

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по: област на висше образование 6.Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.1 Растениевъдство, научна специалност „Селекция и семенпроизводство на културните растения“

Автор на дисертационния труд: Боряна Петрова Хаджииванова, асистент в ИПК- Чирпан, Селскостопанска академия, София.

Тема на дисертационния труд: „ПРОУЧВАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ОТДАЛЕЧЕНА ХИБРИДИЗАЦИЯ В СЕЛЕКЦИЯТА НА ТВЪРДА ПШЕНИЦА (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.))“.

Рецензент: Доцент д-р Нина Иванова Ненова, от ДЗИ-Ген.Тошево, професионално направление 6.1 Растениевъдство, научна специалност „Селекция и семенпроизводство на културните растения“, определена за член на научно жури със заповед № РД-05-150/24.06.2026 г. на Председателя на ССА.

1. Кратко представяне на кандидата

Боряна Петрова Хаджииванова е родена на 08.07.1974 г. През 1993 г. завършва Висшия селскостопански институт- гр. Пловдив като ОКС „магистър“ със специалност „Агроинженерство, растителна защита“. От 2004 до 2016 г. е работила като лаборант в ИПК – Чирпан. През периода 2017 до 2022 г. е заемала същата позиция във фирма „Млин-97“ АД, гр. Разград. От 2023 г. до сега е асистент в ИПК – Чирпан в сферата на растителните биотехнологии при твърдата пшеница, като извършва различни анализи, разработки и селективни подходи при тази култура. Ас. Боряна Хаджииванова е включена в състава на четири науучно-изследователски проекта. Публикувани са 10 научни статии, свързани с дисертационния труд в индексирани и рецензирани списания, като в четири от тях е първи автор. Владее добре английски език и има нужните компютърни умения.

Ас. Хаджииванова е зачислена в докторантура на самостоятелна подготовка по докторска програма „Селекция и семенпроизводство на културните растения“, към ИПК-Чирпан със заповед № РД 05-137/19.05.2025 на Председателя на ССА. Отчислена е с право на защита със заповед № РД 05-47/19.05.2026. Основната работа на докторанта е свързана със селекционни проучвания при твърдата пшеница в съчетание с междувидовата хибридизация и биотехнологични подходи.

2. Обща характеристика на дисертационния труд автореферата- структура, обем и съдържание

Дисертационният труд съдържа общо 191 страници. Те са разпределени както следва: увод- 3 стр.; литературен преглед – 36 стр.; цел и задачи – 2 стр; материал и методи -17 стр.; резултати и обсъждане 86 стр.; заключение -13 стр.; изводи -3 стр.; приноси – 2 стр.; литературна справка -28 стр. от изнесеното по - горе личи, че дисертационния труд е структуриран правилно, като отделните раздели са структурирани по обем. Дисертацията включва 28 таблици и 21 фигури и снимков материал. Таблиците са добре структурирани и в тях добре е отразена статистическата обработка на резултатите от проучванията по всички включени в дисертационния труд.

Представеният автореферат отговаря на изискванията и отразява много добре всички структурни елементи, анализи, доказателствен материал, изводи и приноси.

3. Актуалност на изследвания проблем

Пшеницата е най-широко отглежданата житна култура в света, Европа и у нас. С нея е свързано до голяма степен изхранването на човечеството. В България площите заети с пшеница ежегодно се увеличават и се движат в диапазона от 15-17 млн дка. Около 8-10 % от тези площи са засяти с твърда пшеница (*Triticum durum*). Тя е основна суровина за приготвяне на паста, кус-кус, фиде, юфка, грис и други продукти. Тя има специфичен и балансиран белтъчно-въглехидратен комплекс в благоприятно съчетание на протеин, глютен, каротеноиди, високо съдържание на незаменими аминокиселини, витамини, мастни киселини и др. Поради всичко това в последните години се създават предпоставки за увеличаване на площите за отглеждани на твърда пшеница.

