



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Ana
Couso Viana

Tese de doutoramento

Estudo da capacidade
reprodutiva e aplicación de
técnicas biotecnolóxicas para a
conservación e restauración da
especie endémica en perigo
Centaurea ultreiae Silva-Pando

Lugo, 2024

TESE DE DOUTORAMENTO

**Estudo da capacidade
reprodutiva e aplicación de
técnicas biotecnolóxicas para a
conservación e restauración da
especie endémica en perigo
Centaurea ultreiae Silva-Pando**

Autora

Ana Couso Viana

Directores: Juan Luis Fernández Lorenzo e Antonio Rigueiro Rodríguez

Titor: Juan Luis Fernández Lorenzo

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN AGRARIA E FORESTAL

LUGO

Para Antón

Agradecementos

En primeiro lugar quero poñer en valor o apoio no plano persoal e no profesional dos meus directores, Juan Luis e Antonio. Pola axuda na concepción, deseño e análise dos experimentos e nas labores de corrección deste manuscrito. Esta tese non tería saído adiante sen vós: grazas.

Agradecer á empresa Greenalia o seu apoio económico, que me permitiu desfrutar dun contrato mentres realizaba os traballos desta tese. Tamén a Javier Silva Pando, por ensinarme a identificar a especie e asistirme en todas as dúbidas relativas aos traballos en campo.

A Juan Luis, o meu titor, gracias por axudarme a superar estes anos, por axudarme a volver a ser eu.

A Noelia, por estar sempre disposta a escoitar e por axudarme a realizar moitos dos experimentos que aparecen recollidos neste traballo. A Lara, a miña primeira alumna. A todas as estudantes que pasaron polo laboratorio. Ao persoal técnico e ao profesorado que traballa na Escola. Para min tería sido imposible superar estes anos sen vós.

A miña rede de apoio, Clara, Mara, Mónica, Helga, Silvia, Irene, Thaís. Grazas por estar. Á toda a xente que me axudou nestes anos que non está aquí mencionada. A Ero, por estar ao meu carón en todas as circunstancias, por consolarme incansablemente durante todos estes anos. Por quererme tanto. Gracias.

A miña familia por que sen eles non son nada. A miña nai, por axudarme a chegar ata aquí a pesar das circunstancias. A Mateo e Andrés, por apoiarnos entre nós e por estar sempre que vos necesito. A miña irmá Sabela, por estar. A miña tía Cris que nos recolleu cando máis o necesitábamos. Ao meu tío Moi, seu polo apoio incondicional. Ao meu irmán Antón, que sei que estarías moi orgulloso de min.

Resumo

Centaurea ultreiae Silva-Pando (familia Asteraceae) é unha planta endémica en perigo de extinción que habita o afloramento de rochas ultrabásicas que aparece na área do Monte Castelo (A Coruña). Trátase dunha especie perenne, acaule, cuxas follas se dispoñen conformando unha roseta basal, que se propaga vexetativamente vía rizomas. Presenta inflorescencias en capítulo formadas por flores hermafroditas, de amarelas a alaranxadas, que aparecen durante a primavera. Frutifica en verán, producindo unha infrutescencia que porta aquenios.

O proxecto de construción do Parque Eólico de Bustelo, que afecta parte da limitada área de distribución da especie, inclúe o “Plan e Programa de Reforzo das Poboacións da especie *Centaurea ultreiae* Silva-Pando no ámbito de ocupación do proxecto do Parque Eólico de Bustelo”, dentro do que se encadra esta tese de doutoramento.

Os obxectivos desta tese consistiron en avaliar o éxito reprodutivo de *C. ultreiae*, a súa viabilidade e a súa capacidade xerminativa, establecer coleccións de propágulos vexetativos en condicións *in vitro* derivados de material adulto e xuvenil, e desenvolver un protocolo eficiente e aplicable a diferentes xenotipos, que permita producir plantas completas mediante micropropagación para o seu uso en reintroducións.

Os resultados dos ensaios de avaliación do éxito reprodutivo indican que a especie presenta baixas taxas de frutificación (~9% de aquenios con aspecto de viables), dos que un 70% son viables segundo o test de tetrazolio (Tz). Determinouse que a tinguidura con Tz ao 0,1% proporciona resultados fiables tomando como referencia os resultados obtidos nas probas de xerminación. Determinouse así mesmo que os aquenios de *C. ultreiae* presentan letargo, que pode romperse mediante un tratamento de choque térmico en estufa a 60°C durante 5 min e posterior retirada das cubertas, proporcionando porcentaxes de xerminación *in vivo* superiores ao 90%. A xerminación *in vitro* pode levarse a cabo mediante a realización dun protocolo de desinfección superficial (15 min 4% de NaClO).

Nas probas de establecemento *in vitro* foi posible establecer cinco clons adultos e nove clons xuvenís representativos de tres localidades, a partir de organoxénese de fragmentos de folla no primeiro caso e por xerminación no segundo caso. A citoquinina thidiazurón (TDZ) foi máis eficiente que 6-benzilaminopurina (BAP) na indución da formación de brotes adventicios.

No que respecta á capacidade de multiplicación dos brotes, con independencia do tipo de clon, estes poden multiplicarse de forma óptima a partir de xemas axilares, mediante cultivo en medio MS suplementado con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, producindo máis 3 brotes por explanto. A fonte de luz empregada na multiplicación afectou á produción de brotes e á concentración de pigmentos fotosintéticos, acadando ambas variables os valores máximos en brotes que medraban baixo iluminación branca, fluorescente ou LED, cunha temperatura de cor de 6500°K , en comparación coas outras cinco fontes de luz ensaiadas. Os brotes poden ser conservados sen subcultivar durante seis meses a 8°C , recuperando a súa capacidade de multiplicación en 3 subcultivos consecutivos en condicións estándar. Nos ensaios de multiplicación observouse floración espontánea nun dos clons establecidos. Experimentos deseñados para reproducir o fenómeno de floración en condicións controladas, variando fotoperíodos, sometendo aos brotes a períodos de frío ou engadindo ao medio ácido xiberélico, foron infructuosos.

O enraizamento en medio con AIB ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) foi eficiente en todos os clons, acadándose valores medios dun 70% na porcentaxe de enraizamento. Na aclimatación, a porcentaxe de supervivencia dos brotes enraizados acadou valores cercanos ao 100% tras realizar unha preaclimatación en cámara de cultivo seguida da transferencia das plantas a condicións de invernadoiro.

Os protocolos de conservación e produción de planta desenvolvidos neste traballo poden ser utilizados en programas de conservación e reintrodución da especie endémica protexida *C. ultreiae*.

Resumen

Centaurea ultreiae Silva-Pando (familia *Asteraceae*) es una planta endémica en peligro de extinción que habita un afloramiento de rocas ultrabásicas que aparece en el área de Monte Castelo (A Coruña). Se trata de una especie perenne, acaule, cuyas hojas se disponen formando una roseta basal, que se propaga vegetativamente por rizomas. Presenta inflorescencias en capítulo formadas por flores hermafroditas, de amarillas a anaranjadas, que aparecen durante la primavera. Fructifica en verano, produciendo una infrutescencia que porta aquenios.

El proyecto de construcción del Parque Eólico de Bustelo, que afecta a parte de la limitada área de distribución de la especie, incluye el “Plan y programa de refuerzo de las poblaciones de la especie *Centaurea ultreiae* Silva-Pando en el ámbito de ocupación del proyecto del Parque Eólico de Bustelo”, en el que se encuadra esta tesis doctoral.

Los objetivos de esta tesis consistieron en evaluar el éxito reproductivo de *C. ultreiae*, su viabilidad y capacidad germinativa, establecer colecciones de propágulos vegetativos en condiciones *in vitro* derivados de material adulto y juvenil, y desarrollar un protocolo eficiente y aplicable a diferentes genotipos, que permita producir plantas completas mediante micropropagación para su uso en reintroducciones.

Los resultados de los ensayos de evaluación del éxito reproductivo indican que la especie presenta bajas tasas de fructificación (~9% de aquenios con aspecto de viables), de los que un 70% son viables según la prueba del tetrazolio (Tz). Se determinó que la tinción con Tz al 0,1% proporciona resultados fiables tomando como referencia los resultados obtenidos en las pruebas de germinación. Así mismo, se determinó que los aquenios de *C. ultreiae* presentan letargo, que puede romperse mediante un tratamiento de choque térmico en estufa a 60°C durante 5 min y posterior retirada de las cubiertas, proporcionando porcentajes de germinación superiores al 90%. La germinación *in vitro* puede llevarse a cabo mediante la realización de un protocolo de desinfección superficial (15 min 4% de NaClO).

En las pruebas de establecimiento *in vitro* fue posible establecer cinco clones adultos y nueve clones juveniles representativos de tres localidades, a partir de organogénesis de fragmentos de hoja en el primer caso y por germinación en el segundo caso. La citoquinina thidiazurón (TDZ) fue más eficiente que 6-benzilaminopurina (BAP) en la inducción de la formación de brotes adventicios.

En lo que respecta a la capacidad de multiplicación de brotes, con independencia del tipo de clon, estos pueden multiplicarse de forma óptima a partir de yemas axilares, mediante cultivo en medio MS suplementa con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, produciendo más de 3 brotes por explanto. La fuente de luz utilizada en la multiplicación afectó a la producción de brotes y a la concentración de pigmentos fotosintéticos, alcanzando ambas variables valores máximos en brotes que crecían bajo iluminación blanca, fluorescente o LED, con una temperatura de color de 6500°K , en comparación con las otras cinco fuentes de luz ensayadas. Los brotes pueden ser conservados sin subcultivar durante seis meses a 8°C , recuperando su capacidad de multiplicación tras tres subcultivos consecutivos en condiciones estándar. En los ensayos de multiplicación se observó floración espontánea en uno de los clones establecidos. Experimentos diseñados para reproducir los fenómenos de floración en condiciones controladas, variando los fotoperiodos, sometiendo a los brotes a períodos de frío o suplementando los medios con ácido giberélico fueron infructuosos.

El enraizamiento en medio con AIB ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) fue eficiente en todos los clones, alcanzándose valores medios de un 70% en el porcentaje de enraizamiento. En la aclimación, el porcentaje de supervivencia de los brotes enraizados alcanzó valores cercanos al 100% después de realizar una preaclimatación en cámara de cultivo seguida de la transferencia de las plantas a condiciones de invernadero.

Los protocolos de conservación y producción de planta desarrollados en este trabajo pueden ser utilizados en programas de conservación y reintroducción de la especie endémica protegida *Centaurea ulreiae*.

Abstract

Centaurea ulreiae Silva-Pando (*Asteraceae*) is an endemic and critically endangered species that grows on ultrabasic substrates in Monte Castelo (A Coruña- Spain). It is a perennial, stemless species, whose leaves are arranged in a rosette and can spread vegetatively via rhizomes. *C. ulreiae* flowers during spring, producing big inflorescences or capitula composed of several yellow to orange hermaphrodite florets. Fruit set occurs in summer, in achene-bearing infructescences.

The construction project for the Bustelo Wind Farm, which will affect part of the species' area of distribution, includes a “Plan and Programme for the Reinforcement of the Populations of the *Centaurea ulreiae* Silva-Pando Species within the area of occupation of the Bustelo Wind Farm project”, The works described in this PhD thesis are included in this Plan.

The objectives of this thesis were to evaluate the reproductive success of *C. ulreiae*, its viability and germination capacity, to establish collections of vegetative propagules under *in vitro* conditions derived from adult and juvenile material, and to develop an efficient protocol applicable to different genotypes to produce complete plants by micropropagation for use in reintroduction programs.

The results of the reproductive success assessment tests indicate that the species has low fruiting rates (~9% of achenes looking viable, of which 70% are viable according to the tetrazolium (Tz) test). 0.1% Tz staining was found to give reliable results based on the results obtained in the germination tests. It was also determined that the achenes of *C. ulreiae* show dormancy, which can be overcome by heat shock treatment in an oven at 60°C for 5 min and subsequent removal of the seed covers, giving germination rates of over 90%. *In vitro* germination can be carried out by performing a surface disinfection protocol (15 min 4% NaClO).

In the *in vitro* establishment tests it was possible to establish five adult and nine juvenile clones representative of three locations, by organogenesis of leaf fragments in the first case and by germination in the second case. Cytokinin Thidiazuron (TDZ) was more efficient than 6-benzylaminopurine (BAP) in inducing adventitious shoot formation.

Regarding shoot multiplication capacity, regardless of the type of clone, shoots can multiply optimally from axillary buds, growing on MS medium supplemented with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, producing more than 3 shoots per explant. The light source used in multiplication influenced shoot production and photosynthetic pigment concentration, both variables reaching maximum values in shoots grown under white, fluorescent or LED lighting, with a colour temperature of 6500°K , compared to the other five light sources tested. Shoots can be stored without subculturing for six months at 8°C , recovering their ability to multiply after three consecutive subcultures in standard conditions. In the multiplication experiments, spontaneous flowering was observed in one of the established clones. Subsequent experiments designed to reproduce flowering phenomena under controlled conditions, by varying photoperiods, subjecting the shoots to cold periods or supplementing the media with gibberellic acid were unsuccessful.

Rooting in medium with AIB ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was efficient in all clones, reaching average values of 70% in rooting percentage. In acclimatisation, the percentage of rooted shoot survival reached values close to 100% after pre-acclimatisation in the growth chamber followed by transfer of the plants to greenhouse conditions.

The conservation and plant production protocols developed in this work can be used in conservation and reintroduction programmes for the protected endemic species *Centaurea ultreiae*.

Índice

1	Introdución	1
1.1	<i>Centaurea ulreiae</i> Silva-Pando	1
1.1.1	Primeira observación	1
1.1.2	Encadre taxonómico de <i>Centaurea ulreiae</i> Silva-Pando.....	1
1.1.2.1	Familia Asteraceae.....	1
1.1.2.2	Xénero <i>Centaurea</i>	2
1.1.3	Descrición botánica de <i>Centaurea ulreiae</i>	4
1.1.4	Distribución, demografía e ecoloxía de <i>Centaurea ulreiae</i>	5
1.1.5	Estado de conservación de <i>Centaurea ulreiae</i>	7
1.1.6	Estrutura xenética da poboación de <i>Centaurea ulreiae</i>	9
1.2	Estratexias de conservación de <i>Centaurea ulreiae</i>	11
1.2.1	Conservación da biodiversidade vexetal	11
1.2.2	Conservación <i>ex situ</i> da biodiversidade vexetal en España.....	13
1.2.3	Conservación de <i>Centaurea ulreiae</i>	14
1.2.4	Reprodución sexual, aquenios e probas de xerminación	15
1.2.4.1	Proceso de xerminación	16
1.2.4.2	Probas de viabilidade por tinguidura	21
1.2.5	Micropropagación.....	25
1.2.5.1	Cultivo in vitro de tecidos vexetais.....	25
1.2.5.2	Micropropagación.....	26
1.2.5.3	Micropropagación para conservación.....	27
1.3	Contexto do traballo.....	37
2	Obxectivos.....	39
3	Material e métodos	40
3.1	Material vexetal	40
3.1.1	Aquenios.....	40
3.1.2	Material vexetativo colleitado en campo.....	40
3.2	Métodos	42
3.2.1	Determinación do número de inflorescencias por planta e proporción de aquenios viables	42
3.2.2	Determinación da viabilidade.....	42
3.2.2.1	Cloruro de tetrazolio	42
3.2.2.2	Estimación da viabilidade en diferentes anos de colleita.....	43

3.2.2.3	Índigo carmín	43
3.2.3	Ensaio de xerminación <i>in vivo</i>	44
3.2.3.1	Choque térmico	44
3.2.4	Ensaio de xerminación <i>in vitro</i>	45
3.2.4.1	Probas preliminares de xerminación	45
3.2.4.2	Probas de desinfección superficial.....	46
3.2.4.3	Proba prexerminativa con AX ₃	47
3.2.5	Establecemento <i>in vitro</i> de material adulto mediante organoxénese adventicia.....	47
3.2.6	Organoxénese a partir de explantos de folla de brotes establecidos <i>in vitro</i>	48
3.2.7	Estudo de factores de cultivo na proliferación por brotes axilares de clons adultos e xuvenís	49
3.2.7.1	Condições xerais.....	49
3.2.7.2	Tipo de luz, calidade e temperatura de cor (clon X1)	49
3.2.7.3	Concentración de BAP e tipo de luz (clon X1).....	49
3.2.7.4	Concentración de BAP (clons xuvenís e adultos)	50
3.2.8	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	50
3.2.9	Ensaio de indución da floración.....	51
3.2.9.1	Aplicación de AX ₃	51
3.2.9.2	Aplicación de diferentes fotoperíodos	51
3.2.9.3	Aplicación de tratamento de frío.....	51
3.2.10	Ensaio de conservación en frío.....	52
3.2.11	Ensaio de enraizamento	52
3.2.11.1	Condições xerais.....	52
3.2.11.2	Efecto do tipo de auxina (ANA ou AIB) e método de indución (clon X1).....	53
3.2.11.3	Efecto do método de indución (clons xuvenís e adultos).....	53
3.2.12	Ensaio de aclimatación	53
3.2.13	Condições da cámara de cultivo.....	54
3.2.14	Análise estatística	54
4	Resultados.....	57
4.1	Número de inflorescencias e produción de capítulos e de aquenios con aspecto de viables.....	57
4.2	Estimación da proporción de aquenios viables mediante tinguidura	58
4.2.1	Avaliación da viabilidade das sementes	58
4.2.2	Comparación de dúas concentracións de Tz (0,1% vs. 1,0%)	58
4.2.3	Tinguidura con IC.....	59
4.3	Ensaio de xerminación <i>in vivo</i>	60
4.3.1	O efecto da luz e do tempo de choque térmico.....	60

4.4	Ensaio de xerminación <i>in vitro</i>	61
4.4.1	Probas de desinfección superficial	61
4.4.2	Probas prexerminativas con AX ₃	62
4.5	Organoxénese a partir de explantos de folia de brotes establecidos <i>in vitro</i>	63
4.5.1	Concentración de BAP e TDZ e resposta de clons adultos e xuvenís.....	63
4.6	Taxa de multiplicación de <i>Centaurea ulreiae</i> en función do tipo de luz e da concentración de BAP	68
4.6.1	Efecto da fonte de luz e da temperatura de cor na multiplicación e na concentración de pigmentos fotosintéticos dos brotes de <i>C. ulreiae</i> (clon X1)	68
4.6.1.1	Efecto sobre a multiplicación de brotes.....	68
4.6.1.2	Efecto sobre a concentración de pigmentos fotosintéticos	69
4.6.2	Concentración de BAP e tipo de luz (clon X1)	70
4.6.3	Concentración de BAP (clons xuvenís e adultos)	73
4.7	Conservación en frío de brotes de <i>Centaurea ulreiae</i>	73
4.8	Indución da floración de <i>Centaurea ulreiae</i>	75
4.9	Ensaio de enraizamento.....	77
4.9.1.1	Efecto do tipo de auxina (ANA ou AIB) e do método de indución.....	77
4.9.1.2	Efecto do método de indución (clons adultos ou xuvenís)	78
4.10	Aclimatación.....	80
5	Discusión.....	83
5.1	<i>C. ulreiae</i> presenta baixas taxas de frutificación	83
5.2	Os aquenios de <i>C. ulreiae</i> presentan altas taxas de viabilidade.....	84
5.3	A xerminación <i>in vivo</i> en <i>C. ulreiae</i>	85
5.4	Os problemas de contaminación no establecemento <i>in vitro</i> de aquenios de <i>C. ulreiae</i>	86
5.4.1	Conservación de aquenios de <i>C. ulreiae</i> en bancos de xermoplasma	87
5.5	Micropropagación de <i>C. ulreiae</i>	88
5.5.1	Os materiais de partida para o establecemento <i>in vitro</i> en <i>C. ulreiae</i>	88
5.5.2	Citoquininas na organoxénese adventicia en <i>C. ulreiae</i>	88
5.5.3	Factores que inflúen na produción de brotes de <i>C. ulreiae</i> mediante micropropagación.....	90
5.5.3.1	Influencia da luz na micropropagación.....	90
5.5.3.2	Concentración de BAP en combinación co tipo de fonte luminosa.....	91
5.5.4	Enraizamento <i>in vitro</i> en brotes de <i>C. ulreiae</i>	92
5.5.5	A preaclimatación en cámara de crecemento maximiza a supervivencia das plántulas ..	93
5.5.6	Conservación de propágulos vexetativos de <i>C. ulreiae</i> en bancos de xermoplasma.....	93
5.5.7	Indución da floración en <i>C. ulreiae</i>	94
6	Conclusións	95

7 Bibliografía.....	97
ANEXO I.....	115

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
K	Grados Kelvin
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido 4-indol-3-butírico
ANA	Ácido α -naftalén-acético
ANOVA	Análise de varianza
AX3	Ácido Xiberélico 3
BAP	6-bencilaminopurina
Chl A	Clorofila A
Chl B	Clorofila B
FLUO	Luces fluorescente
IC	Índigo camín (Indigotinsulfonato)
Kin	Kinetina
LED	Light emitting diode
LSD	Least significant difference
MB	Medio base
min	Minuto
MS	Medio mineral Murashige & Skoog (1962)
mT	Meta-Topolina
RCV	Regulador do crecemento vexetal

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Centaurea ultreiae* Silva-Pando

1.1.1 Primeira observación

Centaurea ultreiae Silva-Pando é un endemismo do noroeste español, que foi descrito por Francisco Javier Silva Pando como unha planta afín a *C. borjæ* pero con corolas amarelas, que crecía en bordes de camiños e lugares removidos sobre un afloramento de rochas ultrabásicas no Monte Castelo (A Coruña) (Silva-Pando, 1987).

1.1.2 Encadre taxonómico de *Centaurea ultreiae* Silva-Pando

1.1.2.1 Familia Asteraceae

O xénero *Centaurea* L., encádrase dentro da familia *Asteraceae*, da orde *Asterales* e da clase *Magnoliopsida*. A clase *Magnoliopsida* contén 64 ordes nas que se distribúen máis de 300.000 especies. Na orde *Asterales*, conviven 11 familias contando con máis de 35.000 especies. A familia *Asteraceae*, a máis extensa da orde, comprende máis de 30.000 especies, repartidas entre 1.600-1.700 xéneros, presentando unha distribución cosmopolita (Funk et al., 2009). A capacidade colonizadora das especies desta familia pode explicarse pola súa plasticidade fenotípica, que lles permite adaptarse a diversos tipos de ecosistemas (Vitales Serrano, 2015).

As especies que pertencen á familia das Asteráceas caracterízanse por presentar unha serie de caracteres morfolóxicos moi evolucionados. As súas flores están organizadas dentro dunha inflorescencia que se denomina capítulo. Os capítulos están conformados por un receptáculo rodeado por brácteas involucrais sobre o que se dispoñen radialmente as flores, que poden ser liguladas ou flósculos (sen lígula). Os froitos das especies da familia *Asteraceae* son

INTRODUCCIÓN

monocarpelares e indehiscentes, denominados aquenios ou cipselas¹, proceden dun ovario ínfero e poden presentar un penacho de pelos na base, que se coñece como papo (Izco et al., 2003; Vitales Serrano, 2015).

1.1.2.2 Xénero *Centaurea*

Centaurea é o cuarto xénero con máis especies da familia *Asteraceae* e, segundo a clasificación que adoptemos, ten entre 400 e 700 especies. (García-Jacas, 2001). Existen 250 especies eurasiáticas de *Centaurea* que se distribúen principalmente na rexión mediterránea e en zonas montañosas de clima temperado en Eurasia (Susanna & García-Jacas, 2009).

A clasificación taxonómica do xénero é complexa, debido tanto á súa dimensión como á diversidade morfolóxica que presenta. Historicamente, foron descritos un gran número de taxons infraxenéricos, que, despois da realización de estudos filoxenéticos, foron cuestionados e posteriormente eliminados. Actualmente o xénero está considerado como parafilético na súa concepción clásica (García-Jacas et al., 2002; Susanna et al., 1995), resultando na disgregación de certos subxéneros e subseccións en xéneros independentes.

A hibridación é un fenómeno estendido no xénero, incluso entre seccións dispares, aumentando a dificultade taxonómica. Os fenómenos de poliploidía definiron a especiación no xénero. Distintos niveis de ploidía son común nalgúns grupos.

Para organizar e delimitar as especies do xénero, véñense utilizando caracteres morfolóxicos, ferramentas moleculares, información cromosómica, carpolóxica e palinolóxica. Os caracteres do pole deste xénero parecen estar unidos intimamente ás liñaxes consideradas na filoxenia (García-Jacas, 2001), o que segundo algúns autores permitiría diferenciar grupos coa categoría de subxéneros (Barres et al., 2013), nomeadamente no grupo *Cyanus-Montana*, que presenta un pole similar ás especies *Centaurea cyanus* L. e *C. montana* L.; o grupo *Acrocentron*, ao que pertence *C. ultreiae*, e un terceiro gran grupo cuxo pole é similar ao da especie *C. jacea* L. Cada unha destas liñaxes subdivídese en grupos máis ou menos diversificados, contando con máis de 40 seccións (López & Devesa, 2008). *C. ultreiae* pertence

¹ Os froitos das Asteráceas están considerados como falsos froitos por derivar dun ovario ínfero, a súa denominación botánica correcta é cipsela. Non obstante, na literatura consultada, os froitos de *Centaurea ultreiae* e doutras especies do xénero son denominados aquenios (Bañares Baudet, 2004; Devesa, et al., 2014; Silva-Pando, 1987). A partir de aquí, referirémonos aos froitos de *C. ultreiae* como aquenios.

á subsección Lagascae (Fern Casas & Susanna), dentro da sección Borjae (Valdes Berm & Rivas Goday) (Devesa, et al., 2014).

O xénero *Centaurea* inclúe plantas herbáceas, con follas alternas enteiras ou pinnatisectas, que carecen de espiñas. As flores están dispostas conformando capítulos ás veces globosos que resultan vistosos e atractivos para os insectos que as polinizan, incluíndo dípteros, himenópteros e lepidópteros, que permiten que se produza a polinización cruzada (Hu et al., 2011). Os capítulos presentan flores hermafroditas ou unha combinación de flores hermafroditas no centro e flores neutras na periferia, como sucede en *C. ulreiae*. Os froitos das especies do xénero son os aquenios, que adoitan presentar elaiosoma (Van Der Pijl, 1969), o que explica nestes casos a dispersión por mirmecocoria.



Figura 1. Vástagos de *C. ulreiae* ilustrando a variabilidade na morfoloxía das follas (Fonte: elaboración propia).

Máis da metade das especies europeas do xénero son exclusivas do continente europeo e a súa distribución non adoita superar fronteiras nacionais, chegando en moitos casos a estar representadas por poboacións únicas (Izco et al., 2003). Na Península Ibérica, unha das rexións europeas máis ricas en especies e endemismos, habitan 94 especies de *Centaurea* (136 taxons, tendo en conta subespecies e híbridos), das que 67 son endémicas. Na Comunidade Autónoma

INTRODUCCIÓN

de Galicia, a provincia de A Coruña presenta tres endemismos do xénero: *Centaurea ultreiae*, *C. borjae* Valdés Berm. & Rivas Goday e *C. corcubionensis* M. Lainz (Devesa, 2016; López, E. & Devesa, J. A., 2013).

Figura 2. (a) Aspecto dos capítulos de *C. ultreiae* antes de abrirse por completo e amosando as diferenzas nas súas cores, coas (b) corolas amarelas da especie tipo, (c) rosadas, da variedade de bazar e (c) un individuo con



coloración intermedia (Fonte: elaboración propia).

1.1.3 Descrición botánica de *Centaurea ultreiae*

Centaurea ultreiae é unha planta herbácea, perenne, de acaule a subacaule, que presenta raíces axonomorfas con cores de verde a verde escuro que lanzan estolóns subterráneos. As follas, cuxas dimensións non superan os 24×8 cm, crecen conformando unha roseta e persisten durante a floración; presentan unha morfoloxía moi variable (Figura 1). As follas primordiais son lanceoladas e enteiras, o resto liradas, pinnatipartidas ou 1-2 pinnatisectas, presentando segmentos de tamaños heteroxéneos, de ovados a ovado-oblongos, enteiros, agudos, de dentados a lixeiramente serrados. O segmento terminal pode ser maior ou igual que os laterais;

o ápice é agudo. Nos pecíolos, a face e o envés son pilosos, portando tanto pelos pluricelulares como unicelulares (Devesa, et al., 2014).

Presenta entre 1 e 10 capítulos por vástago, radiais, con flores superiores parcialmente transformadas en brácteas (Figura 2a). As flores do disco son tubulares e hermafroditas, as periféricas neutras e de tamaño similar, e denomínanse flósculos. O involucre (22-30 mm × 16-26 mm) é ovoide e máis curto que as flores. As brácteas son imbricadas e están dispostas en 6-7 series. As corolas son glabras e amarelas na especie tipo (Figura 2b), os flósculos presentan un tubo abrancazado e un limbo de amarelo a amarelo pálido, que no caso dos flósculos hermafroditas presentan un engrosamento na base. En *Centaurea ultreiae* var. *bazarensis* Blanco-Dios, os flósculos presentan unha coloración rosada nas corolas, máis ou menos intensa en función do individuo (Figura 2c-d). Frutifica de xuño a agosto e produce aquenios 5-6,4 mm × 2,4-2,9 mm, oblongo obovoides, comprimidos, truncados e con reborde enteiro. En estado de madurez, son pardo-negrexados, presentan vilano basal e elaiosoma no extremo apical. A dispersión dos froitos sucede mediante mirmecocoria ou hidrocoria accidental (Devesa, et al., 2014).

