



**Ocena osiągnięcia naukowego oraz pozostałej aktywności
naukowej
dr Miriam Szurman-Zubrzyckiej**

Wobec niekorzystnych zmian klimatycznych i skażeniem środowiska w wyniku działalności antropogenicznej, coraz więcej uwagi poświęca się badaniom nad wpływem szeroko rozumianego stresu abiotycznego na uprawy roślin, szczególnie stresu suszy i wpływu jonów różnych metali, co powoduje zahamowanie wzrostu, a co zatem idzie spadek plonowania. Podejmuje się wiele badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów oddziaływania czynników stresowych na rośliny i w oparciu o tę wiedzę próbuję się uzyskać rośliny bardziej odporne. Spośród toksycznych metali, do niedawna niewiele uwagi poświęcano glinowi, jednak okazuje się, że na zakwaszonych glebach, u niektórych gatunków, takich jak jęczmień, problem toksycznego działania jonów tego pierwiastka może być poważnym problemem dla rolnictwa. Dlatego więc podjęcie tego tematu przez habilitantkę jest całkowicie uzasadnione.

Osiągnięcie naukowe - cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych

W ramach tego osiągnięcia habilitantka przedstawiła 6 artykułów (4 eksperymentalne oraz 2 przeglądowe), których sumaryczny IF wynosi 25, a liczba punktów czasopism wg listy MNiSW - 660 (720). We wszystkich tych publikacjach autorka jest albo pierwszym autorem bądź korespondencyjnym (w pięciu pierwszym, w czterech korespondencyjnym), co wskazuje na jej dominujący bądź znaczący udział, co można też wywnioskować z dodatkowych informacji podanych przy poszczególnych pracach. Wyniki badań autorki były publikowane w renomowanych czasopismach,

takich jak *Frontiers in Plant Science* (IF = 4,8), *IJMS* (4,9) czy *Plant and Soil* (4,1), co świadczy o wysokim poziomie jej badań.

W publikacji **Szurman-Zubrzycka i in. (2021) (zał. A3)**, której habilitantka jest głównym autorem (pierwszym i korespondencyjnym), przedstawiono wyniki bardzo obszernych badań nad globalną analizą transkryptomu komórek merystemów korzeni jęczmienia hodowanych zarówno w niskim pH oraz traktowanych glinem. Po 48h wzrostu w niskim pH, aż 1899 genów ulegało różnicowej ekspresji, natomiast po 7 dniach ilość ta spadła do 870. Odwrotny efekt obserwowano natomiast dla jonów Al^{3+} w tym samym pH – początkowo wynosiła 986 a po 7 dniach wzrosła aż do 5873 genów, co wskazuje na zdecydowanie odmienny mechanizm działania fitotoksycznego jonów glinu niż kwaśnego pH na poziomie ekspresji genów. Niektóre z konkluzji wyników omawianej pracy wydają się być nieco 'na wyrost', np. jeśli chodzi o podwyższony stres oksydacyjny. W istocie obserwowano głównie podwyższony poziom ekspresji peroksydaz, które są enzymami egzokomórkowymi wydzielanymi do ściany komórkowej, a więc nie głównymi, komórkowymi enzymami antyoksydacyjnymi takimi jak SOD, APX czy katalazy.

Niewątpliwie jednak, przedstawiona lista genów o zróżnicowanej ekspresji może być z powodzeniem wykorzystywana w przyszłych badaniach nad mechanizmami toksyczności niskiego pH oraz Al^{3+} u jęczmienia. Uzyskane wyniki niewątpliwie dostarczają wielu nowych i cennych informacji odnośnie mechanizmów odpowiedzialnych za tolerancję na niskie pH i toksyczność Al^{3+} u jęczmienia. Wykazano, że w odpowiedzi na te stresy uruchamiane są zarówno wspólne, jak i specyficzne ścieżki molekularne. Uzyskane wyniki sugerują, że zarówno niskie pH i jony Al^{3+} są czynnikami stresowymi dla jęczmienia. Sam glin wywołuje jednak większe spektrum zmian w transkryptomie, szczególnie po ekspozycji przez dłuższy czas.

Wieloautorska publikacja (**Szurman-Zubrzycka i in., 2018; A1**). to rezultat ogromnego, zespołowego przedsięwzięcia, którego wynikiem jest uzyskanie metodą TILLING (chemicznej mutagenazy) platformy jęczmienia *HorTILLUS*, która jest wykorzystywana do analizy funkcjonalnej genów i została wykorzystana przez habilitantkę do badań wybranych genów, które zaowocowały szeregiem kolejnych publikacji. Jest wykorzystywana nie tylko przez grupę habilitantki, ale też w ramach

współpracy międzynarodowej i krajowej innym zespołom i będzie niewątpliwie służyć jeszcze przez wiele lat.

