

**РЕЦЕНЗИЯ**

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен "доктор" по: област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина”, професионално направление 6.1. „Растениевъдство”, научната специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения”

**Автор на дисертационния труд:** Станислав Дечков Божимиров, докторант задочна форма на обучение при Земеделски институт - Шумен.

**Тема на дисертационния труд:** „ВЛИЯНИЕ НА ГЕНОТИПА ВЪРХУ РАЗВИТИЕТО И РЕПРОДУКЦИЯТА НА СТЕВИЯ В УСЛОВИЯТА НА БЪЛГАРИЯ “

**Рецензент:** Доц. д-р Станимир Божидаров Енчев, Земеделски институт, Шумен. Област на висше образование: Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.1. Растениевъдство, научната специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения“.

Рецензията е изготвена съгласно Заповед № РД 05-167/07.07.2025 г на Председателя на ССА.

**I. Кратко представяне на кандидата:**

Станислав Дечков Божимиров е роден на 04.08.1983 г в гр. Шумен. Висшето си образование завършва в Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2006 г. - степен ОКС бакалавър, специалност Молекулярна биология. През 2008 г. отново в СУ „Св. Климент Охридски“ с отличен успех от следването придобива квалификационна степен „Магистър“ по специалността „Генетика“.

През периода 2006-2007 г е работил като специалист биолог в Института по Генетика, БАН. От 2010 до 2011 г. е молекулярен биолог в Земеделски институт - Шумен. Понастоящем работи в сферата на търговията с лекарства.

Владее на добро ниво писмено и говоримо английски език. Притежава много добри компютърни умения в ползването на Microsoft Office, Word, Excel, PowerPoint.

Зачислен е в докторантура - задочна форма на обучение със срок на обучение

01.02.2018 г. до 01.02.2022 г. със заповед № НП-08-07/25.01.2018 г. на Председателя на ССА. Отчислен е с право на защита от 02.02.2018 г. със заповед № РД 05-68/27.04.2022 г.

## **II. Актуалност на проблема:**

Проблемът, свързан с необходимостта от намаляване на прекалената консумация на захари и заместването им с изкуствени и естествени подсладители не е нов в страната, тъй като България е сред водещите страни по консумация на бяла захар.

В България растението стевия беше обект на изследване през 80-те години на миналия век в бившия Институт по захарно цвекло, който сега е в състава на Земеделски институт – Шумен. В резултат на тези изследвания бяха разработени хранителни среди за микроразмножаване и вкореняване, методи за вкореняване при оранжерийни условия и основни аспекти от агротехниката за вегетативно размножаване на стевията. Поради повишеният интерес към тази култура в последните години се разработи интензивна селекционна програма за обогатяване на генофонда и популяризиране на стевията. В резултат на това през 2016 е признат, а през 2017 г. е патентован и единствен български сорт стевия – „Стела“.

Засилването на интереса към естествените подсладители, което се допълва и от значителните лечебни свойства, които притежава южноамериканското растение стевия (*Stevia rebaudiana* B.) предполага засилване на интереса от страна на потребителите от една страна и от друга – задълбочаване на изследванията и създаване на модерни механизирани системи за производство.

Ниската кълняемост на семената от стевия затруднява нейното култивиране. Семенното размножаване има съществен недостатък – потомството от семена е генетично разнородно и получените растения се различават по отношение на хабитус и състав на стевииозида. Това е основната причина да се предпочита вегетативното размножаване, при което се запазва генотипа на изходните растения. Вегетативното размножаване обаче е ограничено от ниският брой индивиди, получени от едно растение.

Многообразие на генетичните форми сред поколението, получено от семена на стевията, ниската кълняемост на семената, както и вегетативно размножаване чрез резници, чиито лимитации са получаването на малък брой индивиди, налага използването на някои от най-съвременните методи в растителните биотехнологии.

През последните години методът на микроразмножаване се използва за получаване на голям брой индивиди с ценни качества от едно изходно растение. Алтернативен ефективен метод е размножаването и поддържането му чрез *in vitro* методи, при които се запазва и изходния генотип.

Успешното микроразмножаване зависи от редица фактори, като вид на изходния експлант, концентрацията и комбинацията на растежните регулатори. В резултат от тази ускорена форма на размножаване могат да се получат здрави растения, необходими за различни селекционни и производствени цели, а получената биомаса да бъде ценен източник за хранителната, фармацевтичната и козметична индустрии у нас.

Представената ми за рецензиране дисертация е посветена на изясняване и решаване на тези актуални стратегически проблеми и задачи на съвременното земеделие.

### **III. Цел, задачи, хипотези и методи на изследване.**

Целта е формулирана правилно, конкретно и точно — е проучване на влиянието на генотипа върху развитието и репродукцията на стевия в условията на България.

Във връзка с изпълнението на целта са разработени следните задачи:

- Оптимизиране на методите за репродукция със семена в условията на България за обогатяване на генофонда.
- Установяване на параметрите на ефективно вкореняване, адаптиране и развитие при външни условия
- Влияние на генотипа, начина на размножаване и условията върху морфологичните и стопански качества

Проучването е проведено в Земеделски институт-Шумен през периода 2018-2021 г., като в дисертацията са включени и по-ранни проучвания за кълняемостта *in vitro* и *in vivo* в периода 2009-2010 г. В изследването е използван селекционен материал от генофонда на Земеделски Институт - Шумен. Източниците са с произход от Япония и Америка. След извършени индивидуален, фамилен и клонов отбор и адаптация към нашите условия, са формирани елитни клонове, както и произходи - продукт на соматклонално и гаметоклонално вариране в култура *in vitro* на меристеми, зародиши, семена.

За постигането на целта и задачите са проведени опити в лабораторни, вегетационни и полски условия:

### **Лабораторни условия**

В Лабораторията по тъканни култури по разработени методики са изолирани меристеми, зародиши и семена

В лабораторията по Семезнание са проведени изпитванията за лабораторна кълняемост и е измерена масата на семената и прорастъците.

### **Вегетационни условия**

В адаптационни помещения с контролирана температура се провеждат изследванията по кълняемост на семената; адаптиране на вкоренените *in vitro* регенеранти към външни условия; вкореняването на резници от коренища и млади растения и пикирането и отглеждането до годен за засаждане при полски условия разсад.

### **Полски условия**

Проучванията са проведени в сравнителни опити за оценка по морфологични и стопански качества на коренища и разсад от елитни клонове, и в селекционни питомници за размножение и оценка на генофонда от клонове и популации. През вегетацията, в периода от разсаждането на полето до прибирането се извършват биометрични измервания и анализи. Определено е съдържанието на сладки вещества.

## **IV. Онагледеност и представяне на получените резултати**

Представеният за рецензиране дисертационен труд е с обем 142 страници в т. ч. 34 таблици, 251 литературни източника - 47 на кирилица и 204 на латиница. Той е добре балансиран и оформен, като обхваща всички раздели.

Литературният обзор с изчерпателен. Написан на 53 страници, като включва 9 подраздела: Произход разпространение и значение; систематика, морфологични особености; биологични особености, химичен състав, отглеждане и размножаване, агротехника, селекция и подраздел болести.

Математическата обработка на данните от лабораторните проучвания и биометрични анализи са обработени с вариационен анализ, а показателите за продуктивност и стопански качества обработени с дисперсионен анализ.

## **V. Обсъждане и оценка на резултати**

Получените резултати са оформени в 3 основни направления: Оптимизиране на методите за репродукция със семена за обогатяване на генофонда; Установяване на параметрите за ефективно вкореняване, адаптиране и развитие при външни условия;

Оценка на морфологични признаци и стопански качества на стевия в зависимост от генотипа, начина на размножаване и условията на средата.

Въз основа на проведените изследвания, статистическа обработка и компетентното обсъждане на резултатите, докторантът формулира 10 достоверни извода. Те са подредени в логическа последователност, обобщавайки получените резултати от проведените опити.

1. С промените на агроклиматичните условия на късна есен и липса на ранни застудявания се увеличава възможността за получаване на жизнени семена в условията на България.
2. Установена е подходяща хранителна среда за *in vitro* покълване на семена и е оптимизирана методика за стерилизация на семената за да се предотврати развитието на гъбни инфекции. Успешна стерилизация на семената, предхождаща *in vitro* култивирането е постигната след обработването им с 0.04% HgCl<sub>2</sub> и 0.1% Tween-20 за 90 минути с последващо трикратно промиване със стерилна дестилирана вода, към която е добавян 0.5 ml/l Цитросепт (15 минути всяко).
3. Установени са оптимални условия за *in vivo* покълване на семена. Масово поникване на семената от стевия ( $77 \pm 4.6\%$ ) се постига върху почвен субстрат смес от торф, пясък и перлит в съотношение 4:1:1, в термостатно помещение с осветление за 16 часа на ден и температура между 18-20 °C.
4. Установена е положителна корелация между лабораторната кълняемост и на поникналите растения в почвена смеска ( $r = 0.678$ ), което прави лабораторната кълняемост достоверен параметър за оценка на жизнеността на семенните потомства за стевията при реални условия.
5. Кълняемостта на семената засадени след една година съхранение е значително по-малка, както от лабораторно установената кълняемост, така и от полската. Разглеждайки резултатите на всеки от произходите се отчита влиянието на генотипа. 20% от тях нямат никаква кълняемост след съхранение от една година, а други 20% имат по-голяма кълняемост на седми ден след съхранение в сравнение с кълняемостта им преди съхранение.
6. За най-успешно вкореняване на растенията от резници, те трябва да бъдат заложени максимално рано през годината. Отклонение беше наблюдавано при произходите – 7E, 9E и A10. Това потвърждава влиянието на генотипа за вкореняването на растенията.
7. Размножаването чрез коренища води до натрупване на почвени патогени през годините и увеличава случаите на листни заболявания. Това налага редуване на

размножаване чрез коренища, *in vitro* и *in vivo* размножаване за производството на елитни разсади. Най-ефективната схема за практическо прилагане на разсад е чрез засяване на семената при контролирани условия през януари-февруари, отглеждане на покълнали и стабилизиращи растения през април-май, засаждане през юни-юли и прибиране на коренищата през октомври, които след съхранение се реализират в следващия период.

8. Средно около 15% от засажените коренища отпадат по време на растежният сезон и не се достига до прибиране на листа за сушене и съхранение на коренищата за другата година. По време на зимното съхранение и преди пролетно изнасяне на коренищата, поради гниене и липсата на жизнеспособни стъбла се губят средно 26%. Това може да се дължи на натрупването на почвени патогени през годините и увеличаването на заболяванията по растенията, което да води до отпадането на растения.

9. Установява се, че по отношение на броя стъбла и височината на стъблата се наблюдават разлики в зависимост от датите на реколтиране на растенията получени от коренища, в зависимост от периода на използването им. Но по отношение на показателя сухи листа, разлика в показателите за различните дати на реколтиране не се наблюдава. Наблюдава се увеличаване на добива на сухи листа от растения получени от многогодишни коренища (средно 84.6 g) в сравнение с двугодишни (средно 76.8 g), а най-нисък добив на сухи листа имат растенията получени от едногодишни коренища (средно 74.6 g).

10. Използването на репродукция със семена разширява възможностите за внедряване в практиката на производството на стевия в условията на България. При повечето от произходите получени от семена съотношението между стевизид и ребаудизид е по-малко от 2:1, което е показател за измерване на сладостта на екстракта от стевия и увеличеното количество на ребаудизиди е показател за намаляването до елиминирането на горчивият послевкус на екстракта. За нуждите на селекцията перспективни остават методите на *in vitro* микроразмножаване и от резници за запазване на изходния генотип.

## **VI. Приноси на дисертационния труд.**

Формулираните от докторанта приноси кореспондират напълно с получените от експерименталната дейности и резултати. Дефинирани са общо 5 научни и 6 научно приложни приноси:

### **Научни приноси**

1. За първи път в България е доказана възможността за използване на репродукция чрез семена за селекцията и практиката.
2. Установени са различни методи за прибиране на узрелите семена в зависимост от това дали ще се използват за експериментална или производствена дейност, за да се получат семена с висока кълняемост.
3. Разработена е подходяща хранителна среда за *in vitro* покълване на семена от *Stevia rebaudiana* Bertoni. Оптимизирана е методика за стерилизация на семената за да се предотврати развитието на гъбни инфекции.
4. Установена е оптимална почвена смеска и оптимални условия за *in vivo* покълване на семена от *Stevia rebaudiana* Bertoni.
5. Направени са изследвания върху лабораторна и полска кълняемост, кълняема енергия и кълняемост, включително и влиянието на периода на съхранение на семената от стевия.

#### **Научно–приложни приноси:**

1. Установен е оптималния период от годината за залагане на резници за вкореняване на растенията.
2. Направена е оценка на биометрични и продуктивни показатели на адаптиран разсад от регенеранти *in vitro* и от резници от коренища.
3. Установено е влиянието на срока за реколтиране на растенията върху добива на суха маса и получаване на жизнени семена.
4. Разработена е ефективна методика за производство на елитни разсади чрез задължително редуване на размножаване чрез коренища, *in vitro* и *in vivo* размножаване.
5. Установява се, че прилагането на размножителни схеми не влияе на устойчивостта на фенотипа при поддържане на сорта.
6. Използването на репродукция със семена разширява възможностите за внедряване в практиката на производството на стевия в условията на България. За нуждите на селекцията перспективни остават методите на *in vitro* микроразмножаване и от резници за запазване на изходния генотип.

#### **VII. Критични бележки и въпроси.**

При част от получените резултати липсва задълбочен анализ. Подходящо би било, част от изнесените резултати да бъдат презентирани чрез графики. В текста се забелязват

граматически грешки, несъответствия и непълнота в използваните термини, пропуски в цитираната литература.

### **VIII. Публикувани статии и цитирания.**

Основните резултати от дисертационният труд са публикувани в три научни труда - два в списание Растениевъдни науки и един в списание Scientific Papers. Series B, Horticulture. Във всички статии докторантът е водещ автор. По този начин личният му принос е ясно определен. Публикациите са добре оформени и имат необходимата научна стойност.

### **Оценка на автореферата**

Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд. Написан е на 41 страници. Съдържа 23 таблици, 1 фигура, 8 снимки и резюме на английски език.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Въз основа на научените и приложените, от докторанта, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане в Селскостопанска академия, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Станислав Дечков Божимиров образователната и научна степен "Доктор" по научната специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения“.

10.08.2025 г.

Гр. Шумен

РЕЦЕНЗЕНТ: 

(доц. д-р Станислав Енчев)

# REVIEW

**On a dissertation for acquiring the educational and scientific degree “Doctor” in the field of higher education 6. “Agricultural sciences and veterinary medicine”, professional field 6.1 “Plant breeding”, specialty “Selection and seed production of cultivated plants”**

**Author of the dissertation:** STANISLAV DECHKOV BOZHIMIROV, part-time doctoral student at Agricultural Institute - Shumen.

**Topic of the dissertation:** "Influence of Genotype on The Development and Reproduction of Stevia in Bulgarian Conditions."

**Reviewer:** Assoc. Prof. Dr. Stanimir Bozhidarov Enchev, Agricultural Institute - Shumen. Field of higher education: Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional field 6.1. Plant Breeding, scientific specialty "Selection and seed production of cultivated plants"

The review was prepared in accordance with Order No. RD 05-167/07.07.2025 of the Chairman of Agricultural Academy - Sofia.

## I. Short description of the candidate

Stanislav Dechkov Bozhimirov was born on 04.08.1983 in Shumen, Bulgaria. He graduated from Sofia University "St. Kliment Ohridski" in 2006 - Bachelor's degree, specialty Molecular Biology. In 2008, he acquired a qualification degree "Masters" in the specialty "Genetics" at Sofia University "St. Kliment Ohridski" with excellent results from his studies.

Between 2006 and 2007, he worked as a specialist biologist at the Institute of Genetics, Bulgarian Academy of Sciences. From 2010 to 2011, he was a molecular biologist at the Agricultural Institute - Shumen. He currently works in the drug trade field.

He has a good level of written and spoken English. He possesses good computer skills in using Microsoft Office, Word, Excel, PowerPoint.

He was enrolled in doctoral studies - part-time form of study for the period from 01.02.2018 to 01.02.2022 with Order No. NP-08-07/25.01.2018 of the Chairman of Agricultural Academy - Sofia. He was enrolled with the right to defend his thesis from 02.02.2018 with Order No. RD 05-68/27.04.2022.

## II. Subject relevancy

The problem related to the need to reduce excessive sugar consumption and replace it with artificial and natural sweeteners is not new in the country, as Bulgaria is among the leading countries in white sugar consumption.

In Bulgaria, Stevia was the subject of research in the 1980s at the former Sugar Beet Institute, which is now part of the Agricultural Institute - Shumen. As a result of this research, nutrient media for micropropagation and rooting, methods for rooting in greenhouse conditions and basic aspects of agrotechnics for vegetative propagation of stevia were developed. Due to the increased interest in this crop in recent years, an intensive selection program has been developed to enrich the gene

pool and popularize stevia. As a result, in 2016, the only Bulgarian Stevia variety - "Stella" was recognized, and in 2017, it was patented.

The increasing interest in natural sweeteners, which is complemented by the significant medicinal properties of the South American plant stevia (*Stevia Rebaudiana* B.), implies an increase in consumer interest on the one hand and on the other – deepening research and creating modern mechanized production systems.

The low germination of stevia seeds makes its cultivation difficult. Seed propagation has a significant drawback – the offspring from seeds are genetically heterogeneous and the resulting plants differ in terms of habit and stevioside composition. This is the main reason to prefer vegetative propagation, which preserves the genotype of the parent plants. However, vegetative propagation is limited by the low number of individuals obtained from one plant.

Diversity of genetic forms among the generation obtained from stevia seeds, low seed germination, as well as vegetative propagation by cuttings, the limitations of which are the obtaining of a small number of individuals, necessitate the use of some of the most modern methods in plant biotechnology.

In recent years, the micropropagation method has been used to obtain a large number of individuals with valuable qualities from a single source plant. An alternative effective method is its propagation and maintenance by *in vitro* methods, in which the source genotype is also preserved.

Successful micropropagation depends on a number of factors, such as the type of source explant, the concentration and combination of growth regulators. As a result of this accelerated form of propagation, healthy plants can be obtained, necessary for various selection and production purposes, and the resulting biomass can be a valuable source for the food, pharmaceutical and cosmetic industries in our country.

The dissertation submitted to me for review is dedicated to clarifying and solving these current strategic problems and tasks of modern agriculture.

### **III. Aim, tasks, hypothesis and methods of analyzing**

The aim is formulated correctly, specifically and precisely - it is a study of the influence of the genotype on the development and reproduction of stevia in the conditions of Bulgaria.

In connection with the implementation of the aim, the following tasks have been developed:

- Optimization of seed reproduction methods in the conditions of Bulgaria to enrich the gene pool.
- Establishment of the parameters of effective rooting, adaptation and development under external conditions
- Influence of the genotype, the method of reproduction and the conditions on the morphological and economic qualities.

The study was conducted at the Agricultural Institute-Shumen during the period 2018-2021, and the dissertation also includes earlier studies on germination *in vitro* and *in vivo* between 2009 and 2010. The study used selection material from the gene pool of the Agricultural Institute - Shumen. The sources originated from Japan and America. After individual, family and clonal selection and

adaptation to our conditions, elite clones were formed, as well as origins - a product of soma clonal and gametoclonal variation in in vitro culture of meristems, embryos, seeds.

To achieve the goal and objectives, experiments were conducted in laboratory, vegetation and field conditions:

#### **Laboratory conditions**

In the Tissue Culture Laboratory, meristems, embryos and seeds were isolated using developed methodologies.

In the Seed Science Laboratory, laboratory germination tests were conducted and the mass of seeds and seedlings was measured.

#### **Vegetation conditions**

In adaptation rooms with controlled temperature, seed germination studies are conducted; adaptation of rooted in vitro regenerants to external conditions; rooting of cuttings from rhizomes and young plants and pricking and growing to seedlings suitable for planting in field conditions.

#### **Field conditions**

The studies were conducted in comparative experiments for the assessment of morphological and economic qualities of rhizomes and seedlings from elite clones, and in selection nurseries for propagation and assessment of the gene pool of clones and populations. During the vegetation period, from transplanting in the field to harvesting, biometric measurements and analyses are performed. The content of sweet substances is determined.

### **IV. Visualization and presentation of the obtained results**

The dissertation submitted for review has a volume of 142 pages, including 34 tables, 251 literary sources - 47 in Cyrillic and 204 in Latin. It is well balanced and structured, covering all sections.

The literature review is comprehensive. Written on 53 pages, including 9 subsections: Origin, distribution and importance; systematics, morphological features; biological features, chemical composition, cultivation and reproduction, agricultural techniques, selection and subsection diseases.

The mathematical processing of the data from laboratory studies and biometric analyses was processed with variation analysis, and the indicators of productivity and economic qualities were processed with dispersion analysis.

### **V. Discussion and assessment of the results**

The results obtained are organized in 3 main directions: Optimization of seed reproduction methods for enriching the gene pool; Establishment of parameters for effective rooting, adaptation and development under external conditions; Evaluation of morphological characteristics and economic qualities of stevia depending on the genotype, method of reproduction and environmental conditions.

Based on the conducted research, statistical processing and competent discussion of the results, the doctoral student formulates 10 reliable conclusions. They are arranged in a logical sequence, summarizing the results obtained from the experiments.

1. With the changes in agroclimatic conditions of late autumn and the absence of early frosts, the possibility of obtaining viable seeds in the conditions of Bulgaria increases.
2. A suitable nutrient medium for in vitro seed germination has been established and a method for seed sterilization has been optimized to prevent the development of fungal infections. Successful sterilization of the seeds, preceding in vitro cultivation, was achieved after their treatment with 0.04% HgCl<sub>2</sub> and 0.1% Tween-20 for 90 minutes with subsequent three-time washing with sterile distilled water, to which 0.5 ml/l Citro sept was added (15 minutes each).
3. Optimal conditions for in vivo seed germination have been established. Mass germination of stevia seeds ( $77 \pm 4.6\%$ ) was achieved on a soil substrate mixture of peat, sand and perlite in a ratio of 4:1:1, in a thermostatic room with lighting for 16 hours a day and a temperature between 18-20 ° C.
4. A positive correlation was established between laboratory germination and the germination of plants in the soil mixture ( $r = 0.678$ ), which makes laboratory germination a reliable parameter for assessing the viability of seed progeny for stevia under real conditions.
5. The germination of seeds planted after one year of storage is significantly lower than both the laboratory-determined germination and the field germination. Considering the results of each of the origins, the influence of the genotype is taken into account. 20% of them have no germination at all after one year of storage, and another 20% have a higher germination on the seventh day after storage compared to their germination before storage.
6. For the most successful rooting of plants from cuttings, they should be planted as early as possible during the year. A deviation was observed in the origins - 7E, 9E and A10. This confirms the influence of the genotype on the rooting of plants.
7. Propagation by rhizomes leads to the accumulation of soil pathogens over the years and increases the incidence of leaf diseases. This requires alternating propagation by rhizomes, in vitro and in vivo propagation for the production of elite seedlings. The most effective scheme for practical application of seedlings is by sowing seeds under controlled conditions in January-February, growing germinated and stabilized plants in April-May, transplanting in June-July and harvesting the rhizomes in October, which after storage are realized in the next period.
8. On average, about 15% of the planted rhizomes are lost during the growing season and the leaves are not harvested for drying and storing the rhizomes for the next year. During winter storage and before spring removal of the rhizomes, an average of 26% is lost due to rotting and the lack of viable stems. This may be due to the accumulation of soil pathogens over the years and the increase in plant diseases, which leads to the loss of plants.
9. It is established that in terms of the number of stems and the height of the stems, there are differences depending on the harvest dates of the plants obtained from rhizomes, depending on the period of their use. However, with regard to the indicator of dry leaves, there is no difference in the indicators for the different harvest dates. An increase in the yield of dry leaves from plants obtained from perennial rhizomes (average 84.6 g) compared to two-year (average 76.8 g), and the lowest yield of dry leaves is observed for plants obtained from annual rhizomes (average 74.6 g).
10. The use of seed reproduction expands the possibilities for implementation in the practice of stevia production in the conditions of Bulgaria. In most of the origins obtained from seeds,