1.1.4 Distribución, demografía e ecoloxía de *Centaurea ultreiae*

Centaurea ultreiae está presente unicamente nunha área de afloramentos ultrabásicos na provincia de A Coruña, concretamente na área de Monte Castelo, onde conflúen os concellos de Carballo, Coristanco, Santa Comba, Tordoia e Val do Dubra (Figura 3), ocupando unha superficie máxima de 12 km², entre os 380-535 m de altitude. Está presente en matos abertos de baixo porte, marxes de camiños, gabias ou noiros, preferindo áreas nas que exista certa exposición á luz. Comparte territorio con especies pioneiras como *Ulex europaeus* L., *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn in Kersten, *Erica cinerea* L., *E. umbellata* Loefl. ex L. ou *E. ciliaris* Loefl. ex L. (Bañares Baudet, 2004).

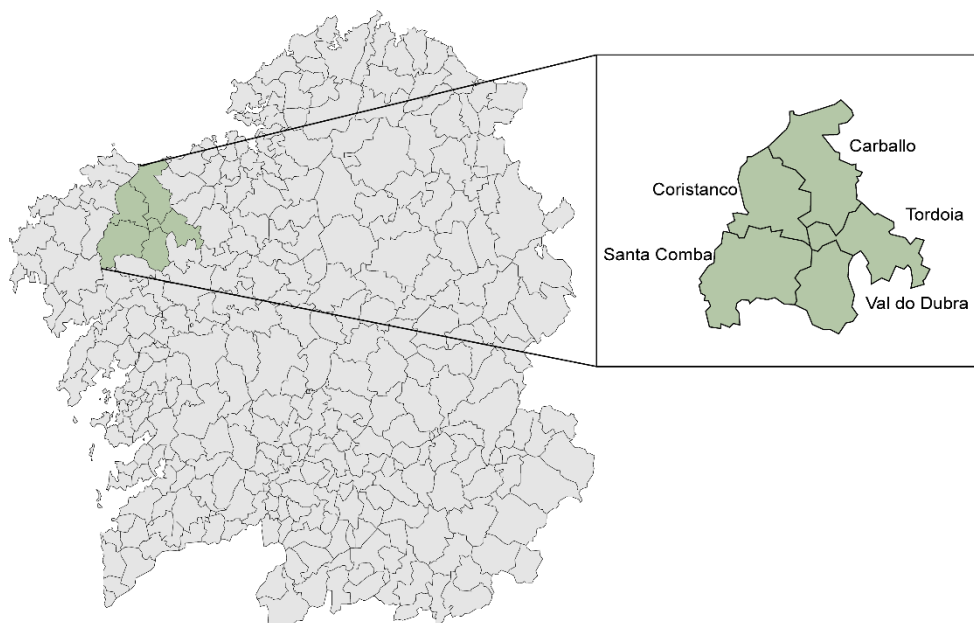


Figura 3. Mapa de localización de *C. ulreiae* por concellos (Fonte: elaboración propia).

Normalmente, as plantas distribúense no espazo formando agregados que poden acadar densidades superiores a 40 vástagos·m⁻² (Figura 4). Isto está relacionado coa súa vía preferente de reprodución, que ten lugar por estolóns subterráneos. O desenvolvemento do mato nas zonas onde vexeta *C. ulreiae* afecta negativamente ao número de plantas presentes (Bañares Baudet, 2004).



Figura 4. Distribución no espazo de vástagos de *C. ulreiae* nun noiro marcados con círculos brancos (Fonte: elaboración propia).

C. ultreiae habita solos derivados de rochas básicas de tipo ígneo, que se localizan no afloramento gabroico de Monte Castelo. Os perfís analizados na zona de distribución da especie indican que a edafoxénese nesta área foi policíclica, presentando un solo actual, duns 60-65 cm de espesor, separado dun solo enterrado (90-135 cm de espesor) por clastos de gabro fresco. Os horizontes presentan unha textura limosa e a cantidade de arxila diminúe co aumento da profundidade. A estrutura do solo vai de moderada-fina a moderada-media, reducíndose a abundancia dos poros coa profundidade. Os solos presentan unha consistencia húmida e firme, mollada e lixeiramente adherente. O pH redúcese ao aumentar a profundidade, pasando de 4,86 no horizonte A ata 4,52 no horizonte máis próximo á rocha. O pH en auga da rocha fresca alcanza o valor de 9,19 (Sanjurjo et al., 2001).

No período de 2006 a 2023, a temperatura media anual da estación meteorolóxica de Río do Sol (Coristanco, 540 m de altitude) foi de 11,30°C, con 16,17°C de media para o mes máis cálido e 6,77°C para o mes máis frío. A precipitación media anual foi de 1600 mm (**Figura 5**). Segundo a clasificación climática de Köppen (1936), trátase dun clima mesotérmico húmido.

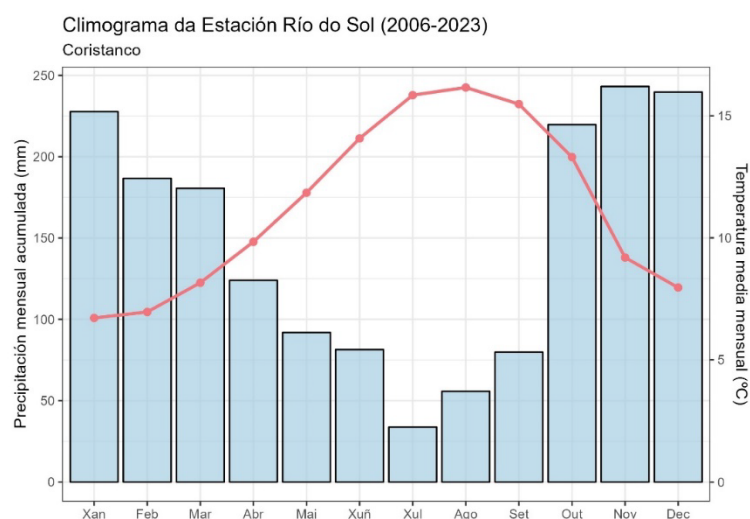


Figura 5. Climograma do período 2006-2023 da Estación meteorolóxica Río do Sol (Coristanco) representando a precipitación media mensual acumulada fronte á temperatura mensual media (°C) (Fonte: elaboración propia).

1.1.5 Estado de conservación de *Centaurea ultreiae*

Como xa se mencionou, *Centaurea ultreiae* ocupa apenas a área correspondente a un afloramento de rochas ultrabásicas localizado no Monte Castelo (Silva-Pando, 1987). No ano 2000, incluíuse como taxon prioritario na primeira “*Lista Roja de la Flora Vasculare Española*”

INTRODUCCIÓN

(VV. AA., 2000), documento técnico que serviu como preámbulo para elaborar o “*Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada*” (AFA) (Bañares Baudet, 2004). No primeiro dos documentos, considérase *C. ultreiae* como especie en perigo de extinción (EN), por ser unha especie cunha distribución moi limitada, composta por unha única poboación (VV. AA., 2000). No ano 2004, inclúese a especie no AFA, e considérase como “en perigo crítico de extinción” (CR), estimándose que o risco de desaparición da especie é extremadamente alto (Bañares Baudet, 2004).

O AFA considera que a principal ameaza para a especie é a actividade humana, en especial a transformación do mato de porte baixo en prados ou cultivos silvícolas. No que respecta ás medidas propostas para a conservación, inclúense restrinxir as prácticas agrícolas a sistemas tradicionais e evitar a transformación de máis áreas a cultivos e a construción de camiños e pistas. Os autores propuxeron incluír a especie en listas de protección nacionais a autonómicas e a creación do Lugar de Interese Comunitario (LIC) “Monte do Castelo”.

Despois de 20 anos, a única medida tomada foi a inclusión de *Centaurea ultreiae* como especie en perigo de extinción no Catálogo Nacional de Especies Ameazadas (CNEA) e no Catálogo Galego de Especies Ameazadas (Decreto 88/2007 do 19 de abril, 2007). Por outra banda, no ano 2008, colleitáronse aquenios da especie, establecéndose unha colección da que descoñecemos o estado actual (Mallón, 2008).

No documento interno “Estudio corolóxico y demográfico de *Centaurea ultreiae* en la zona de Monte Castelo (Coristanco, Santa Comba, Tordoia, Val do Dubra)- Proyecto Greenalia”, analizáronse inventarios realizados entre 1997 e 2008, e considerouse que o estado de conservación da planta era relativamente bo, contando con máis de 7.500 individuos en 2008 (Táboa 1).

Táboa 1. Número de individuos de *Centaurea ultreiae* no período 1997-2008 (Fonte: Xunta de Galicia, 2020).

1997	2003	2007	2008
8.484	6.821	5.016	7.504

Máis recentemente, ao abeiro do “Plan de Conservación e Recuperación de *Centaurea ulreia*e no entorno do Monte Castelo”² no que se encadra este traballo, elaborado polo CIF de Lourizán en colaboración coa USC, deseñáronse actividades encamiñadas a realizar un censo de individuos da especie. A partir dos datos históricos (Táboa 1) e de prospeccións realizadas polo equipo de traballo, seleccionáronse zonas potenciais onde realizar o censado de individuos en parcelas, mostraxes mediante transectos e actividades de seguimento mensual de individuos marcados.

En total, avalíouse a cobertura, empregando os métodos citados, nunhas 14 ha con presenza de planta, contabilizándose 83.402 vástagos. As estimacións do equipo apuntan a que o número total de plantas superaría os 100.000 vástagos, multiplicando 10 veces o valor obtido en censos anteriores.

1.1.6 Estrutura xenética da poboación de *Centaurea ulreia*e

Dispónse dun estudo da diversidade xenética de *C. ulreia*e realizado no Instituto Botánico de Barcelona, encargado no marco do citado contrato². Este estudo foi entregado no segundo trimestre de 2023 (García-Jacas et al., 2023).

A diversidade da especie avalíouse a través da análise de once microsátélites, partindo de follas colleitadas en 8 núcleos (25 mostrax por núcleo) delimitados polo investigador principal do proxecto (F.J. Silva-Pando): Noroeste (NO), Noreste (NE), Monte Toural (MT), Bazar Norte (BN), Bazar Sur (BS), Monte Castelo (MC), Xallas de Castriz (XA), Fonte dos Corzos (FC) (**Figura 6**).

Os microsátélites son repeticións curtas de ADN (1-6 pares de bases) cuxo número pode variar entre os individuos dunha mesma especie. *C. ulreia*e é hexaploide, o que dificulta a interpretación clásica dos resultados dos microsátélites, polo que se decidiu avaliar a presenza

² “Contrato de colaboración entre a Axencia Galega da Calidade Alimentaria (AGACAL), a través do Centro de Investigación Forestal de Lourizán e a Universidade de Santiago de Compostela e a empresa, GREENALIA Wind Power Monte Toural, S.L.U., GREENALIA Wind Power Campelo, S.L.U., GREENALIA Wind Power Bustelo, S.L.U., e Acivro Consultoría de Medioambiente S.L., para realizar os traballos necesarios para a elaboración e seguimento do Plan de Conservación e Recuperación de *Centaurea ulreia*e no entorno do Monte Castelo”.

INTRODUCCIÓN

ou ausencia das repeticións nas mostras representativas dos diferentes núcleos, seguindo o protocolo de Becher et al. (2000).

Nas mostras analizadas ($n=200$), once pares de *primers* deron como resultado 133 alelos amplificados, dos que 22 eran privados (non aparecían en máis dun núcleo). O cálculo da varianza molecular, tendo en conta os oito núcleos seleccionados, amosou que a maior proporción (89%) se correspondía coa varianza entre individuos da poboación e a varianza entre os núcleos explicaba unicamente un 11% da variabilidade total.

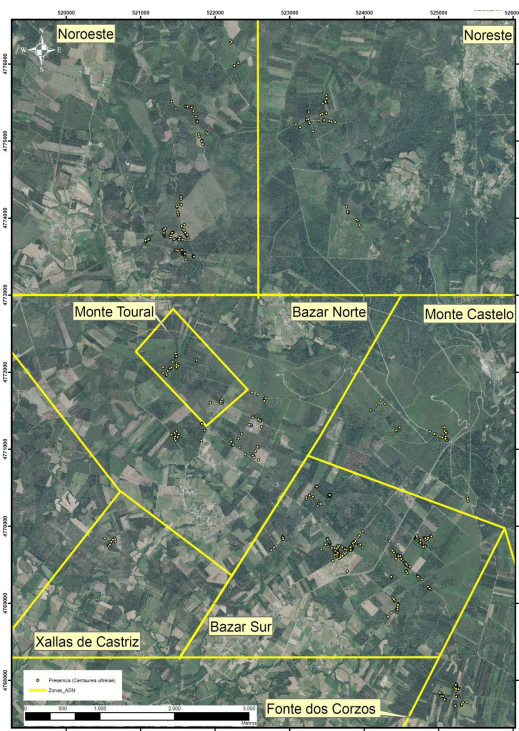


Figura 6. Distribución espacial dos individuos colleitados dos oito núcleos de poboación para realizar a análise xenética no Instituto Botánico de Barcelona (Fonte: García-Jacas et al., 2023. Autorización para o uso no ANEXO I).

Os núcleos definidos durante a toma de mostras non se correspondían con áreas diferenciadas dende un punto de vista xenético. A partir dos resultados obtidos concluíuse que todos os individuos de *C. ultriae* deben ser considerados como pertencentes a unha única poboación, xa que as distancias xenéticas entre os núcleos definidos de forma artificial foron moi baixas. En calquera caso, estes núcleos pódense ordenar segundo o grao de variabilidade xenética, que de maior a menor sería: BS, XA, BN/NE, MT, NO, FC e MC.

A variabilidade que foi reportada neste estudo entra dentro do esperable nunha especie endémica que presenta unha única poboación. O grao de variabilidade que foi observado, aínda que pequeno, é significativo tendo en conta a alta taxa de reprodución asexual da especie.

Os autores do estudo conclúen que a variabilidade xenética do conxunto da poboación indica que *Centaurea ulreiae* presenta unha saúde xenética aceptable. Ademais, a presenza de alelos privados en todos os núcleos definidos, apunta a que todos son relevantes dende o punto de vista da conservación. Os núcleos, BS, MC, BN e NE presentan un maior número de alelos privados, indicando unha maior reserva de variabilidade xenética. Os autores do estudo propoñen que a poboación de *Centaurea ulreiae* debe ser considerada no seu conxunto para a conservación.

1.2 Estratexias de conservación de *Centaurea ulreiae*

1.2.1 Conservación da biodiversidade vexetal

A nivel global, 26.276 especies vexetais están en perigo de extinción; máis dun 80% delas pertencen á clase Magnoliopsida (IUCN, 2023). O número de especies ameazadas aumenta anualmente, sendo a desaparición dos ecosistemas terrestres a principal causa. Conservar a diversidade xenética e ecolóxica das especies e as súas poboacións, as cales representan un patrimonio natural de valor incalculable, é unha prioridade global para manter o equilibrio do sistema Terra (FAO, 2019; Manole-Paunescu, 2014; Reed et al., 2011).

As especies endémicas son aquelas cuxa distribución natural, que soamente se estende nunha área xeográfica específica, ven determinada como consecuencia de motivos históricos e/ou factores ecolóxicos (Morrone, 2008). Estas especies son vulnerables ás presións antrópicas, xa que, ademais da limitada distribución espacial, adoitan compartir algunhas das seguintes características: baixo número de poboacións que frecuentemente contan con poucos individuos, baixa capacidade de rexeneración e alto grao de adaptación a certas condicións edafoclimáticas. Cantas máis características conflúan nunha especie, maior é a vulnerabilidade da mesma á extinción (Işik, 2011).

Existen dúas estratexias principais para conservar a biodiversidade: a conservación *in situ* e a conservación *ex situ*. A conservación *in situ* comprende o conxunto de técnicas e medidas a través das cales a biodiversidade se conserva no seu hábitat natural. As estratexias de

INTRODUCCIÓN

conservación *ex situ* inclúen aquelas que son utilizadas para conservar a biodiversidade fóra da súa área de distribución. Ambas estratexias son complementarias e impleméntanse conxuntamente nos plans de conservación e recuperación de especies en perigo (Heywood, 2019a, 2019b).

A conservación *in situ* adoita realizarse mediante o establecemento de figuras de protección da área na que habitan as especies que se pretende protexer, incluíndo a regulación dos usos permitidos. Isto posibilita a preservación da variabilidade xenética das especies e da contorna natural na que habitan, incluíndo a paisaxe, o que asegura a conservación das relacións entre as especies que conforman un ecosistema e os valores culturais e científicos que representan. As estratexias de conservación *in situ* adoitan ser economicamente custosas e difíciles de aplicar (Heywood, 2014, 2015).

As estratexias *ex situ* pretenden conservar unha parte suficiente e representativa da diversidade xenética dunha especie ou poboación fóra do seu hábitat natural. En moitos casos, as estratexias *ex situ* son a única opción que garante a conservación dalgunhas especies (Engelmann, 2011; González-Benito & Martín, 2011; Heywood, 2019a, 2019b). Os xardíns botánicos e os bancos de xermoplasma (de sementes ou de propágulos vexetativos) son exemplos de estratexias eficientes de conservación. Estímase, por exemplo, que os xardíns botánicos conservan máis dunha terceira parte da biodiversidade vexetal mundial (Engelmann, 2011).

A conservación de sementes en bancos de xermoplasma en condicións de baixa humidade e temperatura (aplicable a especies de sementes ortodoxas) é unha estratexia eficiente para conservar a diversidade xenética (Belokurova, 2010; Coelho et al., 2020; Kulak et al., 2022). O mantemento de sementes recalcitrantes ou intermedias en bancos de xermoplasma non é viable. Tampouco resulta viable establecer coleccións que comprometan a supervivencia das poboacións naturais cun número escaso de individuos ou naqueles casos nos que a viabilidade das sementes sexa moi baixa.

Con respecto ao mantemento de propágulos vexetativos nos bancos de xermoplasma, o uso de técnicas biotecnolóxicas, baseadas na tecnoloxía do cultivo *in vitro*, resulta de grande utilidade para preservar plantas raras ou ameazadas (Coelho et al., 2020; Engelmann, 2011). As técnicas de cultivo *in vitro* permiten manter durante tempos prolongados un número elevado de

explantos de distintos xenotipos representativos das poboacións a conservar nun espazo reducido. Este material pode conservarse a medio (conservación a 4-8°C) ou a longo prazo (criopreservación en nitróxeno líquido) mantendo a súa viabilidade e a súa capacidade de multiplicación (González-Benito & Martín, 2011; Taji et al., 1992).

1.2.2 Conservación *ex situ* da biodiversidade vexetal en España

España presenta unha gran diversidade biolóxica. No territorio nacional habitan polo menos 8.000 especies de plantas vasculares, das que practicamente un 20% son endémicas. Por outro lado, do total das especies presentes en España, o 12 % están ameazadas, sendo o país europeo con maior número de plantas nesta categoría (Bermejo et al., 2005). Nos últimos anos, pese ao establecemento de figuras de protección e a adopción de plans de conservación *in situ*, a degradación e fragmentación dos ecosistemas naturais é a principal ameaza para a biodiversidade vexetal en España. Ante a insuficiente eficacia destas medidas o Atlas de Flora Amenazada (AFA) propuxo en 2004 o uso de estratexias de conservación *ex situ*, recomendando o establecemento de accesións en bancos de xermoplasma para o 58% dos taxons e o uso de técnicas de micropropagación para o 28% das especies en perigo (Bañares Baudet, 2004; González-Benito & Martín, 2011).

A maior parte de bancos de xermoplasma que hai no estado establecéronse para conservar especies e variedades de interese agronómico. En total existen 25 bancos de sementes deste tipo, nos que se conservan máis de 65.000 accesións.

O primeiro banco de sementes dedicado á conservación de especies silvestres foi establecido en 1966 polo Profesor Gómez Campo na Universidade Politécnica de Madrid (UPM), para conservar a diversidade das Brasicáceas mediterráneas. Na década dos 70, o banco da UPM comezou a albergar coleccións de flora endémica da Península Ibérica. Posteriormente, establecéronse outros bancos de xermoplasma dedicados á conservación de sementes de especies silvestres. En 2002, constituíuse a Rede Española de Bancos de Xermoplasma de Plantas Silvestres e Fitorrecursos Autóctonos (REDBAG) (Bermejo et al., 2005). Os 11 bancos que a compoñen conservan máis de 24.000 accesións de 9.736 taxons (Táboa 2).

INTRODUCCIÓN

Táboa 2. Bancos de xermoplasma da REDBAG, as súas coleccións principais, ano de establecemento e número de taxons e accesións que albergan (Fonte: Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos. Elaboración propia).

Banco de xermoplasma	Coleccións principais	Ano de establecemento	Nº taxons	Nº accesións
Jardín Botánico Atlántico	Flora cantábrica ameazada, rara ou endémica	2004	208	337
Jardí Botànic Marimurta	Flora protexida de Cataluña. Colección de <i>Androcymbium</i>	1990	178	230
Jardí Botànic de Barcelona	Flora catalana e norteafricana	1998	661	948
Jardí Botànic de Sóller	Flora balear, das illas mediterráneas e áreas de influencia. Variedades tradicionais de hortalizas e cereais de Baleares	1991	300	764
Real Jardín Botánico Juan Carlos I	Flora autóctona, exótica e Cactáceas	1995	301	590
Real Jardín Botánico de Madrid	Flora Ibérica	1987	1.417	2.550
Universidad Politécnica de Madrid	Crucíferas, endémicas peninsulares, das Illas Baleares e da rexión Macaronésica	1966	2.349	5.132
Jardí Botànic Universitat de València	Flora silvestre valenciana	1991	1.150	2.858
Jardín Botánico de Castilla-La Mancha	Flora silvestre de Castilla-La Mancha, especialmente especies endémicas ou ameazadas	2008	153	223
Banco de Germoplasma Vegetal Andaluz	Flora Andaluza, etnobotánica. Colección <i>Cardueae</i>	1982	2.302	7.981
Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo	Flora endémica Canaria. Etnobotánica	1983	712	3.998

Por outra banda, xa dende os anos 80, diversos investigadores de centros de investigación e universidades tiñan realizado un esforzo importante para producir protocolos de micropropagación para a flora ameazada española, especialmente nas familias *Plumbaginaceae* e *Asteraceae* (González-Benito & Martín, 2011), que serven de base para o establecemento de bancos de xermoplasma baseados nestas técnicas.

1.2.3 Conservación de *Centaurea ulreiae*

Cando se iniciou este traballo, había un coñecemento escaso sobre cuestións relativas ao estado de conservación de *Centaurea ulreiae*. Nese momento, os últimos inventarios coñecidos da especie databan de 2008 (Táboa 1). Na tese de doutoramento de R. Mallón (2008) mencionábase o establecemento dun banco de xermoplasma da especie. Agora ben, a localización do banco, as condicións de conservación, o número de accesións, as localidades de orixe destas e, sobre todo, o seu estado actual eran descoñecidos. A tese de Mallón desenvolvía un protocolo de micropropagación e criopreservación para *C. ulreiae*, estudando un único xenotipo, establecido a partir dunha plántula xuvenil (Mallón, 2008).

Con respecto á conservación de material *in vitro*, precísase desenvolver protocolos de micropropagación aplicables a un amplo número de xenotipos representativos da poboación da especie. Ao mesmo tempo, resulta de grande interese o desenvolvemento de protocolos válidos a partir de follas de material colleitado en campo, que permitan reducir a presión sobre as poboacións naturais da especie, derivada da colleita das infrutescencias.

1.2.4 Reprodución sexual, aquenios e probas de xerminación

Na reprodución sexual de *Centaurea* hai que ter en conta unha serie de aspectos que afectan a súa eficiencia. Entre eles, as inflorescencias que aparecen neste xénero presentan unha enorme diversidade fenotípica, xogando un papel central na interacción cos insectos polinizadores (Funk et al., 2009; Izco et al., 2003).

Ademais das inflorescencias, outros factores ligados ao mecanismo de cruzamento afectan á reprodución no xénero. As plantas superiores, en xeral, presentan un sistema de compatibilidade que define dous grupos, aquelas plantas cuxos estigmas poden ser polinizados por pole propio (autocompatibles) e as plantas que unicamente poden ser polinizadas por pole que proveña dunha planta xenéticamente diferente (autoincompatibles). En todos os casos se require dun vector biótico que transporte o pole entre as flores dos diferentes individuos ou dentro dun mesmo individuo, para que a polinización (autógama ou alógama) poida resultar na produción de sementes. O sistema de compatibilidade e o tipo de polinización determinan a dependencia das especies dos polinizadores e a variabilidade xenética da súa proxenie (Aguilar et al., 2006; Richards, 1997).

Por outro lado, os recursos a disposición dun individuo no medio no que habita tamén afectan ao éxito da reprodución sexual. Desta forma, un alto gasto de recursos na formación das inflorescencias ou na produción das substancias que atraen aos polinizadores parecen reducir a taxa de frutificación (Pyke, 1991; Snow and Whigham, 1989).

Como consecuencia da polinización prodúcese a fertilización do óvulo da flor, dando lugar ao desenvolvemento dun embrión e dun novo organismo. Nas plantas anxiospermas, o resultado da maduración dun ovario resulta na produción dun froito. Como se mencionou anteriormente, nas Asteráceas, os froitos denomínanse aquenios. Dentro deles, alóxanse as sementes, que son

INTRODUCCIÓN

as estruturas que conteñen o embrión e as reservas precisas para iniciar a xerminación (Barclay, 2002; Ferrandiz, 2011).

Os mecanismos de cruzamento e o sistema de compatibilidade afectan aos equilibrios de colonización-extinción que teñen lugar nas poboacións naturais e determinan a diversidade xenética, un factor especialmente importante en especies endémicas e ameazadas, dentro dunha poboación. En especies autocompatibles cunha alta taxa de autofecundación prodúcese unha redución da variabilidade xenética así como a aparición de depresión por consanguinidade. Estes dous factores poden aumentar a susceptibilidade a pragas ou a variacións aleatorias no ambiente (Aguilar et al., 2006).

1.2.4.1 *Proceso de xerminación*

As sementes, que están conformadas polo embrión, os tecidos de reserva enerxética e as estruturas que os recubren (cubertas) (Bewley et al., 2013), xerminan cando se dan as condicións óptimas para a súa supervivencia, incluíndo a temperatura, humidade, osíxeno e calidade da luz, sempre e cando non existan fenómenos de letargo. O proceso de xerminación está regulado por diversos factores intrínsecos que interactúan entre si e con factores ambientais. Por exemplo, o balance entre ácido abscísico e xiberelinas considérase un factor relevante (Baskin & Baskin, 2004; Sajeev et al., 2024).

1.2.4.1.1 Estratexias de reprodución sexual e capacidade xerminativa en especies endémicas de *Centaurea*

As estratexias de reprodución sexual no xénero *Centaurea* son variadas. Existen especies autocompatibles (*C. calcitrapa* L., *C. sulphurea* Willd. e *C. diffusa* Lam.) e autoincompatibles (*C. scabiosa* L., *C. jacea*, *C. solstitiatis* L. e *C. corymbosa* Pourr.) (Devesa et al., 2014; Sun & Ritland, 1998). Nalgúns experimentos en especies consideradas como autoincompatibles, observouse que a autopolinización daba lugar á produción de froitos viables, o que suxire que existe certa plasticidade nos sistemas de compatibilidade (Bellanger et al., 2014; Penet et al., 2012).

Outro aspecto relevante no proceso reprodutivo é a posible relación entre o grao ou a intensidade de floración e a eficacia da frutificación. Se ben, como se comentou anteriormente, nalgúns casos un grao de floración que supere uns determinados límites pode ir en detrimento da taxa de frutificación, nalgúns especies de *Centaurea*, como *C. scabiosa*, demostrouse que o número de capítulos producido por individuo non afectaba á súa taxa de frutificación, que parece verse afectada pola disposición espacial dos xenotipos dentro dunha poboación e pola actividade dos polinizadores (Ehlers, 1999).

Con todo isto, na maioría das especies endémicas de *Centaurea* as taxas de frutificación son baixas. Así, no caso de *C. corymbosa*, especie autoincompatible, os capítulos producen só entre 20-30 aquenios viables de media por capítulo. Ademais, a súa taxa de frutificación (ovarios que se transforman en aquenios) varía entre un 10% e un 50% en función do individuo, poboación e ano, segundo a cantidade de pole e de recursos dispoñibles (Colas et al., 2001; Riba et al., 2005). *C. cineraria subsp. circae* (Sommier) Cela Renz. & Viegi produce $20 \pm 3,9$ aquenios totais por capítulo. A maioría deles presentan aspecto van ou están infestados por insectos. Só un 5,5% presentan unha morfoloxía e consistencia aparentemente viable (Valletta et al., 2016). De forma similar, noutras centaureas, como *C. pseudaxilaris* Stef. & T. Georgiev e *C. davidovii* Urum, aparecen altas taxas de infestación por insectos. Algúns autores suxiren que estas infestacións se deben á forma preferida de dispersión dos froitos, a mirmecocoria, xa que a recompensa (elaiosoma) pode atraer a outros insectos que depreden os aquenios (Gorgorov et al., 2015; Traykova et al., 2015). Noutros casos, como en *C. tomentella* Hand.-Mazz., na literatura menciónase a produción de aquenios totais (Uysal et al., 2006) pero non a taxa de viabilidade.

