

INSTYTUT AGROFIZYKI  
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Jacek Panek

**OPRACOWANIE METOD DETEKCJI GRZYBÓW  
TERMOOPORNYCH Z GATUNKU *TALAROMYCES  
FLAVUS* NA PODSTAWIE TECHNIK PCR,  
REAL-TIME PCR ORAZ LAMP**

DEVELOPMENT OF DETECTION METHODS OF HEAT-RESISTANT FUNGI  
*TALAROMYCES FLAVUS* BY PCR, REAL-TIME PCR AND LAMP TECHNIQUES

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora:

prof. dr hab. Magdaleny Frąć

© Jacek Panek

Lublin 2018

## Streszczenie

Psucie żywności przetwarzanej termicznie przez grzyby jest słabo poznanym i bardzo istotnym problemem w przetwórstwie żywności. Proces cieplnego utrwalania produktów na drodze pasteryzacji, jest szeroko stosowany w przetwórstwie żywności. W wyniku ogrzania produktu do temperatury wyższej niż 70°C niszczone są zarówno strzępki, jak i zarodniki większości grzybów. Niektóre grzyby, należące do grupy grzybów termoopornych, wytwarzają termooporne zarodniki workowe pozwalające na przetrwanie takich warunków. Pleśnie termooporne występują głównie w glebie, skąd mogą kontaminować owoce roślin takich jak truskawki. Grzyby z rodzaju *Talaromyces* należą do najpowszechniej występujących grzybów termoopornych, zaś *Talaromyces flavus* jest najczęściej wykrywanym gatunkiem rodzaju *Talaromyces*. Do wykrywania grzybów termoopornych standardowo wykorzystywane są tradycyjne metody posiewów mikrobiologicznych, które ze względu na długie oczekiwanie na wynik, mają ograniczone zastosowanie w monitorowaniu surowców na skalę przemysłową. Coraz częściej do wykrywania i identyfikacji grzybów stosowane są techniki biologii molekularnej, takie jak: łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (qPCR/real-time PCR), amplifikacja wykorzystująca zapętlanie (LAMP) oraz sekwencjonowanie DNA. Nie powstały jeszcze jednak metody, pozwalające na szybką, czułą i skuteczną detekcję *T. flavus*. Z tego powodu w ramach niniejszej rozprawy opracowano metody detekcji i identyfikacji *T. flavus* oparte o wyżej wymienione techniki. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metodę PCR pozwalającą na detekcję 5 pg DNA *T. flavus*, metodę real-time PCR o progu detekcji wynoszącym 200 fg DNA, a także metodę LAMP, która pozwoliła na detekcję 1 fg DNA *T. flavus* w trakcie 60 minut. Opracowano także metodę DirectLAMP pozwalającą na wykrycie jednego zarodnika workowego *T. flavus* w wodzie bez potrzeby wcześniejszej izolacji DNA w trakcie 60 minut. Specyficzność amplifikacji została potwierdzona z wykorzystaniem szczepów *T. flavus*, a także innych z rodzaju *Talaromyces* i innych grzybów termoopornych. Na podstawie sekwencjonowania genu D2LSU określono przynależność badanych szczepów do gatunku. Dokonano również sekwencjonowania otrzymanych amplikonów, dodatkowo potwierdzając specyficzność opracowanych metod.

### Słowa kluczowe:

*Talaromyces flavus*, grzyby termooporne, PCR, qPCR, real-time PCR, LAMP, DirectLAMP, sekwencjonowanie DNA

## **Abstract**

Fungal spoilage of thermal processed food is poorly recognised but very important issue of food industry. Pasteurization is one of the most common method for food preservation in food industry. The process of heating the product to the temperature higher than 70°C kills or neutralises spores or hyphae of most fungi. However, there exist group of heat-resistant fungi that produce heat resistant ascospores which allow them to survive these conditions. Heat-resistant fungi contamination of fruits like strawberries origin from soil which is their main habitat. Genus *Talaromyces* is one of the most common in heat-resistant fungi group and *Talaromyces flavus* is the most frequent species of this genus. Typical and conventional way to detect heat-resistant fungi utilizes microbiological plate method. The main disadvantage of this approach is connected with long time needed to obtain the results. This characteristic makes these methods less convenient for industrial monitoring of agricultural raw products. Nonetheless there emerge methods for detection and identification of fungi based on molecular biology techniques. These methods are: polymerase chain reaction (PCR), PCR with real-time detection (real-time PCR/qPCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP) or DNA sequencing. Notwithstanding, there are no methods for rapid, sensitive and effective detection of *T. flavus*. To fulfil this gap, in this thesis the methods for detection of *T. flavus* were developed. As a result, the PCR method capable of detection of 5 pg of *T. flavus* DNA, real-time PCR method which allowed to detect 200 fg of *T. flavus* DNA and LAMP method that succeeded in detection of 1 fg of *T. flavus* DNA were developed. The DirectLAMP method able to detect 1 ascospore of *T. flavus* in water in 60 minutes without DNA isolation prior to reaction was also developed. The specificity of methods was assessed using *T. flavus* strains and other species of fungi including genus *Talaromyces* and other heat-resistant fungi. To further assure the specificity of methods, the D2LSU marker gene and obtained amplicons were sequenced and analysed.

### **keywords:**

*Talaromyces flavus*, heat-resistant fungi, PCR, qPCR, real-time PCR, LAMP, DirectLAMP, DNA sequencing