *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*, Springer, eds. Jankowicz-Cieslak, Tai, Kumlehn, Till, pp. 281-303. doi: 10.1007/978-3-319-45021-6_18 - **załącznik B3**
Rozdział w książce; 20 pkt MNiSW; Google Scholar – 18; Scopus - 15

4. Maluszynski M, Szarejko I, Maluszynska J, **Szurman-Zubrzycka M**. 2017. Mutation Techniques. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences 2*, Academic Press, pp. 215-228. doi: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00194-5 - **załącznik B4**
Rozdział w książce; 50 pkt MNiSW; Google Scholar – 54; Scopus - 4

5. Ingelbrecht I, Jankowicz-Cieslak J, **Szurman-Zubrzycka M**, Till B, and Szarejko I. 2018. Chemical mutagenesis. In: *Manual on Mutation Breeding (third edition)*. Vienna, FAO, pp.51-81, ISBN 978-92-5-130526-3 – **załącznik B5**
Rozdział w książce; 5 pkt MNiSW; Google Scholar – 11; Scopus – brak w bazie

6. Jost M, **Szurman-Zubrzycka M**, Gajek K, Szarejko I and Stein N. 2019. TILLING in barley. *Methods in Molecular Biology, Barley 1900*, pp. 72-94. Springer Protocols. doi: 10.1007/978-1-4939-8944-7_6 - **załącznik B6**
IF = brak danych; 70 pkt MNiSW; Google Scholar – 14; Scopus - 10

7. **Szurman-Zubrzycka M**, Kurowska M, **Till B**, and Szarejko I. 2023. Is it the end of TILLING era in plant science? *Frontiers in Plant Science* 14: 1160695. doi: 10.3389/fpls.2023.1160695 - **załącznik B7**

IF=4.1; 140 pkt MNiSW (wg obecnej punktacji 100 pkt); Google Scholar – 11; Scopus - 8

Ponadto, wykorzystaliśmy również naszą populację *HorTILLUS* w celu opracowania wysokoprzepustowej metody umożliwiającej sekwencjonowanie wybranych regionów genomowych z wykorzystaniem NGS (Next Generation Sequencing). Metoda opiera się na multipleksowaniu amplikonów PCR i wielowymiarowym pulowaniu. Z uwagi na to, że bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR jest ograniczone ze względu na długość odczytów dostępnych w wielu sekwenatorach nowej generacji, amplikony poddawaliśmy fragmentacji z wykorzystaniem ultrasonikacji. Szczegółowy opis metodyki, jak również otrzymane rezultaty opisaliśmy w artykule:

8. Tramantano A, Luka J, Jankowicz-Cieslak J, Hofinger B, Gajek K, **Szurman-Zubrzycka M**, Szarejko I, Ingelbrecht I, and Till B. 2019. Fragmentation of pooled PCR products for highly multiplexed TILLING. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9(8): 2657-2666. doi: 10.1534/g3.119.400301 – **załącznik B8**

IF=2.781; 70 pkt MNiSW; Google Scholar – 7; Scopus - 5

Analiza funkcjonalna genów zaangażowanych w różne procesy z wykorzystaniem mutantów TILLING pochodzących z populacji HorTILLUS – współpraca międzynarodowa

Swoje umiejętności oraz wiedzę z zakresu strategii TILLING i identyfikacji mutantów jęczmienia wykorzystuję podczas współpracy z zagranicznymi zespołami badającymi mechanizmy związane z odpowiedzią roślin na zalewanie (Uniwersytet w Nottingham; [9]), czy z produkcją biomasy (Uniwersytet Poczdamski; [10]), co zaowocowało wspólnymi publikacjami:

9. Mendiondo G, Gibbs D, **Szurman-Zubrzycka M**, Korn A, Marquez J, Szarejko I, Maluszynski M, King J, Axcell B, Smart K, Corbineau F, and Holdsworth M. 2016. Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal* 14(1): 40-50. doi: 10.1111/pbi.12334 – **załącznik B9**

IF=7.443; 45 pkt MNiSW (wg obecnej punktacji 140 pkt); Google Scholar – 161; Scopus - 122

10. Jöst M, Soltani O, Kappel C, Janiak A, Chmielewska B, **Szurman-Zubrzycka M**, McKim S, and Lenhard M. 2024. The gain-of-function blf13 in the barley orthologue of the rice growth regulator NARROW LEAF1 is associated with increased lead width. *Journal of Experimental Botany* 75, 850-867. doi: 10.1093/jxb/erad403 – **załącznik B10**
IF za 2023=5.6; 140 pkt MNiSW; Google Scholar – 1; Scopus - 1