Nas distintas especies endémicas do xénero, a taxa de xerminación é extremadamente variable, indo dende un 0,7% en *C. pseudaxillaris* (Traykova et al., 2015) ata un 88% en *C. tchihatcheffi* Fisch. & C.A.Mey. (Arpaguş et al., 2017). Isto está relacionado en grande medida con fenómenos de letargo. De feito, máis dun 70% das centaureas nas que se estudou a xerminación precisaron dalgún tratamento para romper o letargo (**Táboa 3**): son comúns os tratamentos de estratificación prolongada, nalgúns casos superando o mes, como en *C. tchihatcheffi* (Arpaguş et al., 2017), e incluso combinando a estratificación cunha imbibición previa á posta en xerminación nunha solución de ácido xiberélico 3 (AX₃), como en *C. achterovii* Urum., *C. pseudaxilaris*, *C. hermannii* F.Herm. e *C. olympica* (DC.) K. Koch

INTRODUCCIÓN

(Traykova et al., 2015; Yankova-Tsvetkova et al., 2018; Yücel, 2021; Yücel & Erken, 2023). Noutros casos, o AX₃ suplementase no medio de indución, como en *C. fenzilii* Reichardt, e en *C. tchihatcheffi* (Arpaguş et al., 2017; Turkoglu et al., 2018). Por outra parte, o nitrato, que foi descrito como un factor determinante na estimulación da xerminación (Sajeev et al., 2024), foi suplementado no medio de indución, estimulando a xerminación en *C. tomentella* (Uysal et al., 2006). Tamén se teñen utilizado tratamentos de escarificación química para mellorar a xerminación en *C. arifolia* Boiss. e *C. amblensis* subsp. *tentundaica* (Rivas Goday) Rivas Mart. (Márquez García, 2016; Yüzbasioğlu et al., 2012) (**Táboa 3**).

A pesar da variedade de tratamentos que se teñen aplicado para superar os procesos de letargo en especies endémicas do xénero, a maior parte dos autores non indica ou descoñece o tipo de letargo que afecta á semente. Entre todos os protocolos revisados (Táboa 3), *C. tchihatcheffi* é a única na que se describe a aparición dun letargo fisiolóxico profundo, especificándose que os tratamentos de estratificación e as xiberelinas se combinan para mellorar a xerminación (Arpaguş et al., 2017; Ozel et al., 2006).

Nos ensaios de xerminación, a maior parte das especies endémicas de *Centaurea* foron establecidas en condicións asépticas nun sistema *in vitro*. Xeralmente, os tratamentos de desinfección superficial resultan nunhas altas taxas de asepsia (Arpaguş et al., 2017; Atalay & Erisen, 2017; Kurt & Erdağ, 2009; Ozel et al., 2006; Perica, 2003). Non obstante, noutras especies describíronse altas taxas de contaminación (Traykova et al., 2015; Yankova-Tsvetkova et al., 2018), a pesar de ter utilizado tempos de incubación e concentracións de desinfectantes similares aos utilizados nas experiencias descritas previamente. Parte das probas de xerminación realizadas *in vitro* nalgunhas especies non detallan a efectividade dos tratamentos de desinfección (Gorgorov et al., 2015; Turkoglu et al., 2018; Yüzbasioğlu et al., 2012).

Táboa 3. Tratamentos de xerminación en especies endémicas do xénero *Centaurea* (DS: desinfección superficial, ADE: auga destilada estéril, MS medio de Murashige e Skoog, 1962). A pesar de non estar mencionado de forma explícita na bibliografía, considerouse que os aquenios presentaban letargo cando se aplicaron tratamentos para superalo (estratificación, tratamentos con xiberelinas, escarificación química). Reflicítese unicamente as condicións que aparecían recollidas nas publicacións consultadas (Fonte: elaboración propia).

Especie	País de orixe	Tipo de ensaio	Presenza de letargo	Pretratamento	Tratamento	Xerminación	Referencia
<i>Centaurea amblensis</i> subsp. <i>tentudaica</i> (Rivas Goday) Rivas Mart.	España	In vivo	Si	Escarificación	16h/8h, 25/12°C, cultivo en agar 1%	76%	(Márquez García, 2016)
<i>Centaurea cineraria</i> subsp. <i>circae</i> (Sommier) Cela Renz. & Viegi	Italia		Non	-	12h/12h, 20/10°C, cultivo en placas Petri	67,50%	(Valletta et al., 2016)
<i>Centaurea hermannii</i> F.Herm.	Turquía		Si	0,2 g l ⁻¹ AX ₃ , 3 meses a 4°C; 3 meses de estratificación húmida 4°C	Cultivo en placas Petri	70,50%	(Yücel, 2021)
<i>Centaurea olympica</i> (DC.) K. Koch	Turquía		Si	3 meses de estratificación húmida 4°C, 24h 0,2 g l ⁻¹ AX ₃ , DS (1 min etanol 70%, 10 min NaClO 5,25%, lavado ADE)	12h/12h, 20±0,5°C cultivo en placas Petri	65,50%	(Yücel & Erken, 2023)
<i>Centaurea tomentella</i> Hand.-Mazz.	Turquía		Si	-	16h/8h, 25 ± 1°C, cultivo en placas Petri con 0,25% KNO ₃	61,25%	(Uysal et al., 2006)
<i>Centaurea achtarovii</i> Urum.	Bulgaria	In vitro	Si	1 mes a 7°C, 20h en 0,35% AX ₃ , DS (lavado baixo auga da billa, 1 min etanol 70%, 10 min NaClO 5%, 3 lavados 5 min con ADE)	16h/8h, 23±2°C, cultivo en medio MS + 3% sacarosa + 0,65% agar (pH=5,75)	12%	(Yankova-Tsvetkova et al., 2018)
<i>Centaurea arifolia</i> Boiss.	Turquía		Si	Estratificación 1,3 ou 7 días a 4°C. Aplicación de H ₂ SO ₄ , DS(30 min baixo a billa, 10 min etanol 70%, 15 min NaClO 4,5%)	12h/12h, 25±2°C, cultivo en medio MS (1/2 sales) + 1% sacarosa + 0,8% agar (pH=5,8)	25%	(Yüzbaşıoğlu et al., 2012)
<i>Centaurea davidovii</i> Urum.	Bulgaria		Non	DS(1 min etanol 70%, 10 min NaClO 5%, lavado con ADE)	16h/8h, 23±2°C, cultivo en medio MS	10%	(Gorgorov et al., 2015)
<i>Centaurea fenzi</i> Reichardt.	Turquía		Si	DS (10 min en 100% lixivia comercial)	Cultivo en medio MS + 1 mg·l ⁻¹ AX ₃	35%	(Turkoglu et al., 2018)
<i>Centaurea lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	Turquía		Non	DS (10-15 min en 50% lixivia comercial, 3 lavados con ADE)	16h/8h, 24±2°C, cultivo en medio MS + 3% sacarosa + 0,8% agar (pH=5,8)	20%	(Atalay & Erisen, 2017)
<i>Centaurea pseudaxilaris</i> Stef. & T. Georgiev	Bulgaria		Si	DS (lavado en solución KMnO ₄ , 1 min etanol 70%, 10 min NaClO 5%) estratificación 1 mes 6°C ou 20h AX ₃ 0,035%	16h/8h, 23±2°C, cultivo en medio MS	0,70%	(Traykova et al., 2015)
<i>Centaurea rupestris</i> L.	Croacia		Non	DS (2% dicloroisocianurato 5 min, 3 lavados, 5 min con ADE, 6% peróxido de hidróxeno, 3 lavados 5 min con ADE)	16h/8h, 22 ± 2°C, cultivo en medio MS (pH=5,7)	46,30%	(Perica, 2003)
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch. & C.A.Mey.	Turquía		Si	Estratificación 13 días 4°C. DS (30 min 50% lixivia comercial)	Escuridade 18°C, cultivo en medio MS+3% sacarosa+0,8% agar	0,0025%	(Ozel et al., 2006)
				4 semanas a 4°C, DS (25 min, 15 min lixivia comercial, 3 lavados 5 min con ADE)	Cultivo en medio MS suplementado con 1 mg·l ⁻¹ AX ₃	88%	(Arpaguş et al., 2017)
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	Turquía		Si	DS (10 min etanol 70%, 15 min NaClO 4,5%, 3 lavados con ADE)	16h/8h ou escuridade, 24±2°C, cultivo en botes con auga destilada + vitaminas MS + 1 mg·l ⁻¹ AX ₃	80%	(Kurt & Erdağ, 2009)

INTRODUCCIÓN

1.2.4.1.2 Reprodución sexual e capacidade xerminativa dos aquenios de *Centaurea ulreia*e

Estudos previos indican que *Centaurea ulreia*e presenta unha baixa taxa de floración: unicamente un 8% dos vástagos presentan capítulos, que se desenvolven plenamente entre abril e xullo. Os abellóns son os principais vectores da polinización cruzada (**Figura 7**) (Bañares Baudet, 2004). O sistema de compatibilidade en *C. ulreia*e non está descrito.

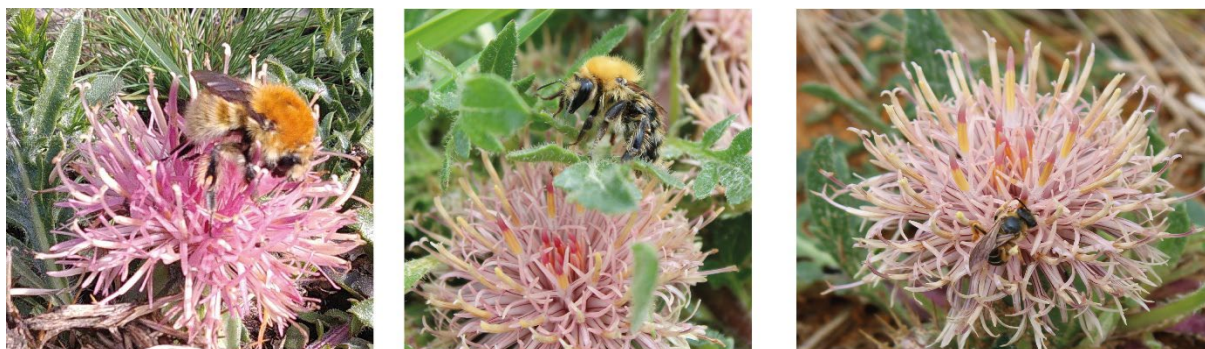


Figura 7. Varios exemplares de *Bombus* spp. polinizando capítulos de *C. ulreia*e (Fonte: elaboración propia).

A eficacia da reprodución sexual en *C. ulreia*e é obxecto de debate. Silva-Pando (1987) considera que a especie parece ter unha reprodución sexual altamente eficaz, observando un número “importante” de froitos viables por capítulo. Pola súa parte, Izco et al. (2003) observan entre 10-12 aquenios viables por capítulo que, en determinadas ocasións superan os 20, estimando unhas taxas de xerminación na natureza no entorno do 40%, e consideran que a reprodución sexual resulta eficaz. Contrariamente a esta afirmación, AFA (2004) indica que as porcentaxes de xerminación en campo están moi por debaixo das obtidas en probas de xerminación, que eles cuantifican nun 30% en condicións óptimas de laboratorio. Por outra banda, estes mesmos autores, estiman unha produción duns 15 aquenios viables por vástago, sendo unha das taxas de viabilidade máis baixas dentro do xénero, co cal, os autores conclúen que nesta especie a reprodución sexual é pouco eficiente.

Máis adiante, Mallón (2008) estudou a capacidade xerminativa dos aquenios de *C. ulreia*e mediante unha serie de ensaios de xerminación *in vivo* e *in vitro*. Nos seus experimentos, dividiu os aquenios en 3 categorías en función do seu peso: lixeiros (<17,5 mg), medios (17,5-22,5 mg) e pesados (>22,5 mg) e calculou a distribución das categorías na natureza (**Táboa 4**).

Táboa 4. Ensaio de xerminación realizados en *Centaurea ulreiae*. Os aquenios foron separados en 3 clases de peso: lixeiros (<17,5 mg), medios (17,5-22,5 mg) e pesados (>22,5 mg), que se distribúen na natureza nas seguintes proporcións: 52,82% lixeiros, 32,78% medios e 14,38% da clase pesada (ADE: auga destilada estéril; DS: desinfección superficial) (Mallón, 2008) (Fonte: elaboración propia).

Tipo de ensaio	Pretratamento	Tratamento	Clase de peso	Xerminación	Xerminación media ponderada	
<i>In vivo</i>	Baño con ADE e Tween 20®, 3 baños en ADE, 24 h imbibición a temperatura ambiente	Escuridade	Lixeiros	5%	5,7%	
			Medios	5%		
			Pesados	10%		
		Iluminación 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Lixeiros	15%	15,7%	
			Medios	15%		
			Pesados	20%		
	Choque térmico en estufa 60°C 15 min	Escuridade	Lixeiros	5%	13,3%	
			Medios	25%		
			Pesados	17%		
		Choque térmico en estufa 90°C 5 min	Escuridade	Lixeiros	5%	5,6%
				Medios	2,5%	
				Pesados	15%	
<i>In vitro</i>	DS(15 min en Domestos® 10%, 4 lavados con ADE), 24 h imbibición en neveira, retirada cubertas.	16h/8h, 24/20 \pm 2°C. Cultivo en MS + 3% sacarosa + agar (pH=5,8)	Lixeiros	50%	66,7%	
			Medios	90%		
			Pesados	75%		

As taxas de xerminación nos ensaios *in vivo* foron relativamente baixas: a maior taxa de xerminación deuse nos aquenios da clase media (25%) despois de aplicar un tratamento de choque térmico en estufa durante 5 min a 60°C. A taxa de xerminación media ponderada (segundo a proporción das clases de peso dos aquenios na natureza) máis alta (15,7%) foi observada no tratamento realizado baixo condicións de iluminación continua (**Táboa 4**).

Por outra banda, os ensaios de xerminación en condicións asépticas sobre medio de cultivo (*in vitro*) deron como resultado taxas de xerminación moito maiores: na clase de peso media acadouse un 90% de xerminación e a xerminación media ponderada foi do 66,7% (**Táboa 4**). Nestes ensaios non se indica a eficacia que tiveron os tratamentos de desinfección superficial dos aquenios. Segundo o autor, os datos de frutificación e xerminación parecen indicar altas taxas de endogamia, aínda que isto non queda plenamente xustifico (Mallón, 2008).

1.2.4.2 Probas de viabilidade por tinguidura

As probas de viabilidade por tinguidura véñense utilizando de forma rutineira dende mediados do século pasado para establecer a viabilidade dos lotes de sementes. Estas probas

INTRODUCCIÓN

son moito máis rápidas que as probas de xerminación e achegan información complementaria a estas últimas, xa que indican a porcentaxe total de embrións viables, permitindo, por exemplo, discernir se nos resultados dos tests de xerminación influíu algún tipo de letargo ou se as condicións de xerminación non foron óptimas. Un condicionante das probas de tinguidura é determinar como viable ou inviable aqueles embrións que presentan un grao de tinguidura parcial, no que a súa interpretación presenta un certo compoñente subxectivo. En xeral, adóitase establecer unha categoría intermedia (embrións semi-viables) nos casos dubidosos (Bachetta et al., 2008; Godefroid et al., 2010).

Dentro das probas de viabilidade por tinguidura, na proba do Índigo Carmín (IC) os tecidos mortos tinguense dunha cor azul intensa, e os tecidos vivos non se tinguen (Copeland & McDonald, 1999). Foi utilizada por primeira vez en Rusia por Neljubow en 1925 (França-Neto & Krzyzanowski, 2019). A ISTA (*International Seed Testing Association*) non recolle o uso desta proba dentro das súas normas, preferindo á proba do tetrazolio. Non obstante, a tinguidura do IC utilízase de forma habitual en España como indicador da viabilidade en varias especies leñosas como o piñeiro, onde se probou que ambas tinguiduras son igualmente eficaces (Moreno-Álvarez et al., 2001)

Na proba do Cloruro de Tetrazolio (Tz), este composto, que é un indicador redox, tingu de cor vermella os tecidos vivos do embrión, como reacción á respiración celular. En cambio, as zonas necróticas non se tinguen. Este test, descrito inicialmente por Lakon (1949), vense utilizando en embrións de diversas especies para coñecer a porcentaxe de viabilidade. A concentración de Tz, o tempo de incubación e a temperatura de reacción afectan á rapidez e a eficacia da tinguidura (França-Neto & Krzyzanowski, 2019).

Os tecidos tratados mediante tinguidura con Tz pódense agrupar nas seguintes categorías: (1) tecidos sans, que presentan un patrón de tinguidura continuo, de aspecto lustroso, de cores vermellas intensas; (2) tecidos que tenden a tinguirse de forma parcial, heteroxénea, presentando unha coloración vermella clara tirando a rosada, pero que se consideran viables; (3) tecidos non viables, de aspecto apagado, presentando coloracións pardas, entre vermello e gris e cunha intensidade variable. (Lakon, 1949)

1.2.4.2.1 Probas de viabilidade en especies endémicas do xénero *Centaurea*

Diversos estudos proporcionan resultados sobre probas de viabilidade con Tz en especies endémicas do xénero (Táboa 5). Os valores de viabilidade máis baixos obtivéronse en *C. ahtarovii* Urum., non superando o 20%, en consonancia cos resultados de xerminación nesta mesma especie (Táboa 3) (Yankova-Tsvetkova et al., 2018). Noutros casos, como en *C. zeybekii* Wagenitz, as taxas de viabilidade foron moi altas, igualmente similares aos resultados obtidos nas probas de xerminación (Táboa 3) (Kurt & Erdağ, 2009).

Táboa 5. Condicións e resultados de diferentes tratamentos de tinguidura con Tz realizados en especies endémicas do xénero *Centaurea*. (n: número de aqenios utilizados, Tz: tetrazolio). Cando non se dá un valor de tempo ou temperatura de incubación, estes non se mencionaron no estudo (Fonte: elaboración propia).

Especie	País de orixe	n	Pretratamentos	Condicións tinguidura	Porcentaxe de viabilidade	Referencia
<i>Centaurea ahtarovii</i> Urum.	Bulgaria	50	Imbibición 24h, retirada de cubertas	1% Tz 24 h -°C	17,50%	(Yankova-Tsvetkova et al., 2018)
<i>Centaurea amaena</i> Boiss & Balansa	Turquía	75	Retirada de cubertas	0,1% Tz - h -°C	82%	(Atasagun e Aksoy, 2018)
<i>Centaurea ambiensis</i> subsp. <i>tentundaica</i> (Rivas Goday) Rivas Mart.	España	-	Imbibición 24h, incisión nas cubertas	1% Tz 48 h 35°C	80-85%	(Márquez García, 2016)
<i>Centaurea fenzilli</i> Reichardt.	Turquía	-	Imbibición 24h, retirada das cubertas	0,1% Tz - h -°C	85%	(Turkoglu et al., 2018)
<i>Centaurea hermanii</i> F. Herm. (Rivas Goday) Rivas Mart.	Turquía	60	Imbibición 24h, eliminación 1/3 ou retirada de cubertas	1% Tz 24 h 30°C	72,22%	(Yücel, 2021)
<i>Centaurea olympica</i> (DC.) K. Koch	Turquía	60	Imbibición 24h, eliminación 1/3 ou retirada de cubertas	1% Tz 24 h 30°C	76,60%	(Yücel e Erken, 2023)
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch, & C.A. Mey	Turquía	-	Cortadas á metade	0,1% Tz 30 min -°C	85%	(Ozel et al., 2006)
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	Turquía	-	Cortados á metade	0,1% Tz 30 min -°C	98%	(Kurt e Erdağ, 2009)

As probas de viabilidade poden resultar moi útiles tanto no manexo periódico de coleccións de sementes como para avaliar a existencia de fenómenos de letargo que poidan estar afectando á xerminación. Desta forma, nalgunhas especies de *Centaurea*, cando se producen diferenzas importantes entre os resultados da proba de tetrazolio e as probas de xerminación, isto pode ser indicativo da aparición de fenómenos de letargo, como en *C. tchihatcheffii*, na que inicialmente se observou unha taxa de viabilidade do 85% mentres que a xerminación foi do 0,0025% (Ozel et al., 2006). Nesta mesma especie, a realización dun tratamento previo de estratificación en

INTRODUCCIÓN

frío durante 4 semanas e o uso dun medio de xerminación suplementado con AX₃ permitiu acadar un 88% de xerminación (Arpaguş et al., 2017)(Táboas 3 e 5).

Con respecto ás condicións de desenvolvemento das probas de viabilidade sobre aquenios de *Centaurea* (Táboa 5), obsérvase que na maior parte das especies se realizaron tratamentos previos de imbibición e/ou retirada total ou parcial das cubertas. No que respecta á concentración de colorante, as concentracións utilizadas foron do 0,1% ou do 1% de Tz. A temperatura e o tempo de incubación variaron amplamente entre as diferentes especies ensaiadas, non mencionándose, a pesar da súa importancia, os valores destes factores nalgúns casos.

1.2.4.2.2 Probas de viabilidade en *Centaurea ulreiae*

Mallón (2008) levou a cabo probas de viabilidade en aquenios de *C. ulreiae*, utilizando aquenios conservados en diferentes condicións (4 anos a 4°C e 1 ou 4 anos a temperatura ambiente) ou acabados de colleitar. Para a realización dos ensaios embebeu os aquenios 24h en auga destilada e retirou as cubertas dos embrións, que foron incubados nunha solución de Tz ao 1% a 30°C durante 48 horas. Nestes ensaios comprobou que os aquenios que foran almacenados a 4°C durante 4 anos conservaban os mesmos valores de viabilidade (90%) que trala colleita (96,6%).

A partir destes resultados, Mallón describiu as condicións máis axeitadas para a conservación dos aquenios (4°C) e teorizou que *C. ulreiae* debía considerarse unha especie ortodoxa. A pesar dos bos resultados obtidos despois das probas de viabilidade, os test de xerminación, especialmente os realizados *in vivo*, proporcionaron resultados netamente inferiores aos obtidos nas probas de viabilidade.

A falta de coñecemento no que respecta ás condicións óptimas para a xerminación *in vivo*, así como doutras características das sementes, que afectan de forma notable ás estratexias de conservación *ex situ*, xustifican a realización deste traballo.

1.2.5 Micropropagación

1.2.5.1 Cultivo *in vitro* de tecidos vexetais

O cultivo *in vitro* de tecidos vexetais comprende o conxunto de técnicas que se poden utilizar para cultivar protoplastos, células, tecidos, órganos e sementes, ou rexenerar organismos completos en medios nutritivos adecuados, nun réxime aséptico, con condicións de temperatura, fotoperíodo, luz e humidade controladas. As técnicas de cultivo *in vitro* baséanse na capacidade das células vexetais de dediferenciarse e poder xerar unha planta completa. Esta capacidade das células adultas para rexenerar un organismo completo coñécese como totipotencia (Haberlandt, G, 1902).

O desenvolvemento das técnicas de cultivo *in vitro* atravesou diversos fitos. A finais de 1930, conseguiuase establecer cultivos *in vitro* de tecidos de varias especies vexetais, e identificouse o primeiro regulador do crecemento, o ácido 3-indol acético (AIA), unha auxina (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1939; White, 1939). Máis tarde, na década dos 1950, co descubrimento da primeira citoquinina, a Kinetina (Kin), determinouse a importancia da ratio auxina:citoquinina na resposta morfoxenética: unha ratio favorable á auxina resultaba na formación de raíces, e unha ratio favorable á citoquinina resultaba na rexeneración brotes. O uso simultáneo de concentracións altas de ambos reguladores resultaba na formación dunha masa de células indiferenciadas denominada calo (Skoog & Miller, 1957).

O cultivo *in vitro* de tecidos vexetais pode ser utilizado con diferentes finalidades, entre as que destacan a produción dun número elevado de plantas (micropropagación), o uso como técnica de rexuvenecemento (subcultivo continuo, microenxerto, illamento de meristemas), a preservación *ex situ* de material xenético (conservación en bancos de xermoplasma), a transformación e rexeneración de individuos producidos en programas de mellora e selección xenética, a produción de metabolitos primarios ou secundarios e a produción de plantas libres de patóxenos.

O establecemento dos cultivos *in vitro*, independentemente da finalidade, debe seguir protocolo de pasos básicos, que comezan coa selección do material de partida. Este material deberá proporcionar unha cantidade suficiente de explantos susceptibles de seren establecidos *in vitro* en condicións asépticas. A elección do material terá implicacións nas técnicas e condicións que se escollerán para a desinfección superficial e o establecemento.

INTRODUCCIÓN

Unha vez obtidos explantos reactivos en condicións asépticas, que se manteñen de forma estable no sistema *in vitro*, na maior parte das aplicacións do cultivo *in vitro*, se inicia unha fase de rexeneración que implica a proliferación celular.

A rexeneración pode producirse mediante dúas vías: indirectas ou directas. As vías indirectas engloban aquelas respostas nas que ten lugar unha fase intermedia, na que as células do tecido inicial forman un calo que, baixo as condicións adecuadas dá lugar a un tecido máis ou menos diferenciado. As vías directas comprenden respostas de rexeneración sen mediación dun calo. Ambas vías poden suceder en procesos de rexeneración *in vitro* de novos órganos (organoxénese) ou de embrións derivados de tecidos somáticos (embrións somáticos) (Street & Henshaw, 1966; Zimmerman, 1993).

A organoxénese é un proceso natural, mediante o que as células se diferencian en tipos celulares específicos cun patrón de desenvolvemento concreto, e acaban por formar órganos e/ou organismos completos. Os vexetais continúan formando novos órganos durante todo o seu ciclo vital como resposta a determinados estímulos a partir dos tecidos meristemáticos. Pódese inducir a formación de órganos a partir de tecidos diferenciados, que poden ou non ser meristemáticos, como resposta a certas condicións. Este proceso coñécese como organoxénese *de novo* (Christianson & Warnick, 1985; Duclercq et al., 2011; Sugiyama, 1999).

A embrioxénese é o proceso polo cal se forma un embrión. Este fenómeno prodúcese na natureza como consecuencia da reprodución sexual, dando lugar a un embrión cigótico. En condicións *in vitro*, a embrioxénese pode ter lugar a partir de células somáticas sometidas a determinados estímulos (Zimmerman, 1993). É o que se coñece como embrioxénese somática e require dunha reprogramación xenética, como resposta á exposición a estrés ou a concentracións relativamente elevadas de reguladores do crecemento (Fehér, 2015; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

1.2.5.2 Micropropagación

A micropropagación presenta 5 fases diferenciadas: a Fase 0 (preparación previa do material de partida), Fase I (establecemento), Fase II (multiplicación), na que se estimula a proliferación dos brotes; Fase III (enraizamento), na que se induce á formación de raíces, e Fase IV (aclimatación), na que as plantas se aclimatan a condicións *ex vitro* (Debergh & Maene, 1981).

A fase 0 engloba todas as accións encamiñadas a seleccionar, colleitar e preparar o material para o establecemento *in vitro*, incluíndo a realización de tratamentos previos para eliminar o letargo en sementes ou tratamentos de estimulación do crecemento en material adulto, así como os tratamentos de limpeza previos á desinfección. Na fase I, realízanse os procesos que permiten establecer un cultivo aséptico sobre un medio mineral, incluíndo a realización dun proceso de desinfección superficial.

O establecemento de cultivos asépticos permite que se inicie a Fase II ou multiplicación, que se caracteriza pola multiplicación rápida e clonal das partes aéreas dunha planta en ciclos de aproximadamente 35 días, cando se produce o subcultivo a medio fresco. Esta fase caracterízase polo uso de citoquininas como principais reguladores do crecemento. Existen tres tipos de multiplicación clonal dos explantos: embrioxénese somática, multiplicación axilar, e multiplicación adventicia (George et al., 2007).

A fase III ou enraizamento se realiza sobre brotes producidos mediante multiplicación axilar ou adventicia. Tipicamente a indución do enraizamento se basea na a exposición a auxinas. Ao final da fase III, dentro do sistema *in vitro* cóntase con plantas completas, que presentan unha parte aérea e un sistema radicular máis ou menos desenvolvido. As plantas completas producidas mediante micropropagación deben ser adaptadas antes do seu traslado a condicións *ex vitro* ou naturais. Este proceso realízase mediante a fase IV ou aclimatación.

1.2.5.3 *Micropropagación para conservación*

A micropropagación abrangue as técnicas de cultivo *in vitro* que se utilizan para rexenerar plantas completas de forma continua. Como se comentou anteriormente, entre as aplicacións da micropropagación, a produción de plantas con interese de conservación vense utilizando como método de conservación *ex situ* e para producir plantas utilizadas en programas de reintrodución que forman parte das estratexias de conservación *in situ* (González-Benito & Martín, 2011).

