



# INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centr. 61 6550200, sekret. 61 6550255 Fax: 61 6550301 E-mail: office@igr.poznan.pl  
www.igr.poznan.pl NIP: 781-16-21-455 REGON: 000326204

dr hab. Łukasz Stępień  
Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Jacka Panka

zatytułowanej: „Opracowanie metod detekcji grzybów termoopornych z gatunku  
*Talaromyces flavus* na podstawie technik PCR, Real-Time PCR oraz LAMP”,

wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk  
w Lublinie, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc.

W przedstawionej do recenzji rozprawie podjęty został istotny problem związany z detekcją termoopornych grzybów z rodzaju *Talaromyces*, odpowiedzialnych za nieskuteczność zabiegów termicznej obróbki przetworów żywnościowych, poddawanych procesowi pasteryzacji. Powszechność występowania tych mikroorganizmów przyczyniła się znacznego zainteresowania sektora przemysłowego metodami ich wykrywania. Dotychczas jednakże były one ograniczone do klasycznych metod mikrobiologicznych, wymagających sporej wiedzy, doświadczenia i pracy, a przede wszystkim czasu.

Z tego względu zadanie postawione sobie przez mgr Jacka Panka jako główny cel rozprawy doktorskiej, polegające na opracowaniu metod identyfikacji i specyficznej detekcji gatunku *Talaromyces flavus*, opartych na zróżnicowanym zestawie technik molekularnych (PCR, qPCR, LAMP oraz sekwencjonowanie DNA), wydaje się jak najbardziej uzasadnione, wartościowe i potrzebne. Niewykluczone, że opracowana metodyka może zostać stosunkowo łatwo zaadaptowana do zastosowań na skalę przemysłową, co dodatkowo zwiększyłoby jej

atrakcyjność. Należy także wspomnieć, że badania wykonane w ramach rozprawy zyskały uznanie w oczach ekspertów, uzyskując w latach 2013-2016 finansowanie w ramach Diamentowego Grantu – program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

### **Ocena formalna rozprawy**

Recenzowana dysertacja jest napisana w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, mieści się na 116 stronach maszynopisu. Po krótkim wprowadzeniu w problematykę badawczą podjętą przez Doktoranta (Wstęp), następuje wyczerpujący rozdział opisujący bieżący stan wiedzy o badanym gatunku, przedstawiający jego morfologię i biologię, a także poruszający, choć w mojej ocenie dosyć pobieżnie, potencjalne zagrożenia ze strony metabolitów wtórnych syntetyzowanych przez *T. flavus*. Następnie na 19 stronach omówiono zostały metody detekcji patogena. Cel pracy sformułowano jasno i przejrzysto.

Rozdział Materiały i metody liczy 20 stron maszynopisu. Muszę przyznać, że niezwykle szczegółowo i wyczerpująco Autor opisuje w nim wykorzystaną w pracy metodologię.

Wyniki rozprawy zostały przedstawione na 23 stronach, po czym następuje dość zwięzły rozdział zawierający Dyskusję otrzymanych wyników w świetle dostępnej literatury światowej. Podsumowanie pracy stanowią wnioski wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych eksperymentów. Po nich następuje lista rysunków i tabel oraz bogaty spis wykorzystanej literatury, liczący 203 pozycje. Uzupełnieniem rozprawy jest metodyczny rozdział przedstawiający metodykę izolacji DNA, która, jak zakładam, została dzięki realizacji pracy uznana za najbardziej przydatną i efektywną.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Grzyby mikroskopowe są wszędzieobecne i prezentują szereg przystosowań do ciągłego rozprzestrzeniania się i zajmowania nowych środowisk. Z tego względu uważane są za najpoważniejsze zagrożenie dla czystości mikrobiologicznej żywności. Są przy tym w stanie przetrwać w znacznie bardziej wymagających warunkach, niż inne organizmy. Przykładem takich warunków mogą być promieniowanie UV, ekstremalne zasolenie, czy temperatury. Szczególną grupą mikroorganizmów są grzyby termooporne, które wytwarzają zarodniki workowe o pogrubionych ścianach, które są zdolne przetrwać proces pasteryzacji. Stanowią



zatem poważny problem dla przemysłu spożywczego, co z kolei tłumaczy zainteresowanie ze strony środowiska naukowego wyrażające się mnogością badań związanych z detekcją i identyfikacją obecności grzybów termoopornych w procesach technologicznych oraz sposobami zapobiegania kontaminacjom produktów. Biorąc pod uwagę powszechność występowania gatunków z rodzaju *Talaromyces* (a w szczególności *T. flavus*), zasadność podjętej w rozprawie problematyki badawczej nie budzi wątpliwości.

Rozdział „Stan wiedzy” jest zwięzłym, podręcznikowym studium badanego gatunku, prezentującym zarówno informacje dotyczące badanego w pracy materiału (Rysunek 1), jak i schematy i mikrografie dostępne w cytowanych pracach). Szczegółowo opisano dostępne w literaturze dane dotyczące zjawiska termooporności i to nie tylko w kontekście badanego organizmu, ale także innych taksonów. Doktorant podjął się żmudnej pracy opracowania metod specyficznej detekcji *T. flavus* opartych o zróżnicowane techniki biologii molekularnej, zarówno w czystych kulturach laboratoryjnych, jak i w materiale zbliżonym do naturalnego środowiska występowania, czyli ekstraktach uzyskanych z gleby oraz owoców truskawki. Celowo używam tego określenia, gdyż wykorzystywane matryce były sztucznie infekowane czystym szczepem patogena, a takie warunki w warunkach polowych są raczej nieosiągalne. Chętnie poddałbym ten wątek do dyskusji w czasie obrony rozprawy doktorskiej.

Podrozdział dotyczący metabolitów wtórnych ogranicza się już tylko do gatunku *T. flavus*, co wydaje się zrozumiałe w kontekście znaczenia badań objętych dysertacją. Jednakże, po jego lekturze odczuwam lekki niedosyt, wynikający z braku jakiegokolwiek odniesienia do szczepów wykorzystywanych w pracy. Jestem świadom, że charakterystyka metaboliczna wybranych szczepów nie była przedmiotem pracy, ale być może dostępne są jakieś szczegółowe dane dotyczące zdolności tych właśnie szczepów do syntezy wymienionych w rozprawie grup metabolitów? Prosiłbym Pana mgr Jacka Panka o komentarz w tej kwestii podczas obrony rozprawy.

Muszę przyznać, że rozdział dotyczący metod detekcji (strony 18-36) wzbudził we mnie mieszane uczucia. Z jednej strony jest to świetnie przedstawiona wiedza ‘książkowa’, która z pewnością byłaby przydatna w formie skryptu dla niejednej grupy studentów, uczestniczących np. w kursie na temat metod biologii molekularnej. Zagadnienia związane z niuansami technik oraz poszczególnymi ich etapami są opisane przejrzysto i zrozumiale. Z drugiej jednak strony, metody te są powszechnie znane i stosowane od wielu lat. Co więcej, są one ponownie szczegółowo opisywane w następnych rozdziałach rozprawy, co zresztą

wydaje się logicznie uzasadnione. Jak na opis stanu wiedzy, czy przeglądu dostępnej w temacie literatury, ta część rozprawy może się wydawać nieco zbyt rozbudowana.

Cel rozprawy został jasno i zwięźle sprecyzowany, choć z naukowego punktu widzenia może być postrzegany jako ściśle techniczny. Zakładając wysoką specyficzność gatunkową opracowanych metod, a także ich potencjalne zastosowanie praktyczne w przemyśle, warto byłoby rozbudować cel pracy o przetestowanie przynajmniej części metod detekcji na rzeczywistych próbach 'środowiskowych', w których niemal pewna jest obecność innych mikroorganizmów. Prosiłbym o komentarz, czy takie eksperymenty były lub będą wykonywane.

Rozdział dotyczący Materiałów i Metod jest szczegółowy i wyczerpujący. Muszę przyznać, że został on przygotowany znakomicie, z jednym jednakże zastrzeżeniem. Mianowicie, niejasna jest lista szczepów wykorzystanych w pracy. Na stronie 38 wspomniane są gatunki *Neosartorya fischeri*, *Byssosclamyces fulva*, *Fusarium culmorum* oraz *F. graminearum*, nie podano jednak żadnych danych na temat pochodzenia tych szczepów ani powodów, dla których te właśnie gatunki zostały wytypowane jako grupa kontrolna. Na liście zamieszczonej na stronie 41 można znaleźć również inne gatunki niż wymienione wcześniej w tekście, brak natomiast choćby danych dla szczepów *Fusarium*. Niejasne jest też, które szczepy pochodzą z kolekcji własnej Instytutu, a które ze wspomnianych międzynarodowych kolekcji. Ciekawi mnie to głównie ze względu na wspomniane wcześniej zróżnicowanie metaboliczne *T. flavus*.

Moje szczere uznanie budzi skrupulatność w zakresie oceny przydatności poszczególnych technik ekstrakcji genomowego DNA z analizowanych gatunków grzybów. Z ciekawości spytam, czy nie było planu by sprawdzić, jak na tle zastosowanych procedur prezentowałyby się powszechnie wykorzystywane uniwersalne zestawy typu Qiagen, czy Promega Wizard.

W Podrozdziale 4.2. Doktorant pisze o projektowaniu starterów do PCR w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych udostępnionych w bazie GenBank NCBI. Wydaje mi się, że dla zwiększenia przejrzystości tej procedury warto byłoby zamieścić w pracy analizowane sekwencje z zaznaczeniem obszarów komplementarnych do zaprojektowanych starterów, np. jako rysunek lub choćby suplement. Nie do końca jest dla mnie jasne, dlaczego sekwencje starterów Tfl\_F/Tfl\_R są powtórzone w dwóch tabelach (Tabele 3 i 5). Uwaga ta dotyczy



także starterów projektowanych w podrozdziałach 4.4. oraz 4.5. Mam pytanie dotyczące Tabeli 10 (strona 53), w której wspomniano o stężeniu fragmentu amplifikowanego wcześniej w reakcji PCR. Skąd wiadomo, że jego stężenie wynosiło akurat 50 ng/μl? Jeśli faktycznie było ono mierzone, to czy pomiarowi poddawano mieszaninę poreakcyjną, czy fragment był oczyszczany z żelu po elektroforezie? Dla dokładności pomiaru wydaje się to mieć kluczowe znaczenie.

Bardzo podoba mi się rozdział „Wyniki”, w którym metodycznie i wyczerpująco opisane zostały rezultaty przeprowadzonych doświadczeń i analiz. Wykresy są przejrzyste i właściwie opisane. Możliwe, że warto byłoby do Rysunków 11 oraz 13 dodać Tabele zawierające konkretne pomiary dla poszczególnych szczepów, ale zamieszczenie obliczonych w taki sposób średnich też jest poprawne, jednakże przydałoby się zdanie wyjaśniające szczegółowo pochodzenie przedstawionych danych, a zwłaszcza liczbę pomiarów, z których wyliczana była pokazana średnia (Rysunek 14). Prosiłbym także Doktoranta o komentarz w kwestii następującej: na Rysunku 15 zaprezentowano średnie stężenie kwasów nukleinowych po ekstrakcji DNA przy użyciu 10 różnych metod. Dla dwóch z nich (Prepman Ultra oraz MagMAX) zakres średnich wartości jest bardzo wąski, podczas gdy pozostałe metody dają najwyraźniej nieco bardziej rozbieżne wyniki. Czy istnieją jakiegokolwiek przesłanki by spekulować o możliwej przyczynie takiego stanu rzeczy? Patrząc na Rysunek 16 można wywnioskować, że wydajność tych dwóch metod ekstrakcji DNA, przynajmniej dla szczepu *T. flavus* DSM 63536, była najniższa. Czy wiadomo zatem, dlaczego inne metody ekstrakcji DNA zdecydowanie bardziej różnicują badane szczepy pod względem stężenia ekstraktów? Przy okazji chciałem podzielić się drobną uwagą redakcyjną, mianowicie szkoda, że sposób opisywania ścieżek przyjęty dla Rysunku 17 nie został zastosowany w następnych fotografiach, szczególnie przedstawionej na Rysunku 18, gdzie rozpoznanie ścieżek elektroforetycznych jest wyjątkowo trudne.

W Podrozdziale 5.3. opisano wyniki eksperymentu mającego pokazać skuteczność, specyficzność oraz czułość metody detekcji *T. flavus* z wykorzystaniem techniki qPCR. Niestety nie znalazłem żadnych danych dotyczących liczby powtórzeń, czy to biologicznych, czy też technicznych, których analiza statystyczna pozwoliłaby na ocenę powtarzalności analiz. Na stronie 68 przedstawiono wyniki detekcji DNA *T. flavus* w matrycach sztucznie infekowanych zarodnikami tego grzyba. Jak już wcześniej wspomniałem, prosiłbym o komentarz w kwestii potencjalnej przydatności badanej metody w przypadku materiału

biologicznego pozyskanego w warunkach naturalnych. Czy opisana metoda qPCR byłaby wystarczająco czuła, by wykryć ilości DNA/grzybni typowo obecne w owocostanach truskawek zainfekowanych przez *T. flavus* w naturalnych warunkach polowych? Z opisu metodyki zrozumiałem, że zarodniki w przedstawionym doświadczeniu były „mieszane” z tkanką roślinną i glebą, po czym następowała procedura ekstrakcji DNA. Dlaczego nie przeprowadzono symulowanej infekcji z choćby kilkudniowym okresem inkubacji patogena po infekcji badanej matrycy?

Na Rysunku 25 krzywych jest znacznie więcej, niż wynika to z legendy. Zakładam, że to zwyczajna pomyłka. Zastanawia mnie również, dlaczego nie uwzględniono choćby jednego szczepu nie należącego do gatunku *T. flavus*. Zakładając wysoką specyficzność metody, powinien on posłużyć niejako jak dodatkowa próba NTC, czyniąc opracowaną metodę jeszcze bardziej wiarygodną. Duże wrażenie zrobiła na mnie przedstawiona na Rysunku 34 czułość metody DirectLAMP, z której w zasadzie wynika, że wcześniej prezentowane wyniki analiz qPCR z wykorzystaniem matryc w postaci infekowanej gleby, czy truskawek, świadczą o zdecydowanie mniejszej czułości tej drugiej. Prosiłbym Doktoranta o komentarz, z czym może być to związane. Mam także pewne wątpliwości dotyczące dendrogramu przedstawionego na Rysunku 36. O ile wcześniejszy dendrogram (Rysunek 35) posiada solidne podparcie w tzw. wartościach „Bootstrap value”, o tyle dendrogram na Rysunku 36 już nie. Prosiłbym Autora o wyjaśnienie, jak zostało to zinterpretowane.

Rozdział „Dyskusja” jest zwięzła i konkretna. Doktorant krytycznie porównuje uzyskane wyniki z dostępnymi źródłami literaturowymi. Ponownie, przydałby się akapit, choćby spekulujący na temat możliwego wykorzystania opracowanych metod na materiale „naturalnie” zainfekowanym. Na stronie 80 wspomniano, że gen użyty do zaprojektowania starterów występuje w genomie w wielu kopiach, nie podano jednak źródła tej informacji, a jest ona bardzo ciekawa. Czy wszystkie kopie są aktywne transkrypcyjnie? Czy znane są różne warianty alleliczne i jak mogłoby to wpływać na dokładność zaprojektowanych metod? Prosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony rozprawy. Intrygująca jest część traktująca o możliwych mechanizmach odpowiedzialnych za powodzenie techniki DirectLAMP używającej jako matrycy zawiesiny askospor. Chciałbym usłyszeć odpowiedź na pytanie, czy prace nad tym zagadnieniem są lub będą kontynuowane.



Rozprawę podsumowuje rozdział „Wnioski”, których sformułowano aż 10. Mówiąc całkiem szczerze, część z nich (konkretnie wnioski nr 1, 3, 4, 7, czy 10) są bardziej podsumowaniem uzyskanych wyników, niż wnioskami z nich płynącymi i z pewnością mogłyby zostać zgrabnie wplecione w kluczowe punkty tego rozdziału. W zakończeniu rozprawy trochę brakuje mi pewnej refleksji i „spojrzenia w przyszłość”. Biorąc pod uwagę potencjalną dalszą karierę naukową Doktoranta, chciałbym prosić Go o podzielenie się planami i perspektywami badawczymi na najbliższe lata.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Pod względem redakcyjnym praca jest przygotowana niezwykle starannie. Autor używa pięknej polszczyzny, stroniąc od żargonu laboratoryjnego i neologizmów. Z dużym zadowoleniem przyznaję, że praca została napisana językiem, którego jakość znacznie wykracza poza spotykane zazwyczaj w pracach doktorskich standardy. Dostrzegłem dosłownie pojedyncze „literówki” i miałbym pojedynczą drobną uwagę natury ogólnej, dotyczącą zamieszczonych w pracy wykresów. Podczas ich studiowania rzuciła mi się delikatna niekonsekwencja w kolejności rozcięń zamieszczonych w legendach (czasem są umieszczone rosnąco, innym razem malejąco). Absolutnie nie obniża to jednak przejrzystości pracy i mojej wysokiej oceny dotyczącej pracy włożonej w edytorską stronę dysertacji.

### **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest niezwykle rzetelnie przygotowanym studium na temat opracowania metod detekcji i identyfikacji termoopornego grzyba *Talaromyces flavus*. W toku realizacji kolejnych celów Doktorant dowiódł sprawnego posługiwania się różnymi technikami laboratoryjnymi, potrafi właściwie planować i wykonywać eksperymenty służące realizacji postawionych sobie zadań. W trakcie prac mgr Jacek Panek zręcznie wykorzystywał posiadaną wiedzę, zarówno praktyczną, jak i teoretyczną, przekonująco dyskutując uzyskiwane wyniki. W podsumowaniu, Doktorant słusznie wskazał zalety i ograniczenia stosowanych metod.

Rozprawa została znakomicie opracowana i zredagowana, czyta się ją z dużą przyjemnością. Konkludując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej

Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie  
o dopuszczenie mgra Jacka Panka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, zmierzającego  
do nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia.

Poznań, 13.02.2018

Lukasz Stepień