Отдалечената хибридизация е един от методите за подобряване на твърдата пшеница чрез използване на различни дивни видове, които са нейни родственици. Чрез успешни кръстоски могат да се създадат генетично стабилни форми тип културна пшеница, носещи желани и ценни за човека признаци като устойчивост към болести, неприятели, студ, суша, недостиг на хранителни елементи, високо протеиново съдържание и други биохимични и физиологични показатели. Някои от характеристиките, отличаващи този метод от вътревидовата хибридизация, са свързани с ниска кръстосваемост, несъвместимост между геномите, стерилност на хибридите и стабилизиране на новополучените линии поради присъствието и влиянието на чуждия генетичен материал. За да могат да се преодолеят всички тези негативи, които пречат да се съчетаят полезните признаци от новите източници, които са носители на полезни гени се използват подходи на растителните биотехнологии. Един от тези подходи, който умело е използван в дисертационния труд е методът на спасяващото ембрио „embryo rescue method“. Този метод не измества традиционните селекционни методи, а комбинирането им дава възможност за преодоляване на несъвместимостта между отдалечените геноми и създаване на форми с подобрени признаци и то за по-кратък период, отколкото само с класически технологии. Маркерната селекция от своя страна, позволява отбор в много ранен стадий от развитието на растението и това също води до неколkokратно съкращаване на селекционния процес. Освен това с нея се доказва и междувидовия произход на новосъздадените форми, като ясно се вижда интрогресията на част от генома на дивия вид в новосъздадения растителен изходен материал. Настоящият дисертационен труд е успешен опит за съчетано използване на традиционните селекционни методи с отлъчена хибридизация, биотехнологични методи и маркерна селекция за повишаване на генетичното разнообразие при твърдата пшеница и до ускоряване на селекционния процес и практическата селекция.

В този аспект темата на дисертационния труд „ПРОУЧВАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ОТДАЛЕЧЕНА ХИБРИДИЗАЦИЯ В СЕЛЕКЦИЯТА НА ТВЪРДА ПШЕНИЦА (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.))“, разработен от докторант Боряна Петрова Хаджииванова е с непреодолима актуалност и значение.

4. Литературна осведоменост по научния проблем.

Литературният обзор е изчерпателен. В него са включени всички аспекти на проблема, като са отразени значението и разпространението на твърдата пшеница; селекционно подоряване; намаляване на генетичното разнообразие и повишаването му; източници на гени от дивите видове от сем. Житни да подобрят на твърдата пшеница; проблеми, свързани с отдалечената хибридизация; методи за идентифициране на преноса на генетичен материал от отдалечената хибридизация в генома на твърдата пшеница.

В подкрепа на разработваната тема са цитирани 394 литературни източника, от които 25 на кирилица и 369 на латиница. Около 45 % от литературните източници са от последните 10 години. Литературния преглед е написан на добър стил. Не се отбелязват пунктуационни и технически грешки. Източниците са цитирани правилно, както в текста, така в литературната справка. Докторанта с лекота коментира и анализира мненията на различните автори.

Цепта на изследването е мотивирана ясно и точно, след задълбочен анализ и обобщение на литературните източници. За изпълнението и са формулирани шест задачи, чрез които е реализирано проучването. Те са формулирани точно и ясно.

5. Оценка на методичната част.

Методически опитите са поставени и изведени правилно в полски и лабораторни условия. Експерименталната работа по темата е проведена в Института по полски култури, Селскостопанска академия – гр. Чирпан, и в Агробιοинститута, Селскостопанска академия – гр. София, в два етапа. Първият етап е осъществен през вегетационните сезони от 2005 г. до 2011 г. Вторият етап е проведен през вегетационните сезони от 2019 г. до 2022 г., при различни метеорологични условия, характерни за всеки един от тях.

Растителен материал. Обект на изследването са образци на отдалечени видове от родовете *Aegilops*, *Triticum* и *Triticale*. Сортовете включени в изследването са: *Apulicum* 233, Гергана, Прогрес, Белослава, Възход, Виктория - българска селекция; *Iride*, *Meridiano* – Италия; *Superdur* – Австрия. Линиите, българска селекция, са: 6189, 6467, 6948, 7110, 7121, 7192, 7208, 7216, 7281, 7307, 7346, 7351, 7383, 7416, 7505, 7538, 7544, 7552, 7647, 7767, 7793, 7794. Чрез ембриокултивиране са получени междуродовите кръстоски с видове от родовете *Aegilops*, *Triticum* и *Triticale*. В изследването са включени F1 хибриди и техните беккросни потомства. Девет беккросни линии, получени при хибридизация на *Triticum durum* с видове от род *Triticum* и *Aegilops*, както и със синтетичния хибрид *Triticale*, са включени за идентифициране на чуждородовия пренос чрез молекулярни маркери. Шест напреднали селекционни линии, резултат на отдалечена хибридизация, са включени за оценка по добив и качествени характеристики на зърното.

Използваният растителен материал е в голям обем, достатъчен за извеждане на експерименталната част, за статистическите обработки и за оформяне на задълбочени изводи и приноси.

