Lublin, 20.05.2021

prof. dr hab. Magdalena Frąc
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Urbaniak
pt. „*Zmienność sekwencji genów kodujących syntetazy nierybosomalnych peptydów oraz charakterystyka wytwarzanych metabolitów z grupy heksadepsipeptydów u Hypocreales*”

Rozprawa doktorska mgr Moniki Urbaniak została wykonana w Zakładzie Interakcji Roślina-Patogen Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod opieką promotora prof. dra hab. Łukasza Stępnia. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w trzech publikacjach, które ukazały się w czasopismach *Toxins* (IF 3,531, punkty MNiSW 100), *Pathogens* (IF 3,018, punkty MNiSW 100) oraz *Journal of Fungi* (IF 4,621, punkty MNiSW 20), a czwarty artykuł wchodzący w skład opracowania stanowi praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie *Toxins* (IF 3,531, punkty MNiSW 100).

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Moniki Urbaniak koncentruje się na zagadnieniach z obszaru mykologii, genetyki i biochemii, obejmując badania nad biosyntezą heksadepsypeptydów (bowerycyny, boweniatyny, eniatyny) u wybranych grzybów należących do rzędu Hypocreales. Badaniami objęto głównie grzyby entomopatogenne z rodzajów *Beauveria*, *Cordyceps* i *Isaria*, fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* oraz saprotroficzne z rodzaju *Trichoderma*. Celem przeprowadzonych badań było określenie zróżnicowania genetycznego i metabolicznego grzybów z rzędu Hypocreales, pochodzących od różnych żywicieli, ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy cyklicznych peptydów oraz określeniem ich potencjału toksynotwórczego poprzez jakościowe i ilościowe analizy heksadepsypeptydów.

Tematyka badań podjętych przez Panią mgr Monikę Urbaniak jest aktualna i interesująca. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mają w szczególności charakter badań podstawowych, przyczyniając się do pogłębienia wiedzy nad zagadnieniami biosyntezy heksadepsypeptydów, obejmując charakterystykę różnic pomiędzy zsekwencjonowanymi fragmentami genu kodującego syntazę bowerycyny izolatów grzybów z rzędu Hypocreales, określenie różnic w biosyntezie cyklicznych peptydów przez grzyby entomopatogenne, fitopatogenne i będące symbiontami roślin oraz porównanie stężenia produktów końcowych metabolizmu wtórnego wybranych grzybów. Jednakże, ze względu na znaczenie badanych mykotoksyn, w tym ich negatywny wpływ na zdrowie człowieka, ale także działanie cytotoksyczne, przeciwbakteryjne, owadobójcze i przeciwgrzybiczne oraz możliwość ich wykorzystania do opracowania nowych biomateriałów i bioproduktów, prowadzone badania mają również wymiar praktyczny. Biologiczne metabolity wtórne grzybów z jednej strony stanowią zagrożenie dla roślin uprawnych, powodując obniżenie jakości plonu, a także poprzez akumulację w tkankach roślinnych i zwierzęcych, obniżają jakość żywności i pasz, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia człowieka. Z drugiej strony właściwości metabolitów wtórnych grzybów powodują, że zarówno te organizmy, jak też produkowane przez nie związki mogą być wykorzystywane do opracowania nowych produktów przeznaczonych do biokontroli. Sprawia to, że badania nad biosyntezą heksadepsypeptydów oraz mechanizmami ich syntezy, nabierają jeszcze większego znaczenia aplikacyjnego, prowadząc do opracowania metod diagnostyki molekularnej na podstawie produkowanych mykotoksyn oraz wykorzystania metabolitów wtórnych jako potencjalnych składników nowych produktów leczniczych. Dlatego dostarczenie wiedzy o strukturze, budowie, różnorodności i toksyczności tych metabolitów jest istotnym elementem do rozwiązania problemów biosyntezy grzybowych heksadepsypeptydów. Pomimo tego, że na całym świecie prowadzone są badania nad syntezą mykotoksyn produkowanych przez grzyby, to ten obszar badawczy wymaga wciąż szerokich badań, ponieważ jest to proces wieloetapowy i często specyficzny gatunkowo, a ponadto zależy od wielu czynników środowiskowych, w tym warunków występujących w danej niszy ekologicznej, z uwzględnieniem różnych organizmów żywicielskich. Dlatego tematyka badań rozprawy doktorskiej wpisuje się w ważne zagadnienia dla jakości upraw i zdrowia człowieka, pozwalając jednocześnie na lepsze zrozumienie zmian profilu metabolitów wtórnych u różnych grzybów należących do rzędu Hypocreales. Badania nad heksadepsypeptydami pod względem poznawczym dostarczają informacji na temat ewolucji klastra genów regulujących ich biosyntezę, a pod względem

aplikacyjnym dostarczają wiedzy z zakresu oddziaływania danej niszy ekologicznej na biosyntezę tych cyklicznych peptydów. W związku z powyższym, wybór tematyki recenzowanej rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadniony i celowy.