O uso da micropropagación permite conservar accesións clonais de especies cuxas sementes presentan un comportamento non ortodoxo (recalcitrante ou intermedio) ou unhas taxas de viabilidade moi baixas (Belokurova, 2010; Coelho et al., 2020; Kulak et al., 2022). Estes métodos resultan eficientes tamén na conservación de material que proveña en especies nas que as poboacións naturais contén cun número moi reducido de individuos, por exemplo en plantas raras ou ameazadas, onde a colleita de material pode afectar negativamente ás

INTRODUCCIÓN

poboacións naturais (Coelho et al., 2020; Engelmann, 2011). A micropropagación permite establecer liñas clonais a partir de material vexetativo sen afectar ás poboacións naturais. Por outro lado, a capacidade de propagar plantas en condicións asépticas permite manter durante tempos prolongados un número elevado de explantos de distintos xenotipos representativos das poboacións a conservar nun espazo reducido. Este material pode conservarse a medio (conservación a 4-8°C) ou a longo prazo (criopreservación en nitróxeno líquido) mantendo a súa viabilidade e a súa capacidade de multiplicación (González-Benito & Martín, 2011; Taji et al., 1992).

Ademais da súa importancia para a conservación, a micropropagación permite producir nun espazo reducido un número importante de individuos, representativos de diversos xenotipos, sendo un método que cobra especial importancia na produción de planta para a realización de reintroducións ou reforzamentos das poboacións naturais.

1.2.5.3.1 Uso de técnicas de cultivo *in vitro* para a conservación de especies endémicas do xénero *Centaurea*

1.2.5.3.1.1 Materiais de partida para a micropropagación

Nos protocolos de micropropagación dispoñibles para plantas endémicas do xénero *Centaurea*, o material de partida máis común son os aquenios, que se fan xerminar en condicións *in vitro* (**Táboa 6**). Este tipo de material adoita presentar problemas asociados ás baixas taxas de frutificación e xerminación que presentan moitas especies do xénero, precisando tratamentos prexerminativos relativamente longos. Así mesmo, nun bo número de ocasións, os protocolos de desinfección previa ao estableemento *in vitro* son pouco eficaces (**Táboa 3**). Como alternativa ao uso dos aquenios, nalgúns especies, utilizáronse caules florais como material de partida, que adoitan portar xemas axilares e son máis fáciles de desinfectar que as follas da roseta basal, como no caso de *C. pauti* Loscos ex Wilk. e *C. spachii* Schultz Bip. ex Wilk. Ademais, no caso de *C. pauti*, téñense reportado fenómenos de hibridación con outras especies, o que descarta o uso dos aquenios como material para a conservación (Cuenca et al., 1999; Cuenca & Amo-Marco, 2000). En *C. cineraria* subsp. *circae* tamén se utilizaron caules florais, pois ao problema da hibridación uníase á dificultade para facer xerminar os aquenios e as altas taxas de infestación por insectos (Valletta et al., 2016).

1.2.5.3.1.2 Protocolos na fase de establecemento

Os aspectos relativos á fase de establecemento *in vitro* de materiais de *Centaurea* foron tratados parcialmente no apartado 1.3.1.1.2, máis concretamente na **Táboa 6**, onde se indicaron os protocolos de desinfección, os medios nutritivos e as condicións de establecemento (xerminación) daquelas especies establecidas a partir de aquenios.

Como xa se ten descrito, existen protocolos de micropropagación de *Centaurea* nos que o material de partida son caules florais, que foron colleitados en campo e lavados exhaustivamente no laboratorio antes de realizar un protocolo de desinfección superficial (Cuenca et al., 1999; Cuenca & Amo-Marco, 2000; Valletta et al., 2016). Unha terceira fonte de explantos son as follas tomadas directamente da roseta basal. Non se acharon protocolos que utilicen este material. Esta fonte de material vexetativo é de interese no xénero, xa que, como no caso de *C. ulreiaae*, unha parte das centaureas son acaules ou subacaules.

1.2.5.3.1.3 Protocolos na fase de multiplicación

Dentro da vintena de protocolos dispoñibles para a micropropagación de especies endémicas de *Centaurea*, case a metade seguen a vía de rexeneración por cauloxénese adventicia indirecta. Nestes traballos non se realizan protocolos posteriores de proliferación axilar, previos á fase de enraizamento. Na maior parte dos protocolos, a multiplicación se basea na proliferación de xemas axilares (**Táboa 6**). Só existe un protocolo de embrioxénese somática entre a bibliografía consultada, en *C. tchihatcheffii* (Ozel et al., 2006). Na práctica totalidade dos protocolos consultados, utilízase o medio MS como medio mineral, suplementado con 3% de sacarosa e 0,65-0,9% de agar, co pH axustado a 5,7. Foron sempre factores invariables o tipo de luz e o fotoperíodo.

Con independencia da vía de rexeneración utilizada, o regulador do crecemento máis frecuente é 6-benzilaminopurina (BAP), en concentracións que varían entre 0,2 e 1,0 mg·l⁻¹. Existen casos nos que se utilizan outras citoquininas (Kin, *meta*-topolina), en solitario ou combinadas con BAP. BAP tamén se utiliza combinada con auxinas, como o ácido indol-3-butírico (AIB) ou o ácido α -naftalén-acético (ANA), especialmente cando se pretende estimular a formación dun calo organoxénico (**Táboa 6**). En varias das especies nas que se estimulou a

INTRODUCCIÓN

producción de brotes adventicios, o uso de thidiazurón (TDZ) resultou ineficaz, ben por non estimular a organoxénese ou por dar lugar á formación de brotes hiperhídricos (Kurt & Erdağ, 2009; Uzun et al., 2020).

As taxas de multiplicación citadas foron moi variables: no caso das vías directas, variaron entre un máximo de 14,7 brotes novos por explanto en *C. zeybekii*, despois da aplicación de 1,0 mg·l⁻¹ BAP (Kurt & Erdağ, 2009), e un mínimo de 3,6 brotes novos despois do cultivo en medio con 0,5 mg·l⁻¹ BAP, en *C. davidovii* (Gorgorov et al., 2015). Nas vías indirectas, mediante o uso combinado de 0,5 mg·l⁻¹ BAP + 0,2 mg·l⁻¹ ANA obtivéronse 32,2 brotes novos por explanto en *C. lycaonica* (Atalay & Erisen, 2017), mentres que en *C. pseudaxillaris*, a aplicación de 0,5 mg·l⁻¹ BAP resultou na produción de tan solo 2,6 brotes novos por explanto (Traykova et al., 2015).

Táboa 6. Protocolos propostos na fase de multiplicación de diferentes especies endémicas do xénero *Centaurea*. (RCV: reguladores do crecemento vexetal; TM: taxa de multiplicación; sac: sacarosa; PF: peso fresco).¹ % de rexeneración² brotes(5-6 g PF calo) (Fonte: elaboración propia).

Especie	Material de partida	Vía de rexeneración	Medio de cultivo	RCV	Capacidade de multiplicación (TM ou ^{1,2})	Referencia
<i>Centaurea amaena</i> Boiss. & Balansa	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta	MS, 3% sac, 0,7% agar (pH=5,5-5,8)	4,0 mg·l ⁻¹ mT	4,13	(Uzun et al. 2020)
	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa		4,0 mg·l ⁻¹ mT	9,97	
<i>Centaurea arifolia</i> Boiss.	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta	MS, 1% sac, 0,8% agar (pH=5,8)	1,0 mg·l ⁻¹ BAP+ 0,1 mg·l ⁻¹ ANA	150% ¹	(Yüzbasıoglu et al. 2012)
<i>Centaurea cineraria</i> subsp. <i>circae</i> (Sommier) Cela Renz & Viegi	Caules florais	Cauloxénese indirecta	B5, 3% sac, 0,7% agar (pH=5,7)	0,1 mg·l ⁻¹ Kin + 0,2 mg·l ⁻¹ BAP	51 ²	(Valletta et al. 2016)
	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS, 3% sac, 0,7% agar (pH=5,7)	2,0 mg·l ⁻¹ Kin + 0,5 mg·l ⁻¹ BAP	5,67	
<i>Centaurea davidovii</i> Urum.	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS, 3% sac, 0,65% agar (pH=5,75)	0,5 mg·l ⁻¹ BAP	3,6	(Gorgorov et al. 2015)
	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta		1,0 mg·l ⁻¹ BAP	4,5	
<i>Centaurea fenizilii</i> Reichardt.	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta	MS, 3% sac, 0,65% agar (pH=5,8)	0,2 mg·l ⁻¹ BAP+ 1,0 mg·l ⁻¹ ANA	5,87	(Turkoglu et al. 2018)
<i>Centaurea lycaonica</i> Boiss. & Heldr	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS, 3% sac, 0,7% agar, (pH=5,8)	0,5 mg·l ⁻¹ BAP	8,7	(Atalay e Erisen 2017)
	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta		0,5 mg·l ⁻¹ BAP + 0,2 mg·l ⁻¹ ANA	32,3	
<i>Centaurea pau</i> Loscos ex. Willk.	Caules florais	Cauloxénese directa	MS, 2% sac, 0,8% agar (pH=5,7)	0,5 mg·l ⁻¹ BAP	4,8	(Cuenca et al. 1999)
<i>Centaurea pseudaxillaris</i> Stef. & T. Georgiev	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta	MS	0,5 mg·l ⁻¹ BAP	2,6	(Traykova et al. 2015)
<i>Centaurea rupestris</i> L.	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS, 3% sac, 0,9% agar (pH=5,7)	0,2 mg·l ⁻¹ BAP+ 1,0 mg·l ⁻¹ AX ₃	9,94	(Perica 2003)
<i>Centaurea spachii</i> Schultz Bip. ex Willk.	Caules florais	Cauloxénese directa	MS, 2% sac, 0,8% agar (pH=5,7)	1,0 mg·l ⁻¹ BAP	3,8	(Cuenca e Amom-Marco 2000)
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch et. Mey	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS	1,0 mg·l ⁻¹ BAP + 1,0 mg·l ⁻¹ AIB	4,18	(Arpaguş et al. 2017)
	Aquenios inmaturos	Embrioxénese somática indirecta	MS 3% sac, 0,7% agar	1,0 mg·l ⁻¹ Kin + 0,25 mg·l ⁻¹ ANA	9,89	(Ozel et al. 2006)
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i> → follas	Cauloxénese indirecta	MS, 3% sac, 0,8% agar (pH=5,8)	1,0 mg·l ⁻¹ Kin	6,2	(Aydoğan e Erdağ 2015)
	Aquenios → plántulas xerminadas <i>in vitro</i>	Cauloxénese directa	MS, 3% sac, 0,8% agar (pH=5,8)	1,0 mg·l ⁻¹ BAP	14,85	(Kurt e Erdağ 2009)

INTRODUCCIÓN

1.2.5.3.1.4 Protocolos na fase de enraizamento

No que respecta aos protocolos dispoñibles para a indución do enraizamento, na maior parte destes utilízanse medios coa formulación estándar de sales de MS, nalgúns casos diluídas á metade. Estes medios están suplementados con 1-3% sacarosa e 0,65%-0,9% agar. O pH axústase entre 5,7-5,8 en todos os casos (Táboa 7).

En todos os protocolos estudados, a indución do enraizamento lévase a cabo mediante a adición de auxina(s) ao medio. A auxina máis utilizada é o AIB nunha concentración de 0,5-2,0 mg·l⁻¹, solo ou combinado con ácido indol-3-acético (AIA) (2,0 mg·l⁻¹). En *C. davidovii* e *C. tchihatcheffii* non se engadiron reguladores do crecemento na fase de enraizamento (Arpaguş et al., 2017; Gorgorov et al., 2015). En *C. pseudaxillaris* observouse formación espontánea de raíces en medio con BAP (Traykova et al., 2015) (Táboa 7).

As taxas de enraizamento foron moi dispares, variando entre un 15% en *C. zeybekii* (Aydoğan & Erdağ, 2015; Kurt & Erdağ, 2009) e un 100% en *C. cineraria* subsp. *circae* (Valletta et al., 2016). Outras variables consideradas normalmente para avaliar a calidade do sistema radicular en protocolos de micropropagación, como o número de raíces por brote enraizado ou a lonxitude das raíces, non se tiveron en conta, a excepción dos traballos en *C. pavi* (Cuenca et al., 1999) e *C. spachii* (Cuenca & Amo-Marco, 2000). Nestas dúas especies o número medio de raíces foi inferior a 2 raíces por explanto, cunha lonxitude media de 1,9 cm en *C. spachii* e de 3,9 cm en *C. pavi* (Táboa 7).

Táboa 7. Protocolos dispoñibles para a fase de enraizamento de diferentes especies endémicas do xénero *Centaurea* (RCV: reguladores do crecemento vexetal; sac: sacarosa) (¹non se dan datos sobre o enraizamento pero se menciona que o enraizamento foi lento; ²non se dan datos sobre o enraizamento pero o tratamento foi considerado como o que produce “mellores resultados”) (Fonte: elaboración propia).

Especie	Material de partida no establecemento	Medio de cultivo	Forma de tratamento	RCV	Capacidade de enraizamento			Referencia
					Porcentaxe de enraizamento	Número de raíces	Lonxitude da raíz máis longa (cm)	
<i>Centaurea amaena</i> Boiss. & Balansa	Aquenios	MS(1/2 macros), 3% sac, 0,7% agar (pH=5,5-5,8)	Adición ao medio	2,0 mg·l ⁻¹ AIB	50%	-	-	(Atasagun e Aksoy 2018)
<i>Centaurea arifolia</i> Boiss.	Aquenios	MS, 1% sac, 0,8% agar (pH=5,8)	Adición ao medio	1,0 mg·l ⁻¹ AIB	- ¹	-	-	(Yüzbaşıoğlu et al. 2012)
<i>Centaurea cineraria</i> subsp. <i>circae</i> (Sommier) Cela Renz & Viegi	Caules florais	MS, 3% sac, 0,6% agar (pH=5,7)	Adición ao medio	0,5 mg·l ⁻¹ AIB	100%	7,95	-	(Valletta et al. 2016)
<i>Centaurea davidovii</i> Urum.	Aquenios	MS (1/2 macros)+3% sac+0,65% agar, (pH=5,75)	-	-	96%	-	9,3	(Gorgorov et al. 2015)
<i>Centaurea fenizilii</i> Reichardt.	Aquenios	MS, 3% sac, 0,65% agar (pH=5,8)	Adición ao medio	1,0 mg·l ⁻¹ AIB	- ²	-	-	(Turkoglu et al. 2018)
<i>Centaurea lycanica</i> Boiss. & Heldr.	Aquenios	MS+3% sac+0,7% agar, (pH=5,8)	Adición ao medio	2,0 mg·l ⁻¹ AIA	90%	-	-	(Atalay e Erisen 2017)
<i>Centaurea paui</i> Loscos ex. Willk.	Caules florais	MS+2% sac+0,8% agar, (pH=5,7)	Adición ao medio	2,0 mg·l ⁻¹ AIA + 2,0 mg·l ⁻¹ AIB	45%	1,8	3,9	(Cuenca et al. 1999)
<i>Centaurea pseudaxillaris</i> Stef. & T. Georgiev	Aquenios	MS(1/2 macros) suplementado con 0,5 mg·l ⁻¹ BAP	-	-	100%	9	-	(Traykova et al. 2015)
<i>Centaurea rupestris</i> L.	Aquenios	MS(1/2 macros), 3% sac, 0,9% agar (pH=5,7)	Adición ao medio	0,6 mg·l ⁻¹ AIB	58%	-	-	(Perica 2003)
<i>Centaurea spachii</i> Schultz Bip. ex Willk.	Caules florais	MS+2% sac+0,8% agar, (pH=5,7)	Adición ao medio	2,0 mg·l ⁻¹ AIA + 2,0 mg·l ⁻¹ AIB	60%	1,9	1,9	(Cuenca e Amo-Marco 2000)
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch et. Mey	Aquenios	MS (1/2 macronutrientes)	-	-	62%	-	-	(Arpağuş et al. 2017)
		MS 3% sac, 0,7% agar	Adición ao medio	1,0 mg·l ⁻¹ AIB	-	3	-	(Ozel et al. 2006)
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	Aquenios	MS+3% sac+0,8% agar, (pH=5,8)	Adición ao medio	0,5 mg·l ⁻¹ AIB	15%	-	-	(Aydoğan e Erdağ 2015)
				0,5 mg·l ⁻¹ AIB	15%	-	-	(Kurt e Erdağ 2009)

INTRODUCCIÓN

1.2.5.3.1.5 Protocolos na fase de aclimatación

As condicións de aclimatación mencionadas nos protocolos estudados varían amplamente no grao de detalle co que estas se describen. En ningún caso se realizaron tratamentos comparativos, limitándose a aplicar un protocolo estándar. En tres especies (*C. pseudaxillaris*, *C. tchihatcheffii*, *C. zeybekiii*) non se indicaron os resultados do proceso de aclimatación (**Táboa 8**). A supervivencia das plantas sometidas ao proceso de aclimatación variou entre o 60% (*C.fenzilii*) e o 100% (*C. lycaonica*).

1.2.5.3.1.6 Fenómenos de floración espontánea en cultivo *in vitro*

Un aspecto que se ten observado no cultivo *in vitro* de varias especies do xénero *Centaurea* é a floración espontánea *in vitro*. No caso de especies endémicas, sucedeu en *C. tchihatcheffii* (Ozel et al., 2006) e *C. davidovii* (Gorgorov et al., 2015). A floración *in vitro* se menciona como un fenómeno espontáneo e non se detalla en ningún dos casos se a floración é normal ou se se produce frutificación. Ademais, tampouco se discuten factores que poidan estar implicados na floración en condicións *in vitro*.

Existen protocolos de indución da floración en especies do xénero con importancia medicinal, como *C. cyanus*, na que se puido inducir a floración utilizando brotes adventicios derivados de organoxénese a partir de follas, mediante cultivo en medio MS suplementado con vitamina B5, 3% sacarosa e 100 mg·l⁻¹ de mio-inositol baixo fotoperiodo 16h/8h durante 4-6 semanas.

No caso de especies endémicas, produciuse floración *in vitro* en *C. tchihatcheffii* (Ozel et al., 2006) e *C. davidovii* (Gorgorov et al., 2015). En ambos casos, os explantos que floreceron *in vitro* foran rexenerados de forma indirecta, ben mediante embrioxénese somática ou mediante organoxénese a partir de follas.

Táboa 8. Condicións de preaclimatación e aclimatación e resultados de supervivencia en condicións de invernadoiro de especies endémicas do xénero *Centaurea* (Fonte: elaboración propia).

Especie	Tratamento	Supervivencia	Referencia
<i>Centaurea cineraria</i> subsp. <i>circae</i> (Sommier) Cela Renz & Viegi	Limpeza das raíces, incubación en matraces pechados con Parafilm®. Aos 3-4 días practicáronse pequenos orificios. Despois de 7 días, as plantas foron transferidas a unha mestura de solo:grava de carbonato de calcio (1:1). <u>Aclimatación</u> : cubertas con film transparente que foi retirado aos 7 días.	90%	(Valletta et al., 2016)
<i>Centaurea davidovii</i> Urum.	<u>Mestura</u> : solo, fibra de coco e area (2:1:1). <u>Preaclimatación</u> en cámara durante 3 semanas, 4 períodos: (1) “mañá”: 3h, 20°C, 2070lx; (2) “día”: 10h, 23°C, 3300lx; (3) “anoitecer”: 3h, 20°C, 2070lx; (4) “noite”:8h, 18°C, escuridade. Ventilación permanente, a HR reduciuse diariamente dende un 90% (4), 80% (2), e 85% (1 e 3) ata acadar 65%, 55% e 60% respectivamente. 2-3 meses en cámara de cultivo, 16-28°C, 500-900lx, 25-60% HR. <u>Aclimatación</u> :cultivo en condicións de invernadoiro.	97,7%	(Gorgorov et al., 2015)
<i>Centaurea fenzlii</i> Reichardt.	<u>Mestura</u> : solo:area (3:1).	60%	(Turkoglu et al., 2018)
<i>Centaurea lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	<u>Mestura</u> : turba: perlita (1:1). Cubertas con bolsas de plástico que foron retiradas gradualmente en 4 semanas.	100%	(Atalay & Erisen, 2017)
<i>Centaurea paui</i> Loscos ex. Wilk.	<u>Mestura</u> : vermiculita: perlita (3:1). <u>Preaclimatación</u> en cámara de crecemento (16h/8h, 28/25±2°C, 120 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹), cubertas con bolsas de plástico que foron retiradas gradualmente en 4 semanas. <u>Aclimatación</u> :cultivo en condicións de invernadoiro.	70%	(Cuenca et al., 1999)
<i>Centaurea pseudaxillaris</i> Stef. & T. Georgiev	<u>Mestura</u> : solo: area: fibra de coco (2:1:1). <u>Preaclimatación</u> en cámara durante 3 semanas, 4 períodos: (1) “mañá”: 3h, 20°C, 2070lx; (2) “día”: 10h, 23°C, 3300lx; (3) “anoitecer”: 3h, 20°C, 2070lx; (4) “noite”:8h, 18°C, escuridade. Ventilación permanente, a HR decrecía cada varios días dende un 90% (4) 80% (2) e 85% (1 e 3) ata acadar 65%, 55% e 60% respectivamente. 2 meses en cámara de cultivo, 16h/8h, 16-28°C, 500-900lx, 25-60% HR. <u>Aclimatación</u> :cultivo en condicións de invernadoiro, sobre un substrato de turba e area (2:1).	-	(Traykova et al., 2015)
<i>Centaurea ruprestris</i> L.	<u>Mestura</u> : solo estéril. <u>Aclimatación</u> cubertas con bolsas de plástico ventiladas que foron retiradas gradualmente en 17±3 días. Cultivo en condicións de invernadoiro.	86%	(Perica, 2003)
<i>Centaurea spachii</i> Schultz Bip. ex Willk.	<u>Mestura</u> : vermiculita: perlita (3:1). <u>Preaclimatación</u> en cámara de crecemento (16h/8h, 28/25±2°C, 120 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹), cubertas con bolsas de plástico que foron retiradas gradualmente en 6 semanas. <u>Aclimatación</u> :cultivo en condicións de invernadoiro.	80%	(Cuenca & Amomarco, 2000)
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> Fisch et. Mey	-	64%	(Arpaguş et al., 2017)
	<u>Mestura</u> : area: vermiculita (1:1). 1 semana cubertas con bolsas de plástico.	-	(Ozel et al., 2006)
<i>Centaurea zeybekii</i> Wagenitz	<u>Mestura</u> : area:perlita (3:1). <u>Preaclimatación</u> en cámara de crecemento 16h/8h, 24±2°C, irrigadas con sales MS semanalmente, cubertas con bolsas de plástico que foron retiradas gradualmente en 4 semanas. <u>Aclimatación</u> :cultivo en condicións de invernadoiro sobre solo.	-	(Kurt & Erdağ, 2009)

INTRODUCCIÓN

1.2.5.3.2 Experiencias previas de micropropagación de *C. ulreiae*

Mallón (2008) puxo a xerminar aquenios desprovistos das cubertas en condicións *in vitro* (Táboa 4). Por outra parte, estableceu fragmentos de embrións que comprendían o eixe embrionario e parte dos cotiledóns. A partir das plántulas xerminadas obtivo explantos de follas e raíces para os que desenvolveu protocolos de organoxénese indirecta. Os fragmentos de embrións cigóticos serviron, pola súa banda, para realizar experiencias de embrioxénese somática indirecta (medio de indución suplementado con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP + $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D). Os embrións somáticos obtidos serviron á súa vez para desenvolver un protocolo de multiplicación a partir de xemas axilares. A citoquinina que proporcionou os mellores resultados foi BAP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Como nos protocolos mencionados anteriormente para outras especies do xénero, empregouse medio MS. A este medio engadiuse 3% sacarosa e 0,7% agar. O pH axustouse a 5,7-5,8 (Táboa 9).

Táboa 9. Protocolos de rexeneración de brotes propostos por Mallón, (2008); Mallón et al. (2010, 2011) (Fonte: elaboración propia).

Vía de rexeneración	Material de partida	Medio de cultivo	Condições de cultivo	RCV	Variables estudadas
Embrioxénese somática indirecta	Embrións cigóticos 3 anos. (DS: 15 min 10% NaClO, 3 lavados con ADE, imbibición retirada de cubertas), imbibición 24 h, retirada cubertas, uso de cotiledóns e eixe embrionario como material de partida	MS, 3% sac, 7% agar, (pH=5,7). En placas Petri. Medio de xerminación: medio con sales á metade	Dúas semanas en escuridade en medio indutor. Catro semanas en medio de expresión 16h/8h, 24/20±2	Medio indutor: $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP + $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D	40% de calo embrioxénico
				Medio de expresión: sen reguladores Medio de xerminación: $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP	1,8 embrións somáticos por explanto
Organoxénese indirecta	Fragmentos de folla/raíz. derivados de semente xerminada <i>in vitro</i>	MS (1/2 macros), 3% sac, 0,7% agar. (pH=5,8) En placas Petri.	Tubos de luz fluorescente branca fría ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 16h/8h, 24/20±2°C	$0,125 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP	2,48 brotes por explanto foliar
				$0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP	7 brotes por explanto radicular
Micropropagación a partir de xemas preexistentes	Ápices caulinares. A partir dun embrión somático xeminado <i>in vitro</i>	MS (1/2 macros), 3% sac, 0,7% agar. (pH=5,8) En jarras 350ml		$1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP	4,66 brotes viables por explanto

Neste mesmo traballo, realizáronse probas de enraizamento utilizando brotes derivados dun único embrión somático xerminado *in vitro*. Ensaíáronse dous métodos de indución do enraizamento: (1) cultivo nun medio suplementado con auxina ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA ou AIB) durante 10 días; (2) inmersión basal (30s ou 60s) nunha solución concentrada ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) de ANA ou

AIB. En ambos casos, tras o tratamento de indución, os brotes foron transferidos a un medio sen reguladores, no que permaneceron 50 días. O enraizamento dos brotes foi maior nos tratamentos de inmersión basal (~90%). O número de raíces producidas foi maior nos tratamentos de inmersión en ANA (23 raíces por explanto).

Os brotes enraizados foron aclimatados en alvéolos que contiñan unha mestura de turba e vermiculita (3:1) durante 3 semanas. Como noutros estudos de *Centaurea*, non se compararon tratamentos nesta fase.

1.3 Contexto do traballo

Este traballo foi realizado no marco do contrato da empresa GREENALIA coa USC, que foi mencionado anteriormente. A través deste proxecto preténdese elaborar un plan de conservación e reforzamento das poboacións naturais de *Centaurea ulreiae* afectadas potencialmente pola instalación dun parque eólico nas áreas de Bustelo, Campelo e Toural.

2 OBXECTIVOS

Os obxectivos que se propuña acadar con esta tese de doutoramento son os seguintes:

1. Avaliar o éxito da reprodución sexual de *C. ulreiae*, incluíndo a produción de aquenios por planta e infrutescencia, a súa viabilidade e a súa capacidade xerminativa.
2. Establecer coleccións de propágulos vexetativos de *C. ulreiae*, en condicións *in vitro*, derivados de material adulto e xuvenil establecido en condicións asépticas.
3. Desenvolver un protocolo, aplicable a diferentes xenotipos de *C. ulreiae*, que permita producir un número significativo de plantas completas mediante micropropagación de clons seleccionados derivados de material adulto e xuvenil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vexetal

3.1.1 Aqueños

Realizáronse 3 campañas (2020, 2021 e 2022) de colleita de capítulos maduros de *C. ultreiae* durante os meses de xuño a agosto sobre plantas que portaban máis de 3 capítulos antes da fase de diseminación (Táboa 10). En cada día de colleita procurouse non colleitar máis dun 20% dos capítulos dispoñibles. Extraéronse as sementes con aparencia viable, que foron gardadas en recipientes de polipropileno con xel de sílice (1:1) a 4°C. Os aqueños foron utilizados como material de partida para ensaios de xerminación *in vivo* e *in vitro*, así como para a avaliación da viabilidade mediante tinguidura.

Táboa 10. Relación do número de plantas nas que se realizou a colleita de capítulos por ano de colleita (Fonte: elaboración propia).

Ano de colleita	Número de capítulos	Número de plantas
2020	30	27
2021	300	213
2022	130	104

3.1.2 Material vexetativo colleitado en campo

Colleitáronse 14 plantas adultas en varias localidades en novembro de 2019. As plantas foron lavadas con auga da billa, frotando as raíces e eliminando as follas que presentaban sinais de necrose. Despois, tratáronse cunha solución de Captán® (0,3 g·L⁻¹ carbamoyl) en auga destilada durante unha hora (Figura 8a). As plantas limpas foron transferidas a macetas que contiñan unha mestura de turba rubia e perlita (1:1) que fora previamente esterilizada en autoclave (121°C, 20 min, 101,3 KPa). As plantas mantivéronse no fitotrón do edificio CACTUS do Campus de Lugo, baixo iluminación branca fría, cun fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuridade) a unha temperatura de 18-22°C, sendo tratadas cunha pulverización de 0,3 g·L⁻¹ Captán cada dúas semanas (Figura 8b). Follas destas plantas foron utilizadas como material

de partida para os ensaios de establecemento *in vitro* que se describen na sección 3.2.5 (Táboa 11). Despois de tres anos de crecemento en fitotrón, as plantas foron trasladadas a macetas (60x30x20 cm) cun substrato mestura de turba e perlita no umbráculo da EPSE, onde se manteñen.