Współpracuję również z dr. Thorstenem Schnurbuschem z IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Niemcy) w badaniach, opierających się na analizie zidentyfikowanych przez nas mutantów z populacji *HorTILLUS*, mających na celu ocenę genetycznych podstaw inicjacji kwitnienia. Przygotowany manuskrypt:

Muqaddasi R, Muqaddasi Q, Trautewig C, Huang Y, Shanmugaraj N, Melzer M, Tschiersch H, Chmielewska B, **Szurman-Zubrzycka M**, Szarejko I, Jayakodi M, Stein N, Mascier M, and Schnurbusch T. „Insights into the genetic basis of pre-anthesis tip degeneration and related traits in barley”

został wysłany do czasopisma *New Phytologist*.

Badania wpływu fitotoksycznych jonów glinu na rośliny – aspekty niezwiązane bezpośrednio z głównym osiągnięciem naukowym

Opracowanie protokołów traktowania jęczmienia jonami glinu oraz zdobyte doświadczenie w analizie jego reakcji na ten pierwiastek pozwoliły mi zaangażować się w inne badania: (1) realizowane w naszym Instytucie, koncentrujące się na szczegółowym badaniu zmian w strukturze ściany komórkowej pod wpływem działania jonów glinu [11] oraz (2) prowadzone w zespole P. Larsena z Uniwersytetu Kalifornijskiego, który wykazał udział czynnika transkrypcyjnego ERF115 w odpowiedzi na glin u *Arabidopsis*, co potwierdziliśmy również w badaniach nad jęczmieniem [12]. Wyniki tych współprac zostały opublikowane we wspólnych pracach:

11. Jaskowiak J, Kwasniewska J, Milewska-Hendel A, Kurczynska E, **Szurman-Zubrzycka M**, Szarejko I. 2019. Aluminum alters the histology and pectin cell wall composition of barley roots. *International Journal of Molecular Sciences* 20(12): 3039. doi: 10.3390/ijms20123039 – **załącznik B11**
IF=4.556; 140 pkt MNiSW; Google Scholar – 55; Scopus - 45

12. Larsen P, He S, Meyer T, Szurman-Zubrzycka M, Alfs C, Kwasniewska J, Pervis A, Gajecka M, Veerabahu A, Beaulieu T, Bolaris S, and Eekhout T. 2024. The stem cell niche transcription factor ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 participates in

Badania regulacji ścieżki DDR indukowanej hydrazylem kwasu maleinowego i zeocyną

Opisany wcześniej mutant *hvatr.g* posłużył nie tylko do analizy ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) indukowanej fitotoksycznymi jonami glinu (co było przedmiotem głównego osiągnięcia). Został on również przebadany pod kątem reakcji na inne czynniki genotoksyczne. Jednym z nich był hydrazyl kwasu maleinowego (MH). Jest to czynnik klastogenny, czyli prowadzący do powstawania widocznych aberracji chromosomowych. Zaobserwowaliśmy, że efekt genotoksyczny wywołany przez MH, oceniany na podstawie testu TUNEL, czy częstotliwości występowania jąder z mikrojądrami, był znacznie mocniejszy u mutantu niż u jego odmiany wyjściowej ‘Sebastian’. MH powodował wyraźny spadek aktywności mitotycznej w obu analizowanych genotypach, przy czym efekt ten był bardziej nasilony u odmiany ‘Sebastian’ (WT). Natomiast analiza wpływu MH na cykl komórkowy korzeni, przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej, nie wykazała istotnych różnic pomiędzy mutantem a WT. Na podstawie tych analiz wykazaliśmy, że u jęczmienia szlak DDR uruchamiany w odpowiedzi na MH jest również, przynajmniej częściowo, regulowany poprzez kinazę ATR [13].