2. Formalna analiza rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Urbaniak została przygotowana w formie manuskryptu, w sposób prawidłowy, typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Wyniki rozprawy doktorskiej, które wchodzą w skład manuskryptu, zostały opublikowane w trzech oryginalnych artykułach naukowych oraz jednej pracy przeglądowej, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych:

- Urbaniak Monika, Stępień Ł., Uhlig S., 2019, *Evidence for Naturally Produced Beauvericins Containing N-Methyl-Tyrosine in Hypocreales Fungi*. Toxins, 11, 182, doi:10.3390/toxins11030182.
- Urbaniak Monika, Waśkiewicz A., Trzebny A., Koczyk G., Stępień Ł., 2020, *Cyclodepsipeptide Biosynthesis in Hypocreales Fungi and Sequence Divergence of the Non-Ribosomal Peptide Synthase Genes*. Pathogens, 9, 552, doi:10.3390/pathogens9070552.
- Urbaniak Monika, Waśkiewicz A., Koczyk G., Błaszczyk L., Stępień Ł., 2020, *Divergence of Beauvericin Synthase Gene among Fusarium and Trichoderma Species*. Journal of Fungi, 6,288, doi:10.3390/jof6040288.
- Urbaniak Monika, Waśkiewicz A., Stępień Ł., 2020, *Fusarium Cyclodepsipeptide Mycotoxins: Chemistry, Biosynthesis, and Occurrence*. Toxins, 12, 765, doi:10.3390/toxins12120765.

We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, a z przedstawionych oświadczeń Doktorantki i współautorów wynika, iż Jej rola w przygotowaniu tych prac była znacząca. Z przedstawionych oświadczeń określających indywidualny wkład Doktorantki wynika, że miała Ona udział w planowaniu eksperymentów i dyskutowaniu uzyskanych wyników, wykonaniu analiz molekularnych i chemicznych, a także analizie danych i interpretacji wyników uzyskanych ze spektrometrii mas oraz analizie uzyskanych sekwencji i rekonstrukcji filogenetycznej. Ponadto Doktorantka przygotowała i napisała manuskrypty poszczególnych prac oraz opracowała odpowiedzi na recenzje i dokonała poprawy manuskryptów.

Publikacje umieszczone w rozprawie doktorskiej objęto wspólnym tytułem „***Zmienność sekwencji genów kodujących syntetazy nierybosomalnych peptydów oraz charakterystyka wytwarzania metabolitów z grupy heksadepsipeptydów u Hypocreales***”, a pracy złożonej z 12 rozdziałów, nadano strukturę obejmującą: **Streszczenie (1) i Summary (2)**, w których umieszczono, odpowiednio w języku polskim i angielskim, uzasadnienie i cele podjętych badań oraz krótkie podsumowanie wyników. **Wstęp (3)**, **Hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań (4)**, **Materiał badawczy i metody badań (5), Najważniejsze wyniki prowadzonych badań (6)**, w którym odnoszono się do wyników opublikowanych w poszczególnych artykułach naukowych, **Podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski (7)**, **Literaturę (8)**. Poza tym, na początku manuskryptu umieszczono **wykaz skrótów używanych w rozprawie**, ułatwiający czytanie pracy, a na końcu rozprawy umieszczono **pełne teksty czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy** oraz **oświadczenia Doktorantki i Współautorów (9-12)**. Praca w takim układzie liczy 119 stron. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej został dobrze sformułowany i odpowiada treści pracy, chociaż można byłoby dodać sformułowanie „*…u grzybów z rzędu Hypocreales*” zamiast „*…u Hypocreales”*.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Nie licząc streszczeń w języku polskim i angielskim pierwszy rozdział rozprawy stanowi „Wstęp”, w którym Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane z tematyką rozprawy, w tym omówiła znaczenie grzybów z rzędu Hypocreales, podkreślając ich zdolności do syntezy nierybosomalnych cyklicznych peptydów. Doktorantka zaprezentowała ogólną charakterystykę różnych heksadepsypeptydów, określając budowę bowerycyny, boweniatyny oraz eniatyny, a także opisała najczęściej wykrywane w roślinach uprawnych i paszach analogi heksadepsypeptydów wraz z podkreśleniem ich funkcji oraz działania. W tej części przedstawiona została zróżnicowana aktywność mykotoksyn związana z różną budową strukturalną tych związków, a także scharakteryzowała ich wpływ na zwierzęta, owady, bakterie czy grzyby oraz zwróciła uwagę na właściwości heksadepsypeptydów, od których zależy ich cytotoksyczność skutkująca indukcją śmierci komórki. Kolejnym blokiem tematycznym wstępu jest część prezentująca budowę bowerycyny i eniatyny. W rozdziale tym opisano gen syntazy eniatyny oraz homologiczny klaster genów biosyntezy bowerycyny, a także omówiono budowę syntazy eniatyny i syntazy bowerycyny. Na końcu rozdziału Doktorantka odniosła się do zakresu badań umieszczonych w rozprawie doktorskiej, z

