

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Jean de Dieu Muhire
“Technologia eradykacji endofitów w produkcji traw modyfikowanych symbiotycznie”

Promotorzy rozprawy doktorskiej:

dr hab. inż. Dariusz Pańka, prof. uczelni

dr hab. inż. Jan Mućko, prof. uczelni

Politechnika Bydgoska

Tematyka oraz cel rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska przygotowana przez Pana mgra inż. Jean de Dieu Muhire porusza ważny i aktualny temat badawczy związany z interakcjami między trawami a endofitami grzybowymi oraz opracowaniem technologii umożliwiającej kontrolowane modyfikowanie tych relacji symbiotycznych. Badania koncentrują się na opracowaniu technologii eliminacji naturalnie występujących endofitów grzybowych z roślin i nasion traw, co umożliwia wprowadzenie wybranych, korzystnych szczepów endofitów.

Endofity grzybowe z rodzaju *Epichloë* tworzą symbiozę z wieloma gatunkami traw, w tym z ważnymi gospodarczo trawami pastewnymi, takimi jak życica trwała. Mikroorganizmy te mogą znacząco wpływać na fizjologię i ekologię roślin, zwiększając ich tolerancję na stresy abiotyczne (np. suszę), poprawiając odporność na patogeny i szkodniki oraz zwiększając trwałość roślin w warunkach stresowych. Jednak niektóre naturalne szczepy endofitów produkują alkaloidy toksyczne dla zwierząt gospodarskich, co powoduje konieczność zastępowania ich wybranymi, korzystnymi szczepami.

W związku z tym opracowanie skutecznych metod eliminacji niepożądanych endofitów z materiału roślinnego przy jednoczesnym zachowaniu żywotności nasion i zdrowotności roślin stanowi istotne wyzwanie naukowe i praktyczne. Rozprawa podejmuje ten problem poprzez

zastosowanie zimnej plazmy atmosferycznej (CAP – *Cold Atmospheric Plasma*) jako nowoczesnej, przyjaznej środowisku metody fizycznej eliminacji endofitów.

Technologia zimnej plazmy w ostatnich latach budzi rosnące zainteresowanie w naukach rolniczych i biologicznych ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz potencjalne zastosowania w zaprawianiu nasion, ochronie roślin i dekontaminacji mikrobiologicznej. Jej zastosowanie do selektywnego usuwania grzybów endofitycznych z tkanek roślin stanowi innowacyjny kierunek badań.

Tematyka rozprawy wpisuje się w aktualne światowe trendy zrównoważonego rolnictwa, nowoczesnych technologii produkcji roślinnej oraz ograniczania stosowania środków chemicznych. Przedstawione badania przyczyniają się do rozwoju nowego podejścia technologicznego wspierającego produkcję ulepszonych odmian traw zawierających korzystne mikroorganizmy symbiotyczne. Tym samym badania te w pełni mieszczą się w obszarze nauk rolniczych, w szczególności w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Należy podkreślić nowatorski charakter rozprawy, zwłaszcza w kontekście potrzeby opracowywania technologii przyjaznych środowisku oraz pogłębiania wiedzy o interakcjach roślina–mikroorganizm. Uzyskane wyniki mogą mieć zarówno znaczenie naukowe, jak i praktyczne, szczególnie w hodowli traw, produkcji nasiennej oraz nowoczesnym zarządzaniu użytkami zielonymi. Problematyka ta jest również zgodna z celami strategicznymi Unii Europejskiej dotyczącymi niskonakładowego rolnictwa. Pozytywnie oceniam zatem zarówno zasadność, jak i znaczenie tematyki podjętej przez Doktoranta w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej.

Struktura i ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Jean de Dieu Muhire została przygotowana w języku angielskim i przedstawia oryginalne badania eksperymentalne. Rozprawa doktorska prezentuje jasno sformułowane cele badawcze oraz posiada strukturę typową dla eksperymentalnych prac doktorskich. Dysertacja składa się z 10 głównych rozdziałów z licznymi podrozdziałami., liczy 175 stron, zawiera liczne rysunki i tabele, a do jej przygotowania Doktorant wykorzystał aż 219 wartościowych pozycji literatury i 15 stron internetowych. Struktura pracy jest logiczna i dobrze zorganizowana, co pozwala czytelnikowi śledzić koncepcję badań, metodykę, wyniki oraz końcowe wnioski. Rozprawa obejmuje następujące rozdziały główne: Wstęp; Przegląd

literatury; Hipotezy badawcze, cel i zakres badań; Metodyka badań; Wyniki; Dyskusja; Wnioski; Literatura oraz streszczenia w języku angielskim i polskim.