Tego samego mutantu *hvatr.g* wykorzystano do szczegółowych analiz transkryptomu (RNA-Seq) w odpowiedzi na inny czynnik uszkadzający DNA – zeocynę, która indukuje podwójne pęknięcia DNA (DSBs). Analiza ujawniła odpowiedzi transkrypcyjne wywołane zeocyną zależne od kinazy ATR, jak również niezależne od kinazy ATR. Do szczegółowych analiz wykorzystano nowo opracowany katalog 421 genów DDR jęczmienia, który uwzględniał filogenetyczne powiązania genów SUPPRESSOR OF GAMMA 1 (SOG1) oraz SOG1-LIKE (SGL). Zeocyna powodowała wzrost ekspresji specyficznych elementów ścieżki DDR oraz spadek ekspresji genów związanych z cyklem komórkowym i genów histonowych, głównie w sposób niezależny od ATR. Zależność od ATR była natomiast wyraźna w przypadku niektórych czynników związanych z DDR podczas replikacji DNA, a także w odniesieniu do licznych genów, które nie wydają się mieć bezpośredniego związku z DDR. Uzyskane wyniki dostarczyły cennych informacji na poziomie molekularnym i pozwoliły lepiej zrozumieć mechanizmy odpowiedzi na indukcję podwójnych pęknięć nici DNA w złożonym genomie jęczmienia [14]. Publikacje będące efektem prowadzonych badań:

13. Jaskowiak J, Kwasniewska J, **Szurman-Zubrzycka M**, Rojek-Jelonek M, Larsen P, and Szarejko I. 2020. Al-tolerant barley mutant *hvatr.g* shows the ATR-regulated DNA damage response to maleic acid hydrazide. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 1-22. doi: 10.3390/ijms21228500 - **załącznik B13**
IF=5.923; 140 pkt MNiSW; Google Scholar – 9; Scopus - 8
14. Vladejić J, Kovacik M, Zwyrková J, **Szurman-Zubrzycka M**, Doležel J, and Pecinka A. 2024. Zeocin-induced DNA damage response in barley and its dependence on ATR. *Scientific Reports* 14(1): 3119. doi: 10.1038/s41598-024-53264-0 - **załącznik B14**
IF za 2023=3.8; 140 pkt MNiSW; Google Scholar – 2; Scopus - 1

Badania regulacji podziałów mejotycznych przez białko DMC1

W ramach swojej pracy naukowej zajmowałam się również badaniem mechanizmów związanych z mejozą u jęczmienia. Mejoza jest procesem prowadzącym do powstania gamet, podczas którego dochodzi do zjawiska crossing-over generującego różnorodność genetyczną poprzez tworzenie nowych kombinacji alleli. Pierwszym etapem crossing-over jest celowa indukcja podwójnego pęknięcia nici DNA (DSB), która umożliwia wymianę materiału genetycznego pomiędzy chromatydami niesiostrzanymi chromosomów homologicznych. Białko DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA1) to rekombinaza występująca specyficznie tylko w komórkach przechodzących mejozę, która uczestniczy w naprawie takich pęknięć poprzez wyszukiwanie i promowanie inwazji homologicznych sekwencji, które są następnie wykorzystywane jako matryca w procesie naprawy. Funkcja genu *DMC1* została potwierdzona u modelowego gatunku roślin dwuliściennych – *Arabidopsis thaliana*, natomiast dotychczas nie przeprowadzono analizy funkcjonalnej homologa tego genu u jęczmienia – gatunku o kluczowym znaczeniu dla rolnictwa. W ramach naszej pracy zidentyfikowaliśmy, z wykorzystaniem strategii TILLING i populacji *HorTILLUS*, mutanty jęczmienia niosące substytucje w genie *HvDMC1*. Jedna mutacja (G2571A), oznaczona jako *dmc1.c*, została niezależnie wykryta w dwóch różnych roślinach pokolenia M₂. Mutacja ta prowadzi do substytucji wysoce konserwowanego aminokwasu – argininy na lizynę w pozycji 183 białka HvDMC1. Dwie niezależne linie mutantów niosące ten sam allel *dmc1.c* wykazywały podobne zaburzenia podczas mejozy. Obserwowane aberracje chromosomowe obejmowały mosty anafazowe i fragmenty chromosomów widoczne w anafazie/telofazie I podziału mejotycznego oraz anafazie/telofazie II podziału mejotycznego, a także mikrojądra w tetradach. Ponadto zaobserwowano również atypowe tetrady zawierające trzy lub pięć komórek. W mutantach *dmc1.c* stwierdzono znacznie wyższą częstotliwość występowania wszystkich aberracji

chromosomowych podczas mejozy w porównaniu do ich odmiany wyjściowej ‘Sebastian’ (Fig. 5).