Uzyskane rośliny zostały też scharakteryzowane pod względem wielu cech w warunkach polowych. Zidentyfikowano wiele linii o interesujących właściwościach pod względem praktycznym, takie jak mutanty karłowe, o kłosach sześciorzędowych, czy wcześniej wytwarzające nasiona, co może być istotną cechą agronomiczną. Uzyskane populacje mogą być nie tylko wykorzystywane w genetyce odwrotnej, ale też jako źródło mutantów do zastosowania w genetyce klasycznej, czyli w celu znalezienia mutantów o interesujących cechach hodowlanych.

W pracy przeglądowej (Szurman-Zubrzycka i in., 2023; A4) przedstawiono szczegółowo dotychczasową wiedzę dotyczącą szlaku DDR u roślin aktywowanego m.in. w odpowiedzi na genotoksyczne działanie jonów glinu. Pierwotnym ogniwem tego szlaku są specyficzne kinazy: ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), która rozpoznaje podwójne pęknięcia DNA (DSBs – Double Strand Breaks) i ATR (ATM and Rad3-related), rozpoznająca pojedyncze pęknięcia DNA. Obie kinazy fosforylują i aktywują czynnik transkrypcyjny SOG1 (Suppressor of Gamma Radiation 1), kluczowy czynnik regulatorowy ścieżki DDR. Fosforylowany SOG1 reguluje ekspresję wielu genów związanych z naprawą DNA (np. *RAD51*, *BRCA1*), regulacją cyklu komórkowego czy programowaną śmiercią komórki. W publikacji omówiono również szczegółowo różne mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA, takie jak BER – Base Excision Repair, NER – Nucleotide Excision Repair, MMR – Mismatch Repair, HR – Homologous Recombination i NHEJ – Non-Homologous End Joining.

Przedmiotem publikacji Szurman-Zubrzycka et al., 2019 (A2) była analiza funkcjonalna genu *HvATR* u jęczmienia, odpowiedzialnego za kodowanie kinazy ATR biorącej udział w naprawie uszkodzeń DNA poprzez aktywację ścieżki DDR. Z wykorzystaniem populacji *HorTILLUS* zidentyfikowano 17 mutantów genu *HvATR* po czym do szczegółowych analiz wytypowano mutant *hvatr.g* gdzie mutacja znajduje się w obrębie konserwatywnej domeny funkcjonalnej. W warunkach kontrolnych system korzeniowy mutantu był zmieniony. W obecności glinu redukcja systemu korzeniowego mutantu była mniej wyraźna niż u typu dzikiego. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że mutant *hvatr.g* wykazuje tolerancję na obecność glinu w środowisku. W pracy tej badano również częstotliwość podziałów komórkowych i uszkodzenie jąder metodą TUNEL. U typu dzikiego pod wpływem glinu następował

wzrost liczby jąder z uszkodzonym DNA z 2% w warunkach kontrolnych do 14% i 20% pod wpływem odpowiednio 5 i 10 μM jonów Al^{3+} . Natomiast, u mutantu już w warunkach kontrolnych ponad 60% jąder wykazywało uszkodzenia DNA. Po ekspozycji na glin u *hvatr.g* parametr ten wzrósł o dodatkowe 10%. Uzyskane wyniki wskazują, że ścieżka DDR jest zaburzona u mutantów *atr* jęczmienia. Mutanty te mają zaburzoną naprawę uszkodzeń DNA, a jednocześnie wykazują fenotyp tolerancyjny na glin. Podkreślono, że uzyskane wyniki są istotne z uwagi na to, że jęczmień, który jest ważną rośliną użytkową, jest bardzo wrażliwy na Al^{3+} , a badane mutanty charakteryzują się zwiększoną tolerancją na ten stres. Niewątpliwie dodatkowe badania pokażą jak omawiane mutanty będą charakteryzowały się pod względem plonowania, parametrów wzrostu, czy odporności na inne stresy jak stres suszy, bowiem zredukowany system korzeniowy może nie być korzystny w zmiennych warunkach polowych.