Wstęp oraz przegląd literatury przedstawiają kompleksowy przegląd obejmujący biologiczne aspekty symbiozy traw z endofitami, znaczenie ekologiczne i rolnicze endofitów oraz metody aktualnie wykorzystywane do ich wykrywania i eliminacji. Szczególną uwagę poświęcono rodzajowi *Epichloë*, który należy do jednych z najważniejszych grup endofitów traw. Naukowe podstawy podjętej tematyki wprowadzają czytelnika w problem interakcji traw z endofitami, rozpatrując interakcje w kontekście roślina–endofit. Jednocześnie Autor przedstawia podstawy naukowe badań oraz jasno formułuje problem badawczy podjęty w rozprawie doktorskiej.

Cele badawcze rozprawy zostały sformułowane jasno i logicznie. Głównym celem pracy było opracowanie i ocena technologii umożliwiającej skuteczną eliminację endofitów grzybowych z traw przy użyciu plazmy niskotemperaturowej, co pozwala na uzyskanie materiału roślinnego odpowiedniego do wprowadzenia wybranych, korzystnych mikroorganizmów symbiotycznych. Uzasadnienie badań, hipotezy, cele oraz główny zakres pracy zostały wyraźnie przedstawione w rozdziale 3 rozprawy doktorskiej.

Część metodyczna przedstawia szeroki zakres technik eksperymentalnych, w tym molekularne wykrywanie endofitów, ocenę skuteczności działania plazmy oraz analizy biochemiczne reakcji roślin. Autor zastosował zarówno klasyczne metody fitopatologiczne, jak i nowoczesne techniki molekularne, w tym izolację DNA, PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), sekwencjonowanie molekularne, testy mikrobiologiczne oraz analizy biochemiczne enzymów związanych z odpowiedzią na patogenezę, takich jak β -1,3-glukanaza, chitynaza oraz aktywność peroksydazy gwajakolowej. Na początku tego rozdziału scharakteryzowano materiał badawczy wykorzystany w pracy. Opisano również kondycjonowanie nasion i materiału roślinnego zimną plazmą atmosferyczną, w tym uwzględniono szczegółowy opis generatorów plazmy oraz określenie parametrów ich pracy dla zabiegów eliminacji endofitów, obejmujących zarówno nasiona, jak i siewki.

Kluczowe problemy badawcze zostały szczegółowo omówione w rozdziałach dotyczących wyników i dyskusji, gdzie autor przedstawia wyniki, a następnie interpretuje je w odniesieniu do ich potencjalnych implikacji praktycznych. Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej są jasno opisane i logicznie uporządkowane. Autor systematycznie przedstawia rezultaty badań eksperymentalnych, co pozwala czytelnikowi śledzić kolejne etapy badań oraz zrozumieć zależności między zastosowanymi zabiegami a uzyskanymi efektami.

Wyniki eksperymentalne dostarczają cennych informacji na temat skuteczności zastosowania zimnej plazmy atmosferycznej w eliminacji endofitów grzybowych z traw przy jednoczesnym zachowaniu żywotności materiału roślinnego. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane parametry zabiegu mają istotny wpływ zarówno na poziom eliminacji endofitów, jak i na reakcje fizjologiczne traktowanych roślin. Rezultaty te stanowią ważną podstawę do dalszego rozwoju rozwiązań technologicznych umożliwiających produkcję traw modyfikowanych symbiotycznie.

Autor ocenia również wpływ zastosowanych zabiegów na reakcje fizjologiczne i biochemiczne roślin. W szczególności analiza enzymów związanych z odpowiedzią na patogenezę oraz innych wskaźników biochemicznych pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy obronne roślin aktywowane po zastosowaniu plazmy. Tego typu analizy znacząco zwiększają wartość naukową uzyskanych wyników, ponieważ dostarczają informacji nie tylko o skuteczności eliminacji endofitów, ale także o potencjalnych konsekwencjach fizjologicznych zastosowanej technologii.