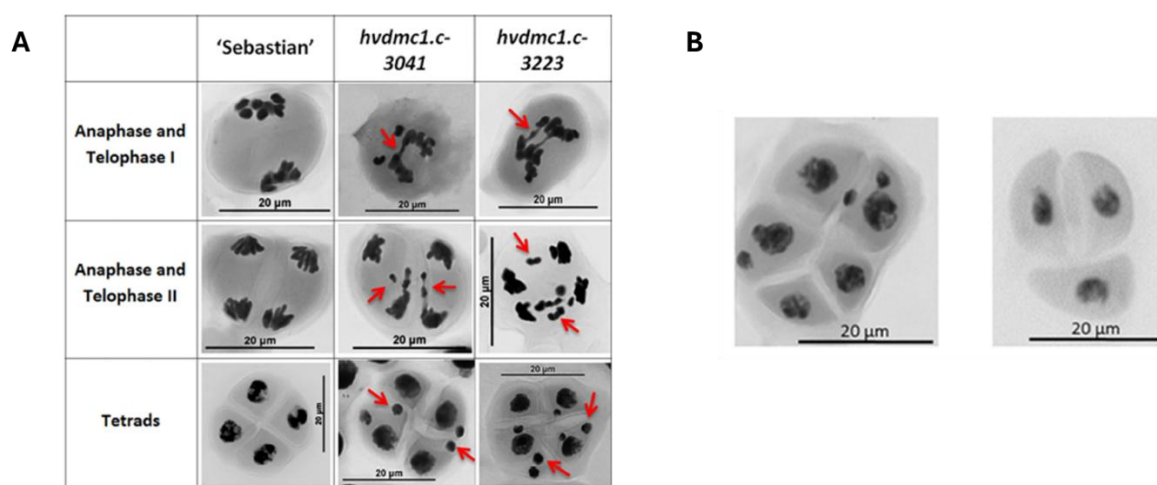


Figura 5. (A) Panel podsumowujący z przykładowymi zdjęciami komórek w różnych fazach podziału mejotycznego u odm. ‘Sebastian’ (WT) oraz mutantów *hvdmc1.c*. Strzałki wskazują na obecność aberracji chromosomowych; (B) Atypowe (5- i 3-komórkowe) stadium tetrad obserwowane u mutantu *hvdmc1.c*.

Nasze obserwacje wskazały, że prawidłowo funkcjonujące białko DMC1 jest niezbędne do naprawy DSBs, crossing-over oraz prawidłowego rozdziału chromosomów podczas mejozy u jęczmienia. Otrzymane wyniki opublikowaliśmy w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*:

15. Szurman-Zubrzycka M, Baran B, Stolarek-Januszkiewicz M, Kwasniewska J, Szarejko I and Gruszka D. 2019. The *dmc1* mutant allows an insight into the DNA double-strand break repair during meiosis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science* 10: 761. doi:10.3389/fpls.2019.00761 - załącznik B15

IF=4.402; 100 pkt MNiSW; Google Scholar – 21; Scopus - 17

Plany badawcze:

Moje najbliższe plany badawcze skupiają się na dwóch kluczowych zagadnieniach.

a. Badanie nowych mechanizmów tolerancji jęczmienia na fitotoksyczne jony glinu

Pierwszy kierunek badań dotyczy dalszego pogłębiania wiedzy na temat mechanizmów tolerancji jęczmienia na toksyczne jony glinu (Al^{3+}). Niedawno uzyskaliśmy finansowanie z Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu OPUS-26, na realizację projektu pt.: „Molekularne mechanizmy odpowiedzi roślin na stres związany z toksycznością glinu” (2023/51/B/NZ9/01175), którego jestem kierownikiem. Realizacja tego projektu rozpoczęła się

w październiku 2024, a finansowanie w kwocie 1 654 127,00 zł otrzymaliśmy na okres 48 miesięcy.

W oparciu o wcześniejsze analizy transkryptomiczne (RNA-seq) wytypowaliśmy geny potencjalnie zaangażowane w odpowiedź jęczmienia na stres związany z obecnością jonów glinu. W naszych pracach skoncentrujemy się na analizie:

- genu kodującego czynnik transkrypcyjny STOP1,
- genów kodujących białka błonowe z rodziny ABC transporterów – ALS1 oraz ALS2.