uwzględnieniem poszczególnych publikacji. Przedstawione we wstępnie omówienie problematyki związanej z tematem rozprawy wprowadza czytelnika w zagadnienia przedstawione w pracy. Doktorantka nakreśliła zagadnienia badawcze, związane z biosyntezą heksadepsypeptydów przez grzyby z rzędu Hypocreales, podkreślając, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* nie były wcześniej opisywane jako zdolne do biosyntezy tych metabolitów.

Kolejny rozdział obejmuje hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań, co wyraźnie wyznacza kierunek podjętych badań, związany z określeniem potencjału toksynotwórczego grzybów z rzędu Hypocreales poprzez jakościowe i ilościowe analizy heksadepsypeptydów oraz ze scharakteryzowaniem różnic pomiędzy sekwencjami genu kodującego syntazę bowerycyny. Chociaż w tej części pracy brakuje jasno sformułowanego ogólnego celu podjętych badań, to cele cząstkowe zostały sformułowane poprawnie, określając jednocześnie zakres badań i odnosząc się do zastosowanych metod badawczych. W części materiał badawczy i metody badań Doktorantka dość ogólnie omówiła wykorzystany w badaniach materiał badawczy oraz wykorzystane metody analityczne z zakresu biologii molekularnej oraz chemii podkreślając, że dokładne opisy materiału badawczego oraz wykorzystanych technik badawczych, sprzętu i metodologia prowadzonych badań zostały przedstawione w poszczególnych publikacjach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Taki sposób prezentacji jest w mojej ocenie dopuszczalny, biorąc pod uwagę fakt, że opis metodyczny prowadzonych badań został szczegółowo przedstawiony w poszczególnych artykułach naukowych.

Rozdział „Najważniejsze wyniki prowadzonych badań" stanowi część pracy, w której Doktorantka prawidłowo omówiła efekty badań. Jest to rozdział napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały, podzielony na bloki tematyczne dotyczące identyfikacji molekularnej badanych szczepów grzybów, zróżnicowania sekwencji genu syntazy nierybosomalnych peptydów oraz biosyntezy heksadepsypeptydów w kulturach *in vitro*, z uwzględnieniem ilościowej i jakościowej analizy heksadepsypeptydów metodą spektrometrii mas. Omawiając wyniki w każdym bloku tematycznym Doktorantka odniosła się do poszczególnych, opublikowanych artykułów naukowych, co ułatwiło śledzenie i analizę wyników poszczególnych artykułów naukowych oraz utworzyło powiązaną całość zakresu badawczego. W przypadku grzybów entomopatogennych identyfikacja molekularna została przeprowadzona na podstawie analizy sekwencji ITS (wewnętrznych sekwencji transkrybowanych), natomiast dla grzybów fitopatogenicznych i saprotroficznych jako marker zastosowano gen kodujący czynnik elongacji translacji (tef-1α). Druga część rozdziału