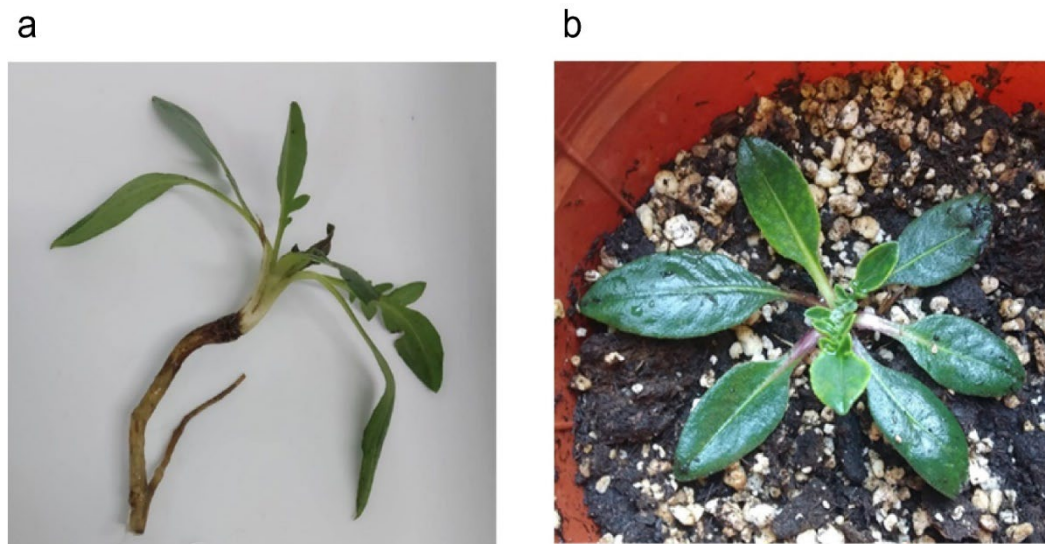


Figura 8. Planta de *Centaurea ultriae* limpa antes do establecemento en maceta (a). Planta establecida en maceta (b) (Fonte: elaboración propia).

Na Táboa 11 amósase a relación de materiais dos diferentes clons establecidos *in vitro*, a localidade de colleita e a correspondencia cos núcleos de poboación que foron determinados no estudo xenético (García-Jacas et al., 2023).

Táboa 11. Procedencia dos diferentes clons establecidos en condicións *in vitro* e correspondencia cos núcleos diferenciados por García-Jacas et al. (2023) (Fonte: elaboración propia).

Nome do clon	Procedencia	Lugar de colleita (Concello)	Correspondencia cos núcleos delimitados no estudo xenético	Uso nos ensaios de micropropagación
M1	Follas de planta adulta	Portorrubio (Coristanco)	Noroeste (NO)	Si
M2				
M3				
M4				
M5				
X1	Aquenios	O Montaña (Coristanco)	Bazar Sur (BS)	Non
X2				
X3				
X4				
X5				
X6				
X7				
X8				
X9				

3.2 Métodos

3.2.1 Determinación do número de inflorescencias por planta e proporción de aquenios viables

Durante as campañas de colleita rexistrouse o número de inflorescencias que aparecían en cada roseta na que se colleitaron capítulos (n=344). Posteriormente, os capítulos foron abertos e contabilizáronse os aquenios que presentaban aspecto viable, os aquenios abortados e as flores non fecundadas. Dentro dos capítulos, consideráronse como aquenios con aspecto de viables aqueles que presentaban unha testa de coloración escura e resistencia á presión. Os que tiñan tonalidades pardo-marróns na testa e unha aparencia va foron consideradas como abortados. Por último, contáronse tamén as flores estériles ou non fecundadas, que presentaban unha morfoloxía tubular e coloración crema (Figura 9). Os datos recollidos agrupáronse por capítulo, localidade e ano de colleita.



Figura 9. Aspecto dos aquenios con aspecto de viables (puros), os abortados e as flores estériles ou non fecundadas de *Centaurea ulreiae* (Fonte: elaboración propia).

3.2.2 Determinación da viabilidade

3.2.2.1 Cloruro de tetrazolio

Realizáronse ensaios de viabilidade mediante tinguidura con cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio (Tz). Para os ensaios seleccionáronse aquenios das campañas de colleita de 2021 e 2022, que foron embebidos en auga destilada estéril durante 24 h a temperatura ambiente; posteriormente retiráronse as cubertas utilizando un bisturí. Os embrións obtidos foron tratados cunha solución ao 0,1% ou ao 1,0% de Tz durante 24 h a 40°C. O pH das solucións (pH=7) foi previamente axustado utilizando unha disolución de tampón fosfato (Patil & Dadlani, 2009).

Pasado o tempo de reacción, laváronse os embrións con auga da billa e observáronse baixo lupa binocular. Os embrións clasificáronse en 3 categorías segundo o patrón de tinguidura que presentaban: (1) completamente tinguidos con coloración vermello escuro, considerados como viables; (2) parcialmente tinguidos, que presentaban a punta apical ou unha parte importante dos cotiledóns coloreada, considerados como semi-viables; (3) embrións que non reaccionan ao colorante e embrións considerados non viables no momento da extracción, considerados como non viables (Figura 10). Cada tratamento consistiu en 4 repeticións de 25 embrións. Os resultados foron expresados como porcentaxe de cada categoría.

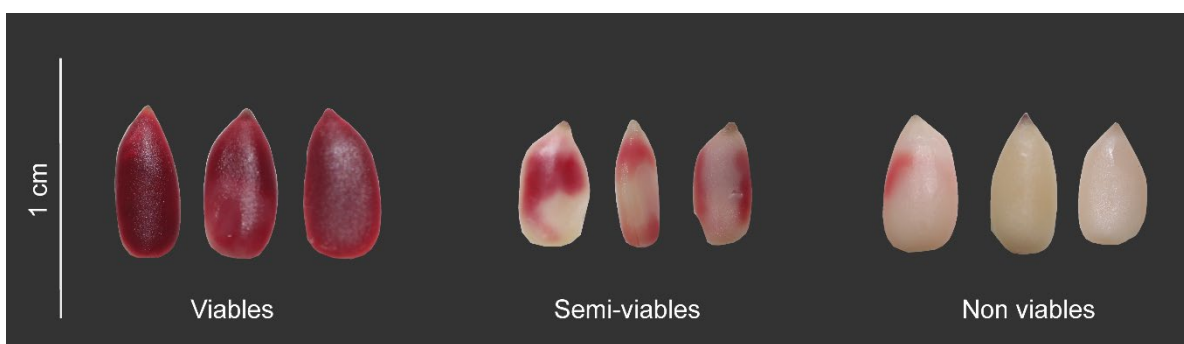


Figura 10. Aspecto xeral dos embrións despois da tinguidura con Tz (0,1%) 24 h a 30°C, os viables amosando unha coloración burdeos, os semi-viables, parcialmente tinguidos e, por último, os non viables (Fonte: elaboración propia).

3.2.2.2 *Estimación da viabilidade en diferentes anos de colleita*

Sobre a base dos resultados do experimento descrito no epígrafe precedente, estimouse a viabilidade real dos lotes considerando os embrións excluídos da tinguidura por presentar claros signos de non viabilidade. Se os resultados obtidos na proba de concentración de Tz non amosan diferenzas significativas, tomaremos como referencia os valores medios de ambas probas. Se estas existiran, adoptaremos como referencia os valores da proba que proporcionara maiores porcentaxes de viabilidade.

3.2.2.3 *Índigo carmín*

Realizouse tamén un ensaio de tinguidura co colorante índigo carmín (Indigotinsulfonato), no que se seleccionaron aquenios da campaña de colleita de 2021. Neste caso, os aquenios

MATERIAL E MÉTODOS

embebéronse en auga destilada durante 24 h a temperatura ambiente e retiráronse as cubertas utilizando un bisturí. Os embrións obtidos foron tratados cunha solución ao 0,15% de índigo carmín durante 3 h a temperatura ambiente.

Despois da reacción, laváronse os embrións con auga da billa e observáronse baixo lupa binocular. Os embrións clasificáronse en 3 categorías segundo o patrón de tinguidura que presentaban: (1) embrións que non reaccionan ao colorante, considerados como viables; (2) parcialmente tinguidos, presentando manchas de cor azulada fóra da zona do embrión, considerados como semi-viables; (3) completamente tinguidos con coloración azul intensa e embrións considerados non viables no momento da extracción, considerados como non viables (Figura 11). A tinguidura con índigo carmín contou con 4 repeticións de 25 embrións. Os resultados foron expresados como porcentaxe de cada categoría.



Figura 11. Aspecto xeral dos embrións despois da tinguidura con índigo carmín (0,15%) a temperatura ambiente durante 3 h, os viables sen coloración, os semi-viables, parcialmente tinguidos e por último, os non viables amosando unha tinguidura de cor azul intensa (Fonte: elaboración propia).

3.2.3 Ensaio de xerminación *in vivo*

3.2.3.1 Choque térmico

Seleccionáronse aquenios que levaban conservados 6 meses a 4°C. Limpáronse baixo a billa cun estropallo e deterxente durante 10 min. Realizáronse catro tratamentos de choque térmico: (1) e (2) son tratamentos de choque térmico en auga, mediante mergullado dos aquenios nun baño de auga destilada a 60°C durante 1 ou 5 min, que foron transferidos a un recipiente con auga destilada estéril a 4°C, (3) e (4) son tratamentos de choque térmico en estufa, que consistiu nunha desinfección superficial dos aquenios mediante nun baño en etanol 70% (1 min), seguido de lavado con auga destilada estéril, un baño en lixivia (40 g·L⁻¹ de cloro activo) (15 min), e finalmente tres lavados con auga destilada estéril. Os aquenios deixáronse embeber en auga destilada estéril durante 24h. Posteriormente, os aquenios escorréronse e

introducíronse nunha estufa a 60°C durante 5 ou 15 min. Tras o tratamento en estufa, retiráronse as cubertas e extraéronse os embrións. (5): tratamento control, no que se desinfectaron os aquenios seguindo o protocolo descrito anteriormente, embebéronse en auga destilada estéril e extraéronse as cubertas.

En todos os casos os aquenios ou embrións foron postos a xerminar sobre placas Petri que tiñan papel de filtro humedecido, que se mantivo húmido engadindo auga destilada estéril cando foi preciso ata que rematou o ensaio. As placas foron establecidas baixo condicións de fotoperíodo de 16h/8h (tratamentos 1, 2, 3, 4, e 5) ou en condicións de escuridade (tratamentos 1 e 2), a 24±2°C. Cada placa considerouse como unha réplica. Cada tratamento consistiu en 6 réplicas de 8 aquenios. Rexistrouse a taxa de xerminación (%) cada 2 días, a taxa de xerminación total aos 82 días¹, e calculouse o tempo medio de xerminación.

Os resultados desta proba serviron como base para determinar as condicións de pretratamento de parte do material xuvenil que se estableceu *in vitro*.

3.2.4 Ensaio de xerminación *in vitro*

3.2.4.1 Probas preliminares de xerminación

Dos aquenios que se colleitaron na campaña de 2020, 96 puxéronse a xerminar *in vitro* un mes despois de ser colleitados. Previamente ao establecemento, sometéronse a un proceso de desinfección superficial, que consistiu nun baño en etanol 70% durante 1 min, lavado con auga destilada estéril, un baño durante 15 min cunha solución de lixivia comercial (40 g·l⁻¹ de cloro activo) ao 0,8%, seguido de varios lavados con auga destilada estéril. As sementes desinfectadas foron establecidas en condicións asépticas en tubos de ensaio, que contiñan 15 ml de Medio Base (MB: MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado (concentración de macronutrientes á metade) con vitaminas, 30 g·l⁻¹ de sacarosa, 7 g·l⁻¹ de Bacto™ Agar (DiFCo), suplementado con 0,2 mg·l⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), co pH axustado a 5,7-5,8 antes de someterse a autoclave durante 20 min a 121°C e 101,3 KPa). Establecéronse así dous clons xuvenís (X1 e X2) que se utilizaron posteriormente nos ensaios de micropropagación (Táboa 11).

¹ O ensaio considerouse finalizado cando deixaron de rexistrarse novas xerminacións nun período de 14 días consecutivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Posteriormente se establecieron outros sete clons (X3-X9) (Táboa 11) procedentes de plántulas obtidas de aquenios sometidos previamente a un tratamento de choque térmico de 5 min a 60°C en estufa, sobre a base dos resultados obtidos nas probas de xerminación *in vivo*.

3.2.4.2 Probas de desinfección superficial

A fin de mellorar o grao de asepsia con respecto á proba preliminar, realizouse un novo ensaio comparando cinco procedementos de desinfección (Figura 12). Previamente á desinfección, seleccionáronse aquenios conservados durante 2 anos a 4°C. Os aquenios foron lavados baixo a auga da billa con deterxente e separáronse en lotes de oito en recipientes de 50 ml, antes de iniciar os tratamentos de desinfección.

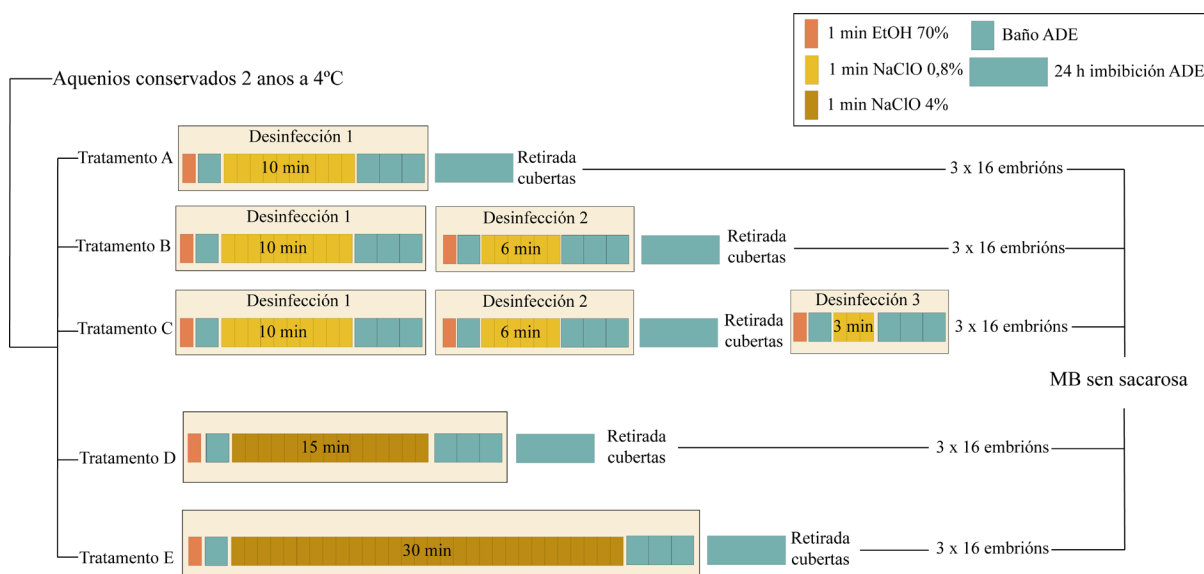


Figura 12. Tratamentos de desinfección utilizados no ensaio. EtOH: etanol, ADE: auga destilada estéril (Fonte: elaboración propia).

Os tratamentos de desinfección consistiron en someter os aquenios a unha serie de baños en disolucións de desinfectantes (etanol 70%, NaClO 0,8% ou 4%) de forma secuencial, en diferentes tempos de incubación (Figura 12). En todos os casos, en diferentes puntos do proceso de desinfección, realizouse un tratamento de imbibición de 24 h a temperatura ambiente en auga destilada estéril. Posteriormente retiráronse as cubertas dos aquenios, que foron cultivados en recipientes de polipropileno de 50 ml que contiñan 10 ml de MB sen sacarosa.

Cada grupo de 16 sementes foi considerado como unha réplica. Cada tratamento consistiu en 3 réplicas de 16 sementes. Rexistráronse as taxas de contaminación e de xerminación (%) cada 2 días, e a taxa de xerminación total aos 60 días².

3.2.4.3 Proba prexerminativa con AX₃

Despois de optimizar o protocolo de desinfección, decidiuse comprobar o efecto da imbibición en AX₃ durante 24h na xerminación dos aquenios. Tomáronse aquenios que levaban 2 anos conservados a 4°C e sometéronse a un proceso de desinfección seguindo o tratamento D ou E (Figura 12). Posteriormente, embebéronse individualmente en tubos eppendorf de 2 ml que contiñan auga destilada estéril ou unha solución estéril de 2,0 mg·l⁻¹ de AX₃ durante 24h. Pasadas as 24h, retiráronse as cubertas da metade dos aquenios e os embrións foron cultivados en recipientes de polipropileno de 50 ml que contiñan 10 ml de MB sen sacarosa. A outra metade dos aquenios foron cultivados directamente (con cubertas) nas mesmas condicións. Cada grupo de 16 sementes foi considerado como unha réplica. Cada tratamento consistiu en 3 réplicas de 16 sementes. Rexistráronse as taxas de contaminación e de xerminación (%) cada 2 días, a taxa de xerminación total aos 60 días², e calculouse o tempo medio de xerminación

3.2.5 Establecemento *in vitro* de material adulto mediante organoxénese adventicia

Para iniciar os cultivos *in vitro* a partir de material adulto, escindíronse follas dos verticilos superiores da roseta basal das plantas colleitadas no campo e mantidas no fitotrón do CACTUS (Centro de Apoio á Investigación, USC-Campus de Lugo). Cada folla cortouse en fragmentos cadrados de 1,0 cm de lado (explantos), que contiñan o nervio central, e nomeáronse segundo a parte da folla da que se obtiveron como: ‘pecíolo’, ‘proximal’ e ‘distal’. Aplicouse parafina atemperada nas áreas de corte. Despois, baixo a cámara de fluxo laminar, realizouse unha desinfección superficial que consistiu nun baño en etanol 70% (30 s), seguida dun lavado con

² O ensaio considerouse finalizado cando deixaron de rexistrarse novas xerminacións nun período de 14 días consecutivos.

auga destilada estéril, baño en lixivia comercial ao 0,8% (6 min), seguido de tres lavados con auga destilada estéril.

Os explantos foron establecidos en condicións asépticas, en posición adaxial, en tubos de ensaio que contiñan 15 ml de MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ou $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, e foron subcultivados a medio fresco cada 35 días. Tras 4 subcultivos, algunhas das follas cultivadas con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP produciron brotes adventicios de forma directa. Desta forma, foi posible establecer 5 clons a partir de material adulto, que foron designados como: M1, M2, M3, M4 e M5 (Táboa 11).

A fin de obter unha cantidade suficiente de material para a realización dos experimentos posteriores, estimulouse a proliferación axilar mediante subcultivo en MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP cada 35 días.

3.2.6 Organoxénese a partir de explantos de folla de brotes establecidos *in vitro*

Neste ensaio contrastáronse distintos tratamentos de indución de brotes adventicios a partir de explantos obtidos de fragmentos de follas de brotes establecidos *in vitro* de distintos clons xuvenís e adultos. Escindíronse nove follas de cada un dos clons M1, M2, M3, M4, M5, X1 e X2, a partir de brotes establecidos *in vitro*. Cada folla cortouse en fragmentos cadrados de 1,0 cm de lado (explantos), que contiñan o nervio central en todos os casos.

Os explantos foron establecidos, en posición adaxial, en botes de vidro que contiñan 90 ml de MB suplementado con distintas concentracións de BAP ($0,1$; $0,2$; $0,5$; $1,0$; $2,0$; $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sobre os clons M1, M2 e X1, e TDZ ($0,3$; $0,6$; $1,2$; $2,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), sobre o resto dos clons.

En todos os casos, os brotes que se formaron como resposta aos tratamentos hormonais foron cultivados posteriormente en MB suplementado con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP. Os brotes procedentes de organoxénese con BAP e TDZ foron debidamente etiquetados para asegurar a súa trazabilidade. Rexistrouse o primeiro día no que apareceron os primordios dos brotes en cada tratamento. Tras 45 días en cultivo, anotouse a porcentaxe de explantos reactivos, que foron considerados como aqueles que presentaban brotes ou formaban calos, o número de brotes adventicios por explanto e o número de explantos que presentaban necrose. Cada recipiente de

cultivo contiña seis explantos e foi considerado como unha réplica. Cada tratamento foi realizado por triplicado.

3.2.7 Estudo de factores de cultivo na proliferación por brotes axilares de clons adultos e xuvenís

3.2.7.1 Condicións xerais

Para os ensaios de multiplicación por brotes axilares utilizáronse brotes cultivados en MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP. Seleccionáronse brotes de calibre homoxéneo, cun tamaño medio das follas máis desenvolvidas de 2,0-4,0 cm (**Figura 13**). En todos os experimentos utilizáronse recipientes de vidro (*Le Pratique*®) cun volume total de 500 ml, que contiñan 90 ml de medio.



Figura 13. Aspecto dos brotes empregados para os ensaios (Fonte: elaboración propia).

3.2.7.2 Tipo de luz, calidade e temperatura de cor (clon X1)

Tomáronse brotes do clon X1 e cultiváronse en medio MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP baixo diferentes fontes de iluminación, brancas ou de cores: luz branca fluorescente 4000 K ou 6500 K, luz branca LED 4000 K, 5500 K, 6500 K, luz LED azul, azul+vermella e vermella durante 35 días. Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 8 explantos.

3.2.7.3 Concentración de BAP e tipo de luz (clon X1)

Tomáronse brotes do clon X1 e cultiváronse en MB suplementado con diferentes concentracións de BAP (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) baixo iluminación fluorescente

6500 K ou tubos LED 6500 K durante 35 días. Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 8 brotes.

3.2.7.4 Concentración de BAP (clons xuvenís e adultos)

Tomáronse brotes dos clons xuvenís (X1, X2) e adultos (M1, M2, M3, M4 e M5) e cultiváronse en medio MB suplementado con 0, 0,1, 0,2 ou 0,5 mg·l⁻¹ de BAP durante 35 días. Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 8 explantos.

Despois de 35 días, tomáronse separadamente os datos do número de explantos con follas cuxa lonxitude superaba 1,0 cm, así como o número de explantos totais, para o cálculo das distintas taxas de multiplicación (número de explantos producidos/número de explantos de partida).

3.2.8 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

A partir de materiais procedentes dos tratamentos realizados sobre o clon X1 no ensaio 3.3.5.3 realizouse a cuantificación dos pigmentos fotosintéticos clorofila A, clorofila B e carotenoides. Despois de 35 días en cultivo, tomáronse 6 repeticións de 100 mg de follas por cada tratamento (luz branca LED 4000 K, 5500 K, 6500 K, luz LED azul, azul+vermella e vermella), que foron introducidas en tubos Eppendorf® de 2 ml e liofilizadas durante 4 días. Despois do proceso de liofilización, as mostras foron homoxeneizadas e sobre elas engadiuse acetona ao 80%. As mostras centrifugáronse durante 5 min a 12.000 rpm. Inmediatamente despois mediuse a absorbancia do sobrenadante sobre una microplaca nun espectrofotómetro Biotek Epoch2™ Microplate Spectrophotometer (Agilent Technologies) a 663, 646 e 470 nm. Para determinar a cantidade dos diferentes pigmentos aplicáronse as seguintes ecuacións (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Clorofila A (ChlA)} (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila B (ChlB)} (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides} (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{ChlA} - 85,02 \times \text{ChlB}}{199} \quad (3)$$

3.2.9 Ensaio de indución da floración

A partir do mes de abril de 2021 (aproximadamente 1 ano despois do establecemento dos clons) e ata o mes de setembro do mesmo ano observouse floración espontánea nalgúns brotes do clon X1 que foran obtidos a partir de organoxénese adventicia con TDZ. O mesmo fenómeno produciuse en brotes do mesmo clon na mesma época nos anos 2022, 2023 e 2024. Os capítulos producidos presentaban un aspecto amorfo e flores afuncionais. Só un deles se desenvolveu completamente ata abrirse. Ao longo deses anos, rexistrouse o número de explantos que produciron capítulos e o número de capítulos por explanto. A raíz desta observación, tomouse a decisión de realizar ensaios coa finalidade de inducir artificialmente a floración *in vitro*. Con ese fin, deseñáronse tres tipos de experimentos. Cada recipiente de cultivo foi considerado como unha réplica. Cada un dos ensaios contaba con 4 réplicas de 8 explantos.

3.2.9.1 Aplicación de AX₃

Brotes do clon X1 cultiváronse sobre medio MB suplementado con 0,1, 0,5, 1,0 ou 2,0 mg·l⁻¹ AX₃ durante 35 días, que posteriormente foron transferidos a medio sen reguladores, subcultivándose en 3 subcultivos consecutivos. Despois de 140 días, non se observou floración.

3.2.9.2 Aplicación de diferentes fotoperíodos

Brotes do clon X1 foron cultivados sobre MB suplementado con 0,1, 0,2 ou 0,5 mg·L⁻¹ BAP, e foron sometidos a tres réximes de foto período por 2 meses: 6h/18h, 12h/12h ou 16h/8h. Pasados os 2 meses, subcultiváronse a medio fresco. Os novos botes creceron baixo fotoperíodo estándar (16h/8h) subcultivándose cada 35 días. Despois de 4 subcultivos non se observou floración.

3.2.9.3 Aplicación de tratamento de frío

Brotes do clon X1 foron cultivados sobre MB sen reguladores, e foron sometidos a un tratamento en frío (8°C) por 1 ou 3 meses. Pasado ese tempo, transferíronse a medio fresco,

onde creceron baixo fotoperíodo estándar (16h/8h), subcultivándose cada 35 días. Despois de 4 subcultivos non se observou floración.

3.2.10 Ensaio de conservación en frío

Como complemento á multiplicación mediante subcultivo continuo, avalíouse a posibilidade de prolongar os períodos entre subcultivos mediante a conservación en frío a 8°C (*slow growth conservation*). O ensaio realizouse sobre brotes do clon X1 introducidos en recipientes estándar de cultivo que contiñan 90 ml de MB suplementado con 0,2 ou 0,5 mg·l⁻¹ BAP. Os recipientes foron introducidos directamente nunha neveira a 8±1°C, situada dentro da cámara de cultivo, que contaba cunha porta de vidro, de forma que recibían radiación difusa. Os brotes permaneceron nestas condicións durante 3 ou 6 meses. Unha vez extraídos da neveira, foron subcultivados sobre medio fresco, coa mesma composición que o medio no que foran conservados, medrando baixo iluminación LED 6500°K. Aos 35 días tomáronse datos da taxa de multiplicación de brotes >1 cm e de brotes totais. Cada tratamento consistiu en 3 réplicas de 8 brotes.

3.2.11 Ensaio de enraizamento

3.2.11.1 Condicións xerais

Realizáronse ensaios de enraizamento sobre brotes tomados ao final dun ciclo de multiplicación (35 días despois do subcultivo). Os explantos utilizados foron equivalentes aos empregados nos ensaios de multiplicación (**Figura 13**). En todos os experimentos utilizáronse recipientes de vidro (*Le Pratique*®) cun volume total de 500 ml, que contiñan 90 ml de medio.

Ensaíáronse dous métodos de indución do enraizamento: (1) suplementación do MB con auxinas; (1) *dipping*, que consiste na inmersión basal dos brotes nunha solución concentrada de auxina, seguida da introdución en MB sen reguladores. Sobre a base destes dous métodos de indución realizáronse tratamentos, que se describirán seguidamente, nos que se estudaron os seguintes factores: tipo e concentración de auxina, tempo de indución por *dipping*, xenotipo.

3.2.11.2 Efecto do tipo de auxina (ANA ou AIB) e método de indución (clon X1)

Brotos do clon X1 foron sometidos a varios tratamentos de enraizamento, utilizando ácido indol-3-butírico (AIB) ou ácido α -naftalén-acético (ANA). Se realizaron cinco tratamentos: (1) control: cultivo dos brotes en MB sen reguladores; (2) *dipping* nunha solución concentrada de AIB ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 60 s; (3) *dipping* nunha solución concentrada de ANA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 60 s; (4) cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB; (5) cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA. Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 5 brotes.

3.2.11.3 Efecto do método de indución (clons xuvenís e adultos)

Brotos dos clons M1, M2, M3, M4, M5, X1, X2 foron sometidos a dous tratamentos de enraizamento: (1) *dipping* en AIB ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 60 s; (2) cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB. Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 8 brotes.

En todos os casos, pasados 35 días, tomáronse datos de porcentaxe de enraizamento, número de raíces por brote e lonxitude da raíz máis longa. Os brotes enraizados foron utilizados como material de partida para as probas de aclimatación.