Kolejnym genem zaangażowanym w szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), analizowanym przez autorkę u jęczmienia był *SOG1* (*Suppressor Of Gamma Radiation 1*) (NAC8) (praca A6), należący do dużej rodziny czynników transkrypcyjnych NAC. Czynniki te są kluczowym elementem regulacyjnym ścieżki DDR zwiększającym ekspresję wielu genów w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Na podstawie analizy *in silico* przeprowadzonej w oparciu o sekwencję *AtSOG1*, autorzy omawianej publikacji zidentyfikowali jęczmiennego homologa - *HvNAC8*, a następnie wykorzystując populację *HorTILLUS*, wyselekcjonowano szereg roślin z mutacjami tego genu. Wytypowano kolejno 4 rośliny z mutacjami w analizowanym genie, a z nich mutant *hvnac8.k* został wybrany do dalszych analiz, gdzie zbadano jego odpowiedź na dwa czynniki genotoksyczne: jony glinu w środowisku o niskim pH oraz zeocynę (chemiczny mutagen). Wykazano, że mutant *hvnac8.k* charakteryzuje się zaburzeniami w funkcjonowaniu szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Analizowany mutant akumulował uszkodzenia DNA nawet w warunkach kontrolnych, tj. bez ekspozycji na czynniki genotoksyczne. Podobne efekty obserwowano dla innych mutantów w genie *HvNAC8* – *hvnac8.i* i *hvnac8.ac*.

W powyższej pracy zaobserwowano ponadto, że w odpowiedzi na stres spowodowany jonami Al^{3+} u typu dzikiego jęczmienia dochodzi do zwiększenia ekspresji genu *HvRAD51*, zaangażowanego w naprawę uszkodzeń DNA, w przeciwieństwie do mutantu *hvnac8.k*. Podobne zależności zaobserwowano w eksperymencie z użyciem zeocyny, indukującej podwójne pęknięcia nici DNA

(DSBs). Jednocześnie u odmiany 'Sebastian' typu dzikiego, pod wpływem zeocyny stwierdzono wyraźny wzrost ekspresji genów *HvBRCA1* i *HvRAD51*, związanych z aktywacją szlaku rekombinacji homologicznej (HR) w procesie naprawy DNA, podczas gdy u mutantu taki wzrost nie miał miejsca. Wyniki te doprowadziły autorów do wniosku, że gen *HvNAC8* reguluje ekspresję genów *HvRAD51* i *HvBRCA1* u jęczmienia i pełni kluczową rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Zasugerowano ponadto, że modulacja szlaku DDR u jęczmienia może zwiększać tolerancję na stres wywołany obecnością jonów glinu w glebie o niskim pH, co stwarza potencjał dla zastosowań agronomicznych, jednak tego typu hipotezy mogą okazać się słuszne dopiero po przeprowadzeniu odpowiednich doświadczeń, gdzie analizowane będą odpowiednie fenotypy mutantów, ich wzrost i plonowanie w warunkach laboratoryjnych i polowych.

Dotychczasowa wiedza na temat mechanizmów toksycznego działania glinu na rośliny i odpowiedzi na ten pierwiastek została zaprezentowana w kilkuautorskiej pracy przeglądowej, gdzie habilitantka jest autorem korespondencyjnym (**praca A5**). W publikacji opisano w przystępny sposób zewnątrzkomórkowe Mechanizmy tolerancji na glin związane z wydzielaniem kwasów organicznych (cytrynowego i jabłkowego) za zewnątrz komórki przez odpowiednie transportery (MATE i ALMT) i chelatowaniem jonów Al^{3+} , a następnie wewnątrzkomórkowe mechanizmy polegające np. na metylacji pektyn ściany komórkowej, wydzielaniu przez transportery STAR1/2UDP-glukozy, która ma za zadanie maskowanie miejsc wiązania Al^{3+} w ścianie komórkowej, transport jonów Al^{3+} do wnętrza komórki przez transportery Nr1 i NIP, wydzielany do wakuoli jonów Al^{3+} z cytoplazmy przez pompę ALS1. Następnie omówiono rolę szeregu czynników transkrypcyjnych, koncentrując się na czynniku STOP1, który autorka ma zamiar bardziej szczegółowo badać w ramach przyznanego projektu OPUS. Czynniki te regulują ekspresję wielu genów chroniących *Arabidopsis* przed toksycznością niskiego pH i Al^{3+} , np. pomp błonowych. Działanie regulacyjne ortologów STOP1 wydaje się zależeć silnie od gatunku rośliny. Z innych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w omawiane procesy, habilitantka omawia ANAC17 (z rodziny NAC), HB7 i HB12 (rodzina HD-ZIP I) czy WRKY (znane z odpowiedzi na różne stresy abiotyczne). W pracy podsumowano również najnowsze odkrycia dotyczące tolerancji roślin na glin, takie jak rola poliamin w zwiększaniu odporności na Al, czy znaczenie niedawno

zidentyfikowanych miRNA, które mogą odgrywać kluczową rolę w mechanizmach tolerancji. Na końcu pracy zaprezentowano 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. Kluczowe w tym procesie są 2 kinazy ATM i ATR, aktywowane przez kompleks białkowy związany z uszkodzonym DNA, które następnie fosforylują czynnik transkrypcyjny SOG1 prowadzący do aktywacji mechanizmów naprawczych DNA lub śmierci komórki.