W ramach projektu planujemy współpracę naukową z dr Alešem Pecinką z Czeskiej Akademii Nauk (z którym wspólnie wyprowadzimy mutanty w tych genach przy użyciu technologii CRISPR/Cas9). Szczegółowa analiza molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na fitotoksyczność jonów glinu ma istotne znaczenie zarówno z badawczego i poznawczego punktu widzenia, jak również agronomicznego. Jęczmień, jako jedno z kluczowych zbóż użytkowych, jest bowiem szczególnie wrażliwy na ten czynnik stresowy.

b. Odpowiedź roślin na stres cieplny i uszkodzenia DNA

Drugim obszarem, który planuję rozwijać, jest badanie odpowiedzi roślin na stres cieplny. W kontekście postępujących zmian klimatycznych rośliny będą coraz częściej narażone na ekstremalne warunki środowiskowe, w tym podwyższoną temperaturę i suszę. Wiadomo, że czynniki te mogą prowadzić m.in. do uszkodzeń DNA, jednak zależności między mechanizmami odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) a tolerancją na te stresy środowiskowe pozostają słabo poznane.

W celu ich dokładniejszego zbadania utworzyliśmy międzynarodowe konsorcjum składające się z 8 europejskich uniwersytetów (Uniwersytet Paris-Saclay jako wiodący w projekcie) i kilku firm hodowlanych, które wspólnie będzie analizować zależność pomiędzy DDR a tolerancją na stres cieplny u różnych gatunków roślin. Opracowany wspólnie projekt, HEATDDR – Harnessing the DNA Damage Response to improve plant tolerance to heat stress, uzyskał finansowanie z Komisji Europejskiej w ramach programu HORIZON-MSCA-Doctoral Network (nr 101169110). Całkowita wartość projektu to 2 254 766,40 EUR, natomiast dofinansowanie dla Uniwersytetu Śląskiego wynosi 226 512 EUR. Jestem kierownikiem polskiej części projektu, a jego realizacja zaplanowana jest na okres 01.03.2025-28.02.2029. Kluczowym elementem projektu HEATDDR będzie szkolenie młodych naukowców – w ramach projektu zostanie zatrudnionych 14 doktorantów, którzy będą specjalizować się w omawianej tematyce.

Oba kierunki badań mają istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów adaptacyjnych roślin w zmieniającym się środowisku, co może przełożyć się na przyszłe strategie hodowlane i zwiększenie odporności upraw na stresy abiotyczne.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W ramach mojej dotychczasowej pracy naukowej miałam okazję pracować i uczyć się w różnych zagranicznych ośrodkach naukowych. Wszystkie wyjazdy, związane głównie z technikami mutacyjnymi, przyczyniły się znacząco do mojego rozwoju naukowego i umożliwiły mi nawiązanie trwałej współpracy naukowej z ich gospodarzami.

1) Uniwersytet Boloński we Włoszech (12.2009 – 02.2010)

Jeszcze w trakcie realizacji doktoratu odbyłam dwumiesięczny staż w Uniwersytecie Bolońskim we Włoszech, na Wydziale Nauk Rolniczych, podczas którego uczestniczyłam w analizach TILLING prowadzonych przez dr Valentinę Talamè pod okiem prof. Roberto Tuberosy. Wyjazd ten zapoczątkował moją przygodę ze strategią TILLING.

Dzięki temu wyjazdowi:

- nawiązałam współpracę z prof. Robertem Tuberosą, która umożliwiła mi m.in. pozyskanie wykładowcy na Międzynarodowy Kurs „Regional Training Course on use of induced mutations (TILLING) and DNA markers in cereal genetics and breeding”, który odbył się w Katowicach w dniach 13-24.09.2010 i był współorganizowany przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej (IAEA) oraz Uniwersytet Śląski. Prof. Tuberosa był głównym wykładowcą, ja z kolei, wraz z członkami naszego Zespołu, prowadziłam zajęcia laboratoryjne. Kurs ten był kierowany do naukowców z krajów rozwijających się w Europie. W kursie wzięło udział 13 uczestników (2 osoby z Polski, 2 osoby z Kazachstanu, 2 osoby z Turcji i po jednej osobie z Uzbekistanu, Serbii, Macedonii, Gruzji, Chorwacji, Bułgarii i Albanii).
- pozyskałam wiedzę i doświadczenie umożliwiające stworzenie największej na świecie populacji TILLING jęczmienia – *HorTILLUS* (Szurman-Zubrzycka i inni, 2018; zał. A1). Jak wcześniej wspomniano populacja ta stanowi cenne źródło mutantów służących analizie funkcjonalnej wielu różnych genów. Jest ona szeroko wykorzystywana w naszym Zespole, jak również jest powszechnie dostępna do współpracy naukowej, z czego skorzystało wiele

zewnętrznych ośrodków, np.: Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, firma hodowlana PlantCarb z Danii, czy Uniwersytet w Nottingham.