Методи. Използвани са редица методи за осъществяване на междуродови кръстоски като ембриокултура, методи за идентифициране преноса на генетичен материал от отдалечените видове в генома на твърдата пшеница, като морфологичен, цитологичен, молекулярен анализ, агрономическа оценка и оценка на качествените показатели при напреднали линии твърда пшеница, получени чрез отдалечена хибридизация. Правилно са подбрани и статистическите методи, с който са обработени получените резултати.

6. Анализ и оценка на резултатите.

Резултатите и обсъжданията са представени на 86 страници от обема на дисертационния труд. Те са обобщени в шест подраздела и представени в 28 добре оформени таблици и 31 фигури и снимков материал.

В първия подраздел е установена кръстосваемостта между отдалечени видове от род *Triticum*, *Aegilops* и синтетичния вид *Triticale* с различни сортове и селекционни линии твърда

пшеница (*Triticum durum*). Ниските стойности на получените завръзи при кръстоските с представители на род *Aegilops* доказват възможността за включване на тези видове в отдалечена хибридизация и използването им като източник на генетично разнообразие в селекционните програми по твърда пшеница. Твърдата пшеница проявява ниска кръстосваемост с генетично отдалечени видове, като по-висока е при тези с хомоложни геноми. Степента на кръстосваемост зависи от нивото на пloidност и броя на хомоложните геноми. Установената кръстосваемост при хибридизацията на *Triticum durum* с *Aegilops macha* и *Triticum spelta* потвърждава, че разликите на ниво пloidност и влиянието на нехомоложния D геном затрудняват кръстосването на хексаплоидните видове с *Triticum durum*. Всички тези резултати са добре представени и доказани в табличен и графичен вид с нужната статистическа обработка.

Вторият подраздел представя подробно оптимизирането на *in vitro* техники за преодоляване на несъвместимостта при муждуродови и междуродови хибридни кръстоски. Оптимизиран е състава на хранителните среди за прилането им при ембриоспасяването за получаване на залъз от отдалечени хибриди, получени от кръстоските на твърдата пшеница с видове от родове *Aegilops*, *Aegilops* и синтетичния вид *Triticale*. Получените резултати показват, че модифицираната MS среда, съдържаща абсцисинова киселина осигурява по-висок потенциал за регенерация на незрели зародиши от отдалечени кръстоски в сравнение с Р8 средата. Тук резултатите са добре обвързани с наличните публикации по проблема и показват, че докторанта е добре запознат с световните постижения.

В третият подраздел са проучени всички получени F₁ хибридни растения, получени при кръстоски с участието на *Aegilops cylindrica* и *Aegilops umbellulata*. При отдалечената хибридизация това е един много важен етап, тъй като се доказва дали в този материал се съдържа фрагмент от генома на дивия вид. Тук всички резултати показват, че докторанта доказва тази интродукция с морфологични анализи и цитологични наблюдения. Морфологичният анализ на F₁ хибридите от кръстоските Виктория × *Aegilops cylindrica* и Белослава × *Aegilops umbellulata* показва, че растенията са фенотипно еднакви в рамките на всяка комбинация и проявяват белези, характерни и за двамата родители. Цитологични данни категорично доказват интрогресията на междуродов наследствен материал дори и при последващи бекросирания с културния родител. Идентифицирането на интрогресирани геномни сегменти наследени от дивите видове би улеснило отбора на линии със специфични признаци и би подпомогнало селекционните програми. Откриването на интрогресии от отдалечените видове в генома на твърдата пшеница може да бъде допълнително подпомогнато от техники, базирани на молекулярни маркери.

В четвъртия раздел са идентифицирани пренос на генетична информация в напреднали бекросни линии, получени от отдалечена хибридизация на твърда пшеница с видове от род *Triticum*, *Aegilops* и *Triticale*. В изследването са включени десет напреднали бекросни линии, получени в резултат на дългогодишната ни работа по отдалечена хибридизация на шест български сорта твърда пшеница с девет отдалечени вида от семейство *Gramineae* и синтетичния вид *Triticale*, като е използвана за бекросно кръстосване. Изследванията демонстрират ефективността на SSR и ISSR технологиите за откриване на полиморфизъм и анализ на интрогресия в сортове твърда пшеница с висока степен на генетично сходство. Полиморфизмът, идентифициран в бекросните линии, е следствие от интрогресивни хибридизации, включващи различни чужди видове и съвременни сортове твърда пшеница. Най-висок процент на интрогресия от тетраплоидните отдалечени видове в генома на твърдата пшеница е установен в сорт Прогрес от *Triticum polonicum* (36,84 %) и *Triticum dicoccum* (34,78

%), а от хексаплоидните отдалечени видове – в сортовете Възход и Прогрес от *Triticale* (41,66 %) и от *Triticum macha* (26,66 %). При селекционната линия с участие на *Triticum macha* е установено почти пълно заместване на 7А хромозомата в донорния сорт твърда пшеница с хомеоложната 7А хромозома от отдалечения вид. Ниско ниво на интрогресия на хроматин в генома на твърдата пшеница се наблюдава при използване на *Aegilops tauschii* и *Aegilops umbellulata*. При беккросната линия, получена от хибридизация с *Triticale*, е установена интрогресия на 10 хроматинови сегмента в различни локуси на хромозоми от различни групи. Допълнителното използване на ISSR маркерите (GA)₆C и (AC)₆G показва наличие на фрагменти от хромозомите на *Triticum timopheevii* и допълнителни фрагменти от *Triticum polonicum* и *Triticum macha* в беккросните линии. Открити са идентифицирани нови алели в беккросните линии, които не съответстват на алелите на двамата родител. Наличието на нови алели е индикация за активна рекомбинация между геномите на чужди видове и сортовете твърда пшеница.

В подраздел пети е извършена фенотипна оценка на напреднали беккросни линии получени при кръстосване на твърда пшеница с отдалечени видове от родовете *Aegilops* и *Triticum*. Повечето от изследваните беккросните линии се характеризират с подобрени агрономически характеристики, като по-късо стъбло, по-дълги флагови листа, по-голяма флагова листна площ и подобрени характеристики, свързани с класовете: по-голям брой класчета в клас, по-голям брой зърна в клас, както и по-високо съдържание на протеин и глютен. Резултатите показват, че използваната беккросна стратегия е подходяща за прехвърляне на нови алели от чужди видове в елитни сортове твърда пшеница.

Практическата ценна стойност на този труд е показана в последния шести подраздел на получените крайни резултати. Извършена е оценка по добив и качество на напреднали селекционни линии твърда пшеница, получени по метода на отдалечената хибридизация с видовете от род *Aegilops* и *Triticum*. Най-висок среден добив за трите години е отчетен при линия ДВ-8360 (672,6 kg/da) с произход *Triticum durum* × *Aegilops kotschy*. Всички анализирани линии се характеризират с висока стъкловидност и едро зърно. Най-голяма маса на 1000 зърна е установена при линиите ДВ-8358 и Д-8572 (*Triticum polonicum* × *Triticum durum*). С най-високо съдържание на протеин и мокър глютен в зърното, силен глютен и най-висока стойност на жълт индекс *b** се отличава линия Д-232. Тя е беккросна линия от отдалечена хибридизация с *Triticum dicoccum* и притежава глиадинова фракция γ -45, свързана с НМГ – 2 тип и силен глютен.

7. Изводи и приноси на дисертационния труд

В резултат на извършените проучвания са направени 19 извода, които точно отразяват получените резултати.

Най-важните приноси на дисертационния труд са обобщени в приноси с научно-теоретичен и приложен характер. Те са формулирани ясно и точно:

Приноси с научно-теоретичен

1. Получена е информация за кръстосваемостта на твърдата пшеница с голям брой отдалечени и родствени видове от род *Aegilops*, род *Triticum* и *Triticosecale* и за възможността за получаване на F₁ хибридни растения с прилагане на ембриоспасяване *in vitro*.

2. С цел преодоляване на ембрионалната несъвместимост при отдалечена хибридизация на твърда пшеница са оптимизирани основни етапи от процедурата по ембриоспасяване *in vitro*.
3. Установени са сериозни нарушения в протичането на микроспорогенезиса, които обясняват частичната или пълна стерилност на хибридни растения от кръстосването на твърда пшеница с *Aegilops umbellulata* и *Aegilops cylindrica*.
4. Демонстрирана е приложимостта и ефективността на SSR и ISSR маркерите при отдалечена хибридизация за откриване на полиморфизъм и анализ на интрогресии, доказващи хибридната природа на създадените беккросни линии.
5. Установено е, че прилаганата беккросна стратегия е ефективен инструмент за въвеждане на нови алели от отдалечени видове без влошаване на основните агрономични качества на твърдата пшеница.

Приноси с научно-приложен характер

1. Разработени са протоколи за ембриоспасяване *in vitro* при твърда пшеница.
2. Създадени са селекционни линии твърда пшеница чрез отдалечена хибридизация и беккросна стратегия, намиращи се в конкурсно сортоизпитване, чрез които е обогатено генетичното разнообразие по важни агрономически признаци.
3. Идентифицирани са беккросните линии, произхождащи от кръстоските с *Triticum dicoccum*, *Triticum polonicum* и *Triticum macha* характеризиращи се с най-добра комбинация от признаци, свързани с продуктивността на класа и качеството на зърното и с потенциалда бъдат признати за нови сортове.

8. Оценка и качество на научните публикации, отразяващи резултатите от дисертационния труд.

Боряна Хаджииванова представя три публикации, свързани с дисертационния труд. В две от тях е първи автор. Статиите отразяват основните части на разработките в дисертацията.

9. Критични бележки и препоръки.

Нямам критични бележки. Бих препоръчала на асистент Боряна Хаджииванова предвид актуалността и важността на разработения дисертационен труд, да продължи и да задълбочи научноизследователската си работа по тези проблеми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С тази разработка дисертанта показва, че вече е изграден научен работник, който владее методите на експериментиране, обработка и интерпретиране на получени резултати. Смятам, че представения дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за прилагането му в ССА за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“.

Това ми дава основание да оценя **положително** дисертационния труд и да предложа да се присъди на Боряна Петрова Хаджииванова образователна и научна

степен „Доктор“ в област на висше образование Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.1. Растениевъдство, научна специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения“.

Л

19.08.2026 г.

Генерал Тошево

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:



/Доц. д-р Нина Ненова/

REVIEW

Of Phd thesis elaborated in the higher education field Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction 6.1 Crop science, scientific speciality “Breeding and seed production of cultivated plants”

Author of the PhD thesis: Boryana Petrova Hadzhiivanova, assistant at IFC-Chirpan, Agricultural Academy, Sofia.

Topic of the PhD thesis: 'STUDIES RELATED TO THE USE OF THE DISTANT HYBRIDIZATION IN DURUM WHEAT BREEDING (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.))'.

Reviewer: Assoc. Professor Dr. Nina Ivanova Nenova from DZI-Gen. Toshevo, professional field 6.1 Crop Production, scientific specialty “Breeding and Seed Production of Cultivated Plants,” appointed as a member of the scientific jury by order No. RD-05-150/24.06.2026 of the President of the Agricultural Academy, Sofia.

1. Brief presentation of the PhD student

Boryana Petrova Hadzhiivanova was born on 08.07.1974. In 1993, she graduated from the Higher Agricultural Institute in Plovdiv with a master's degree in Agroengineering, specializing in plant protection. From 2004 to 2016, she worked as a lab technician at IFC – Chirpan. Between 2017 and 2022, she held the same position at the company "Mlin-97" AD in Razgrad. Since 2023, she has been working as an assistant at IFC – Chirpan in the field of plant biotechnology for durum wheat, performing various analyses, developments, and selective approaches for this crop. Asst. Prof. Boryana Hadzhiivanova is part of four research projects. She has published 10 scientific articles related to her dissertation in indexed and peer-reviewed journals, being the first author in four of them. She has a good command of English and possesses the necessary computer skills.

Asst. Hadzhiivanova was enrolled in a doctoral program for independent study in the PhD program 'Selection and Seed Production of Cultivated Plants' at IPC-Chirpan by order No. RD 05-137/19.05.2025 of the President of the SSA. She was withdrawn with the right to defend her dissertation by order No. RD 05-47/19.05.2026. The main work of the PhD student is related to breeding research in durum wheat, combined with distant hybridization and biotechnological approaches.

2. General characteristics of the dissertation thesis and autoreferee - structure, volume, and content

The PhD thesis contains a total of 191 pages. They are distributed as follows: introduction – 3 pages; literature review – 36 pages; aim and objectives – 2 pages; materials and methods – 17 pages; results and discussion – 86 pages; conclusion – 13 pages; findings – 3 pages; contributions – 2 pages; used references – 28 pages. From the above, it is clear that the dissertation is properly structured, with each section organized according to volume. The dissertation includes 28 tables and 21 figures and photographic material. The tables are well-structured and clearly reflect the statistical processing of the study results for all aspects included in the dissertation. The presented autoreferee meets the requirements and very well reflects all structural elements, analyses, evidence, conclusions, and contributions.

3. Relevance of the researched problem

Wheat is the most widely grown cereal crop in the world, in Europe, and here in our country. It is largely connected to feeding humanity. In Bulgaria, the areas planted with wheat increase every year and range between 15-17 million decares. About 8-10% of these areas are sown with durum

wheat (*Triticum durum*). It is the main raw material for making pasta, couscous, vermicelli, noodles, semolina, and other products. It has a specific and balanced protein-carbohydrate complex with a favorable combination of protein, gluten, carotenoids, a high content of essential amino acids, vitamins, fatty acids, and more. Because of all this, in recent years conditions have been created for increasing the areas for growing durum wheat.

Distant hybridization is one of the methods for improving durum wheat by using different wild species that are its relatives. Through successful crossbreeding, genetically stable forms resembling cultivated wheat can be created, carrying desirable and valuable traits for humans, such as resistance to diseases, pests, cold, drought, nutrient deficiencies, high protein content, and other biochemical and physiological characteristics. Some of the features that set this method apart from distant hybridization are related to low crossability, genome incompatibility, hybrid sterility, and the stabilization of the newly obtained lines due to the presence and influence of foreign genetic material. To overcome all these negatives that prevent combining the useful traits from new sources carrying beneficial genes, plant biotechnology approaches are used. One of these approaches, which skillfully used in the dissertation, is the embryo rescue method. This method doesn't replace traditional breeding methods, but combining them allows overcoming incompatibility between distant genomes and creating forms with improved traits in a shorter period than using only classical technologies. Marker-assisted selection, in turn, allows a team to work at a very early stage of plant development, which also leads to a multiple shortening of the breeding process. In addition, it also proves the interspecies origin of newly created forms, clearly showing the introgression of part of the wild species' genome into the newly created plant material. This dissertation is a successful attempt to combine traditional breeding methods with targeted hybridization, biotechnological methods, and marker-assisted selection to increase genetic diversity in durum wheat and to speed up both the breeding process and practical breeding.

4. Literary awareness of the research problem.

The literature review is comprehensive. It covers all aspects of the problem, reflecting the importance and distribution of durum wheat; breeding improvement; the reduction of genetic diversity and its increase; sources of genes from wild species of the grass family to improve durum wheat; issues related to distant hybridization; methods for identifying the transfer of genetic material from distant hybridization into the genome of durum wheat.

In support of the developed topic, 394 literary sources are cited, of which 25 are in Cyrillic and 369 in Latin. About 45% of the literary sources are from the last 10 years. The literature review is written in a good style. No punctuation or technical errors are noted. The sources are cited correctly, both in the text and in the reference list. The PhD student easily comments on and analyzes the opinions of different authors.

The purpose of the study is clearly and precisely motivated, following a thorough analysis and summary of the literature. Six tasks have been formulated to carry it out, through which the research has been conducted. They are stated clearly and precisely.

5. Evaluation of the methodological part.

The experiments were methodically set up and carried out correctly under both field and laboratory conditions. The experimental work on the topic was conducted at the Institute of Field Crops, Agricultural Academy – Chirpan, and at the Agrobiointitute, Agricultural Academy – Sofia, in two stages. The first stage took place during the growing seasons from 2005 to 2011. The second stage was carried out during the growing seasons from 2019 to 2022, under different weather conditions typical for each of them.

Plant material. The study focuses on samples of distant species from the genera *Aegilops*, *Triticum*, and *Triticale*. The varieties included in the study are: Apulicum 233, Gergana, Progress, Beloslava, Vuzhod, Victoria - Bulgarian selection; Iride, Meridiano – Italy; Superdur – Austria. The lines, Bulgarian selection, are: 6189, 6467, 6948, 7110, 7121, 7192, 7208, 7216, 7281, 7307, 7346, 7351,

7383, 7416, 7505, 7538, 7544, 7552, 7647, 7767, 7793, 7794. Intergeneric hybrids with species from the genera *Aegilops*, *Triticum*, and *Triticale* were obtained through embryo culture. The study includes F1 hybrids and their backcross progeny. Nine backcross lines, obtained by hybridizing *Triticum durum* with species from the *Triticum* and *Aegilops* genera, as well as with the synthetic hybrid *Triticale*, are included for identifying alien gene transfer using molecular markers. Six advanced breeding lines, resulting from distant hybridization, are included for evaluation of yield and grain quality traits. The plant material used is in large quantities, sufficient for carrying out the experimental part, statistical analyses, and forming in-depth conclusions and contributions.