dotycząca analizy filogenetycznej genu syntazy bowerycyny wykazała, że gatunek *B. felina* jest wczesnym, ewolucyjnie rozbieżnym producentem bowerycyny. Analiza filogenetyczna na podstawie genu kodującego syntazę bowerycyny izolatów z rodzaju *Fusarium* i *Trichoderma*, nieprodukujących i produkujących bowerycynę, wykazała trzy oddzielne klady, grupujące badane izolaty, a wyniki badań wskazują, że wciąż brakuje badań obejmujących gatunki *Trichoderma* w odniesieniu do zróżnicowania klastra genów kodujących biosyntezę bowerycyny. W mojej ocenie na szczególne podkreślenie zasługuje ilościowa i jakościowa analiza heksadepsypeptydów. Pomimo tego, że wyniki wskazujące, że najwydajniejszymi producentami bowerycyny były izolaty z rodzaju *Fusarium*, a izolaty z rodzaju *Trichoderma* syntetyzowały bowerycynę w niewielkich ilościach, nie są zaskakujące, ze względu na zdolności fitopatogenicne grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz oportunistyczny i niepatogenny tryb życia grzybów z rodzaju *Trichoderma*, to ciekawą część uzyskanych wyników stanowią rezultaty badań dotyczące analizy jakościowej heksadepsypeptydów. W sumie wykryto 11 analogów bowerycyny oraz 10 analogów boweniatyny, w tym 2 nowe analogi bowerycyny (bowerycyna L i K) oraz jeden analog boweniatyny (boweniatyna-L). Obszerny materiał badawczy zaowocował dużą ilością wyników, które omówiono i przedstawiono na licznych rysunkach oraz zestawiono w tabelach umieszczonych w poszczególnych artykułach naukowych. Uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje na temat charakterystyki oraz zmienności biosyntezy heksadepsypeptydów, takich jak bowerycyny, boweniatyny i eniatyny, wśród grzybów entomopatogennych z rodzaju *Beauveria*, *Cordyceps*, *Isaria*, fitopatogenicznych z rodzaju *Fusarium* oraz saprotroficznych z rodzaju *Trichoderma*, co zostało przedstawione w rozdziale dotyczącym podsumowania uzyskanych wyników i wniosków. W tej części rozprawy Doktorantka przedstawiła najważniejsze rezultaty przeprowadzonych badań, odnosząc się do wyników dostępnych w poszczególnych publikacjach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W tej części Doktorantka podsumowuje również zakres badań, przeprowadzonych z wykorzystaniem szeregu technik analitycznych oraz formułuje pięć trafnych wniosków. Świadczy to o dobrze zaplanowanych badaniach. Publikacja przeglądowa wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. Doktorantka udowodniła, że posiada szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań. Na końcu pracy znajduje się literatura, obejmująca 67 pozycji, w większości z ostatnich 10 lat, co potwierdza aktualność

podjętej tematyki badawczej, oraz umieszczone zostały pełne teksty opublikowanych przez Doktorantkę artykułów naukowych.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się poniższe komentarze i zagadnienia do dyskusji, proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

- Czy mogłaby Pani omówić główne czynniki wpływające na zróżnicowanie biosyntezy mykotoksyn, biorąc pod uwagę również wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej?
- Czy (a jeśli tak, to w jaki sposób) przeprowadzone przez Panią badania mogłyby przyczynić się do opracowania innowacyjnego biopreparatu, który mógłby być wykorzystany w rolnictwie?

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie, tekst został napisany jasno, a dokumentacja publikacyjna potwierdza, że badania zostały wykonane prawidłowo. W treści pracy znalazły się drobne błędy edytorskie i stylistyczne, które zostały zaznaczone w tekście rozprawy m.in. w tekście występują sformułowania „*…geny odpowiedzialne*”, zamiast „*…geny kodujące*”. Ponadto, w niektórych miejscach zamiast częstego powtarzania sformułowań, że szczegółowy opis znajduje się w publikacjach, można było krótko przedstawić opisy wyników badań. Jednakże, nie jest to błędem i nie obniża wartości pracy, a jedynie ułatwiłoby śledzenie i analizę uzyskanych rezultatów.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego określenia zmienności sekwencji genów kodujących syntetazy nierybosomalnych peptydów oraz charakterystyki wytwarzanych metabolitów z grupy heksadepsypeptydów u grzybów z rzędu Hypocreales.

Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność prowadzenia badań naukowych, opanowała szeroki warsztat badawczy, a także wykazała się zdolnością do omówienia, opracowania, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pani mgr Moniki Urbaniak jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, w szczególności w zakresie biosyntezy heksadepsypeptydów przez wybrane rodzaje grzybów. Recenzowaną rozprawę oceniam pozytywnie podkreślając jej wysoki poziom naukowy i wartość merytoryczną.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Urbaniak spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Magdalena Frąc

prof. dr hab. Magdalena Frąc

Lublin, 20.05.2021