3.2.12 Ensaio de aclimatación

As vitroplantas obtidas despois da fase de enraizamento sometéronse a un proceso de aclimatación para a súa adaptación a condicións *ex vitro*. As vitroplantas foron extraídas coidadosamente dos recipientes de cultivo e foron lavadas de forma exhaustiva, eliminando das raíces todos os restos de medio. Tras a limpeza, plantáronse en bandexas alveoladas de polietileno (volumen dos alvéolos= 300 ml), que contiñan una mestura de turba rubia e perlita (1:1), previamente esterilizada en autoclave nas condicións indicadas previamente. Realizáronse dous tratamentos de aclimatación:

- (1) Aclimatación directa en umbráculo: as bandexas mantivéronse no umbráculo da EPSE, cunha malla de sombreo (luz= 50%), en condicións naturais, durante os meses de abril a xuño, con rega automática por aspersion, programada segundo as necesidades hídricas dos cultivos. As plantas cubríronse con campás de polietileno transparente

durante a primeira semana. Despois da primeira semana os vasos foron retirados diariamente durante períodos de tempo progresivamente máis longos cada día (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 12 h) ata que se retiraron por completo ás 2 semanas.

- (2) Preaclimatación en cámara de cultivo: as bandexas mantivéronse na cámara de cultivo do laboratorio de micropropagación dentro de caixas transparentes de polipropileno de 45 l con tapa transparente. As caixas mantivéronse pechadas durante a primeira semana de preaclimatación. Posteriormente, as tapas da caixas retiráronse diariamente durante períodos de tempo progresivamente máis longos cada día (5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 12 h) ata que as caixas permaneceron sen tapa de forma permanente dende a 2 semana de preaclimatación ata o día 30, en que foron trasladadas ao umbráculo da EPSE.

Cada tratamento consistiu en 3 repeticións de 28 plantas. Tomáronse datos de supervivencia aos 15, 30, 45, e 60 días.

3.2.13 Condicións da cámara de cultivo

Os ensaios de xerminación, micropropagación e preaclimatación leváronse a cabo nunha cámara de cultivo nas seguintes condicións: fotoperíodo estándar de 16 h/8 h, temperatura de $24\pm 2^\circ\text{C}$. As fontes de iluminación foron, dependendo dos ensaios, tubos fluorescentes de luz branca (4000 K, 6500 K) ou tiras LED brancas (4000 K, 5500 K, 6500 K) ou de cor (vermella, azul e vermella+azul). A intensidade luminosa foi de $45\text{-}55 \mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.14 Análise estatística

O software utilizado para a análise estatística foi RStudio (versión 4.0.2) (R Core Team, 2020). En todos os casos realizáronse probas paramétricas. Comprobouse a normalidade (proba de Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade (proba de Levene) dos datos antes de realizar unha proba ANOVA de unha ou dúas vías ou a unha proba *t*-Student segundo correspondese. Cando a proba ANOVA amosaba diferenzas significativas, realizouse a proba de comparación de

medias Fisher LSD (*Least Significant Difference*). As diferenzas consideráronse significativas para un valor de significación $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Número de inflorescencias e produción de capítulos e de aquenios con aspecto de viables

As rosetas que florecen produciron de media $5,04 \pm 2,91$ capítulos. Non se observaron diferenzas no número de capítulos por planta entre as campañas de colleita. De media, os capítulos que se colleitaron contiñan $14,46 \pm 12,40$ aquenios con aspecto aparentemente viable, considerando todas as localidades e anos de colleita. Se producirían, polo tanto, uns 70 aquenios con aspecto viable por individuo en fase reprodutora.

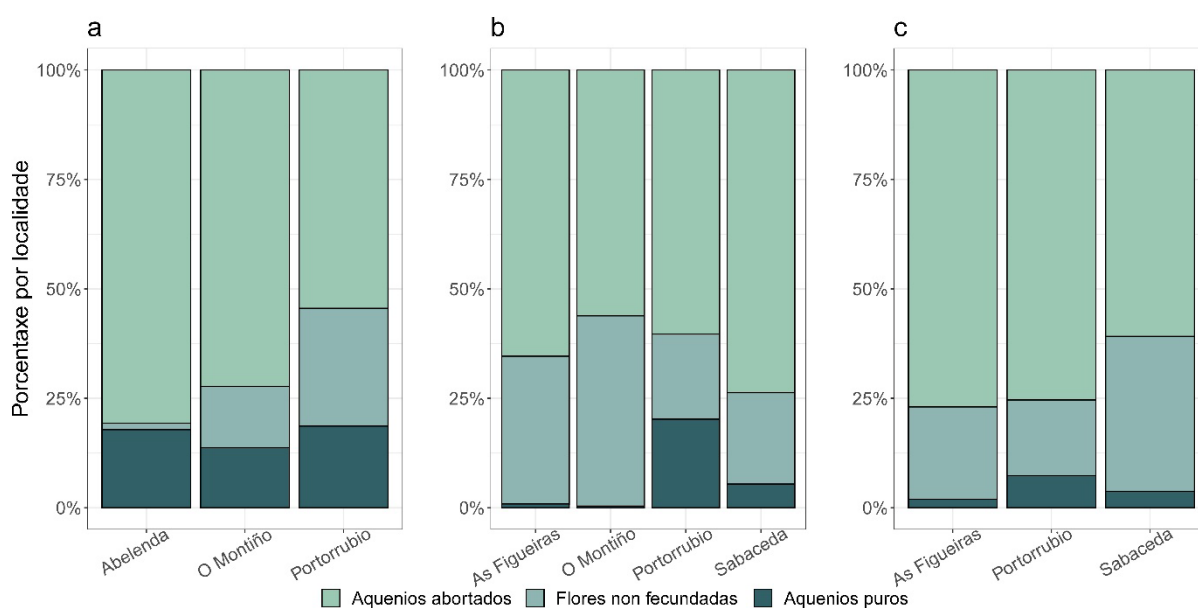


Figura 14. Percentaxe de flores estériles ou fecundadas, aquenios abortados e aquenios con aspecto de viables por localidade e ano de colleita: (a) 2020, (b) 2021, (c) 2022 (Fonte: elaboración propia).

Obsérvase unha certa variabilidade nas proporcións das categorías de aquenios con aspecto de viables, abortados e flores estériles ou non fecundadas ao longo dos distintos anos de colleita e localidades, pero esta non é significativa (Figura 14).

RESULTADOS

Tendo en conta todas as campañas e localidades de colleita, a categoría máis común correspondeuse cos aquenios abortados (porcentaxe sempre superior ao 50%), acadando o seu máximo na localidade de Abelenda, na campaña de 2020, cun 80% de aquenios abortados (Figura 14a). A porcentaxe de aquenios con aspecto de viables non supera en ningún caso o 25%, acadando o seu máximo na localidade de Portorrubio, na campaña do 2021, cun 20,2% (Figura 14b).

4.2 Estimación da proporción de aquenios viables mediante tinguidura

4.2.1 Avaliación da viabilidade das sementes

Neste caso, os resultados inclúen a porcentaxe de aquenios que se consideraron non viables previamente ás probas de tinguidura, o que proporciona unha visión completa das taxas de viabilidade dos lotes (Táboa 12). Como se observa, a porcentaxe de aquenios non viables antes da tinguidura é maior no lote de 2021. Considerando o conxunto de aquenios non viables, tanto previa como posteriormente á tinguidura, unha vez máis a porcentaxe de non viables é maior no lote de 2021.

Táboa 12. Porcentaxe media (\pm desviación típica) de embrións viables, semi-viables e non viables procedentes de aquenios de *C. ultreiae* conservados durante 1 ou 2 anos a 4°C. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

	2021 (conservados 2 anos)	2022 (conservados 1 ano)
Viables p=0,0123	60,90 \pm 6,35% a	75,60 \pm 6,57% b
Semi viables p=0,133	16,16 \pm 5,21% a	12,20 \pm 23,28% a
Non viables p=0,112	12,49 \pm 3,12% a	9,64 \pm 3,68% a
Non viables antes da tinguidura P= 0,0009	10,00 \pm 4,78% a	2,50 \pm 3,36% b

4.2.2 Comparación de dúas concentracións de Tz (0,1% vs. 1,0%)

Os valores da porcentaxe de embrións viables non presentaron diferenzas significativas en función das concentracións de Tz ensaiadas, variando entre o 66,13% e o 80,79%. Detéctase polo tanto unha certa perda de viabilidade do material conservado dous anos con respecto ao

conservado un solo ano (Táboa 13). Globalmente, observouse unha maior porcentaxe de viabilidade na colleita do 2022, e as diferenzas foron significativas cando se empregou 0,1% Tz. Detéctase polo tanto unha certa perda de viabilidade do material conservado dous anos con respecto ao conservado un solo ano.

Táboa 13. Porcentaxe media (\pm desviación típica) de embrións viables, semi-viables e non viables na proba de tinguidura con cloruro de tetrazolio (0,1% e 1,0%) sobre aquenios de *C. ulreiae* conservados durante 1 ou 2 anos a 4°C. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

Categoría	0,1% Tz		1,0% Tz	
	Aquenios de 2021 (conservados 2 anos)	Aquenios de 2022 (conservados 1 ano)	Aquenios de 2021 (conservados 2 anos)	Aquenios de 2022 (conservados 1 ano)
Viables p=0,0122	66,63 \pm 4,21% b	80,79 \pm 5,11% a	66,13 \pm 7,62% b	74,30 \pm 4,02% ab
Semi viables p=0,144	17,67 \pm 5,76 % a	11,12 \pm 2,09% a	16,48 \pm 6,79% a	13,94 \pm 1,47% a
Non viables P=0,0447	15,69 \pm 3,39 % a	8,08 \pm 3,27% b	12,16 \pm 2,55% ab	11,74 \pm 3,70% ab

4.2.3 Tinguidura con IC

Os aquenios da colleita de 2021 sometéronse igualmente a unha tinguidura con índigo carmín, que, aínda non sendo oficial segundo as normas ISTA, presenta maior facilidade de aplicación que a proba do Tz. Como resultado da proba, observouse que os valores da porcentaxe de embrións viables foron máis baixos que os obtidos nas probas con Tz, o cal parece indicar que a proba IC subestima a viabilidade dos embrións (Táboa 14).

Táboa 14. Media da porcentaxe de aquenios viables, semi-viables e non viables (\pm desviación típica) despois da tinguidura con 0,15% índigo carmín durante 3 horas sobre aquenios de *C. ulreiae* conservados 2 anos (Fonte: elaboración propia).

Categoría	0,15% índigo carmín
	Aquenios de 2021 (conservados 2 anos)
Viables	46,36 \pm 6,57%
Semi-viables	38,54 \pm 4,79%
Non viables	21,16 \pm 9,94%

4.3 Ensaio de xerminación in vivo

4.3.1 O efecto da luz e do tempo de choque térmico

Entre os pretratamentos que se contemplaron para mellorar os resultados dos test de xerminación está a aplicación de choque térmico. A Figura 15 amosa os resultados correspondentes ás porcentaxes de xerminación e ao tempo medio de xerminación en función do tipo de tratamento de choque térmico aplicado. A porcentaxe de xerminación significativamente máis alta, un 93,75%, acadouse cando os aquenios foron sometidos a un tratamento de choque térmico de 5 min a 60°C en estufa, seguido da retirada das cubertas e a posta a xerminar dos embrións sobre placa Petri baixo fotoperíodo 16 h /8 h. Nos tratamentos de choque térmico en auga a 60°C durante 1 ou 5 min, os aquenios que foron postos a xerminar baixo fotoperíodo presentaron porcentaxes de xerminación significativamente superiores, de 30 e 60% respectivamente, en comparación cos aquenios sometidos ao mesmo tratamento pero establecidos en condicións de escuridade (Figura 15a).

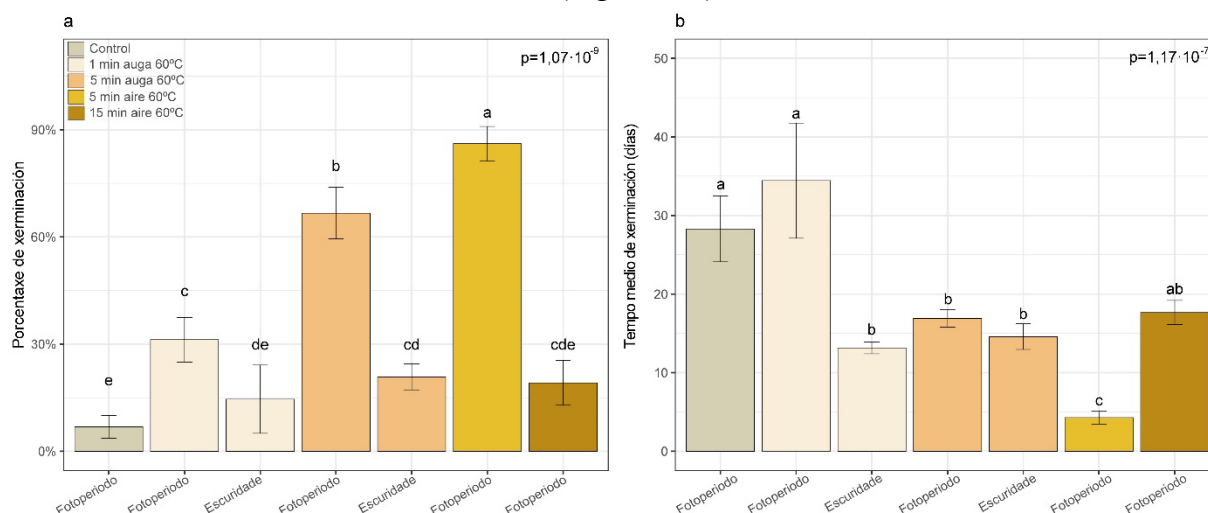


Figura 15. (a) Porcentaxe de xerminación e (b) tempo medio de xerminación (\pm desviación típica) baixo catro tratamentos de choque térmico e establecemento en placas Petri baixo condicións de escuridade ou 16 h/10 h fotoperíodo. Nos tratamentos de choque térmico en auga (1 ou 5 min) os aquenios intactos foron postos a xerminar. No caso do control e do choque térmico en aire (5 ou 15 min), as cubertas dos aquenios foron retiradas antes da colocación en placa. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

O menor tempo medio de xerminación (4,28 días) foi observado nos aquenios postos a xerminar sen cubertas, despois de realizar un choque térmico de 5 min a 60°C, sendo significativamente menor a todos os tratamentos probados (Figura 15b)

Posteriormente, partindo dos resultados obtidos neste experimento, establecéronse outros sete clons xuvenís (X3-X9), que formaron parte do total de xenotipos conservados como resultado deste traballo.

4.4 Ensaio de xerminación *in vitro*

4.4.1 Probas de desinfección superficial

A realización dunha proba preliminar de desinfección de aquenios intactos (etanol 70% 1 min+0,8% NaClO 15 min) deu como resultado unha taxa de contaminación do 97,91%.

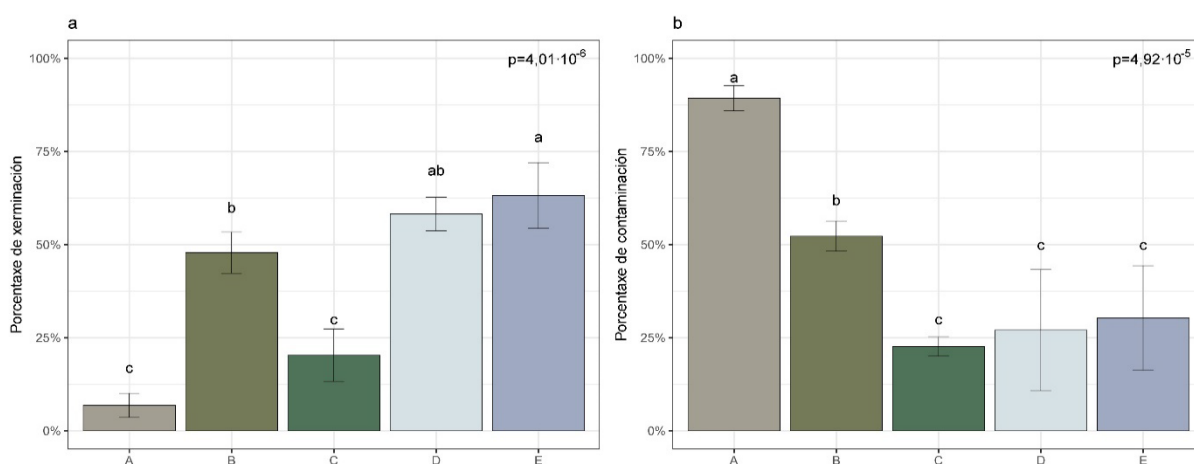


Figura 16. Porcentaxe media de xerminación (a) e porcentaxe media de contaminación (b) (\pm desviación típica) baixo cinco tratamentos de desinfección (A-E, ver detalles na Figura 12), cultivados en botes que contiñan MB sen sacarosa. O valor de p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

Para mellorar as taxas de aquenios non contaminados, realizouse un ensaio comparando cinco procedementos de desinfección (Figura 12, Material e Métodos) nos que os aquenios foron introducidos *in vitro* desprovistos de cubertas. O tratamento A foi o menos eficiente (taxa de contaminación $\sim 90\%$), presentando diferenzas significativas co resto dos tratamentos. Co tratamento B a porcentaxe de contaminación descende ao 50% aproximadamente, sendo significativamente maior que nos tratamentos C, D, e E. Entre eles non hai diferenzas significativas, proporcionando valores en torno ao 25% de contaminación (Figura 16b).

Os tratamentos de desinfección afectaron de forma diferencial ás taxas de xerminación. As maiores taxas de xerminación ($\sim 60\%$) déronse nos aquenios tratados mediante o tratamento E

(30 min en NaClO 4%), sen diferenzas significativas co tratamento D (15 min en NaClO 4%) (Figura 16a).

4.4.2 Probas prexerminativas con AX₃

Realizouse un ensaio no que se avaliou o efecto da imbibición das sementes en AX₃ (2,0 mg·l⁻¹) e a retirada ou non das cubertas sobre a xerminación *in vitro*. Os aquenios intactos (con cuberta), tanto os tratados en AX₃ como o control, presentaron taxas máis altas de contaminación que os desprovistos de cuberta e non amosaron signos de xerminación despois de 60 días en cultivo. No caso dos aquenios sen cuberta, non se observaron diferenzas significativas entre os tratados con AX₃ e os non tratados, variando entre o 64% e o 70% de aquenios xerminados. Con respecto ao tempo medio de xerminación, tampouco existiron diferenzas significativas entre o control e os aquenios tratados con AX₃ (**Figura 17a-b**).

No que respecta ás plántulas obtidas na xerminación, aínda que estas presentaban inicialmente un aspecto normal, no momento do subcultivo aos 7 días, observouse que unha porcentaxe elevada (70%) presentaba un aspecto hiperhídrico, cun patrón de desenvolvemento anormal, necrosándose despois dun mes en cultivo (**Figura 17d**). Este fenómeno observouse unicamente nas plántulas derivadas de aquenios postos a xerminar *in vitro*.

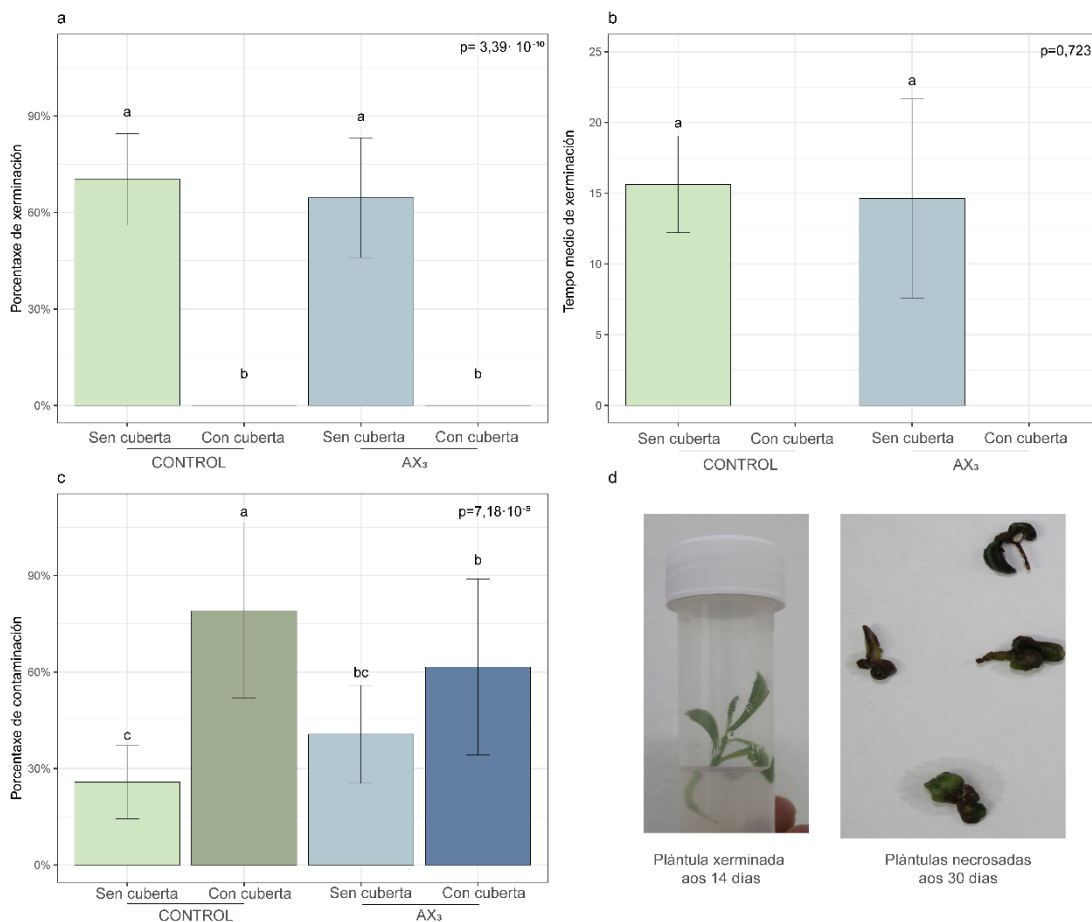


Figura 17. (a) Percentaxe media de xerminación, (b) tempo medio de xerminación, (c) percentaxe media de contaminación (\pm desviación típica) e (d) aspecto das plántulas aos 14 días (esquerda) e das plántulas necrosadas despois de realizar os tratamentos de desinfección (E e D) sobre aquenios, que foron embebidos en auga destilada estéril (ADE) ou AX₃ (2,0 mg·l⁻¹) durante 24 h a temperatura ambiente, desprovistos de cubertas e postos a xerminar en MB sen sacarosa. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

4.5 Organoxénese a partir de explantos de folia de brotes establecidos *in vitro*

4.5.1 Concentración de BAP e TDZ e resposta de clons adultos e xuvenís

A produción de brotes adventicios a partir de explantos foliares en medios con BAP ou TDZ varía de forma significativa en función do clon e da concentración de citoquinina e da interacción entre ambos factores (Táboa 15).

RESULTADOS

Táboa 15. Valores de p correspondentes á proba ANOVA de dúas vías para as variables de enraizamento en función dos diferentes tratamentos empregados ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

Variable dependente	Variable independente			
	Clon	Citoquinina	Interacción	Tratamento
Porcentaxe de resposta	$6,26 \cdot 10^{-14}$	$4,21 \cdot 10^{-14}$	$1,84 \cdot 10^{-14}$	$2 \cdot 10^{-16}$
Número de brotes por explanto reactivo	$5,5 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-12}$	$6,73 \cdot 10^{-8}$	$6,77 \cdot 10^{-13}$

As porcentaxes de resposta máis elevadas observáronse, para a xeneralidade dos clons, nos tratamentos con TDZ (Figura 18), a excepción do clon adulto M1 no que non presentaron diferenzas con respecto ao control. Os valores máis altos obtivéronse nos clons M3 ($2,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ) e M4 ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ), con un 92% e un 75% de explantos que responden, respectivamente. A resposta dos clons a TDZ foi heteroxénea, e os clons M4 e M5 foron os únicos que responderon a todas as concentracións. A única concentración na que houbo resposta en todos os casos foi $1,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ (Táboa 16).

Con respecto aos tratamentos con BAP, o clon xuvenil X1 responde a todas a concentracións ensaiadas, mentres que nos clons M1 e M2 non houbo resposta á aplicación de $4,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP. En ambos clons adultos a aplicación de BAP proporciona porcentaxes de resposta significativamente superiores ao control (Táboa 16).

No que respecta ao número medio de brotes producidos por explanto reactivo, a resposta variou segundo o clon tratado e o tipo e concentración de regulador. O maior número de brotes acadouse no clon M4 no tratamento con $0,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ, con 13 brotes por explanto. Este mesmo tratamento foi o que proporcionou os mellores resultados nos clons M2, M3 e M5 (Táboa 17).

Con respecto á produción de brotes nos clons X1, M1 e M2 tratados con BAP, da mesma maneira que ocorría coa porcentaxe de resposta, o clon X1 responde a todas as concentracións ensaiadas, mentres que nos clons M1 e M2 non houbo produción despois da aplicación de $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP. En ambos clons adultos a aplicación de BAP proporciona porcentaxes de resposta significativamente superiores ao control (Táboa 17).



Figura 18. Aspecto de dous explantos foliares que produciron brotes adventicios despois do tratamento con TDZ (Fonte: elaboración propia).

RESULTADOS

Táboa 16. Porcentaxe de resposta (\pm desviación típica) de explantos foliares de dous clons xuvenís (X1, X2) e cinco clons adultos (M1 a M5) tratados con diferentes concentracións de citoquininas (BAP ou TDZ). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas (minúsculas por filas, maiúsculas por columnas) segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

RCV	Concentración ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	M1 $p=0,015$	M2 $p=0,040$	M3 $p=0,003$	M4 $p=0,0005$	M5 $p=0,0007$	X1 $p=0,0002$	X2 $p=0,032$
-	0 $p=ns$	0% a E	0% a D	0% a C	0% a C	0% a C	0% a D	0% a C
BAP	0,1 $p=0,799$	11 \pm 5% a BCDE	16 \pm 12% a ABC	-	-	-	12 \pm 1% a CD	-
	0,2 $p=0,465$	33 \pm 24% a A	17 \pm 1% a AB	-	-	-	17 \pm 0% a BCD	-
	0,5 $p=0,507$	19 \pm 9% a ABCD	23 \pm 6% a AB	-	-	-	27 \pm 3% BC	-
	1,0 $p=0,0951$	29 \pm 6% a AB	11 \pm 7% a ABCD	-	-	-	27 \pm 3% a BC	-
	2,0 $p=0,0521$	25 \pm 12% b ABC	18 \pm 2% b AB	-	-	-	58 \pm 12% a A	-
	4,0 $p=0,567$	0% c DE	0 \pm 0% b CD	-	-	-	25 \pm 12% a BC	-
TDZ	0,3 $p=0,004$	0% c DE	8 \pm 12% c BCD	42 \pm 12% b B	75 \pm 12% a A	0% c C	17 \pm 24% bc BCD	25 \pm 12% bc A
	0,6 $p=0,002$	0% e DE	25 \pm 12% cd A	50 \pm 0% ab B	33 \pm 0% bc B	58 \pm 12% a A	58 \pm 12% a A	8 \pm 12% de BC
	1,2 $p=0,007$	8 \pm 12% c CDE	25 \pm 12% bc A	58 \pm 12% a B	33 \pm 0% b B	33 \pm 0% b B	33 \pm 0% b B	17 \pm 0% bc AB
	2,4 $p=0,001$	17 \pm 0% b ABCDE	17 \pm 3% b AB	92 \pm 12% a A	25 \pm 12% b B	25 \pm 12% b B	0% b D	0% b BC

Táboa 17. Media do número de brotes por explanto reactivo producidos (\pm desviación típica) a partir de explantos foliares de dous clons xuvenís (X1, X2) e cinco clons adultos (M1 a M5) tratados con diferentes concentracións de citoquininas (BAP ou TDZ). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas (minúsculas por filas, maiúsculas por columnas) segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

RCV	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	M1 $p=0,0194$	M2 $p=0,0463$	M3 $p=0,05$	M4 $p=1,98\cdot 10^{-5}$	M5 $p=0,045$	X1 $p=0,0008$	X2 $P=2\cdot 10^{-16}$
-	0	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a B	0,00 a C	0,00 a C
BAP	0,1 $p=0,354$	1,50 \pm 0,11 a AB	2,00 \pm 0,12 a AB	-	-	-	1,00 \pm 0 a BC	-
	0,2 $p=0,221$	3,00 \pm 0,12 a A	2,50 \pm 0,12 a AB	-	-	-	1,00 \pm 0 a BC	-
	0,5 $p=0,547$	2,50 \pm 0,11 a AB	1,80 \pm 0,09 a AB	-	-	-	2,50 \pm 0,12 a B	-
	1,0 $p=0,049$	2,00 \pm 0,12 ab AB	1,00 \pm 0,03 b B	-	-	-	2,50 \pm 0,12 a B	-
	2,0 $p=0,004$	0,50 \pm 0,12 b C	1,50 \pm 0,03 b B	-	-	-	7,50 \pm 0,35 a A	-
	4,0 $p=0,05$	0,00 b C	0,00 b C	-	-	-	2,00 \pm 0,00 a B	-
TDZ	0,3 $p=0,047$	0,00 c C	1,50 \pm 0,35 ab AB	4,50 \pm 0,12 ab AB	7,00 \pm 0,23 a B	0,00 c B	0,50 \pm 0,24 b BC	0,00 c C
	0,6 $p=0,042$	0,00 c C	5,50 \pm 0,59 b A	9,50 \pm 0,12 ab A	13,00 \pm 0,24 a A	8,00 \pm 0,47 ab A	3,00 \pm 0,47 b B	0,50 \pm 0,12 c B
	1,2 $p=2\cdot 10^{-6}$	0,50 \pm 0,11 b BC	1,00 \pm 0,00 a B	0,00 b C	1,00 \pm 0,00 a C	1,00 \pm 0,23 a B	1,00 \pm 0,47 a BC	2,00 \pm 0,24 a A
	2,4 $p=0,05$	1,00 a BC	0,00 b C	2,50 \pm 0,12 a B	1,50 \pm 0,12 a C	0,00 b B	0,00 b C	0,00 b C

RESULTADOS

4.6 Taxa de multiplicación de *Centaurea ulreiae* en función do tipo de luz e da concentración de BAP

4.6.1 Efecto da fonte de luz e da temperatura de cor na multiplicación e na concentración de pigmentos fotosintéticos dos brotes de *C. ulreiae* (clon X1)

4.6.1.1 Efecto sobre a multiplicación de brotes

Na Figura 19 amósanse os resultados correspondentes ao efecto da fonte de luz e da temperatura de cor sobre a produción de brotes no clon X1. Obsérvase que a produción de brotes >1 cm foi significativamente maior nos explantos que foron cultivados baixo luz branca LED 6500 K ou FLUO 4000 K ou FLUO 650 K. No resto dos tipos de luz ensaiados, tanto en luz branca como de cor (azul, vermello, azul+vermello), a produción de brotes >1 cm non superou 1,5 brotes por explanto (Figura 19a).