Methods. A number of methods have been used to carry out interspecific crosses, such as embryo culture, methods to identify the transfer of genetic material from distant species into the genome of durum wheat, including morphological, cytological, and molecular analyses, agronomic evaluation, and assessment of quality traits in advanced durum wheat lines obtained through distant hybridization. The statistical methods used to process the obtained results were also properly selected.

6. Analysis and evaluation of the results.

The results and discussions are presented on 86 pages of the dissertation. They are summarized in six subsections and shown in 28 well-designed tables and 31 figures and photos.

In the first subsection, the crossability between distant species from the genus *Triticum*, *Aegilops*, and the synthetic species *Triticale* with different varieties and breeding lines of durum wheat (*Triticum durum*) was established. The low values of the resulting set seeds in crosses with representatives of the genus *Aegilops* show the possibility of including these species in distant hybridization and using them as a source of genetic diversity in durum wheat breeding programs. Durum wheat shows low crossability with genetically distant species, while it's higher with those having homologous genomes. The degree of crossability depends on the ploidy level and the number of homologous genomes. The observed crossability in hybridizing *Triticum durum* with *Aegilops macha* and *Triticum spelta* confirms that differences in ploidy level and the influence of the non-homologous D genome make crossing hexaploid species with *Triticum durum* difficult. All these results are well presented and proven in tables and graphs with the necessary statistical analysis.

The second section presents in detail the optimization of in vitro techniques for overcoming incompatibility in interspecies and intergeneric hybrid crosses. The composition of the nutrient media has been optimized for their use in embryo rescue to obtain seedlings from distant hybrids, produced from crosses of durum wheat with species from the genera *Aegilops*, *Aegilops*, and the synthetic species *Triticale*. The results show that the modified MS medium containing abscisic acid provides a higher potential for regenerating immature embryos from distant crosses compared to the P8 medium. Here, the results are well aligned with the existing publications on the issue and indicate that the PhD student is well acquainted with the global achievements.

In the third subsection, all obtained F1 hybrid plants from crosses involving *Aegilops cylindrica* and *Aegilops umbellulata* are studied. In distant hybridization, this is a very important step because it proves whether a fragment of the wild species' genome is present in this material. Here, all results show that the PhD student proves this introduction through morphological analyses and cytological observations. The morphological analysis of the F1 hybrids from the crosses *Victoria* × *Aegilops cylindrica* and *Beloslava* × *Aegilops umbellulata* shows that the plants are phenotypically identical within each combination and exhibit traits characteristic of both parents. Cytological data clearly prove the introgression of interspecific genetic material even after subsequent backcrosses with the cultivated parent. Identifying introgressed genomic segments inherited from wild species would make it easier to select lines with specific traits and support breeding programs. The detection of introgressions from distant species in the hard wheat genome could be further aided by molecular marker-based techniques.

In the fourth section, the transfer of genetic information in advanced backcross lines, obtained from distant hybridization of durum wheat with species from the *Triticum*, *Aegilops*, and *Triticale*

genera, is identified. The study includes ten advanced backcross lines, developed as a result of our long-term work on distant hybridization of six Bulgarian durum wheat varieties with nine distant species from the grass family (*Gramineae*) and the synthetic species *Triticale*, which were used for backcrossing. Studies show the effectiveness of SSR and ISSR technologies for detecting polymorphism and analyzing introgression in durum wheat varieties with a high degree of genetic similarity. The polymorphism identified in the backcross lines results from introgressive hybridizations involving various alien species and modern durum wheat varieties. The highest percentage of introgression from tetraploid distant species into the durum wheat genome was found in the Prograss variety from *Triticum polonicum* (36.84%) and *Triticum dicoccum* (34.78%), while from hexaploid distant species – in the Vuzhod and Prograss varieties from *Triticale* (41.66%) and from *Triticum macha* (26.66%). In the breeding line involving *Triticum macha*, almost complete replacement of the 7A chromosome in the donor durum wheat variety with the homologous 7A chromosome from the distant species has been observed. Low levels of chromatin introgression into the durum wheat genome are seen when using *Aegilops tauschii* and *Aegilops umbellulata*. In the backcross line obtained from hybridization with *Triticale*, introgression of 10 chromatin segments in various loci of chromosomes from different groups has been detected. In the backcross line obtained from hybridization with *Triticale*, introgression of 10 chromatin segments was observed at different loci on chromosomes from various groups. The additional use of ISSR markers (GA)₉C and (AC)₉G shows the presence of fragments from *Triticum timopheevii* chromosomes as well as additional fragments from *Triticum polonicum* and *Triticum macha* in the backcross lines. New alleles have been identified in the backcross lines that do not match the alleles of the two parents. The presence of new alleles indicates active recombination between the genomes of different species and durum wheat varieties.

In subsection five, a phenotypic evaluation was carried out on advanced backcross lines obtained from crossing durum wheat with distant species from the genera *Aegilops* and *Triticum*. Most of the studied backcross lines are characterized by improved agronomic traits, such as shorter stems, longer flag leaves, larger flag leaf area, and enhanced traits related to the ears: more spikelets per spike, more grains per spike, as well as higher protein and gluten content. The results show that the backcrossing strategy used is suitable for transferring new alleles from foreign species into elite durum wheat varieties.

The practical value of this work is shown in the last sixth subsection of the final results obtained. An assessment was made of the yield and quality of advanced breeding lines of hard wheat, obtained by the method of distant hybridization with species from the *Aegilops* and *Triticum* genera. The highest average yield over the three years was reported for line DV-8360 (672.6 kg/da), originating from *Triticum durum* × *Aegilops kotschy*. All analyzed lines are characterized by high vitreousness and large grains. The highest thousand-kernel weight was found in lines DV-8358 and D-8572 (*Triticum polonicum* × *Triticum durum*). Line D-232 stands out with the highest protein and wet gluten content in the grain, strong gluten, and the highest yellow index b* value. It is a backcross line from distant hybridization with *Triticum dicoccum* and has the γ-45 gliadin fraction, associated with HMW – 2 type and strong gluten.

7. Conclusions and Contributions of the Dissertation

As a result of the conducted studies, 19 conclusions were drawn, which accurately reflect the results obtained.

The most important contributions of the dissertation are summarized as contributions of a scientific-theoretical and applied nature. They are formulated clearly and precisely:

Contributions with scientific-theoretical focus

1. Information has been obtained on the crossability of durum wheat with a large number of distant and related species from the genera *Aegilops*, *Triticum*, and *Triticosecale*, as well as on the possibility of obtaining F1 hybrid plants through in vitro embryo rescue.

2. To overcome embryonic incompatibility in distant hybridization of durum wheat, the main stages of the *in vitro* embryo rescue procedure have been optimized.

3. Serious disturbances in microsporogenesis have been identified, which explain the partial or complete sterility of hybrid plants resulting from crossing durum wheat with *Aegilops umbellulata* and *Aegilops cylindrica*.

4. The applicability and effectiveness of SSR and ISSR markers in distant hybridization have been demonstrated for detecting polymorphism and analyzing introgressions, confirming the hybrid nature of the developed backcross lines.

5. It has been found that the backcross strategy used is an effective tool for introducing new alleles from distant species without compromising the main agronomic qualities of durum wheat.

Scientific and Applied Contributions

1. Protocols for *in vitro* embryo rescue in durum wheat have been developed.

2. Durum wheat breeding lines have been created through distant hybridization and backcrossing strategies, which are currently in competitive variety trials, enriching the genetic diversity for important agronomic traits.

3. Backcross lines derived from crosses with *Triticum dicoccum*, *Triticum polonicum*, and *Triticum macha* have been identified, showing the best combination of traits related to spike productivity and grain quality, and have the potential to be recognized as new varieties.

8. Evaluation and quality of the scientific publications reflecting the results of the dissertation work.

Boryana Hadzhiivanova presents three publications related to her dissertation. She is the first author on two of them. The articles reflect the main parts of the developments in the dissertation

9. Critical remarks and recommendations.

I have no critical remarks. I would recommend that assistant Boryana Hadzhiivanova, given the relevance and importance of the developed dissertation work, continue and deepen her research on these issues.

CONCLUSION

With this work, the candidate demonstrates that they have already become a researcher who is skilled in the methods of experimentation, processing, and interpreting obtained results. I believe that the presented dissertation meets the requirements of the Law for development of academic staff in Republic of Bulgaria and its Regulations at the Agricultural Academy for obtaining the educational and scientific degree of 'Doctor'.

This gives me reason to **positively** evaluate the dissertation and to propose that Boryana Petrova Hadzhiivanova be awarded the educational and scientific degree of 'Doctor' in the field of higher education in Agrarian sciences and veterinary medicine, professional direction 6.1. Crop production, scientific specialty 'Selection and seed production of cultivated plants'.

19.08.2026

General Toshevo

REVIEWER:

/Assoc. Prof. Dr. Nina Nenova/