Rozdział Dyskusja pokazuje, że Doktorant potrafi interpretować uzyskane wyniki w sposób krytyczny i naukowo uzasadniony. Autor porównuje swoje wyniki z danymi przedstawionymi we wcześniejszych badaniach oraz omawia możliwe wyjaśnienia obserwowanych zjawisk. Dyskusja jest dobrze poparta odpowiednią literaturą naukową i wyraźnie wskazuje, że Doktorant posiada dobrą znajomość szerszego kontekstu naukowego prowadzonych badań.

Ogólnie rzecz biorąc, wyniki uzyskane w rozprawie w istotny sposób przyczyniają się do rozwoju wiedzy dotyczącej interakcji roślina-endofit oraz innowacyjnych metod manipulowania tymi relacjami symbiotycznymi. Przedstawione wyniki mogą mieć praktyczne znaczenie dla programów hodowli traw, technologii nasiennej oraz nowoczesnego zarządzania użytkami zielonymi.

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej

W ocenie recenzenta, do najważniejszych osiągnięć naukowych rozprawy doktorskiej należą:

- Opracowanie i ocena innowacyjnego podejścia do eliminacji endofitów grzybowych z traw z wykorzystaniem technologii zimnej plazmy atmosferycznej.

- Identyfikacja i charakterystyka endofitów grzybowych kolonizujących rośliny traw oraz ocena ich występowania w badanym materiale roślinnym.
- Określenie skutecznych parametrów zabiegu zimnej plazmy atmosferycznej umożliwiających redukcję lub eliminację grzybów endofitycznych przy jednoczesnym zachowaniu żywotności nasion oraz aktywności fizjologicznej roślin.
- Ocena reakcji biochemicznych roślin poddanych działaniu plazmy, w tym analiza enzymów związanych z odpowiedzią na patogenezę, powiązanych z mechanizmami obronnymi roślin, wykazująca najsilniejszy efekt stymulacji aktywności glukanaz, chitynaz oraz peroksydazy gwajakolowej w roślinach po kondycjonowaniu nasion.
- Integracja klasycznych metod fitopatologicznych i mikrobiologicznych z nowoczesnymi technikami molekularnymi, co umożliwiło kompleksową ocenę interakcji roślin-mikroorganizm.
- Zaproponowanie koncepcji technologicznej umożliwiającej produkcję traw modyfikowanych symbiotycznie, zawierających wybrane, korzystne szczepy endofitów.

Uzyskane wyniki w istotny sposób poszerzają aktualną wiedzę na temat możliwości manipulowania symbiozą roślina-endofit z wykorzystaniem innowacyjnych technologii fizycznych i mogą stanowić podstawę do dalszych badań w tym obszarze.

Uwagi i sugestie do rozprawy doktorskiej

Pomimo wysokiej wartości naukowej rozprawy, kilka aspektów mogłoby zostać doprecyzowanych lub omówionych bardziej szczegółowo.

Po pierwsze, wskazane byłoby szersze omówienie potencjalnej skalowalności zaproponowanej technologii opartej na metodzie zimnej plazmy atmosferycznej w komercyjnych systemach produkcji nasiennej. Praktyczne wdrożenie tego typu technologii często wymaga uwzględnienia aspektów technicznych i ekonomicznych wykraczających poza badania prowadzone w skali laboratoryjnej.

Po drugie, chociaż rozprawa doktorska przedstawia szczegółowe analizy reakcji fizjologicznych roślin na działanie plazmy, warto byłoby szerzej omówić długoterminową stabilność materiału roślinnego pozbawionego endofitów. W szczególności interesujące byłoby rozważenie możliwości ponownej kolonizacji roślin przez mikroorganizmy środowiskowe po przeprowadzeniu zabiegu.

Kolejną kwestią wartą omówienia są ekologiczne konsekwencje manipulowania naturalnymi zbiorowiskami endofitów w trawach. Choć wprowadzenie korzystnych endofitów może przynosić wyraźne korzyści w produkcji roślinnej, należy również w większym stopniu uwzględnić potencjalne interakcje ekologiczne w obrębie mikrobiomu roślin.