Podsumowując, przedstawione do oceny osiągnięcie stoi na wysokim poziomie naukowym i niewątpliwie stanowi bardzo istotny wkład w poznanie naszej wiedzy na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi jęczmienia na glin i spełnia zdecydowanie warunki stawiane osiągnięciom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego.

Pozostały dorobek naukowy – inne osiągnięcia

Na pozostały dorobek naukowy habilitantki składa się z 10 publikacji eksperymentalnych, które ukazały się w sporej części w wysoko notowanych czasopismach, takich jak *Frontiers in Plant Science* (IF = 4,8), *Plant Biotechnology Journal* (7,4), *Journal of Experimental Botany* (5,6) czy *Plant Cell and Environment* (6,1) oraz 5 rozdziałów w książkach. Sumaryczny IF tych prac to 46,4 (1240 punktów MNiSW, 406 cytacji w Google Scholar, 443 wg Scopus).

Wiele z tych prac przybliży czytelnikowi strategię TILLING, w której autorka stała się specjalistką, włączając w to protokoły różnych metod indukcji i detekcji mutacji (publikacje B1-B7).

Wyjściowa populacja "HorTILLUS" została wykorzystana przez autorkę do opracowania wysokoprzepustowej metody umożliwiającej sekwencjonowanie wybranych regionów genomowych z wykorzystaniem NGS (Next Generation Sequencing) przy wykorzystaniu fragmentacji ampikonów za pomocą sonikacji (praca B8). Kolejne prace dotyczące analizy funkcjonalnej określonych genów z wykorzystaniem mutantów TILLING w ramach współpracy międzynarodowej z Uniwersytetem w Nottingham (udział czynnika N-end rule pathway N-recognin E3 ligase PROTEOLYSIS6 w odporności na zalewanie roślin - publikacja B9) czy Uniwersytetem w Poczdamie (udział ortologu białka ryżu NARROW LEAF1 w

regulacji szerokości liści u jęczmienia co przekłada się na produkcję biomasy - publikacja B10).

Kolejne prace dotyczyły badania wpływu fitotoksycznych jonów glinu na rośliny: szczegółowym badaniu zmian w strukturze ściany komórkowej pod wpływem działania jonów glinu (B11) oraz przeprowadzone w zespole P. Larsena z Uniwersytetu Kalifornijskiego, które wykazały udział czynnika transkrypcyjnego ERF115 w odpowiedzi na glin u *Arabidopsis*, co zostało potwierdzone również w badaniach nad jęczmieniem (B12). W pierwszej z tych prac zaobserwowano w korzeniach zmianę składu chemicznego pektyn, większą średnicę korzeni, skrócenie czapeczki, powiększenie komórek ryzodermalnych oraz zwiększenie częstotliwości podziałów komórek egzodermalnych i korykalnych. W drugiej publikacji wykazano, że Al^{3+} -zależne hamowanie wzrostu korzenia wymaga uruchomienia ścieżki DDR prowadzącej do aktywacji czynnika transkrypcyjnego SOG1, który uruchamia kolejne odpowiedzi w tym aktywacji czynnika ERF115 prowadzącego do zamierania komórek korzeni. Zidentyfikowano również ortolog tego białka u jęczmienia.

W kolejnych 2 publikacjach przeprowadzono analizę regulacji ścieżki DDR indukowanej chemicznymi mutagenami - hydrazidem kwasu maleinowego i zeocyną (odpowiednio prace B13 i B14), indukowanej przynajmniej częściowo poprzez ścieżkę zależną od kinazy ATR.

W ramach kolejnej pracy (B15) zidentyfikowano, z wykorzystaniem strategii TILLING i populacji *HorTILLUS*, mutanty jęczmienia niosące substytucje w genie *HvDMC1*, prowadzące do zaburzenia mejozy, co wskazuje na regulacji podziałów mejotycznych przez białko DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA1), które jest rekombinazą występującą specyficznie tylko w komórkach podlegających mejozie, znaną wcześniej u *Arabidopsis*.

W podsumowaniu, szereg publikacji wchodzących w skład pozostałego osiągnięcia naukowego stanowi istotny wkład w stworzenie i wykorzystanie platformy *HorTILLUS* do poznania molekularnych aspektów odpowiedzi jęczmienia na jony glinu, jak też innych abiotycznych czynników stresowych.