Con respecto á produción de brotes totais, que inclúe todos os brotes micropropagables, o maior valor obtívose nos brotes que se cultivaron baixo luz LED azul, sen diferenzas significativas coa produción baixo luces LED 6500 K, vermella e azul+vermella, e foi significativamente maior que a obtida nos tratamentos de luz branca FLUO 4000 K, LED 4000 K e LED 5500 K (Figura 19b).

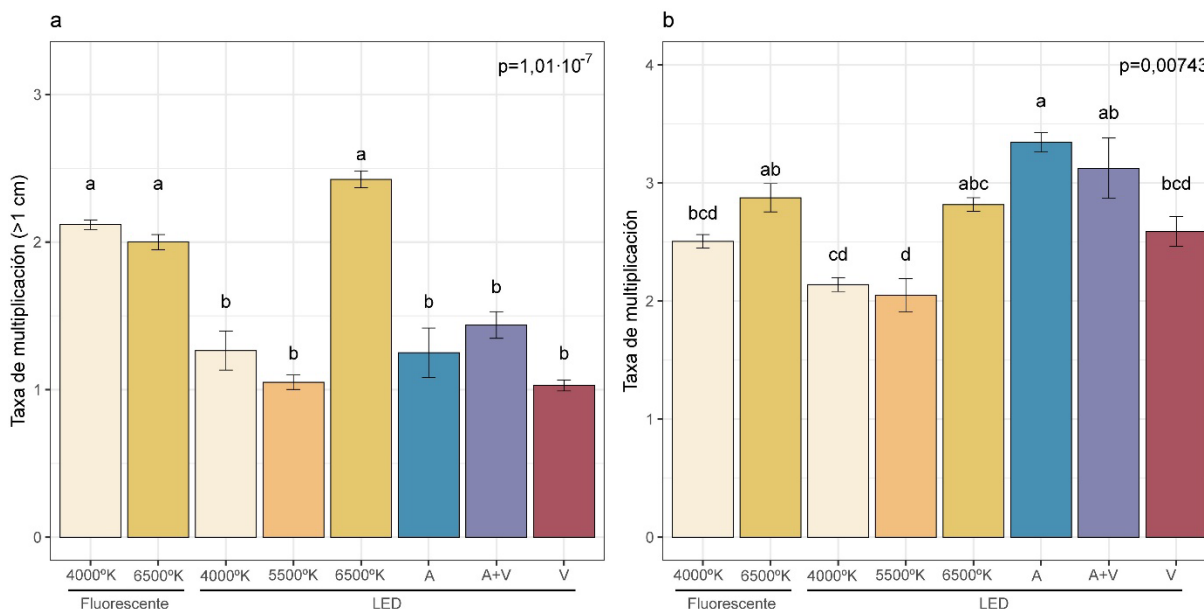


Figura 19. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (± desviación típica) despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0,2 mg·l⁻¹ de BAP baixo luz branca fluoescendente 4000 K, ou LED 4000 K, 5500 K, 6500 K ou azul (A), azul e vermello (A+V) ou vermello (V). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD (p≤0,05) (Fonte: elaboración propia).

4.6.1.2 Efecto sobre a concentración de pigmentos fotosintéticos

Na **Figura 20** amósanse os resultados correspondentes ao efecto da fonte de luz e da temperatura de cor sobre a concentración de pigmentos fotosintéticos no clon X1.

No caso da clorofila A, os brotes que medraron baixo luz branca LED 5500 K e LED 6500 K presentaron os valores máis elevados, superando os 16 mg·g⁻¹ materia seca, sen diferenzas significativas coa concentración que presentaban os brotes baixo LED 4000 K, e LED azul ou azul + vermella. Os brotes que presentaron menor cantidade de clorofila A foron aqueles que creceron baixo luz vermella (**Figura 20a**).

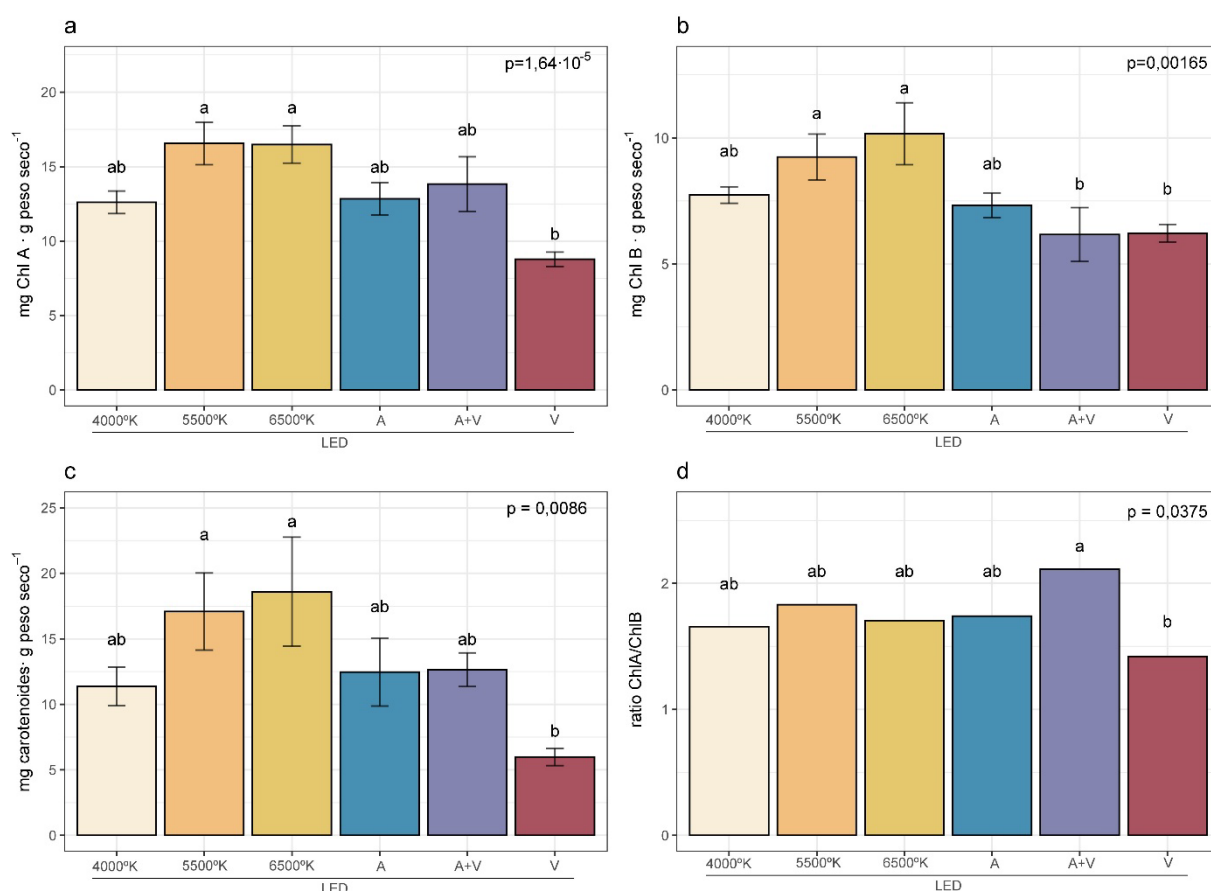


Figura 20. (a) Concentración de clorofila A (Chl A), (b) de clorofila B (Chl B), (c) de carotenoides (\pm desviación típica) e (d) ratio entre clorofila A e clorofila B (ChlA/ChlB) cuantificados a partir da extracción con Acetona 80% dos pigmentos de follas de brotes que creceron baixo iluminación LED branca, temperatura de cor 4000 K, 5500 K e 6500 K ou baixo luces LED azuis (A), azul+vermello (AV) ou vermello (V). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

A maior concentración de clorofila B observouse tamén nos brotes que creceron baixo luz branca LED 5500 K e LED 6500 K, con valores en torno aos 9 mg·g⁻¹ materia seca, sen diferenzas significativas con LED 4000 K ou LED azul + vermella. No caso da clorofila B os

RESULTADOS

valores máis baixos foron observados cando as plantas creceron baixo iluminación vermella ou azul+vermello (**Figura 20b**).

Con respecto á concentración de carotenoides, os valores máis elevados observáronse igualmente nos brotes que creceron baixo luz branca LED 5500 K e LED 6500 K, con valores en torno aos $17 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ materia seca, presentando diferenzas significativas con respecto á concentración baixo luz LED vermella ($\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ materia seca) (**Figura 20c**).

A ratio entre a clorofila A e a clorofila B dá información sobre o estado funcional do aparello fotosintético. Esta ratio acadou o seu máximo nos brotes que medraron baixo iluminación LED azul+vermella, con valores superiores a 2. Este valor é significativamente maior ao acadado en brotes que medraron baixo luces LED vermellas (**Figura 20d**).

4.6.2 Concentración de BAP e tipo de luz (clon X1)

A partir dos resultados obtidos no experimento no que se compararon diferentes tipos de luz e temperaturas de cor, seleccionáronse as dúas fontes de luz que proporcionaron os mellores resultados na multiplicación (LED 6500 K e FLUO 6500 K) e estudouse o efecto combinado da fonte de luz e da concentración de BAP.

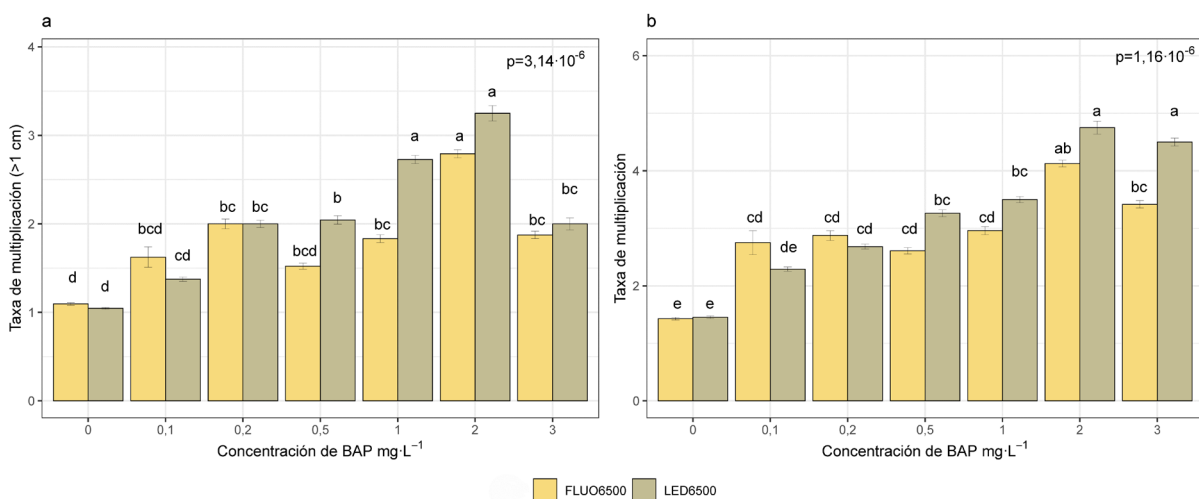


Figura 21. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (\pm desviación típica) no clon X1 despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, ou 4,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP baixo luz fluorescente ou LED 6500 K. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

As maiores taxas de produción de brotes >1 cm obtivéronse cando os brotes foron cultivados con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo luz LED (3,35 brotes por explanto), sen diferenzas significativas co tratamento coa mesma concentración baixo luz fluorescente (2,79) ou co tratamento con $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo iluminación LED (2,72). Por outro lado, a aplicación de $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP proporciona valores significativamente menores aos obtidos con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 21a).

Con respecto á produción de brotes totais, esta acadou igualmente o valor máximo sobre medios con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo luz LED (4,75 brotes por explanto), sen diferenzas significativas co tratamento coa mesma concentración baixo luz fluorescente (4,12) ou co tratamento con $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo iluminación LED (4,5) (Figura 21b).

Aínda que a xeneralidade dos brotes presentaba unha morfoloxía normal (Figura 23), unha parte dos que se cultivaron en medio suplementado con $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP (~15%), $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP (14%) e $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP (17%) amosaban un aspecto anormal ou hiperhídrico (Figura 22). Estes brotes foron desbotados para subcultivos posteriores e para a produción de planta *ex vitro*.

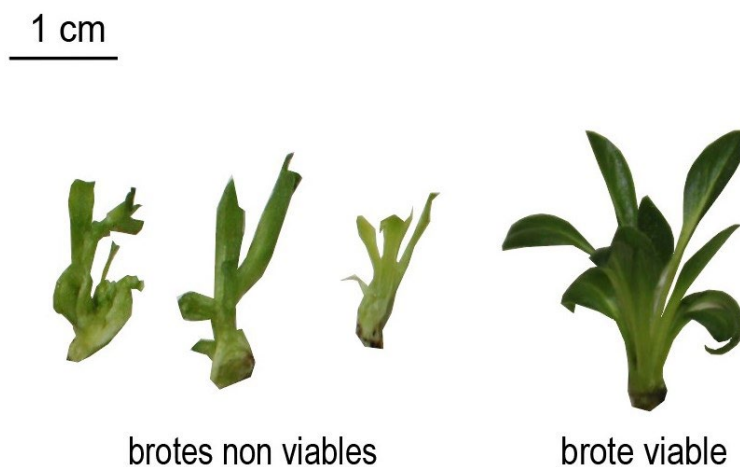


Figura 22. Aspecto de brotes hiperhídricos (esquerda) comparados cun brote normal (dereita) (Fonte: elaboración propia).

RESULTADOS

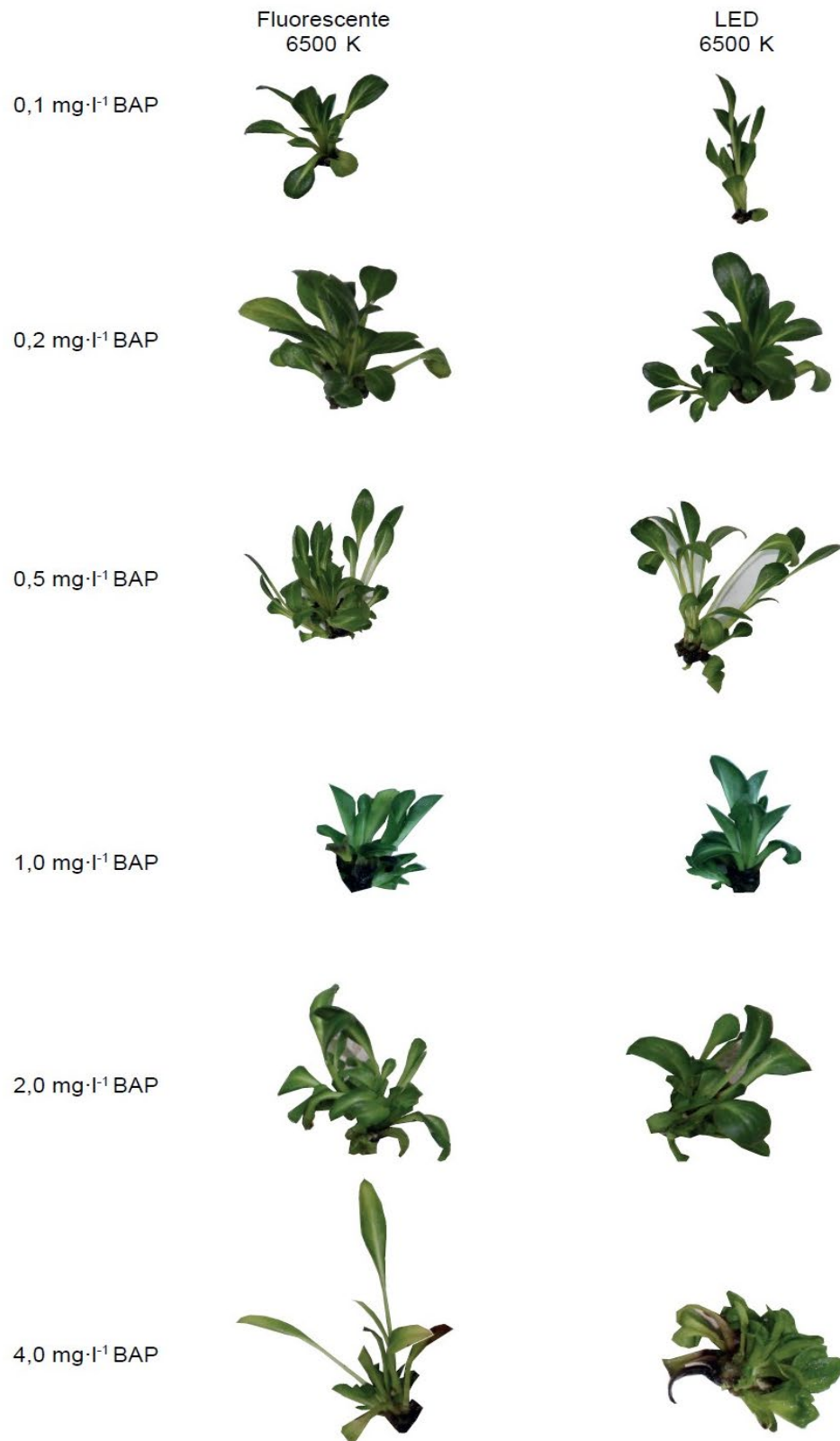


Figura 23. Aspecto dos brotes do clon X1 despois de 35 días de cultivo sobre MB suplementado con 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, ou 4,0 mg·l⁻¹ BAP baixo luz fluorescente ou LED 6500 K (Fonte: elaboración propia).

4.6.3 Concentración de BAP (clons xuvenís e adultos)

Na **Figura 24** amósanse as respostas na produción de brotes axilares dos clons multiplicados *in vitro* en función de distintas concentracións de BAP.

Obsérvase que os diferentes clons responden de forma similar ás concentracións de BAP ensaiadas. Na xeneralidade dos clons, a maior produción de brotes > 1 cm obtívose cando se cultivaron en 0,5 mg·l⁻¹ BAP, sen presentar diferenzas significativas coa produción en 0,2 mg·l⁻¹ BAP na maior parte dos casos (**Figura 24a**). De forma similar, na produción de brotes totais, as taxas de produción foron significativamente maiores no tratamento 0,5 mg·l⁻¹ BAP con respecto ao resto de concentracións ensaiadas (**Figura 24b**).

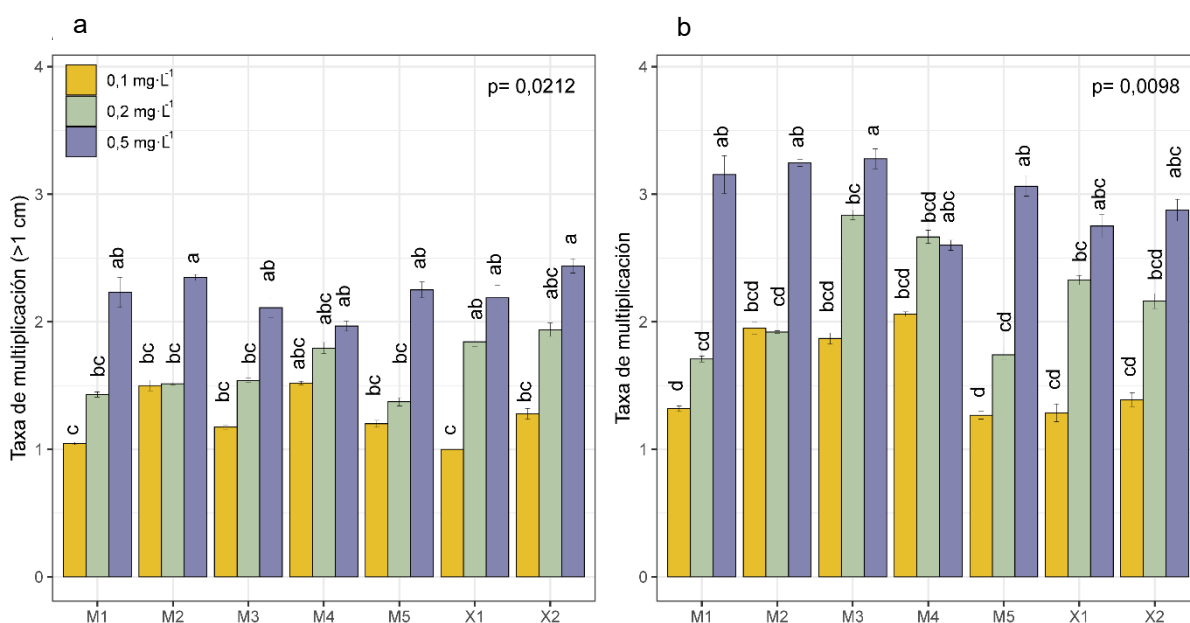


Figura 24. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (\pm desviación típica) en clons seleccionados de *Centaurea ulreiae*, cinco procedentes de material maduro (M1-5) e dous de material xuvenil (X1-2), despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0,1, 0,2 ou 0,5 mg·l⁻¹ de BAP baixo luz fluorescente 4000 K. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

4.7 Conservación en frío de brotes de *Centaurea ulreiae*

A conservación en frío a 8°C de material establecido *in vitro* pode representar unha vía para manter os stocks en condicións asépticas, simplificando o mantemento. No caso de *C. ulreiae* ensaiouse o efecto de dous tempos de conservación, 3 ou 6 meses, e dúas concentracións de BAP (0,2 mg·l⁻¹ e 0,5 mg·l⁻¹) sobre a capacidade de recuperación dos brotes tras a conservación.

RESULTADOS

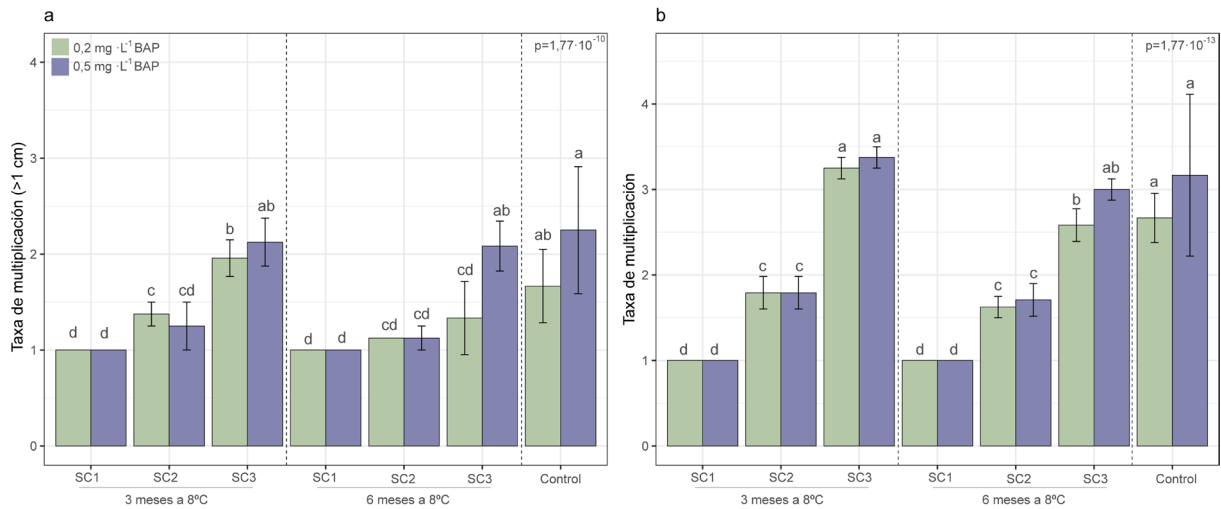


Figura 25. (a) Producción de brotes >1 cm, e (b) producción de brotes totais (± desviación típica) durante 2 subcultivos consecutivos en medio suplementado con 0,2 ou 0,5 mg·l⁻¹ BAP, despois de ser mantidos en neveira a 8°C durante 3 ou 6 meses. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD (p≤0,05) (Fonte: elaboración propia).

O aspecto do 100% dos brotes durante e despois da conservación a 8°C era saudable. Despois de extraer os brotes do tratamento en frío non se observou crecemento de novos brotes, polo que o denominado SC1 deu como resultado taxas de multiplicación iguais a 1,0 (**Figura 25 a e b**). As follas non presentaban signos de necrose ou clorose (**Figura 26**).

Os brotes conservados 3 meses recuperan a taxa estándar de multiplicación de brotes > 1 cm despois de dous subcultivos consecutivos, sen diferenzas significativas co control multiplicado por subcultivo continuo en condicións de cámara de cultivo, independentemente da concentración de citoquinina empregada.

Os brotes conservados durante 6 meses en medio con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, tras tres subcultivos en condicións estándar, recuperan os valores do control. Por outra banda, os cultivados en $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP non recuperan os valores de taxa de multiplicación dos cultivos estándar no mesmo medio tras tres subcultivos (**Figura 25a**).

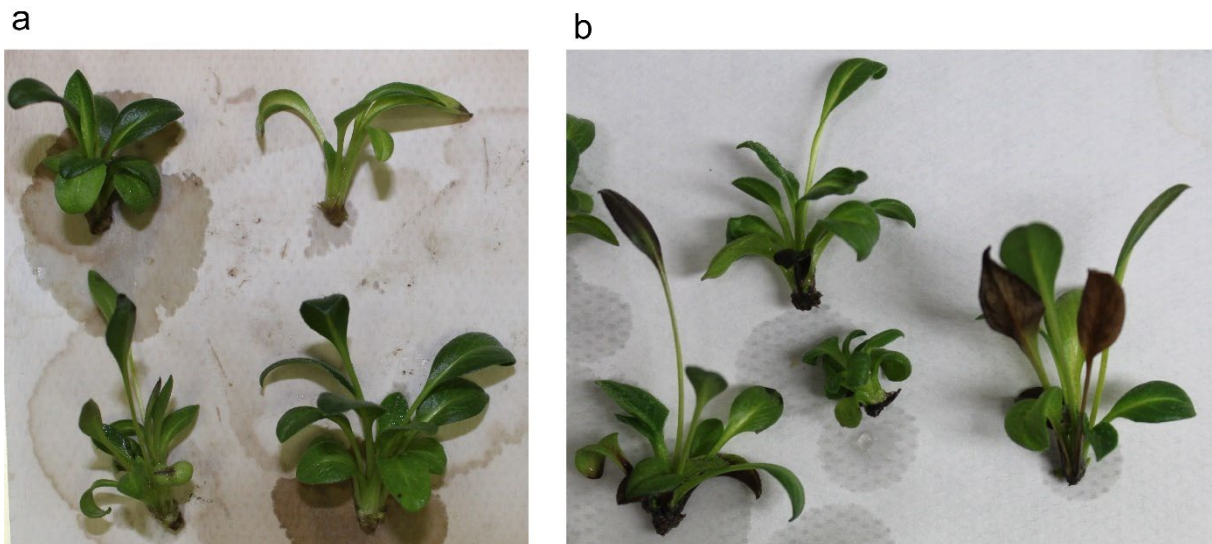


Figura 26. Aspecto dos brotes despois da conservación durante (a) 3 ou (b) 6 meses a 8°C (Fonte: elaboración propia).

O comportamento da taxa de multiplicación de brotes totais é similar á observada para brotes $> 1 \text{ cm}$. Así, no terceiro subcultivo obtéñense valores comparables aos estándar nos brotes que foran conservados durante 3 meses, mentres que a recuperación na produción retrásase no caso dos brotes conservados en frío durante 6 meses (**Figura 25b**).