Uwagi te nie umniejszają jednak ogólnej, pozytywnej oceny rozprawy.

Pytania do Doktoranta

W związku z przedstawionymi badaniami chciałabym zadać Doktorantowi następujące pytania:

- Proszę przypomnieć i podsumować, jakie markery molekularne zostały wykorzystane do wykrywania i identyfikacji endofitów grzybowych oraz jak skuteczne okazały się w rozróżnianiu poszczególnych gatunków *Epichloë*?
- Czy Doktorant zaobserwował jakiegokolwiek zmiany w składzie innych mikroorganizmów związanych z tkankami roślin po zastosowaniu plazmy? Czy eliminacja endofitów grzybowych może wpływać na strukturę pozostałego mikrobiomu roślin? Czy dostępne są badania w tym zakresie?
- Jakie są najbardziej prawdopodobne mechanizmy mikrobiologiczne odpowiedzialne za eliminację grzybów endofitycznych podczas działania zimnej plazmy atmosferycznej?
- W jaki sposób eliminacja naturalnie występujących endofitów może wpływać na odporność roślin na stresy środowiskowe, jeśli dobroczynne szczepy nie zostaną ponownie wprowadzone?
- Czy możliwe jest ponowne zasiedlenie roślin pozbawionych endofitów przez szczepy grzybów pochodzące ze środowiska podczas dalszej uprawy? Jeśli tak, jakie strategie mogłyby zostać zastosowane w celu zapobiegania takiej rekolonizacji?
- Czy zdaniem Doktoranta technologia plazmowa mogłaby być również zastosowana do selektywnego manipulowania innymi mikroorganizmami związanymi z roślinami, takimi jak endofity bakteryjne?

Podsumowanie i wnioski

Rozprawa doktorska pt. „Technologia eradykacji endofitów w produkcji traw modyfikowanych symbiotycznie”, przygotowana przez mgr inż. Jean de Dieu Muhire, podejmuje ważny i istotny naukowo problem badawczy związany z interakcjami roślin-

mikroorganizm oraz rozwojem innowacyjnych technologii w produkcji roślinnej. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej przyczyniają się do lepszego zrozumienia możliwości manipulowania symbiozą traw z endofitami oraz wprowadzają nowe podejścia technologiczne do eliminacji naturalnie występujących endofitów grzybowych.

Rozprawa doktorska dowodzi, że Doktorant, mgr inż. Jean de Dieu Muhire, posiada umiejętność planowania i prowadzenia zaawansowanych badań naukowych, stosowania nowoczesnych technik analitycznych i molekularnych oraz prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników w kontekście istniejącej wiedzy naukowej.

Rozprawa opisuje aktualne i bardzo nowoczesne zagadnienia. Praca jest dobrze napisana i udokumentowana. Tekst został przygotowany w sposób przejrzysty i zwięzły. Wnioski potwierdzają, że główne cele rozprawy zostały osiągnięte. Eksperymenty były dobrze zorganizowane, a metody i techniki pomiarowe zostały zastosowane prawidłowo. Wyniki zostały właściwie opracowane, a ich interpretacja stoi na dobrym poziomie naukowym.

Tematyka pracy ma duże znaczenie nie tylko dla nauki, ale również dla licznych zastosowań praktycznych, szczególnie w sektorach rolnictwa i ogrodnictwa. Zarówno środowisko naukowe, jak i różne gałęzie przemysłu mogą wykorzystać wyniki rozprawy w dalszych badaniach i wdrożeniach, co zostało podkreślone przez Doktoranta w części dotyczącej perspektyw dalszych badań.

Rozprawa doktorska mgra inż. Jean de Dieu Muhire obejmuje interesujący i bardzo aktualny temat, zawiera oryginalne i wartościowe wyniki naukowe oraz dobrze wpisuje się w nadchodzącą erę rozwoju projektów interdyscyplinarnych. Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym rekomenduję Radzie Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich dopuszczenie mgra inż. Jean de Dieu Muhire do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Magdalena Frąc, czł. koresp. PAN

Lublin, 10.03.2026