Udział w konferencjach

Habilitationka prezentował wyniki swoich badań na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie prezentacji ustnych lub posterów:

- 7 wystąpień ustnych, w większości po doktoracie,
- współautorstwo 9 referatów ustnych,
- 7 doniesień plakatowych na konferencjach międzynarodowych (2/5 - przed/po doktoracie),
- 4 plakaty na konferencjach krajowych (3/1)

Udział w projektach badawczych

Habilitationka była kierownikiem bądź wykonawcą w wielu projektach badawczych, zarówno krajowych jak też międzynarodowych.

Jest kierownikiem obecnie realizowanego projektu OPUS26 oraz projektów BeethovenLife1 (polsko-niemiecki) i 'HEATDDR – Harnessing the DNA Damage Response to improve plant tolerance to heat stres' (w ramach konsorcjum) oraz członek zespołu realizującego projekt HORYZONT 2020 - „RecoBar – wykorzystanie i przywracanie różnorodności w obrębie starych i nowych odmian jęczmienia jarego dla rolnictwa”, finansowanego przez Unię Europejską.

Dr Szurman-Zubrzycka była członkiem zespołów realizujących 6 projektów badawczych (wykonawcą), takich jak ERA CAPS II (projekt międzynarodowy z udziałem NCN), SONATA, ERA-NET CO FUND FACCE SURPLUS (z udziałem NCBiR), projekt POLAPGEN-BD, pt.: „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymania odmian zbóż o zwiększonej odporności na suszę” (w konsorcjum z polskimi uniwersytetami i spółkami hodowlanymi), FAO/IAEA Co-ordinated Research Programme (CRP): “Enhancing the Efficiency of Induced Mutagenesis through an Integrated Biotechnology Pipeline” (finansowany przez IAEA/MNiSW), czy projekt PBZ-MNiSW pt. ‘Stworzenie platformy TILLING *Hordeum vulgare* jako trwałego narzędzia genomiki funkcjonalnej i doskonalenia cech użytkowych’.

Staże naukowe

Habilitationka odbyła po doktoracie 2 zagraniczne staże naukowe: 2-miesięczny w Uniwersytecie Bolońskim w ramach programu European Union, Human Capital Operational Programme oraz 3-miesięczny w IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research), Gatersleben, Niemcy (program NITKA), ponadto odbywała kilkudniowe wizyty w Plant Breeding and Genetics Section, IAEA, Seibersdorf pod Wiedniem, Austria.

Pozostała aktywność

Godne podkreślenia są prowadzone przez habilitantkę cykle wykładów w Pretorii (RPA – 2014) w ramach kursu 'Mutation Induction and in vitro techniques' oraz w Limie (Peru 2014) – kurs 'Use of mutation induction in crop breeding for abiotic stresses'.

Dr Szurman-Zubrzycka brała udział również w organizacji kilku kursów i warsztatach w macierzystej jednostce.

W ramach współpracy z sektorem gospodarczym habilitantka prowadziła Komercyjne badania zlecone Uniwersytetowi Śląskiemu przez firmę PlantCarbAps (Dania), gdzie pełniła funkcję kierownika wszystkich prac zleconych, dotyczących identyfikacji nowych alleli wybranych genów u jęczmienia uzyskanych metodą TILLING.

Kandydatka ma również szereg osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę. Pełniła funkcję promotora 8 prac licencjackich oraz funkcję promotora jednej pracy magisterskiej i była opiekunem naukowym 5 prac magisterskich. prowadziła zajęcia kursowe dla studentów I i II stopnia kierunków Biotechnologia, Biologia oraz Ochrona Środowiska (Genetyka Molekularna, Analiza Genetyczna, Inżynieria Genetyczna, Podstawy Genetyki, Bionformatyka i inne). Z osiągnięć organizacyjnych warto wymienić współorganizację na Uniwersytecie Śląskim kursów, finansowanych przez IAEA, dla naukowców z krajów rozwijających się. W 2023 roku pełniła funkcję dyrektora kursu oraz współorganizację szkoły technik NGT – School of Genomics and New Genomic Techniques.

Podsumowując, stwierdzam że zarówno przedstawione osiągnięcie naukowe, jak też pozostała aktywność naukowa (publikacje, staże, uzyskane projekty badawcze) świadczą o dojrzałości oraz samodzielności naukowej habilitantki i spełniają wszystkie warunki do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego stawiane w art. 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668).

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

prof. dr hab. Jerzy Kruk

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin