

Dr hab. inż. Marek Kopacki
Katedra Ochrony Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Akademicka 13, Lublin

Lublin, 26 stycznia 2026 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Jean de Dieu Muhire

**pt. Endophytes eradication technology in the production
of symbiotically modified grasses**

**(Technologia eradykacji endofitów w produkcji traw
modyfikowanych symbiotycznie)**

wykonanej w Pracowni Mykologii Molekularnej,
Fitopatologii i Entomologii
Katedra Biologii i Ochrony Roślin
Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Recenzję pracy doktorskiej przygotowano w oparciu o postanowienie Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy nr 2/NB.520.11.2025 z dnia 17 listopada 2025



roku oraz w związku z art. 190 ustęp 2 i art. 183 ustawy z dnia 23 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dziennik Ustaw 2023 poz. 742 z późniejszymi zmianami) o powołaniu mnie na Recenzenta tej pracy. Praca doktorska mgr inż. Jean de Dieu Muhire została napisana pod kierunkiem dr hab. inż. Dariusza Pańki, profesora PBŚ oraz promotora pomocniczego dr hab. inż. Jana Mućko profesora PBŚ.

Problematyka badawcza podjęta przez Autora w przedstawionej do recenzji pracy dotyczy aspektów produkcji traw modyfikowanych symbiotycznie. Jest bardzo aktualna w dobie rosnącego zapotrzebowania na żywność oraz zwiększania wydajności produkcji roślinnej. Z drugiej strony istnieje silna presja ograniczania negatywnego wpływu środków produkcji na jakość produkowanej żywności oraz środowisko naturalne. Problematyka ta stanowi ona ważny element zrównoważonego rozwoju rolnictwa i obszarów wiejskich w UE. Jej podstawowym założeniem jest redukcja stosowania chemicznych środków ochrony roślin oraz szczególnie niebezpiecznych pestycydów o 50% do 2030 roku. W związku z tym, najistotniejszym elementem ochrony będzie wykorzystanie naturalnego potencjału środowiska i niechemicznych metod ochrony roślin. Uprawa traw, zwłaszcza życicy trwałej, ogrywa istotną rolę w produkcji żywności oraz wpływa na utrzymywanie bioróżnorodności ekosystemów i estetykę terenów zieleni. Dzięki obecności endofitów *Epichloë*, trawy są zazwyczaj bardziej odporne na liczne czynniki stresowe, zarówno abiotyczne, jak i biotyczne. Wybrane izolaty grzybów endofitycznych z rodzaju *Epichloë/Neotyphodium*, tzw. „novel endophytes”, mogą być wykorzystane do symbiotycznej modyfikacji traw (SMG), zapewniając roślinom większą odporność na czynniki stresowe. Wprowadzenie tych izolatów do rośliny wymaga jednak wcześniejszego usunięcia dzikich endofitów z odmiany, która ma być



symbiotycznie modyfikowana. Proces eradykacji, przeprowadzany najczęściej przy pomocy fungicydów lub wysokiej temperatury, jest trudny i czasochłonny. Ważny jest to w produkcji materiału siewnego. Dzięki temu można zmniejszyć nakłady na ochronę chemiczną zwiększając bezpieczeństwo produkcji roślinnej dla środowiska i konsumentów, szczególnie w kontekście obligatoryjnego stosowania zasad integrowanej ochrony roślin obowiązujących profesjonalistów od 1 stycznia 2014 roku.

W tym kontekście, podjęcie przez Doktoranta badań nad oceną nasion traw w Polsce, należy uznać za bardzo trafne i uzasadnione. Zwłaszcza że występujące na nich symbiotyczne endofity odgrywają wielką rolę w rozwoju traw poprzez wpływ na fotosyntezę i inne procesy zwiększając biofortyfikację roślin dzięki czemu są one bardziej odporne na agrofagi. Jednak naturalnie występujące endofity mogą przez swoje metabolity pogarszać jakość trawy i wpływać negatywnie na zjadające je zwierzęta prowadząc do zatruc. Dlatego często prowadzi się ich usunięcie wykorzystując różne metody, często o niskiej skuteczności i wprowadza inne. Wykorzystanie do tego aplikacji plazmy niskotemperaturowej przy pomocy różnych plazmotronów oraz ocena procesów fizjologicznych zachodzących w tkankach ogrywa ogromną rolę zarówno dla badacza jak i praktyka. Dlatego też uzyskane wyniki posiadają nie tylko wysoką wartość naukową, ale także użyteczną.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 175 stron tekstu przeplatane tabelami (35) oraz rysunkami (36, w tym 10 fotografii). Autor podzielił pracę na 10 ponumerowanych rozdziałów: Wprowadzenie, Przegląd literatury, Hipoteza badawcza, cel i zakres badań, Metodyka badań, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura, Streszczenie w języku angielskim oraz Streszczenie w języku polskim.



Uwagi szczegółowe

Poniżej zamieszczam główne sugestie i rekomendacje, aby lepiej usystematyzować uwagi:

1. Temat pracy. Wprowadzenie.

Temat pracy jest dobrze zdefiniowany i zgodny z przedstawionymi wynikami badań.

Rozdział Wprowadzenie wprowadza w tematykę badań, wskazuje na istotność problemu oraz identyfikuje lukę w literaturze. Autor pokazał rolę symbiotycznych endofitów, zwłaszcza tych tzw. nowych oraz zwrócił uwagę na potrzebę wcześniejszego usunięcia toksycznych endosymbiontów do czego może być przydatna plazma niskotemperaturowa (CAP), jako skuteczna alternatywa dla fungicydów.

2. Przegląd literatury

W rozdziale tym liczącym 22 strony, podzielonym na podrozdziały, Autor w obszerny sposób przedstawił najważniejsze wyzwania w produkcji żywności, omówił znaczenie traw, zwłaszcza życicy trwałej uwzględniając problemy związane z jej uprawą a także bardzo szczegółowo omówił zagadnienie pozytywnej roli endofitów powodujących zwiększoną odporność na patogeny, owady i nicienie, poprawiających tolerancję na suszę i wpływających na procesy biochemiczne. Zwrócił też uwagę na problemy z obecnością niektórych endofitów a także sposoby ich eradykacji i zastąpienia innymi z uwzględnieniem szerokiego zastosowania aplikacji plazmy niskotemperaturowej jako elementu fizycznej metody ochrony roślin. Należy podkreślić bardzo trafny i umiejętny dobór pozycji bibliograficznych do skonstruowania tego rozdziału. Znaczna część cytowanych pozycji pochodzi z ostatnich lat. Dzięki temu rozdział posiada wysoką wartość merytoryczną.



Sugestie: omawiając działanie plazmy niskotemperaturowej wykorzystującej najczęściej powietrze jako gaz roboczy interesujące może być rozważenie wykorzystania w badaniach innych gazów roboczych np. argonu, choć może być związane z dużymi kosztami.

Sugerowałbym bardziej dokładne omówienie roli reakcji redox w procesach biochemicznych w komórkach grzyba i związaną z tym rolą reaktywnych form tlenu i azotu (RONS).

3. Hipoteza badawcza, cel i zakres badań.

Sformułowano hipotezę roboczą, że dzięki działaniu przeciwbakteryjnemu i przeciwgrzybiczemu plazmy niskotemperaturowej wzrost endofitu *Epichloë festucae* może zostać znacząco zahamowany po zastosowaniu plazmy DBD (Dielectric Barrier Discharge) oraz GA (Gliding Arch).

Rozwijając główny cel badawczy podano szczegółowe cele, które zostały sformułowane w celu osiągnięcia celu głównego:

- (i) zebranie genotypów traw i izolatów grzybów endofitycznych zasiedlających różne genotypy dostępne komercyjnie, jak również ekotypy i scharakteryzowanie genotypów zasiedlonych przez endofity na podstawie wybranych parametrów,
- (ii) identyfikacja zebranych izolatów endofitów i określenie ich zróżnicowania genetycznego,
- (iii) określenie granicznych i optymalnych parametrów pracy generatora plazmy DBD i plazmy GA zapewniających najwyższy poziom eradykacji endofitów,
- (iv) porównanie efektywności plazmy DBD i plazmy GA,
- (v) określenie wpływu zimnej plazmy atmosferycznej (plazmy DBD i GA) na kontaminację nasion grzybami mikroskopowymi,



- (vi) określenie wpływu plazmy DBD i GA na aktywność wybranych enzymów białek związanych z patogenezą (PRP),
- (vii) zaproponowanie wytycznych dla prototypu projektu technologii eradykacji endofitów przy użyciu zimnej plazmy.

Sugestie: podczas przygotowania pracy do druku zaleca się uzupełnienie o bardziej bezpośrednie sformułowanie hipotezy alternatywnej wobec hipotezy zerowej.

