

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен "Доктор" по научна специалност "Селекция и семенепроизводство на културните растения", в професионално направление 6.1 Растениевъдство

Автор на дисертационния труд: ас. Боряна Петрова Хаджииванова – докторант на самостоятелна подготовка, към Института по полски култури – Чирпан.

Тема на дисертационния труд: "Проучвания свързани с използването на отдалечена хибридизация в селекцията на твърда пшеница (*Triticum durum* Desf.)"

Рецензент: проф. дн Ана Стоилова Салджиева, научна специалност "Селекция и семенепроизводство на културните растения", определена за член на научно жури със Заповед № РД 05-150/24.06 2026 г. на Председателя на ССА – София, проф. дн Стефан Гандев.

1. Кратко представяне на кандидатката. Боряна Петрова Хаджииванова е родена на 08.07.1974 г. Завършва висше образование през 1998 г. във ВСИ (днес Аграрен университет) – гр. Пловдив, специалност "Агроинженерство – растителна защита", като придобива образователно-квалификационна степен "Магистър" и професионална квалификация инженер-агроном. От февруари 2004 г. до октомври 2016 г. работи като асистент в Института по полски култури – Чирпан, където участва в научноизследователска работа, свързана с генетиката и селекцията на твърда пшеница и памук. В периода ноември 2017 г. – януари 2022 г. работи като лаборант по окачествяване към "Млин – 97" АД, гр. Разград, където извършва физико-химични и органолептични анализи на зърно, мливини продукти, готови брашна и др. Този професионален опит допринася за задълбочаване на познанията ѝ в областта на качествените показатели на зърното. От април 2023 г. до настоящия момент отново заема академичната длъжност "асистент" в ИПК – Чирпан.

Със Заповед № РД-05-137 / 19.05.2025 г. на Председателя на Селскостопанска академия ас. Боряна Петрова Хаджииванова е зачислена в докторантура на самостоятелна подготовка по докторска програма "Селекция и семенепроизводство на културните растения", професионално направление 6.1. Растениевъдство, към Института по полски култури – Чирпан. Дисертационният ѝ труд е на тема "Проучвания, свързани с използването на отдалечена хибридизация в селекцията на твърда пшеница (*Triticum durum* Desf.)". Научни ръководители са проф. д-р Виолета Божанова от ИПК – Чирпан и проф. д-р Елена Тодоровска от Агробιοинститута – София.

През периода на обучение докторантката изпълнява успешно задачите, заложили в Индивидуалния учебен план. Полага докторантски минимум по дисциплините "Селекция и семенепроизводство на културните растения" и "Растителни биотехнологии" с общ успех Отличен (6.00). След успешно изпълнение на програмата за обучение и индивидуалния учебен план е отчислена с право на защита със Заповед № РД-05-47 / 23.03.2026 г. на Председателя на ССА.

Научните ѝ интереси са в областта на генетиката и селекцията на зърнено-житни култури, растителните биотехнологии, цитологичните анализи и методите за оценка качеството на зърното. Научната ѝ дейност е насочена към използването на отдалечена хибридизация в селекцията на твърда пшеница, както и към прилагането на съвременни биотехнологични подходи, включително молекулярни маркери и биохимични методи за характеризиране на селекционен материал. Участвала е в разработването на четири приключили и един текущ научноизследователски проекти към ССА, свързани със селекционни и генетични изследвания при твърда пшеница и памук, както и със създаване на нови сортове твърда пшеница.

Ас. Боряна Хаджииванова има 15 години научен трудов стаж и общо 10 научни публикации. Тя е много организирана и отговорна, последователна и прецизна в научните изследвания, и системно повишава своята квалификация чрез участия в курсове за обучение и специализации. Притежава добро ниво на владение на английски език (писмено и говоримо – B1), както и високи компютърни умения за работа със специализиран и офис софтуер, включително MS Office (Word, Excel, PowerPoint) и Statistica 13.

2. Актуалност на проблема. Твърдата пшеница (*Triticum durum* Desf.) е важна зърнено-житна култура с голямо икономическо значение, което се определя от високите хранителни и технологични качества на зърното. Тя е основна суровина за производството на макаронени изделия, при които не може да бъде напълно заменена от други пшенични видове.

България има дългогодишни традиции в производството и селекцията на твърда пшеница. Съвременните селекционни програми са насочени към създаване на високопродуктивни, стабилни сортове с високо качество на зърното, отговарящи на изискванията на пазара. В същото време интензивното използване на ограничен брой сортове със сходна генетична структура създадени главно чрез междусортова хибридизация е довело до стесняване на генетичната основа на културата, което ограничава възможностите за нейното по-нататъшно селекционно подобряване.

В тази връзка използването на отдалечената хибридизация е ефективен подход за разширяване на генетичното разнообразие и въвеждане на ценни гени от родствено близки и отдалечени диви видове в генома на твърдата пшеница. Въпреки трудностите и по-продължителния селекционен процес, този метод запазва своето значение като ефективно средство за генетично и селекционно подобряване на културните растения.

Темата на дисертационния труд е изключително актуална и перспективна, тъй като е насочена към проучване на възможностите за получаване на междувидови и мвждуродови хибриди при *Triticum durum* с отдалечени видове от семейство *Poaceae*, както и към идентифициране на преноса на чуждо видов генетичен материал чрез прилагане на съвременни биохимични, молекулярни и цитологични методи.

Избраната тематика е добре аргументирана от докторантката и има висока научна и научно-приложна значимост.

3. Общо описание на дисертационния труд и на приложените към него материали. Структурирането и обемът на дисертационния труд са в съответствие с Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в ССА. Написан е на 190 стандартни страници и съдържа задължителните раздели: "Въведение" – 2 стр.; "Литературен преглед" – 36 стр.; "Цел и задачи" – 2 стр.; "Материал и методи" – 17 стр.; "Резултати и обсъждане" – 100 стр.; "Изводи" – 3 стр.; "Приноси" – 2 стр.; "Литература" – 28 стр.; на 1 стр. е представено "Научни публикации, свързани с дисертацията"; "Съдържание" на дисертацията е на 2 стр., "Използвани съкращения и символи" – на 1 стр. (без номерация).