- w oparciu o pozyskaną na tym wyjeździe wiedzę oraz późniejsze doświadczenia i współpracę z innymi badaczami stworzyliśmy szereg artykułów i rozdziałów w książkach przedstawionych w moich „pozostałych osiągnięciach” (**załączniki B1-B7**), mających na celu poszerzanie wiedzy dotyczącej strategii TILLING oraz udostępnianie protokołów metodycznych.

2) **Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)** w Gatersleben, Niemcy (01-03.2015)

W 2015 roku odbyłam kolejny dwumiesięczny staż w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Niemczech, gdzie poznawałam techniki związane z mutagenizacją insercyjną (m.in. NGT - TALEN, CRISPR/Cas9) i uczestniczyłam w pracach prowadzonych przez dr Goetza Hensela w grupie dr Jochena Kumlehna.

Dzięki temu wyjazdowi:

- nabyłam doświadczenia związanego z transformacją roślin (w tym techniki NGT – TALEN, CRISPR/Cas9)

- nawiązałam stałą współpracę z dr Goetzem Henselem, która umożliwiła mi m.in:

a) organizację kolejnego kursu IAEA, którego byłam dyrektorem, dla doktorantów i hodowców z krajów Europy Wschodniej i Azji, na którym dr Goetz Hensel był wykładowcą i współuczestniczył w prowadzeniu przez nas zajęć laboratoryjnych. Kurs „Regional Training Course on Molecular Markers and TILLING Application for Crops Improvement” odbył się w Katowicach w dniach 25.09-06.10.2023. W kursie tym wzięło udział 15 osób (po 2 osoby z Turcji, Gruzji, Uzbekistanu i Serbii, i po jednej osobie z Północnej Macedonii, Słowenii, Albanii, Kirgistanu, Chorwacji, Grecji i Bułgarii)

b) współorganizację szkoły technik NGT – School of Genomics and New Genomic Techniques w dniach 18-21.11.2024. W ramach szkoły odbył się podstawowy kurs dla młodzieży oraz zaawansowany kurs dla studentów. Kursy te przybliżyły tematykę NGT (m.in. technologię CRISPR/Cas9) - jako zaproszony ekspert swoją wiedzą ze studentami dzielił się dr G. Hensel (IPK), ja z kolei prowadziłam zajęcia laboratoryjne

- nawiązałam współpracę z dr Nielsem Steinem z IPK, której efektem była publikacja:

Jost M, **Szurman-Zubrzycka M**, Gajek K, Szarejko I and **Stein N**. 2019. TILLING in barley. *Methods in Molecular Biology, Barley* – **załącznik B6**

3) **Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej (IAEA)** w Wiedniu, Austria

Dwukrotnie wyjeżdżałam na **wyjazdy studyjne** (2009, 2015) do siedziby Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA) w Wiedniu, gdzie wspólnie z dr Bradem Tillem m.in. izolowałam enzym CJE niezbędny do analiz TILLING prowadzonych w naszym Zespole.

Dzięki tym wyjazdom:

- wyizolowałam enzym, który obniżył koszty analiz TILLING wykonywanych w naszym Zespole i jest wykorzystywany w nim do dziś
- nawiązałam **stałą współpracę z IAEA**

W ramach nawiązanej współpracy z IAEA:

- zostałam zaproszona do wygłoszenia, jako keynote speaker, referatu na temat strategii TILLING u zbóż na międzynarodowym sympozjum IAEA w Wiedniu (FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology; 27-31.08.2018). Jako efekt tego sympozjum i zainteresowania naszą pracą wśród uczestników, w tym organizatorów PAG, otrzymałam zaproszenie do wygłoszenia referatu na prestiżowej konferencji PAG (Plant and Animal Genome Conference) w San Diego (PAGXXVII; 12-16.01.2019).

Tytuł wystąpienia na sympozjum IAEA: „TILLING as a renewable source of mutations for functional genomics and practical breeding”

Tytuł wystąpienia na PAG: “Barley root mutants to uncover the secrets of hidden parts of plants”

- z ramienia FAO/IAEA zostałam zatrudniona jako ekspert do prowadzenia wykładów i współprowadzenia zajęć dotyczących mutagenезы roślin uprawnych na tygodniowych szkoleniach kierowanych do hodowców i naukowców z Ameryki Południowej oraz z Afryki. Szkolenia IAEA odbyły się stacjonarnie w jednostkach naukowych za granicą:

- Pretoria, RPA - (07.2014) – Council for Scientific and Industrial Research (CSIR)

Kurs „Mutation Induction and *In vitro* Techniques”

- Lima, Peru – (11.2014) - Uniwersytet La Molina

Kurs „Use of Mutation Induction in Crop Breeding for Abiotic Stresses”

Szkolenia te miały na celu podniesienie poziomu niezbędnej wiedzy dotyczącej technik mutacyjnych oraz ich wykorzystania w hodowli roślin w trudnych warunkach klimatycznych w krajach rozwijających się Afryki i Ameryki Południowej.