4. Metodyka badań.

Rozdział ten liczący 18 stron, podzielony na 9 podrozdziałów, zawiera szczegółowy opis wykorzystanego materiału badawczego oraz zastosowanych metod badawczych, w tym statystycznych. Autor omówił sposoby wykrywania endofitów różnymi metodami, także z wykorzystaniem ich identyfikacji molekularnej, metodą Real-Time PCR oraz testy molekularne z wykorzystaniem analizy sekwencji regionu ITS dotyczące różnorodności genetycznej izolatów endofitów pobierając fragmenty pochw liściowych oraz przeprowadził charakterystykę genotypów kolekcji traw w warunkach doniczkowych oceniając wybrane parametry cech morfologicznych oparte na protokołach UPOV i CPVO i wymaganiach hodowców. Dokładnie omówił podając schematy budowy generatorów plazmy DBD i GA, łącznie z panelem sterującym umożliwiającym aplikację plazmy niskotemperaturowej przy odpowiedniej mocy i szybkości. Urządzenie umożliwiało precyzyjny dobór dawki energii potrzebnej do przetwarzania materiału biologicznego. Nasiona życicy były traktowane 5 poziomami mocy przy użyciu plazmotromu DBD oraz 1 przy użyciu plazmotronu GA. Użyto 3 czasy ekspozycji i co najmniej 100 nasion w kombinacji. Plazmą traktowano również wcześniej odkażone siewki i oceniano obecność endofitu. Traktowano również plazmą zanieczyszczone przez grzyby nasiona i umieszczano na szalkach Petriego na agarze PDA. Wybrane próbki nasion życicy traktowane plazmą wysiewano do doniczek z torfem by po 30 dniach zebrać materiał roślinny



i poddać ekstrakcji i analizie białek związanych z patogenezą. Analiza wariancji i inne metody statystyczne są właściwie dobrane. Zostały one prawidłowo dobrane do zakresu przeprowadzonych badań i nie budzą zastrzeżeń. Autor opisał je starannie i precyzyjnie. Rozdział posiada bardzo rozbudowaną strukturę podrozdziałów, co z jednej strony porządkuje doskonale informacje w nich zawarte z drugiej jednak, nieco utrudnia czytelnikowi śledzenie wątków badawczych. Całość potwierdza bardzo dobre przygotowanie Doktoranta do prowadzenia prac badawczych oraz solidny warsztat metodyczny. Niedociągnięcia, jak np. brak umieszczenia metody statystycznej w spisie literatury (str. 51) nie zmniejszają wartości tego rozdziału.

5. Wyniki

Rozdział ten liczący 86 stron zawiera bogatą dokumentację złożoną z tabel, wykresów i fotografii. Uzyskane wyniki wykazały, że plazma DBD istotnie hamowała wzrost *Epichloë festucae* var. *lolii* w badanych genotypach życicy trwałej. Kolonizacja zebranej kolekcji genotypów życicy trwałej przez endofita wyniosła średnio 36,2%, a kolonizacja kolekcji genotypów kostrzewy łąkowej 29,6%. Siła asocjacji endofit/życica trwała w kolekcji genotypów, wyrażona jako gęstość grzybni w pochwach liściowych wahała się od 4,8 do 20,8 strzępek na 1 mm szerokości pochw liściowych. Analiza molekularna metodą Real-Time PCR potwierdziła obecność *E. festucae* var. *lolii* w 10 genotypach życicy trwałej. Na podstawie testów molekularnych dwa wyizolowane izolaty endofita nie wykazały zmienności w sekwencji ITS i były identyczne z niektórymi sekwencjami grzyba zdeponowanymi w Banku Genów NCBI, a z innymi sekwencjami wykazywały podobieństwo powyżej 99%.

Należy podkreślić, że w kolekcji genotypów życicy trwałej zasiedlonych przez endofita, siedem wybranych genotypów wykazało stosunkowo wysoką wartość



użytkową, określoną na podstawie wybranych cech i może stanowić materiał wyjściowy w hodowli nowych odmian.

Kolejne uzyskane wyniki wskazują, że genotyp życicy trwałej, poziom mocy (od 200 W do 600 W) plazmy DBD oraz czas ekspozycji nasion (10 s, 20 s i 30 s) na działanie plazmy miały istotny wpływ na zagęszczenie grzybni endofita w roślinach. Dla większości genotypów, zwiększenie mocy znacząco zmniejszyło zawartość grzybni w roślinach. Czas ekspozycji plazmy miał jednak mniejszy wpływ. Podkreślić należy, że ogólną tendencją był spadek zawartości grzybni endofitów w roślinie wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na plazmę. Plazma DBD miała największy efekt hamujący na rozwój endofitów w roślinach w zakresie mocy 300 - 600 W. Genotyp życicy trwałej, poziom mocy (200-400 W) plazmy DBD oraz czas ekspozycji siewek (10 s, 20 s i 30 s) również miały istotny wpływ na zagęszczenie grzybni endofitów w roślinach.

Zwrócić uwagę należy, że genotyp miał największy wpływ na rozwój endofitów w roślinie. Poziom mocy i czas ekspozycji miały znacznie mniejszy wpływ na zagęszczenie grzybni. Zastosowanie plazmy GA (200 W) przez 10 s, 20 s i 30 s na nasiona życicy trwałej nie miało istotnego efektu hamującego rozwój symbionta w roślinie. W przypadku plazmy DBD jej aplikacja na nasiona życicy trwałej miało istotnie większy efekt hamujący na rozwój grzybni endofitów w roślinie niż zastosowanie plazmy DBD na 3-dniowe siewki lub zastosowanie plazmy GA na nasiona.

W kolejnym doświadczeniu wykazano, że procentowa redukcja kontaminacji nasion życicy trwałej grzybami mikroskopowymi po zastosowaniu plazmy DBD (300 W, 400 W, 500 W, przez 10 s, 20 s, 30 s) na nasiona była wysoka dla większości testowanych genotypów życicy trwałej, sięgając prawie 80%, chociaż w niektórych przypadkach zastosowanie plazmy stymulowało wzrost grzybów.



Ze względu na duże zróżnicowanie pomiędzy kombinacjami różnych poziomów mocy i czasów ekspozycji, niemożliwe jest określenie jednoznacznej zależności i wpływu każdego czynnika na kontaminację nasion grzybami.

Analizując procesy biochemiczne, uzyskane wyniki wskazują, że genotyp życicy trwałej i poziom mocy (200 - 400W) plazmy DBD miał istotnie największy wpływ na stymulację aktywności glukanaz, chitynaz i peroksydazy gwajakolowej w roślinach po zaaplikowaniu na nasiona. Czas ekspozycji nasion na działanie plazmy miał mniejszy wpływ na aktywność tych enzymów.

Pod koniec rozdziału Autor przedstawił bardzo interesujący projekt prototypu urządzenia do traktowania nasion plazmą DBD uwzględniając metodę termiczną lub wykorzystanie fungicydu co wybitnie podnosi aplikacyjny charakter pracy.

Wyniki zostały dobrze przedstawione, obejmując zarówno aspekty ilościowe, jak i jakościowe. Wyniki są logiczne i zgodne z oczekiwaniami.

Sugestie: Warto rozważyć zwiększenie czasu aplikacji plazmy na nasiona czy też wykorzystania innych gazów roboczych pomimo obaw związanych z ryzykiem fitotoksyczności.

Warto też zwrócić uwagę na proponowane fungicydy, zwłaszcza że corocznie ubywa dopuszczonych do stosowania substancji czynnych (np. polecany często tiuram).

6. Dyskusja

Wyniki niniejszych badań potwierdzają, że plazma niskotemperaturowa atmosferyczna (CAP) może skutecznie redukować liczebność grzybowych endofitów w nasionach życicy trwałej, przy czym efekt ten jest silnie zależny od zastosowanych parametrów ekspozycji oraz od genotypu rośliny. Zaobserwowane zmniejszenie liczby strzępek endofitu wskazuje, że CAP może stanowić obiecujące narzędzie w procesie eradykacji endofitów przed introdukcją nowych, nietoksycznych szczepów symbiotycznych.



Mechanizm działania CAP wobec mikroorganizmów grzybowych jest wieloczynnikowy i obejmuje przede wszystkim fizyczne oraz chemiczne uszkodzenia struktur komórkowych. Generowane w trakcie obróbki reaktywne formy tlenu i azotu (RONS) prowadzą do zaburzeń integralności ściany i błony komórkowej, deformacji komórek oraz wycieku składników cytoplazmatycznych, co skutkuje zahamowaniem wzrostu grzybni lub jej całkowitą inaktywacją. Mechanizmy te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi inaktywacji bakterii i grzybów przy użyciu plazmy typu DBD. Uzyskane w niniejszej pracy poziomy redukcji mikroorganizmów, sięgające do 75% w wybranych genotypach, są porównywalne z wynikami uzyskiwanymi w badaniach nad innymi gatunkami roślin, w tym pszenicą, bazylią czy gryką. W literaturze wykazano, że CAP może powodować redukcję obciążenia mikrobiologicznego w zakresie od 1 do 5 jednostek logarytmicznych, bez negatywnego wpływu na zdolność kiełkowania nasion ani kondycję siewek, co czyni tę technologię atrakcyjną alternatywą dla chemicznych metod dezynfekcji.