4. Познаване състоянието на проблема. Направен е обстоен литературен преглед на резултатите на наши и чужди автори и получена много ценна научна информация за решените и нерешените проблеми, свързани с тематиката на дисертационния труд. Списъкът на литературата включва 394 източника, от които само 25 са на кирилица и 369 на латиница. Голяма част от тях (105) са от последните 10 години. Прегледът е направен по раздели и обхваща всички направления на изследването. Специално внимание е отделено на проблемите, съпътстващи отдалечената хибридизация и методи за преодоляването им, и на методи за идентифициране преноса на генетичен материал от отдалечените видове в генома на твърдата пшеница. Проучването на всички тези въпроси е обогатило силно познанията на докторантката, дало ѝ е възможност да ги оцени и да ги приложи в своите изследвания.

Литературният преглед показва съвременно ниво на поставените проблеми и много добра информираност на докторантката в научната област, в която тя работи. Това ѝ е дало възможност да се ориентира в неизяснените въпроси и да постави целта и съответните задачи на своето изследване.

5. Цел, задачи и методи на изследване. Докторантката е формулирала ясно и коректно целта на изследването, а именно: "Проучване на възможностите за получаване на междувидови и междуродови хибриди между твърда пшеница (*Triticum durum* Desf.) и отдалечени видове от семейство *Poaceae*, и идентифициране на чуждовидов пренос на генетичен материал чрез фенотипни, цитологични и молекулярни подходи".

За постигане на поставената цел са формулирани шест конкретни задачи, които са логически последователни и напълно съответстват на предмета и обхвата на изследването. При тяхното изпълнение са приложени съвременни методи и подходи, адекватни на поставените научноизследователски цели.

Използваният растителен материал е представителен и добре избран. Като бащини компоненти в междувидовите и междуродовите кръстоски са използвани образци от родовете *Aegilops*, *Triticum* и *Triticale*, а като майчини компоненти – български и чуждестранни сортове и перспективни селекционни линии твърда пшеница. Хибридизацията е проведена както при полски условия, така и в условията на открита оранжерия (вегетационна къща).

Особено внимание е отделено на оптимизирането на *in vitro* техниките за преодоляване на ембрионалната несъвместимост при отдалечената хибридизация. Идентифицирането на чуждовидовия пренос на генетичен материал е осъществено чрез комплексен подход, включващ фенотипен, цитологичен и молекулярен анализ, което повишава надеждността на получените резултати.

Разработената селекционна стратегия включва фенотипиране на напреднали беккросни линии, създадени чрез кръстосване на *Triticum durum* с представители на родовете *Triticum* и *Aegilops*, както и оценка на напреднали селекционни линии по основни стопански и качествени показатели. На всички етапи от изследването е извършена комплексна оценка на голям брой морфологични, биологични и стопански ценни признаци.

За статистическата обработка на експерименталните данни са приложени подходящи съвременни математико-статистически методи, включително двуфакторен дисперсионен анализ (ANOVA) за оценка на генотипните различия и влиянието на изследваните фактори, както и множествен тест на Duncan за установяване достоверността на различията. Обработката на данните е извършена с програмния пакет Statistica 13.0 (TIBCO Software, 2018).

В заключение считам, че методичната част на дисертационния труд е много добре разработена, логично структурирана и напълно съобразена с поставената цел и предвидените задачи.

6. Онагледеност и представяне на получените резултати. Дисертационният труд съдържа богат и убедителен експериментален материал, онагледен с 28 таблици, 10 фигури и 11 фотографии с високо качество. Резултатите са представени ясно, последователно и по начин, който улеснява тяхното възприемане и интерпретиране.

Трудът е написан на прецизен научен език, в ясен аналитичен стил, като изложението е логично структурирано и професионално издържано. Таблиците, фигурите и фотографиите са информативни, прецизно оформени и подходящо избрани, като ефективно допълват и илюстрират изложението, без да го претоварват.

7. Анализ и оценка на резултатите. Резултатите от проведените изследвания са представени обективно, анализирани задълбочено и интерпретирани компетентно. Те обогатяват съществуващите знания относно възможностите за използване на отдалечената хибридизация в селекцията на твърдата пшеница и съдържат значителен обем нова научна

информация с ясно изразена приложна насоченост. При обсъждането на резултатите докторантката коректно съпоставя собствените си данни с тези на водещи български и чуждестранни автори, което свидетелства за отлично познаване на състоянието на проблема и за умение критично да интерпретира получените резултати. Всеки раздел на дисертационния труд завършва с ясно формулирани изводи, което улеснява проследяването на научната логика и съдейства за убедителното формулиране на обобщените изводи и приносите.

Дисертационният труд се основава на мащабни и продължителни експериментални изследвания, отличаващи се с комплексен подход и използване на съвременни методи. Получените резултати имат както фундаментално, така и приложно значение.

Резултатите са обобщени в шест взаимно свързани глави, които напълно съответстват на поставените цел и задачи на дисертационния труд.

В първата глава (5.1) са представени резултатите от изследванията върху кръстосваемостта между твърдата пшеница и представители на родовете *Aegilops*, *Triticum* и *Triticale*. Установено е, че степента на кръстосваемост зависи основно от броя на хомоложните геноми, нивото на пloidност, отсъствието на D-геном, структурните различия в основния пивотален геном А на дивите и културните пшеници и генотипа на родителските форми. Най-висока кръстосваемост е отчетена при видовете с АВ геном, а най-ниска – при видовете от род *Aegilops*, което е в съответствие с генетичната им отдалеченост. Особено ценни са резултатите, доказващи влиянието на майчиния генотип върху успешното получаване на хибриди, тъй като те имат непосредствено значение при планирането на бъдещи селекционни програми.

Във втора глава (5.2) са представени резултатите от оптимизирането на *in vitro* техники за преодоляване на ембрионалната несъвместимост при междувидова и междуродова хибридизация. Главата е логично структурирана в две подглави - оптимизиране на състава на хранителната среда и прилагане на метода на ембриоспасяване при кръстоски на *Triticum durum* с видове от родовете *Triticum*, *Aegilops* и със синтетичния вид *Triticale*.

Особено ценни са изследванията, свързани с оптимизирането на условията за *in vitro* култивиране на незрели ембриони. Чрез сравнителен анализ на модифицирана MS хранителна среда, съдържаща абсцисинова киселина (ABA), и среда Р8 е доказано предимството на модифицираната MS среда за развитието и диференцирането на незрелите ембриони. Потвърдено е също потискащото действие на ABA върху преждевременното прорастване на ембрионите и благоприятният ѝ ефект върху тяхното нормално развитие при *in vitro* условия.

Получените резултати показват значителни различия в честотата на образуване на хибридни ембриони и регенерирани растения при различните хибридни комбинации, както и ясно изразено влияние на генотипа на използваните форми твърда пшеница. Установен е сравнително нисък адаптационен потенциал на регенерираните растения, което още веднъж потвърждава сложността на отдалечената хибридизация и необходимостта от оптимизиране на отделните етапи на процеса.

За успеха на ембриоспасяването особено значение има установяването на оптималния срок за изолиране на незрелите ембриони – между 16-ия и 20-ия ден след опрашването, което осигурява най-добри условия за последващото им *in vitro* развитие и регенерация.

Считам, че резултатите, представени в тази глава, имат съществен научен и приложен принос. Разработените и оптимизирани *in vitro* подходи създават надеждна методична основа за повишаване ефективността на отдалечената хибридизация при твърдата пшеница и

разширяват възможностите за използване на генетични ресурси от диви и културни родствени видове в селекционната практика.

Следващата трета глава (5.3) също е структурирана в две подглави. В първата подглава е проследено развитието на F_1 хибридните растения, получени при кръстосване на *Triticum durum* с *Aegilops cylindrica* и *Aegilops umbellulata*, както и на последващите беккросни поколения. Установена е пълна стерилност при хибридите с *Aegilops cylindrica*, докато при кръстоските с *Aegilops umbellulata* са получени жизнеспособни растения с частична фертилност и BC_1 потомства с частично възстановена фертилност. Тези резултати имат особена практическа стойност, тъй като доказват възможността за интрогресия на ценни признаци от дивите видове в генома на твърдата пшеница.

Особено високо оценявам изследванията във втората подглава, свързани с морфологичния и цитологичния анализ на хибридите. Установени са закономерни нарушения в развитието на хибридните завръзи, като слабо развитие или липса на ендосперм, като убедително е показано, че степента на тези нарушения зависи от генетичната отдалеченост на използваните видове за родителски форми. Представени са надеждни морфологични и цитологични доказателства за хибридната природа на успешно адаптираните растения.

Задълбочено са анализирани основните причини за проявата на стерилитет, понижената жизненост и други аномалии, характерни за отдалечената хибридизация. Въз основа на извършените цитологични изследвания е проследено мейотичното поведение на хромозомите във F_1 и BC_1 потомствата и са изяснени механизмите, определящи проявата на стерилност и частичното възстановяване на фертилността. Наблюдаваните нарушения в микроспорогенезата са подробно документирани и убедително подкрепени със снимков материал.

Считам, че тази глава е сред най-стойностните на дисертационния труд. Получените резултати не само разширяват познанията за биологичните особености на междувидовите хибриди, но и имат съществено значение за разработването на ефективни стратегии за преодоляване на репродуктивните бариери и за успешното използване на отдалечената хибридизация в селекцията на твърдата пшеница.

Особено съществена част от дисертационния труд е глава 5.4, в която са представени резултатите от изследванията свързани с идентифицирането на пренос на генетичен материал в напреднали беккросни линии, получени чрез отдалечена хибридизация на твърда пшеница с представители на родовете *Triticum*, *Aegilops* и със синтетичния вид *Triticale*. Това е една от най-значимите глави на дисертацията, тъй като представя убедителни молекулярно-генетични доказателства за успешната интрогресия на чуждовидов генетичен материал.

Материалът е логично структуриран в седем подглави, в които последователно са анализирани различни комбинации от донорски генотипове и резултатите от приложените молекулярно-генетични анализи. За генотипиране са използвани 33 SSR маркера – 23 за A и B геномите и 10 за D генома, което осигурява надеждна основа за идентифициране на интрогресирани хроматинови участъци.

Получените резултати разкриват различна степен на интрогресия в зависимост от използвания донорски вид. Най-високи стойности са установени при *Triticum polonicum* и *Triticum dicoccum* сред тетраплоидните видове, както и при *Triticale* и *Triticum macha* сред хексаплоидните форми. Особено ценен резултат е установеното почти пълно заместване на хромозомата 7A на твърдата пшеница с хомеоложната хромозома от *Triticum macha*, което представлява убедително доказателство за успешен пренос на генетичен материал.

Значителен научен интерес представлява и идентифицирането на нови алели в част от беккросните линии, които не съответстват на алелите на родителските форми. Този резултат разширява познанията за генетичните промени, настъпващи при отдалечената

хибридизация, и открива перспективи за създаване на нов изходен материал с ценни селекционни качества.

Молекулярно-генетичните анализи са изпълнени прецизно, резултатите са убедително интерпретирани и подкрепени с подходящи таблици и фигури. Те демонстрират високото ниво на експерименталната работа и ефективното използване на съвременни молекулярни маркери за доказване на интрогресирани хроматинови участъци.

Оценявам тази глава като една от най-съществените научни части на дисертационния труд. Представените резултати не само доказват ефективността на отдалечената хибридизация като средство за разширяване на генетичното разнообразие при твърдата пшеница, но и предоставят надеждна научна основа за използване на получените линии в бъдещи селекционни програми. Именно тези изследвания формират един от най-значимите научни приноси на дисертацията.

В следващите две глави (5.5 и 5.6) са представени и интерпретирани резултатите от фенотипната оценка на напреднали беккросни линии и от оценката по добив и качество на селекционни линии, получени чрез отдалечена хибридизация с представители на родовете *Aegilops* и *Triticum*. Тези изследвания имат особено важно значение, тъй като дават реална оценка на селекционната стойност на получения изходен материал.

Докторантката е извършила задълбочено фенотипиране и комплексна оценка на получените беккросни потомства и напреднали селекционни линии. Самото създаване и последващо характеризиране на този ценен селекционен материал е убедително доказателство за успешното изпълнение на поставената цел и задачи и потвърждава ефективността на разработената методична схема. Получените резултати показват, че отдалечената хибридизация при *Triticum durum* е реална възможност за разширяване на генетичното разнообразие и за създаване на перспективен изходен материал за селекция на нови сортове с ценни стопански признаци.

Особено ценни са резултатите от статистическия анализ, които показват водещото значение на генотипа за формирането на основните качествени показатели, докато при добива генотипът и условията на средата оказват сравнително еднакво влияние. Тези резултати имат практическо значение при подбора на перспективни линии в селекционния процес.

Висока оценка заслужават и изследванията върху качеството на зърното. Чрез електрофоретичен анализ на γ -глиадиновия състав са идентифицирани линии с висока селекционна стойност, съчетаващи висока продуктивност и благоприятни показатели за качество. Особено внимание заслужава беккросната линия Д-232, при която са установени желаната γ -45 глиадинова фракция и НМГ-2 тип, свързани с добри хлебопекарни качества, което значително повишава практическата стойност на получения селекционен материал.

В обобщение считам, че дисертацията съдържа оригинални научни резултати с безспорно научно и приложно значение, които представляват съществен принос към изследванията върху използването на отдалечената хибридизация в селекцията на твърдата пшеница. Представените резултати убедително показват, че докторантката е овладяла и успешно е приложила широк спектър от класически и съвременни методи в селекцията, цитогенетиката, биотехнологиите и молекулярната генетика, което е позволило решаването на поставените научни задачи и получаването на резултати с висока теоретична и практическа стойност.

8. Приноси на дисертационния труд. Резултатите от проведените изследвания са обобщени в 11 извода, които са формулирани ясно, кратко и информативно. Те обективно отразяват основните резултати от експерименталната работа и направените анализи. Приемам всички научни и научно-приложни приноси на докторантката, чрез които са получени нови научни данни и е обогатена информацията относно възможностите за

използване на генетичния потенциал на отдалечени видове от родовете *Aegilops* и *Triticum*, както и на *Triticale*, за генетично и селекционно подобряване на твърдата пшеница. Като най-съществени могат да бъдат открити следните

ПРИНОСИ:

Приноси с научно-теоретичен характер:

- ✓ Получена е нова информация относно кръстосваемостта на твърдата пшеница с широк набор от отдалечени и родствено близки видове от родовете *Aegilops*, *Triticum* и *Triticale*, както и относно възможностите за получаване на F₁ хибридни растения чрез прилагане на метода на *in vitro* ембриоспасяването.
- ✓ Оптимизирани са основни етапи от технологията за *in vitro* ембриоспасяване, което повишава ефективността на получаването на хибридни растения при преодоляване на ембрионалната несъвместимост.
- ✓ Установени и характеризирани са нарушенията в протичането на микроспорогенезата, обуславящи проявата на частична или пълна стерилност при хибридните растения, получени от кръстоските на твърда пшеница с *Aegilops umbellulata* и *Aegilops cylindrica*.
- ✓ Доказана е приложимостта на SSR и ISSR молекулярните маркери за установяване на генетичен полиморфизъм и за идентифициране на интрогресиран генетичен материал при отдалечена хибридизация на твърдата пшеница.
- ✓ Доказано е, че използваната беккросна стратегия е ефективен подход за въвеждане на нови алели от отдалечени видове в генома на твърдата пшеница при запазване на ценни агрономични характеристики.

Приноси с научно-приложен характер:

- ✓ Разработени са и са оптимизирани протоколи за *in vitro* ембриоспасяване при твърда пшеница, позволяващи по-ефективно преодоляване на репродуктивните бариери при отдалечена хибридизация.
- ✓ Създадени са нови селекционни линии твърда пшеница чрез прилагане на отдалечена хибридизация и беккросна стратегия. Полученият изходен материал разширява генетичното разнообразие на вида по отношение на важни агрономически признаци и представлява ценен ресурс за бъдещи селекционни програми.
- ✓ Идентифицирани са перспективни беккросни линии, получени чрез участие на *Triticum dicoccum*, *Triticum polonicum* и *Triticum macha*, характеризиращи се с благоприятно съчетание на признаци, свързани с продуктивността на класа и качеството на зърното, и с потенциал да бъдат признати за нови сортове.

9. Личен принос на докторантката. Разработеният дисертационен труд е основан на резултати от собствени научни изследвания на докторантката. Тя е участвала активно във всички основни етапи на разработката. Използваните в дисертацията литературни данни и резултати от други автори са коректно цитирани в текста и са надлежно представени в списъка с използвана литература. Анализът и обсъждането на получените резултати показват способност на докторантката самостоятелно да оценява научната информация, да прави обосновани заключения и да определя значението на получените резултати за теорията и практическата селекция. Считам, че личният принос на докторантката в разработването на дисертационния труд е съществен и безспорен, като обхваща както експерименталната работа, така и научната интерпретация на получените резултати, изводи и приноси.

10. Критични бележки и въпроси. Нямам съществени критични бележки и въпроси към дисертационния труд. Считам, че поставената цел е напълно постигната, а получените

результати са убедително анализирани, обосновани и представени на високо научно ниво. Бих отправила единствено препоръка към докторантката да се възползва от възможностите, които предоставя програмата „Еразъм+“, за краткосрочни специализации и научна мобилност в утвърдени чуждестранни научни центрове. Това би допринесло за по-нататъшното ѝ професионално развитие, разширяване на научните контакти и усвояване на нови методологични подходи в областта на селекцията и молекулярната генетика на пшеницата.

11. Публикувани статии и цитирания. Във връзка с дисертационния труд са публикувани три научни статии: една в списание *“Растениевъдни науки”*, една в *“Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special”* и една във *“Field Crops Studies”*. Една от публикациите е с двама автори, а останалите две – с трима автори. Докторантката е първи автор в две от публикациите, което ясно показва водещото ѝ участие в разработването на изследванията, анализа и представянето на получените резултати. В една от публикациите тя е трети автор. Научната продукция, свързана с дисертационния труд, съответства на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“. Общият брой точки от публикационната дейност е 33 при изискуем минимум 30 точки.

Представеният автореферат обективно отразява структурата, съдържанието и основните резултати от дисертационния труд.

Дисертационният труд представлява добре планирано, комплексно и успешно реализирано научно изследване. Докторантката се е справила успешно с поставената цел и формулираните задачи. При разработването на дисертационния труда тя демонстрира задълбочени познания върху състоянието на изследвания проблем, добро владение на съвременни методи на изследване и способност за самостоятелен анализ, интерпретация и обобщаване на експерименталните резултати. Компетентното използване на специализираната терминология и научния стил на представяне допълнително потвърждават нейната подготовка като изграден изследовател.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на извършената изследователска работа, използваните и успешно приложени от докторантката съвременни методи и подходи, правилно планираните и проведени експерименти, както и на получените оригинални резултати, направените обобщения, изводи и формулираните научни и научно-приложни приноси, считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника на ССА за неговото приложение.

Дисертационният труд представлява цялостно, задълбочено и успешно реализирано научно изследване с висока научна и приложна стойност. В него са получени значими резултати относно възможностите за използване на отдалечената хибридизация за разширяване на генетичното разнообразие и генетично-селекционно подобряване на твърдата пшеница.

Това ми дава основание да оценя дисертационния труд **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Предлагам на почитаемото Научно жури също да даде положителна оценка и да присъди на ас. Боряна Петрова Хаджииванова образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения“, в професионално направление 6.1. Растениевъдство.

Дата: 30.08. 2026 г.
гр. Чирпан

РЕЦЕНЗЕНТ:.....
(проф. дн Ана Стоилова)

REVIEW

of the dissertation submitted for the award of the educational and scientific degree of Doctor in the scientific specialty "Breeding and Seed Production of Cultivated Plants", Professional Field 6.1 Crop Production

Dissertation author. Assistant Boryana Petrova Hadzhiivanova, PhD candidate in independent study at the Field Crops Institute – Chirpan.

Dissertation title: "Studies on the Use of Distant Hybridization in the Breeding of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.)"

Reviewer: Prof. Ana Stoilova Saldzhieva, DSc, 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 Chairman of the Agricultural Academy – Sofia, Prof. Dr. Stefan Gandeov.

1. Brief Introduction of the Candidate. Boryana Petrova Hadzhiivanova was born on 8 July 1974. In 1998, she graduated from the Higher Agricultural Institute (now the Agricultural University) in Plovdiv with a Master's degree in Agroengineering – Plant Protection, qualifying as an Agricultural Engineer (Agronomist). From February 2004 to October 2016, she held the academic position of Assistant at the Field Crops Institute – Chirpan, where she participated in research on the genetics and breeding of durum wheat and cotton. Between November 2017 and January 2022, she worked as a Laboratory Assistant and Quality Control Technician at Mlin-97 AD, Razgrad. In this position, she carried out physicochemical and organoleptic analyses of grain, milling products, and flour, thereby expanding her expertise in the assessment of grain quality. Since April 2023, Assistant Boryana Hadzhiivanova has once again held the academic position of Assistant at the Field Crops Institute – Chirpan.

By Order No RD-05-137/19.05.2025 of the Chairman of the Agricultural Academy, Assistant Boryana Petrova Hadzhiivanova was admitted to independent doctoral study in the doctoral program "Breeding and Seed Production of Cultivated Plants", Professional Field 6.1 Crop Production, at the Field Crops Institute – Chirpan. Her dissertation is entitled "*Studies on the Use of Distant Hybridization in the Breeding of Durum Wheat (Triticum durum* Desf.)". The scientific supervisors are Prof. Dr. Violeta Bozhanova (Field Crops Institute – Chirpan) and Prof. Dr. Elena Todorovska (Agrobiointstitute – Sofia).

During her doctoral studies, the candidate successfully fulfilled all requirements of her Individual Study Plan. She passed the doctoral examinations in "Breeding and Seed Production of Cultivated Plants" and "Plant Biotechnologies" with an overall grade of Excellent (6.00). Having successfully completed the doctoral training program and fulfilled all requirements of the Individual Study Plan, she was granted the right to publicly defend her dissertation by Order No RD-05-47/23.03.2026 by the Chairman of the Agricultural Academy.

The scientific interests of Assistant Boryana Hadzhiivanova are focused on the genetics and breeding of cereal crops, plant biotechnology, cytological analyses, and methods for evaluating grain quality. Her research activities are primarily directed toward the use of distant hybridization in durum wheat breeding, as well as the application of modern biotechnological approaches, including molecular markers and biochemical methods for the characterization of breeding material. She has participated in four completed and one ongoing research projects funded by the Agricultural Academy, focusing on the breeding and genetic improvement of durum wheat and cotton, as well as the development of new durum wheat cultivars.

Assistant Boryana Hadzhiivanova has 15 years of research experience and 10 scientific publications. She is an organized, responsible, and dedicated researcher who continuously

enhances her professional qualifications through participation in training courses and specialized professional programs. She has a good command of English (B1 level, both written and spoken) and possesses strong computer skills, including proficiency in MS Office applications (Word, Excel, and PowerPoint) and the statistical software package Statistica 13.

2. Relevance of the Research Topic. Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) is an economically important cereal crop owing to the high nutritional and technological quality of its grain. It is the principal raw material for pasta production and cannot be fully replaced by other wheat species. Bulgaria has a long-standing tradition in the cultivation and breeding of durum wheat. Contemporary breeding programs are focused on the development of high-yielding, stable cultivars with superior grain quality that meet the requirements of both producers and the market. However, the intensive use of a limited number of cultivars in production and of parental forms with similar genetic structure created mainly through intervarietal hybridization in breeding programmes has resulted in a narrowing of the crop's genetic diversity, thereby limiting the opportunities for its further genetic improvement.

In this context, distant hybridization represents an effective approach for broadening the genetic base of durum wheat through the introgression of valuable genes from related and wild species. Despite the technical challenges and the longer breeding process associated with this approach, distant hybridization remains an important tool for the genetic improvement of cultivated plants.

The dissertation topic is highly relevant and timely, as it addresses the potential for developing interspecific and intergeneric hybrids between *Triticum durum* and distantly related species within the family *Poaceae*, while also investigating the transfer of alien genetic material through the application of modern biochemical, molecular, and cytological methods. The research topic is well justified by the doctoral candidate and is of considerable scientific and practical significance.

3. General Description of the Dissertation and the Accompanying Materials. The structure and overall length of the dissertation comply with the requirements of the Regulations for the Implementation of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria at the Agricultural Academy. The dissertation comprises 190 standard pages and includes the following mandatory sections: Introduction (2 pages), Literature Review (36 pages), Aim and Objectives (2 pages), Materials and Methods (17 pages), Results and Discussion (100 pages), Conclusions (3 pages), Scientific Contributions (2 pages), and References (28 pages). A list of the Scientific Publications Related to the Dissertation is presented on one page. The dissertation also contains a Table of Contents (2 pages) and a list of Abbreviations and Symbols Used (1 unnumbered page).

4. Knowledge of the State of the Art. A comprehensive review of the relevant national and international scientific literature has been conducted, providing a thorough overview of both the achievements to date and the unresolved issues related to the dissertation topic. The bibliography comprises 394 references, including 25 publications in Cyrillic and 369 in Latin script. A substantial proportion of the cited sources (105) have been published within the last ten years, demonstrating that the review is based on current scientific knowledge.

The literature review is well structured and organized into thematic sections covering all major aspects of the research topic. Particular attention is paid to the challenges associated with distant hybridization and the approaches used to overcome them, as well as to the methods employed for detecting the transfer of alien genetic material into the genome of durum wheat. The thorough examination of these issues has provided the doctoral candidate with a solid theoretical foundation, enabling her to critically evaluate the available information and apply it effectively in her own research.

The literature review reflects the current state of knowledge in the field and demonstrates the doctoral candidate's excellent familiarity with the scientific issues addressed in the dissertation. This has enabled her to identify existing knowledge gaps and to formulate a clear research aim together with appropriate research objectives.

5. Aim, Objectives, and Research Methods. The doctoral candidate has clearly and appropriately formulated the main aim of the research, namely: to investigate the potential for obtaining interspecific and intergeneric hybrids between durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and distantly related species of the family *Poaceae*, and to identify the transfer of alien genetic material through phenotypic, cytological, and molecular approaches.

To achieve this aim, six specific research objectives have been defined. These are logically structured and fully consistent with the scope and subject of the study. Their implementation involved the application of modern research methods and experimental approaches appropriate to the stated objectives.

The plant material used is representative and has been carefully selected. Accessions from the genera *Aegilops*, *Triticum*, and triticale were used as paternal parents in the interspecific and intergeneric crosses, while Bulgarian and foreign durum wheat cultivars, together with promising breeding lines, served as maternal parents. Hybridization was carried out under both field conditions and in an unheated greenhouse.

Particular attention was devoted to the optimization of in vitro techniques for overcoming embryo incompatibility associated with distant hybridization. The identification of alien genetic material transfer was based on an integrated approach combining phenotypic, cytological, and molecular analyses, thereby increasing the reliability of the obtained results.

The breeding strategy developed within the study included the phenotypic evaluation of advanced backcross lines derived from crosses between *Triticum durum* and representatives of the genera *Triticum* and *Aegilops*, as well as the assessment of advanced breeding lines using the principal agronomic and grain quality traits. Throughout the study, a comprehensive evaluation of numerous morphological, biological, agronomic, and quality characteristics was conducted.

The experimental data were analysed using appropriate contemporary statistical methods, including two-way analysis of variance (ANOVA) to evaluate genotypic differences and the effects of the studied factors, followed by Duncan's multiple range test to determine the statistical significance of the observed differences. Statistical analyses were performed using the Statistica 13.0 software package (TIBCO Software, 2018).

In conclusion, the methodological framework of the dissertation is well designed, logically structured, and fully aligned with the stated research aim and objectives. The selected experimental approaches and analytical methods provide a sound basis for obtaining reliable scientific results and for drawing well-supported conclusions.

6. Presentation and Visualization of the Research Results. The dissertation contains extensive and convincing experimental material, presented through 28 tables, 10 figures, and 11 high-quality photographs. The research results are presented clearly, systematically, and in a manner that facilitates their interpretation.

The dissertation is written in precise scientific language and follows a clear analytical style. Its presentation is logically structured and professionally organized. The tables, figures, and photographs are informative, well designed, and appropriately selected, effectively complementing the text without unnecessarily overloading it.

The overall layout and organization of the dissertation are of a high standard, enabling the reader to follow the research process with ease and to understand and evaluate the conclusions drawn.

7. Analysis and Evaluation of the Research Results. The dissertation is based on extensive, long-term experimental research characterized by an integrated approach and the application of modern analytical methods. The obtained results include a number of original scientific findings and possess both fundamental and practical significance.

The results obtained from the conducted research are presented objectively, analyzed in depth, and interpreted competently. They contribute to the existing knowledge regarding the application of distant hybridization in durum wheat breeding and provide substantial new scientific information with a clearly expressed practical orientation. In the discussion of the results, the doctoral candidate appropriately compares her findings with those reported by leading Bulgarian and international researchers, demonstrating excellent knowledge of the current state of the art and the ability to critically interpret the obtained data.

Each section of the dissertation concludes with clearly formulated statements, facilitating the understanding of the scientific rationale and supporting the formulation of well-founded general conclusions and contributions.

The results are presented and summarized in six interrelated chapters, which fully correspond to the aim and objectives of the dissertation.

The first chapter (5.1) presents the results of investigations on the crossability between durum wheat and representatives of the genera *Aegilops*, *Triticum*, and *Triticale*. It was established that the degree of crossability depends mainly on genomic relatedness (genome homology), ploidy level, and the genotype of the parental forms. The highest crossability was observed in species possessing the AB genome, whereas the lowest was recorded in species of the genus *Aegilops*, which corresponds to their greater genetic distance. Particularly valuable are the results demonstrating the influence of the maternal genotype on the successful production of hybrids, as they have direct practical implications for the planning of future breeding programs.

The second chapter (5.2) presents the results obtained from the optimization of *in vitro* techniques for overcoming embryo incompatibility in interspecific and intergeneric hybridization. The chapter is logically structured into two subchapters focusing on the optimization of the culture medium and the application of embryo rescue techniques in crosses between *Triticum durum* and representatives of the genera *Triticum*, *Aegilops*, and the synthetic species *triticale*.

Of particular value are the studies related to the optimization of conditions for the *in vitro* cultivation of immature embryos. Through comparative analysis of a modified MS medium supplemented with abscisic acid (ABA) and P8 medium, the advantages of the modified MS medium for the development and differentiation of immature embryos were demonstrated. The inhibitory effect of ABA on premature embryo germination, as well as its beneficial role in promoting normal embryo development under *in vitro* conditions, was also confirmed.

The obtained results revealed significant differences in the frequency of hybrid embryo formation and regenerated plant production among the different hybrid combinations, as well as a pronounced influence of the genotype of the durum wheat parental forms used. A relatively low adaptation capacity of regenerated plants was established, further confirming the complexity of distant hybridization and the need for optimization of the individual stages of the process.

For the successful application of embryo rescue techniques, determining the optimal time for immature embryo isolation is of particular importance. The period between the 16th and 20th day after pollination was identified as providing the most favorable conditions for subsequent *in vitro* development and plant regeneration.

In my opinion, the results presented in this chapter represent a significant scientific and practical contribution. The developed and optimized *in vitro* approaches provide a reliable methodological foundation for increasing the efficiency of distant hybridization in durum wheat and broaden the

possibilities for utilizing genetic resources from wild and cultivated related species in breeding practice.

The following third chapter (5.3) is also structured into two subchapters and focuses on the development of F_1 hybrids and subsequent backcross generations, as well as on the morphological and cytological characterization of the obtained hybrids.

The first subchapter follows the development of F_1 hybrid plants obtained from crosses between *Triticum durum* and *Aegilops cylindrica* and *Aegilops umbellulata*, together with the subsequent backcross generations. Complete sterility was observed in the hybrids involving *Aegilops cylindrica*, whereas crosses with *Aegilops umbellulata* resulted in viable plants with partial fertility and BC_1 progenies with partially restored fertility. These results are of particular practical significance, as they demonstrate the possibility of introgressing valuable traits from wild species into the genome of durum wheat.

I particularly appreciate the investigations related to the morphological and cytological characterization of the hybrids. Specific patterns in the development of hybrid progenies have been established, including poor development or absence of endosperm, and it has been convincingly demonstrated that the extent of these abnormalities is determined by the genetic distance of the species used for parental forms. Reliable morphological and cytological evidence confirming the hybrid nature of successfully established and adapted plants has been provided.

The main factors responsible for sterility, reduced viability, and other abnormalities typical of distant hybridization have been thoroughly analyzed. Based on the cytological investigations, the meiotic behavior of chromosomes in F_1 and BC_1 progenies was examined, allowing clarification of the mechanisms underlying sterility expression and partial fertility restoration. The abnormalities observed during microsporogenesis have been documented in detail and convincingly supported by photographic evidence.

In my opinion, this chapter represents one of the most valuable sections of the dissertation. The results obtained not only contribute to a better understanding of the biological characteristics of interspecific hybrids but also have significant importance for developing effective strategies to overcome reproductive barriers and for the successful application of distant hybridization in durum wheat breeding.

A particularly important part of the dissertation is Chapter 5.4, which presents the results of research related to the identification of genetic material transfer in advanced backcross lines obtained through distant hybridization of durum wheat with representatives of the genera *Triticum* and *Aegilops*, as well as with the synthetic species triticale. In my opinion, this is one of the most significant chapters of the dissertation, as it provides convincing molecular genetic evidence for the successful introgression of alien genetic material.

The chapter is logically structured into seven subchapters, in which the different donor genotypes and the derived backcross lines are analyzed sequentially. Genotyping was performed using 33 SSR markers, including 23 markers for the A and B genomes and 10 markers for the D genome, providing a reliable basis for the identification of introgressed chromosomal regions.

The results obtained demonstrate different levels of introgression depending on the donor species involved. The highest values were observed in *Triticum polonicum* and *Triticum dicoccum* among the tetraploid species, as well as in triticale and *Triticum macha* among the hexaploid forms. A particularly valuable finding is the almost complete replacement of durum wheat chromosome 7A with the corresponding homeologous chromosome from *Triticum macha*, which provides convincing evidence of successful genetic material transfer.

Of considerable scientific interest is also the identification of new alleles in some of the backcross lines that do not correspond to the alleles detected in the parental forms. This finding

contributes to a better understanding of the genetic changes occurring during distant hybridization and opens new opportunities for the development of breeding material with valuable agronomic traits.

The molecular genetic analyses have been performed with high precision, and the results are convincingly interpreted and supported by appropriate tables and figures. They demonstrate the high quality of the experimental work and the effective application of modern molecular markers for the detection and characterization of introgressed chromosomal regions.

I consider this chapter to represent one of the most significant scientific contributions of the dissertation. The presented results not only confirm the effectiveness of distant hybridization as a tool for expanding the genetic diversity of durum wheat but also provide a reliable scientific foundation for the practical utilization of the obtained lines in future breeding programs. These studies constitute one of the major scientific contributions of the dissertation.

The following two chapters (5.5 and 5.6) are devoted to the phenotypic evaluation of advanced backcross lines and to the yield and quality assessment of breeding lines obtained through distant hybridization with representatives of the genera *Aegilops* and *Triticum*. These studies are of particular importance, as they provide a practical assessment of the breeding value of the developed genetic material.

The doctoral candidate has performed comprehensive phenotyping and a complex evaluation of the obtained backcross progenies and advanced breeding lines. The development and subsequent characterization of this valuable breeding material provide convincing evidence for the successful achievement of the research aim and objectives and confirm the effectiveness of the proposed methodological approach. The results obtained demonstrate that distant hybridization in *Triticum durum* represents an effective strategy for broadening genetic diversity and developing promising source material for the breeding of new cultivars with valuable agronomic traits.

Of particular value are the results of the statistical analyses, which demonstrate the predominant effect of genotype on the formation of the main grain quality traits, while yield formation is influenced to a relatively similar extent by both genotype and environmental conditions. These findings have direct practical relevance for the selection of promising lines within breeding programmes.

The studies on grain quality also deserve high appreciation. Through electrophoretic analysis of the γ -gliadin composition, lines with high breeding potential have been identified, combining high productivity with favorable quality characteristics. Special attention should be given to the backcross line D-232, in which the desirable γ -45 gliadin fraction and the NMG-2 type, associated with good baking quality, were identified. This finding substantially increases the practical value of the developed breeding material.

In summary, I consider that the dissertation contains original scientific findings of undeniable scientific and practical significance, representing a substantial contribution to research on the use of distant hybridization in durum wheat breeding.

The presented results convincingly demonstrate that the doctoral candidate has mastered and successfully applied a broad range of classical and modern approaches in plant breeding, cytogenetics, biotechnology, and molecular genetics. This has enabled the successful completion of the formulated research objectives and the generation of results with high theoretical and practical value.

8. Contributions of the Dissertation. The results of the conducted research are summarized in 11 conclusions, which are clearly, concisely, and informatively formulated. They objectively reflect the main findings of the experimental work and the analyses performed. I fully accept the scientific and applied scientific contributions of the doctoral candidate, through which new

scientific knowledge has been generated and existing information has been expanded regarding the possibilities for utilizing the genetic potential of distant species from the genera *Aegilops* and *Triticum*, as well as triticale, for the genetic improvement and breeding of durum wheat. The most significant contributions can be summarized as follows:

Scientific and theoretical contributions:

- ✓ New knowledge has been obtained regarding the crossability of durum wheat with a wide range of related and distant species from the genera *Aegilops*, *Triticum*, and *triticale*, as well as regarding the possibilities for obtaining F₁ hybrid plants through the application of the *in vitro* embryo rescue technique.
- ✓ Key stages of the *in vitro* embryo rescue technology have been optimized, resulting in increased efficiency in the production of hybrid plants through overcoming embryo incompatibility.
- ✓ The abnormalities occurring during microsporogenesis that determine partial or complete sterility in hybrid plants obtained from crosses between durum wheat and *Aegilops umbellulata* and *Aegilops cylindrica* have been identified and characterized.
- ✓ The applicability of SSR and ISSR molecular markers for assessing genetic polymorphism and identifying introgressed genetic material in distant hybridization of durum wheat has been demonstrated.
- ✓ The applied backcross strategy has been proven to be an effective approach for the introgression of new alleles from distant species into the durum wheat genome while maintaining valuable agronomic traits.

Scientific and Applied Contributions:

- ✓ Protocols for *in vitro* embryo rescue in durum wheat have been developed and optimized, enabling more effective overcoming of reproductive barriers in distant hybridization.
- ✓ New durum wheat breeding lines have been developed through the application of distant hybridization and backcrossing strategies. The resulting breeding material broadens the genetic diversity of the species with respect to important agronomic traits and represents a valuable resource for future breeding programs.
- ✓ Promising backcross lines involving *Triticum dicoccum*, *Triticum polonicum*, and *Triticum macha* have been identified and characterized. These lines combine favorable traits related to spike productivity and grain quality and possess potential for future release as new cultivars.

9. Personal Contribution of the Doctoral Candidate. The dissertation is the original work of the doctoral candidate and is based on the results of her own scientific research. She has actively participated in all major stages of the research process, including the planning and implementation of experiments, the development and evaluation of hybrid material, the analysis and interpretation of the obtained results, as well as the formulation of conclusions and scientific contributions. The literature sources and research findings of other authors cited in the dissertation are appropriately referenced in the text and correctly presented in the reference list. The analysis and discussion of the obtained results demonstrate the doctoral candidate's ability to independently evaluate scientific information, draw well-founded conclusions, and assess the significance of the results obtained for both the theory and practice of plant breeding. I consider the personal contribution of the doctoral candidate to the development of the dissertation to be substantial and indisputable, encompassing both the experimental research and the scientific interpretation of the obtained results.

10. Critical Remarks and Questions. I have no significant critical remarks or questions regarding the dissertation. I consider that the stated aim has been fully achieved and that the obtained results have been convincingly analyzed, scientifically substantiated, and presented at a high academic level. I would only recommend that the doctoral candidate make use of the opportunities provided by the *Erasmus+* Program for short-term research specializations and scientific mobility at established international research institutions. Such activities would contribute to her further professional development, expansion of scientific collaborations, and acquisition of new methodological approaches in the fields of wheat breeding and molecular genetics.

11. Publications Related to the Dissertation and Citations. Three scientific articles related to the dissertation have been published: one in the journal *Plant Sciences*, one in the *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue*, and one in *Field Crops Studies*. One of the publications has two authors, while the other two have three authors each. The doctoral candidate is the first author of two of the publications, which clearly demonstrates her leading contribution to the development of the research, analysis of the results, and preparation of the manuscripts. In one publication, she is the third author. The scientific output related to the dissertation meets the requirements for awarding the educational and scientific degree Doctor. The total number of points achieved from the publication activity is 33, exceeding the required minimum of 30 points.

The presented abstract of the dissertation objectively reflects its structure, content, and main scientific results.

The dissertation represents a well-designed, comprehensive, and successfully completed research study. The doctoral candidate has successfully achieved the stated aim and fulfilled the formulated objectives. In the development of the dissertation, she has demonstrated in-depth knowledge of the current state of the research field, a good command of modern research methodologies, and the ability to independently analyze, interpret, and summarize experimental results. The competent use of specialized scientific terminology and the high academic standard of presentation further confirm her qualification as an accomplished researcher.

CONCLUSION

Based on the research conducted, the modern methods and approaches successfully applied by the doctoral candidate, the well-planned and properly executed experiments, the original results obtained, the scientifically substantiated generalizations and conclusions, and the formulated scientific and applied contributions, I consider that the presented dissertation meets the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its implementation at the Agricultural Academy.

The dissertation represents a comprehensive, in-depth, and successfully completed scientific study of significant scientific and practical value. It provides substantial results regarding the possibilities of applying distant hybridization for broadening the genetic diversity and for the genetic improvement and breeding of durum wheat.

Based on the above, I give a POSITIVE evaluation of the dissertation.

I recommend that the esteemed Scientific Jury also give a positive evaluation and award Assistant Boryana Petrova Hadzhiivanova the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Breeding and Seed Production of Cultivated Plants", Professional Field 6.1 Crop Production.

Date: 30.08. 2026
Town of Chirpan

REVIEWER: .....
(Prof. Ana Stoilova DSc)