the ratio between stevioside and rebaudioside is less than 2:1, which is an indicator for measuring the sweetness of the stevia extract and the increased amount of rebaudiosides is an indicator for the reduction or elimination of the bitter aftertaste of the extract. For the needs of selection, the methods of in vitro micropropagation and from cuttings to preserve the original genotype remain promising.

## **VI. Contributions to the dissertation.**

The contributions formulated by the doctoral student fully correspond to the experimental activities and results obtained. A total of 5 scientific and 6 scientifically applied contributions have been defined:

### **Scientific contributions**

1. For the first time in Bulgaria, the possibility of using seed reproduction for selection and practice has been proven.
2. Different methods for harvesting ripe seeds have been established depending on whether they will be used for experimental or production activities in order to obtain seeds with high germination.
3. A suitable nutrient medium for in vitro germination of *Stevia rebaudiana* Bertoni seeds has been developed. A method for seed sterilization has been optimized to prevent the development of fungal infections.
4. An optimal soil mixture and optimal conditions for in vivo germination of *Stevia rebaudiana* Bertoni seeds have been established.
5. Studies have been conducted on laboratory and field germination, germination energy and germination, including the influence of the storage period of stevia seeds.

### **Scientific and applied contributions:**

1. The optimal period of the year for planting cuttings for rooting plants has been established.
2. An assessment of biometric and productive indicators of adapted seedlings from in vitro regenerants and from rhizome cuttings has been made.
3. The influence of the term for harvesting plants on the yield of dry matter and obtaining viable seeds has been established.
4. An effective methodology for producing elite seedlings through mandatory alternation of propagation by rhizomes, in vitro and in vivo propagation has been developed.
5. It has been established that the application of propagation schemes does not affect the stability of the phenotype when maintaining the variety.
6. The use of seed reproduction expands the possibilities for implementation in the practice of stevia production in the conditions of Bulgaria. For the needs of selection, the methods of in vitro micropropagation and from cuttings for preserving the initial genotype remain promising.

## **VII. Critical notes and questions**

Some of the results obtained lack in-depth analysis. It would be appropriate for some of the presented results to be presented through graphs. The text contains grammatical errors, inconsistencies and incompleteness in the terms used, and omissions in the cited literature.

## **VIII. Published articles and citations.**

The main results of the dissertation work have been published in three scientific papers - two in the journal Plant Science and one in the journal Scientific Papers. Series B, Horticulture. In all articles, the doctoral student is the lead author. In this way, his personal contribution is clearly defined. The publications are well-formed and have the necessary scientific value.

### **Evaluation of the abstract**

The presented abstract objectively reflects the structure and content of the dissertation work. It is written on 41 pages. It contains 23 tables, 1 figure, 8 photos and a summary in English.

## **CONCLUSIONS:**

Based on the various research methods learned and applied by the doctoral student, the correctly conducted experiments, the generalizations and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of the Agricultural Academy of the Republic of Bulgaria Act on Agricultural Research and Development and the Regulations for its implementation at the Agricultural Academy, which gives me reason to evaluate it **POSITIVELY**.

I would like to propose that the esteemed Scientific Jury also vote positively and award Stanislav Dechkov Bozhimirov the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Selection and Seed Production of Cultivated Plants".

**10.08.2025**

**Shumen, Bulgaria**

**REVIEWER: .....**

**/Assoc. Prof. Dr. Stanimir Enchev/**