Jednocześnie należy podkreślić, że odpowiedź na obróbkę plazmą była zróżnicowana pomiędzy badanymi genotypami. W niektórych kombinacjach mocy i czasu ekspozycji obserwowano brak istotnej redukcji, a nawet wzrost liczby mikroorganizmów. Zjawisko to może być związane z działaniem subletalnych dawek CAP, które indukują łagodny stres oksydacyjny, aktywując mechanizmy kompensacyjne lub systemy antyoksydacyjne grzybów. Podobne efekty opisywano wcześniej w odniesieniu do innych mikroorganizmów poddawanych krótkotrwałej ekspozycji plazmą.

Uzyskane wyniki wskazują, że skuteczność CAP jako narzędzia eradykacji endofitów wymaga precyzyjnej optymalizacji parametrów obróbki, uwzględniającej specyfikę genotypową roślin. Pomimo tych ograniczeń, technologia CAP wykazuje duży potencjał aplikacyjny jako metoda przyjazna środowisku, umożliwiająca kontrolę



mikroorganizmów endofitycznych bez stosowania fungicydów. Dalsze badania powinny koncentrować się na określeniu progów subletalnych oraz długoterminowych skutków obróbki plazmą dla stabilności symbiozy roślina–endofit. Rozdział jest konfrontacją otrzymanych rezultatów z dostępną na ten temat literaturą przedmiotu. Napisany jest poprawnie z wykorzystaniem aktualnej i prawidłowo dobranej literatury. Zagadnienia podjęte w dyskusji doskonale korespondują ze sformułowanymi wcześniej celami, tworząc logiczną całość z pozostałymi rozdziałami. Potwierdza to umiejętność prawidłowej syntezy uzyskanych wyników będąc jednocześnie świadectwem dojrzałości badawczej Autora i syntetycznego prezentowania wyników wskazuje na ugruntowany warsztat badawczy.

7. Wnioski

Wnioski z pracy są istotnym elementem oceny całości badań, ponieważ stanowią podsumowanie głównych wyników i odpowiadają na pytania badawcze lub hipotezy postawione na początku. zawiera 14 wyodrębnionych akapitów. Stanowią one bardzo dobre podsumowanie rezultatów przeprowadzonych eksperymentów.

Sugestie: W związku z bardzo obszernymi badaniami wykonanymi przez Autora, rozdział ten jest bardzo obszerny Część akapitów, jednak, ma charakter wynikowy i utrudnia czytelnikowi klarowną ocenę. Dlatego też, sugeruję ich przeredagowanie (skrócenie, pogrupowanie) w trakcie przygotowywania pracy do opublikowania.

8. Literatura

Zamieszczona literatura przedmiotu stanowi bardzo bogatą listę, starannie dobranych 221 pozycji bibliograficznych oraz 15 pozycji danych internetowych. Znaczna większość wszystkich pozycji stanowią opracowania z ostatnich lat. Na podkreślenie i uznanie zasługuje również fakt wykorzystania przez Autora prawie wyłącznie prac angielskojęzycznych.

Sugestie: Pozycja Müller J.L. 2019 nie jest cytowana w tekście.

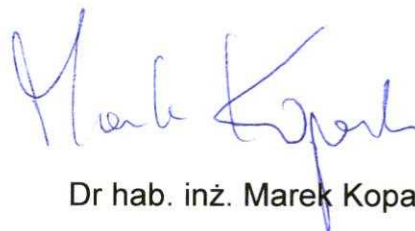


9. Streszczenie w języku angielskim

10. Streszczenie w języku polskim

11. Podsumowanie

Oceniając oryginalność pracy, jest to pierwsze badanie w celu określenia wpływu plazmy niskotemperaturowej DBD i GA na nasiona traw, grzyby endofityczne i procesy biochemiczne. Na szczególne podkreślenie i jednocześnie uznanie zasługuje bardzo wysoki poziom językowy i edytorski pracy. Błędy literowe czy brak spacji występują rzadko. Praca jest innowacyjna zarówno pod względem tematyki, jak i metodologii i posiada dodatkowo wyjątkową wartość aplikacyjną. Dysertacja przedstawiona przez Autora stanowi spójną i logiczną całość. Jest dobrze przygotowana, przedstawia wysoki poziom naukowy oraz wnosi istotny wkład w dział szeroko rozumianej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Spełnia również wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce stawiane kandydatom do stopnia doktora. Wniosuję, zatem do członków Szanownej Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy o podjęcie uchwały zawierającej opinię popierającą o nadanie mgr inż. Jean de Dieu Muhire stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, a jednocześnie wnoszę prośbę o wyróżnienie Go stosownym wyróżnieniem/nagrodą.



Dr hab. inż. Marek Kopacki