- wraz z dr B.Tillem, dr I. Ingelbrechtem i dr J. Jankowicz-Cieślak z IAEA współtworzyliśmy rozdział w książce wydanej przez Joined FAO/IAEA Programme:

Ingelbrecht I, Jankowicz-Cieslak J, **Szurman-Zubrzycka M, Till B**, and Szarejko I. 2018. Chemical mutagenesis. In: Manual on Mutation Breeding (third edition). Vienna, FAO, pp.51-81, ISBN 978-92-5-130526-3 – **zał. B5**

oraz przeprowadziliśmy badania opisane w części dot. pozostałych osiągnięć, które opublikowaliśmy:

Tramantano A, Luka J, Jankowicz-Cieslak J, Hofinger B, Gajek K, **Szurman-Zubrzycka M**, Szarejko I, Ingelbrecht I, and **Till B**. 2019. Fragmentation of pooled PCR products for highly multiplexed TILLING. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 19(8): 2657-2666 (doi: 10.1534/g3.119.400301) – **zał. B8**

Nadal aktywnie współpracuję z dr B. Tillem, o czym świadczyć może niedawno wydana publikacja przeglądowa, której jesteśmy współautorami:

Szurman-Zubrzycka M, Kurowska M, **Till B**, and Szarejko I. 2023. Is it the end of TILLING era in plant science? *Frontiers in Plant Science* 14: 1160695 (doi: 10.3389/fpls.2023.1160695) – **zał. B7**

- ponadto, poza organizacją opisanych wcześniej kursów IAEA, współorganizowałam w naszym Uniwersytecie staże naukowe, finansowane przez IAEA, dla dr Arioli Bacu z Albani (tygodniowa wizyta – 12-18.10.2014) i prof. Eleny Todorovskiej z Bułgarii, Agro Bio Institute (dwumiesięczny staż: 21.05.2017-22.07.2017). Obie badaczki zdobywały u nas doświadczenie w technikach identyfikacji mutacji stosowanych w strategii TILLING.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne:

- pełniłam funkcję promotora 8 prac licencjackich, a obecnie jestem promotorem jednej pracy licencjackiej rozpoczętej w 2024 roku
- byłam recenzentem 5 prac licencjackich
- pełniłam funkcję promotora jednej pracy magisterskiej obronionej w 2024 roku
- byłam opiekunem naukowym 5 prac magisterskich (obronionych kolejno w 2016, 2021, 2022 i dwie w 2023 r.) – nadzór naukowy obejmował nauczanie niezbędnych technik laboratoryjnych, kontrolę pracy magistranta w laboratorium oraz wstępną korektę tekstu prac magisterskich przed ich przekazaniem promotorowi

- byłam recenzentem pracy doktorskiej p. Klary Prochazkowej pt.: „Identification of genes involved in the repair of toxic DNA-protein crosslinks in *Arabidopsis thaliana*”, która była zrealizowana w Uniwersytecie w Ołomuńcu (Czechy) (obrona w 2023 r.)
- prowadziłam i nadal prowadzę zajęcia kursowe dla studentów I i II stopnia kierunków Biotechnologia, Biologia oraz Ochrona Środowiska. Prowadzone zajęcia często były oceniane przez studentów, a w ramach tych ocen uzyskiwałam następujące noty (dane z ostatnich pięciu lat):
 - Analiza Genetyczna – kierunek Biotechnologia – oceny: 2023/2024 - 5/5;
 - Genetyka Molekularna – kierunek Biotechnologia – oceny: 2023/2024 – 5/5;
 - Inżynieria Genetyczna – kierunek Biotechnologia – oceny: 2023/2024 – 5/5;
 - Podstawy Genetyki – kierunek Biotechnologia – oceny: 2023/2024 – 4.68/5; 2022/2023 – 4.76/5; 2021/2022 – 4.69/5; 2019/2020 – 4.76/5
 - Bionformatyka – kierunek Biotechnologia – oceny: 2022/2023 – 4.61/5; 2021/2022 – 4.84/5 (zaj. komputerowe) i 4.7/5 (wykłady); 2020/2021 – 4.85/5;
- prowadzę zajęcia kursowe Bioinformatics dla studentów II stopnia anglojęzycznego kierunku Biotechnology
- prowadzę zajęcia z przedmiotu Plant Functional Genomics w języku angielskim dla studentów studiów doktoranckich „Advanced Methods in Biotechnology and Biodiversity” w Szkole Doktorskiej UŚ
- opracowałam autorskie konspekty zajęć dla przedmiotów: Bioinformatyka, Mutagenеза Roślin oraz dla anglojęzycznych przedmiotów: Bioinformatics i Plant Functional Genomics
- prowadziłam zajęcia w ramach przedmiotu Inżynieria Genetyczna na studiach podyplomowych dla nauczycieli kwalifikujących do nauczania przedmiotu Biologia oraz Przyroda, realizowanych przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (2012-2014)
- w celu podniesienia kwalifikacji dydaktycznych ukończyłam m.in. tygodniowe szkolenie: "Flipped Classroom for Activating Students in Online Classes" (Bułgaria - 25.06.2022 - 02.07.2022)

Osiągnięcia organizacyjne:

- pełniłam funkcję członka Komisji Organizacyjnej V Ogólnopolskiej Nocy Biologów (2016)
- byłam koordynatorem wydziałowym 4. Śląskiego Festiwalu Nauki (2020)
- współorganizowałam na Uniwersytecie Śląskim kursy, finansowane przez IAEA, dla naukowców z krajów rozwijających się (2010, 2023). W 2023 roku pełniłam funkcję dyrektora kursu, odpowiadając za całość spraw organizacyjnych i logistycznych

- współorganizowałam warsztaty dla hodowców jęczmienia w Polsce (2011) oraz spotkanie hodowców i genetyków roślin użytkowych (2014) odbywające się w Katowicach
- współorganizowałam szkołę technik NGT – School of Genomics and New Genomic Techniques (2024).

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

- jestem ambasadorem kierunku Biotechnology na Wydziale Nauk Przyrodniczych, UŚ
- prowadziłam zajęcia w Uniwersytecie Śląskim Młodzieży (2022)
- prowadziłam zajęcia w ramach Uniwersytetu Śląskiego Dzieci: (1) „Zabawa w rozszyfrowywanie DNA”, (2) „Tour de WNP – wycieczka po laboratoriach Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ” oraz (3) „Czy te oczy mogą kłamać? W laboratorium Thomasa Morgana” (2023)
- prowadziłam zajęcia dla dzieci i młodzieży w ramach UTN – Uniwersyteckie Towarzystwo Naukowe pt.: „Nurtująca genetyka”
- uczestniczyłam w projektach: „Aktywny w szkole – aktywny w życiu” i „Partnerzy w nauce” skierowanych do uczniów szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych, w ramach tych projektów prowadziłam zajęcia z izolacji DNA oraz wykłady na temat inżynierii genetycznej i Genetycznie Modyfikowanych Organizmów dla nauczycieli, jak również prowadziłam wykłady w szkołach średnich, np.: wykład na Festiwalu Nauki w zespole szkół ponadgimnazjalnych w Wodzisławiu Śląskim „GMO – Genetycznie Modyfikowane Organizmy” (2012)
- prowadziłam wykłady oraz zajęcia praktyczne na Ogólnopolskich Nocach Biologów oraz Nocy Biologów na bis skierowanych do uczniów szkół podstawowych oraz ponadpodstawowych

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

- nominacja do nagrody Naukowiec Przyszłości 2023 w kategorii: Kobieta nauki, która zmienia świat, za realizację projektu pt.: „Kompleks DREAM i NAC – molekularny mechanizm odpowiedzi roślin na stres wywołany czynnikami genotoksycznymi” oraz działalność B+R z zakresu nauk biologicznych i biotechnologii
- współpraca z zagranicznym sektorem gospodarczym – w latach 2020-2023 zrealizowałam, z ramienia Uniwersytetu Śląskiego, 8 prac zleconych przez spółkę PlantCarb ApS (Dania) obejmujących identyfikację, z wykorzystaniem naszej populacji *HorTILLUS* oraz duńskiej

populacji TILLING jęczmienia, mutacji w wybranych przez spółkę genach związanych z produkcją skrobi (zawartością amylozy) w ziarniakach jęczmienia.

.....

(podpis wnioskodawcy)