4.8 Indución da floración de *Centaurea ulreiae*

O clon X1 foi establecido a partir dunha semente xerminada *in vitro* en abril de 2020. Dende ese momento ata xaneiro de 2021 mantívose por subcultivo continuo en MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP. Follas obtidas de brotes deste clon foron utilizadas para realizar ensaios de organoxénese en medios que contiñan TDZ. Brotes adventicios obtidos nestes experimentos establecéronse no medio antes mencionado, en febreiro de 2021. A partir de dous meses despois, comezáronse a observar floracións espontáneas nalgúns brotes (Figura 27), especialmente nos brotes obtidos de follas que foran tratadas con $1,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ TDZ. Os capítulos presentaban un aspecto normal cando estaban pechados. Unicamente dous dos capítulos formados espontaneamente se abriron parcialmente tras 20-30 días. Os capítulos

RESULTADOS

formados estaban baleiros no seu interior e eran afuncionais. Un 50% dos brotes que formaron capítulos terminaron por necrosarse (Figura 27b). O número máximo de flores observado en 2021 foi de 6, no mes de agosto, en 2022 foi de 10, no mes de xullo e en 2023 foi de 14, no mes de xuño (Figura 27a). Este fenómeno continúa observándose ata a actualidade.

Á vista destas observacións deseñáronse experimentos co obxectivo de estudar factores susceptibles de inducir a floración en condicións *in vitro*.

Todos os tratamentos de indución ensaiados ((a) cultivo en medio suplementado con AX₃ a 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg·l⁻¹, (b) cultivo baixo fotoperíodos de 6/18 ou 12/12 e posterior cultivo baixo 16 h/8h, (c) vernalización a 8°C durante 1 ou 3 meses e posterior cultivo baixo 16 h/8h en condicións estándar), foron ineficientes, non observándose formación de capítulos en ningún tratamento.

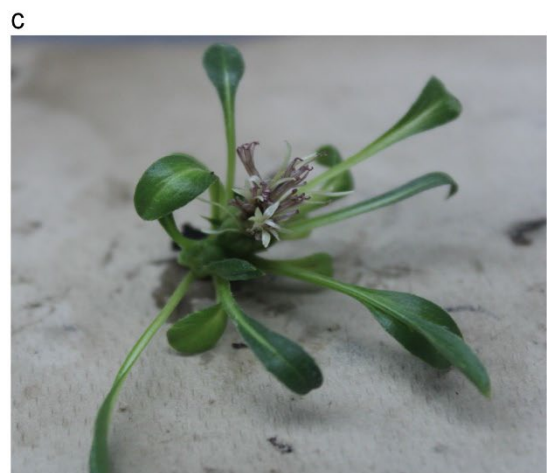
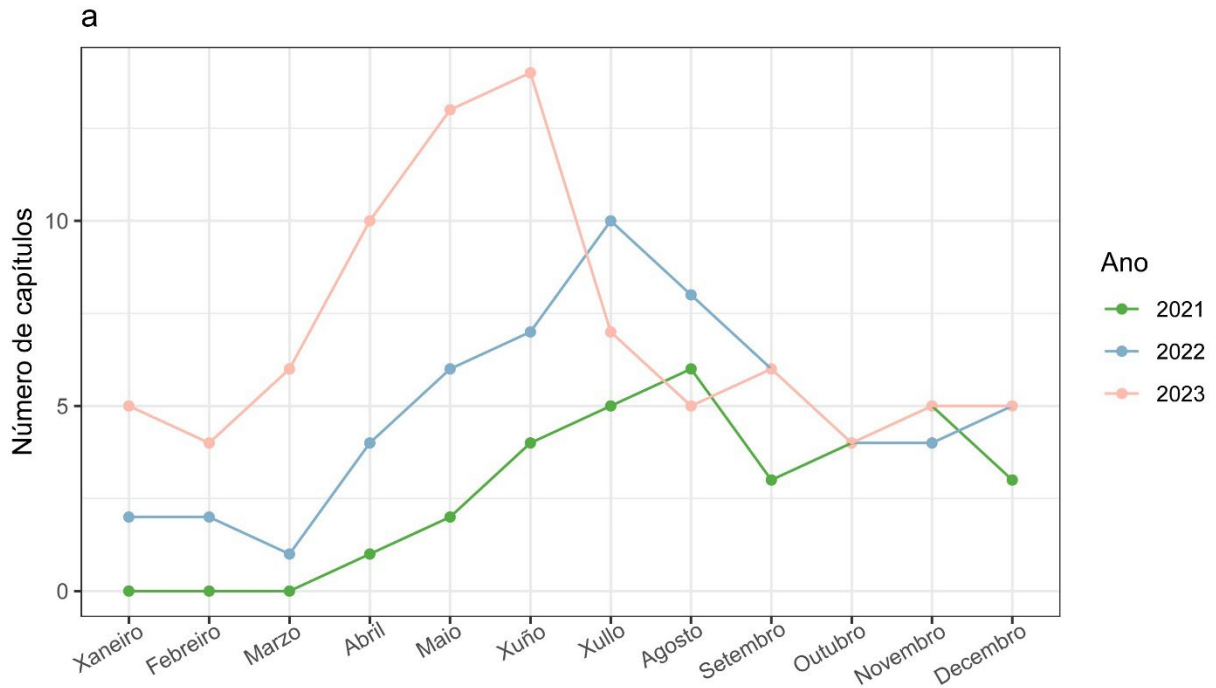


Figura 27. (a) Número de capítulos observados cada mes durante os anos 2021, 2022 e 2023. (b) aspecto de brotes que presentan floración espontánea (Fonte: elaboración propia).

4.9 Ensaio de enraizamento

4.9.1.1 Efecto do tipo de auxina (ANA ou AIB) e do método de indución

Na .

Figura 28 amósanse os resultados dun experimento de enraizamento no que se ensaiaron dúas auxinas (AIB e ANA) utilizando dous métodos de indución (auxina no medio e *dipping*).

RESULTADOS

As maiores porcentaxes de enraizamento obtivéronse cando os brotes foron tratados con AIB, independentemente do método de indución utilizado: 67% de enraizamento mediante *dipping* e 62% mediante a adición de AIB ao medio. No tratamento control (sen indución auxínica) non se obtivo enraizamento (Figura 28a). As variables número de raíces por brote enraizado (Figura 28b) e lonxitude da raíz máis longa (Figura 28c), que son indicativas da calidade do sistema radicular, non presentan diferenzas significativas entre os tratamentos ensaiados.

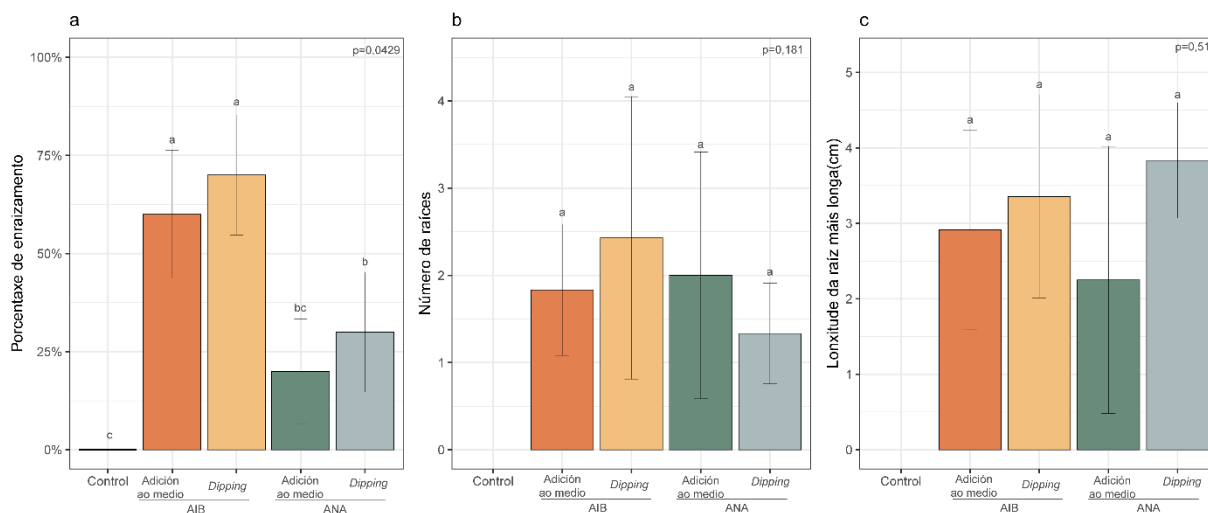


Figura 28. (a) Porcentaxe de enraizamento, (b) número de raíces por explanto enraizado, e (c) lonxitude da raíz máis longa (cm) (\pm desviación típica) de brotes de X1 sometidos a distintos tratamentos de indución de enraizamento: Adición ao medio (cultivo en MB suplementado con 2,0 mg·l⁻¹ de AIB ou ANA), ou *dipping* (inmersión basal durante 60 s nunha solución de 2,0 mg·ml⁻¹ de AIB ou ANA e posterior cultivo en MB). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

4.9.1.2 Efecto do método de indución (clons adultos ou xuvenís)

Tomando como base os resultados obtidos sobre o clon X1, aplicouse a auxina AIB mediante os dous métodos de indución descritos sobre a totalidade dos clons dispoñibles en condicións *in vitro*. Ambos tratamentos de indución foron eficaces para estimular o enraizamento adventicio, con porcentaxes de enraizamento que variaron entre o 25% e o 80%.

A proba ANOVA determinou que existen diferenzas significativas en todas as variables en función do método de indución empregado. No caso da porcentaxe de enraizamento e do número de raíces os valores máis elevados foron observados nos explantos que foron tratados con adición de AIB ao medio. Pola contra, o valor lonxitude da raíz máis longa foi significativamente máis alto nos brotes tratados mediante *dipping* (Táboa 18 e Figura 29).

Táboa 18. Valores de p correspondentes á proba ANOVA de dúas vías para as variables de enraizamento en función dos diferentes tratamentos empregados ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).

Variable dependente	Variable independente		
	Clon	Método indución	Interacción
Porcentaxe de enraizamento	0,261149	0,000522	0,381542
Número de raíces	0,38175	0,000633	0,70236
Lonxitude da raíz máis longa	0,577411	0,000107	0,279463

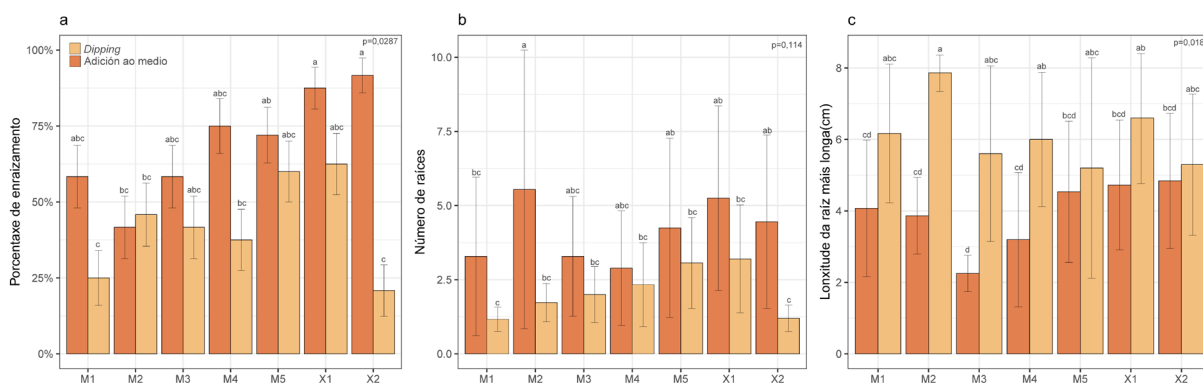


Figura 29. (a) Porcentaxe de enraizamento, (b) número de raíces por explanto enraizado e (c) lonxitude da raíz máis longa (cm) por explanto enraizado (\pm desviación típica) de brotes de seis clons de *Centaurea ulreiae* (clons maduros: M1-4, e clons xuvenís: X1-2) despois dun tratamento de adición ao medio (cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB) ou un tratamento de *dipping* durante 60 s nunha solución de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de AIB e posterior cultivo en MS, cultivados ambos durante 35 días. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).



Figura 30. Aspecto das vitroplantas de *C. ulreiae* enraizadas despois de 35 días en cultivo (Fonte: elaboración propia).

4.10 Aclimatación

Despois da fase de enraizamento, as vitroplantas (Figura 30) foron sometidas a un proceso de aclimatación a condicións *ex vitro*, no que se compararon dous tratamentos para achar as condicións que maximizaban a supervivencia das plántulas: unha aclimatación directa das plántulas en umbráculo ou unha preaclimatación en cámara de crecemento.

No caso das plántulas aclimatadas directamente no umbráculo, a taxa de supervivencia aos 30 días foi de ~70%, diminuíndo ata o 60% aos 60 días. Cando se realizou preaclimatación en cámara de crecemento, as taxas de supervivencia mantivéronse próximas ao 100% (96,4% aos 60 días), sendo significativamente superiores ás acadadas mediante aclimatación en umbráculo (Figura 31a).

Durante o proceso de aclimatación obsérvase un bo crecemento das vitroplantas, que non foi cuantificado (Figura 31b-d). Aos dous anos da aclimatación, as plantas amosan trazos de madurez, como a aparición de follas pinnatisectas (Figura 31e).

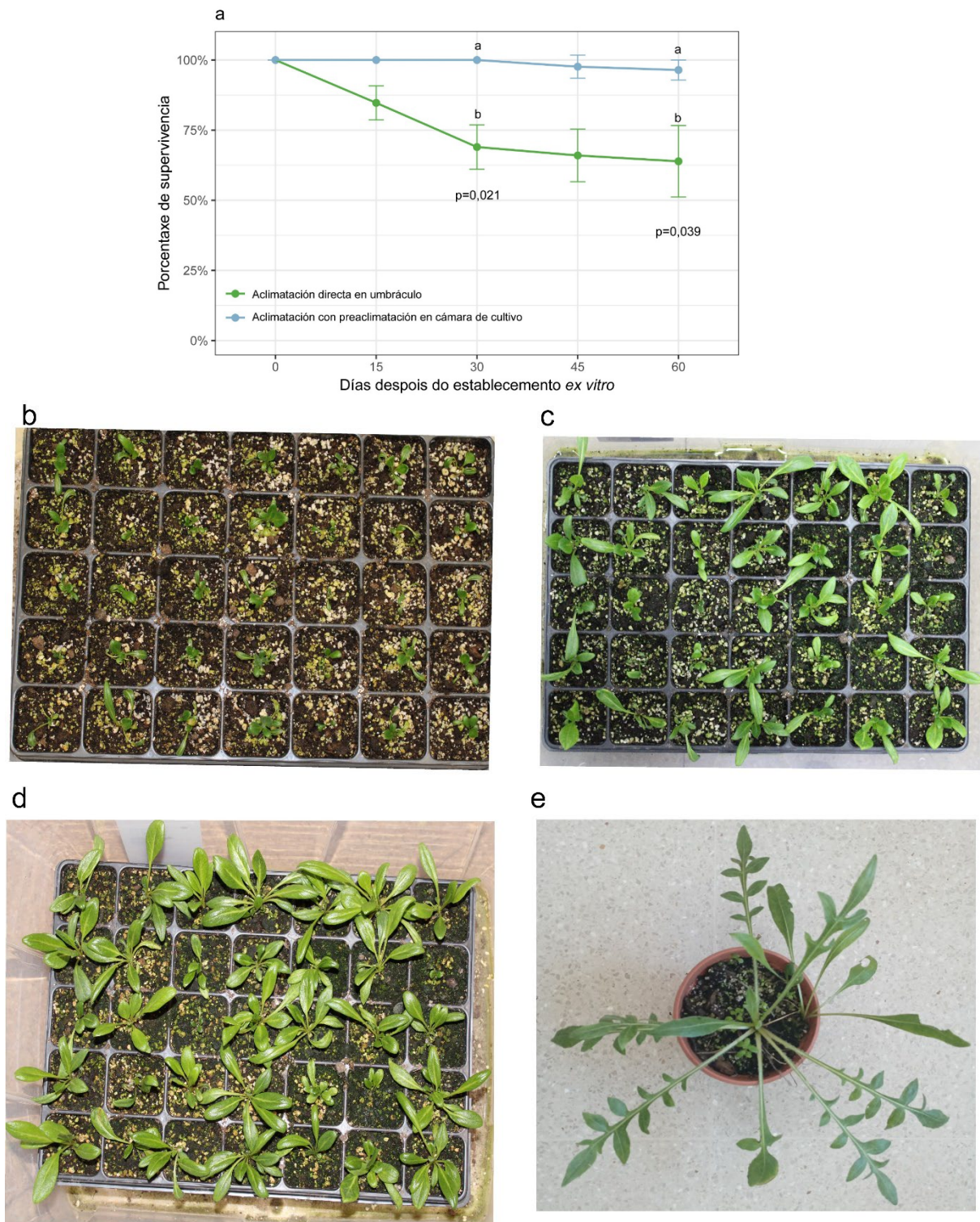


Figura 31. (a) Porcentaxe de supervivencia de vitroplantas de *Centaurea ulreiae* aclimatadas a condicións *ex vitro* mediante 2 tratamentos de aclimatación. O p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$). (b) aspecto das vitroplantas no momento do paso a terra; (c) aos 30 días, (d) 60 días e (e) despois de 2 anos en condición de invernadoiro (Fonte: elaboración propia).

5 DISCUSIÓN

5.1 *C. ulreiae* presenta baixas taxas de frutificación

Os resultados de frutificación obtidos ($14 \pm 12,40$ aquenios por capítulo) son similares aos que foran xa reportados previamente por Silva-Pando (1987) e por Izco (2003) (10-12 aquenios por capítulo). Estes datos son moi superiores aos recollidos no AFA (2004), no que se consideraba que *C. ulreiae* producía 15 froitos viables por vástago, que corresponderían a uns 3 aquenios viables por capítulo, partindo dos datos obtidos nesta tese en canto ao número de capítulos por vástago ($5,04 \pm 2,91$). As baixas taxas de frutificación son comúns noutras especies endémicas do xénero. Así, *C. corymbosa* e *C. cineraria* subsp. *circae* presentan taxas de frutificación que están en torno aos 20 aquenios por capítulo (Colas et al., 2001; Ehlers, 1999; Riba et al., 2005; Valletta et al., 2016).

Inicialmente, Mallón (2008) atribúe as baixas taxas de frutificación da especie ás altas taxas de endogamia. Posteriormente, García-Jacas et al. (2023), baseándose na orixe mediterránea da sección *Acrocentron* (Font et al., 2009), á que pertence *C. ulreiae*, propoñen unha explicación alternativa, considerando que as baixas taxas de frutificación se deben á dificultade de maduración dos froitos na planta nai, como resultado dunha deficiente adaptación ao clima húmido. Na Península Ibérica, á parte *C. ulreiae*, só *C. lagascana* e *C. borjae* habitan áreas con clima oceánico, compartindo con esta as baixas taxas de frutificación.

Independentemente da causa da baixa frutificación, o cambio de usos tradicionais do monte cara ás plantacións forestais ou prados non parece estar afectando o éxito reprodutivo da especie, que se mantén relativamente estable en canto ao número de individuos e taxa de frutificación, dende que foi descrita hai 37 anos (Izco et al., 2003; Silva-Pando, 1987). As variacións na cantidade de aquenios en función do ano de colleita, que xa foran reportadas por Mallón (2008), poden deberse a cambios interanuais na dispoñibilidade de recursos ou ás

diferentes condicións climáticas que, en calquera caso, non parecen afectar á dinámica da especie.

5.2 Os aquenios de *C. ultreiae* presentan altas taxas de viabilidade

O uso da tinguidura con Tz para avaliar a viabilidade das sementes de *C. ultreiae* indicou que a viabilidade dos aquenios está en torno ao 80% despois de un ano de conservación en frío e ao 65% despois de dous anos. Os resultados obtidos en *C. ultreiae* foron similares a outras especies do xénero como *C. amaena*, *C. olympica*, *C. tchihatcheffii*, *C. hermanii* e *C. amblensis* subsp. *tentundaica* (Atasagun & Aksoy, 2018; Márquez García, 2016; Ozel et al., 2006; Yücel, 2021; Yücel & Erken, 2023). Por outro lado, como xa reportara Mallón (2008), a conservación a 4°C mantén a viabilidade das sementes de *C. ultreiae* relativamente estable.

As concentracións de Tz empregadas nas probas de viabilidade nas especies do xénero se limitan aos valores de 0,1% e 1,0%. No caso de *C. ultreiae* a concentración de 0,1% proporcionou resultados que poden considerarse máis fiables tomando como referencia as taxas de xerminación obtidas nos test de xerminación. Nas especies *C. amaena*, *C. fenzilii*, *C. tchihatcheffii* e *C. zeybekii* tamén se seleccionou esta concentración (Kurt & Erdağ, 2009; Ozel et al., 2006; Turkoglu et al., 2018; Uzun et al., 2020).

Con respecto á tinguidura con índigo carmín, esta infraestima a viabilidade, xa que atribuíu unha porcentaxe de sementes viables (conservadas dous anos) dun 40%, moi por debaixo dos resultados da tinguidura empregando Tz (65%).

As porcentaxes de viabilidade en condicións óptimas son menores que as reportadas por Mallón (2008) (94%). Esta diferenza pode deberse a unha redución na viabilidade da especie nos últimos anos, ou ben á percepción subxectiva das categorías de viabilidade (viable, semi-viable e non viable), xa que no estudo de Mallón non se define especificamente o criterio seguido para establecer as diferentes categorías.

5.3 A xerminación *in vivo* en *C. ulreiae*

Os únicos datos publicados para a xerminación *in vivo* de *C. ulreiae* outorgábanlle un 15% de xerminación, ao mesmo tempo que unha viabilidade (mediante Tz) do 90% (Mallón, 2008). Estes resultados eran indicativos da posible existencia de fenómenos de letargo nos aquenios. Durante a realización do presente traballo, observáronse igualmente diferenzas importantes entre os resultados obtidos nas probas de xerminación no tratamento control (menores ao 10%) e nos ensaios de viabilidade Tz (65-80%).

Existen diferentes alternativas para romper o letargo das sementes. Neste traballo aplicouse sen éxito a imbibición en AX₃ tanto en probas *in vivo* (datos non amosados) como *in vitro*, onde as taxas de xerminación acadadas (en torno ao 60% en aquenios sen cubertas) non diferiron significativamente das do control. Posteriormente, o uso de diferentes procedementos de choque térmico proporcionou resultados positivos. Os tratamentos prexerminativos de choque térmico adoitan realizarse en especies que presentan letargo e adaptadas ao clima mediterráneo (Mallón, 2008), orixe que foi suxerida para *C. ulreiae* (García-Jacas & Susanna, 1992). No presente estudo, o tratamento de choque térmico en estufa 5 min a 60°C foi eficiente, estimulando a xerminación (94%) e reducindo o tempo medio de xerminación (4,9 días) con respecto a outros tratamentos. A duración do choque térmico en estufa xoga un papel importante nos resultados obtidos, posto que no tratamento durante 15 min a xerminación descendeu ata o 15%, o que implica que superado un determinado tempo de exposición a 60°C as sementes sofren un deterioro evidente.

No tratamento de choque térmico en auga (5 min a 60°C) seguido da posta a xerminar dos aquenios intactos (coas súas cubertas) baixo fotoperíodo (16 h / 8 h) observouse que a exposición á luz favorecía á xerminación *in vivo*, dando lugar a taxas de xerminación que superaban o 60%, significativamente máis altas que as obtidas nas probas en escuridade (15%). Mallón (2008) pola súa parte non atopou diferenzas neste aspecto, obtendo porcentaxes baixas de xerminación (13-15%) tanto en condicións de luz como de escuridade. Noutras especies do xénero, como *C. cineraria* subsp. *circae*, a xerminación tamén se ve favorecida pola luz (Valletta et al., 2016).



O ensaio de choque térmico en estufa durante 5 min a 60°C e posterior eliminación das cubertas resultou nas taxas de xerminación *in vivo* máis elevadas, superando o 90% de sementes

DISCUSIÓN

xerminadas. Ademais, este tratamento proporcionou un tempo medio de xerminación duns 5 días, similar ao observado por Mallón nas mesmas condicións de choque térmico seguido de posta en xerminación de aquenios intactos en condicións de escuridade (6,5 días), aínda que neste caso as taxas de xerminación que obtivo foron moi baixas como se dixo anteriormente (13,7%).

Se se toman como referencia as condicións naturais nas que ten lugar a xerminación nesta especie, existe unha certa analoxía cos resultados observados nos tratamentos prexerminativos descritos: *C. ulreiae* é unha especie pioneira que prefire áreas solleiras, onde a comunidade vexetal non está moi desenvolvida. Nestas condicións, a iluminación e a temperatura elevada estimularían a xerminación.

A combinación de choque térmico (5 min en estufa a 60°C) coa presenza de luz e a retirada das cubertas revélase como un tratamento eficaz para a xerminación. O conxunto dos resultados obtidos apunta á existencia de letargo físico en *C. ulreiae*, do que non existía constancia experimental clara ata hoxe.

5.4 Os problemas de contaminación no establecemento *in vitro* de aquenios de *C. ulreiae*

Nos primeiros ensaios de establecemento *in vitro* de aquenios de *C. ulreiae* observáronse taxas de contaminación elevadas, chegando practicamente ao 100%. En ensaios posteriores, observouse que o tratamento con lixivia comercial pura (4,0% de cloro activo) durante 15 min e a eliminación posterior das cubertas permitía reducir a porcentaxe de contaminación ao 30%, manténdose taxas de xerminación relativamente altas (~60%). Noutras especies, como *C. tchihatchefii*, un tratamento con lixivia comercial ao 15% (porcentaxe de cloro activo non mencionada) durante 10 min permitiu obter taxa de desinfección do 94% (Arpaguş et al., 2017).

No traballo previo en *C. ulreiae* (Mallón, 2008), non se detallan as taxas de asepsia obtidas co procoloto (15 min en Domestos® 10%) que proporcionou os mellores resultados de xerminación (66,7%).

As altas taxas de contaminación observadas no presente traballo poderían estar relacionados coa proximidade dos capítulos á superficie do chan, debido á natureza acaule desta

especie, o que favorecería a presenza dunha elevada concentración de microorganismos na superficie dos aquenios.

A presenza do elaiosoma nos aquenios tamén pode xogar un papel importante. Esta estrutura, que serve para atraer ás formigas que participan na dispersión, podería atraer a outros insectos que depredan os aquenios, transitan sobre eles ou fan postas no seu interior, como se ten reportado noutras especies, como *C. cineraria* subsp. *circae* e *C. montis-borlae* Soldano (Boracchia et al., 2007; Valletta et al., 2016). Moitos aquenios poderían presentar un aspecto viable e conter embrións non viables.

5.4.1 Conservación de aquenios de *C. ulreiae* en bancos de xermoplasma

Tomando como referencia as indicacións para especies silvestres (ENSCONET et al., 2009), a colleita de accesións de *C. ulreiae* debe realizarse tendo en conta o límite dun 20% do material maduro dispoñible por localidade e día de colleita, colleitando como media 50-200 individuos material na poboación. Tendo en conta a estrutura xenética descrita por García-Jacas et al. (2023), *C. ulreiae* está composta por unha única poboación. Aínda así os individuos núcleos definidos polos autores, presentan alelos privados e polo tanto se consideran todos eles como relevantes para a conservación.

No que respecta á conservación dos aquenios en bancos de xermoplasma, Mallón (2008) xa probara que estes presentan un comportamento ortodoxo, e poden ser conservados en condicións de baixa temperatura e humidade, sen perder viabilidade.

Durante este traballo, desenvolveuse un protocolo estándar para avaliar a viabilidade de lotes de aquenios, comprobando ademais que a perda de viabilidade na conservación a 4°C está en torno a un 10% anual. Ademais, propuxéronse as condicións para acadar taxas óptimas de xerminación (~90%), que aseguran a rexeneración das accesións no banco de xermoplasma permitindo realizar reintroducións en campo ou establecer novas liñas clonais *in vitro*.

5.5 Micropropagación de *C. ulreiae*

5.5.1 Os materiais de partida para o establecemento *in vitro* en *C. ulreiae*

Aquenios e fragmentos de folla de material adulto foron empregados como material de partida neste traballo. Ambos demostraron ser unha fonte de material válida para o establecemento *in vitro* de *C. ulreiae*. Tomando como base a ampla bibliografía consultada sobre cultivo *in vitro* no xénero *Centaurea*, este traballo reportaría por primeira vez o uso como material de partida de follas adultas da roseta basal tomadas de plantas na natureza.

Noutras especies do xénero, debido a fenómenos de hibridación (Cuenca et al., 1999; Cuenca & Amo-Marco, 2000) ou baixa produción de aquenios viables (Valletta et al., 2016), é frecuente recorrer ao emprego de caules florais como material de partida. Neses casos, desbotouse o uso de follas da roseta basal pola súa proximidade á superficie do chan. En *C. ulreiae*, na que non aparecen caules vexetativos nin florais, non é posible aplicar os protocolos mencionados, polo que é obrigatorio recorrer ás follas da roseta basal.

A este respecto, existen autores (Cuenca & Amo-Marco, 2000) que consideran que a extracción de plantas da súa contorna natural para a obtención de materiais vexetativos (como as follas da roseta) que se utilizarán como material de partida é prexudicial dende a perspectiva da conservación *in situ*, polo que debería darse preferencia ao material como os aquenios ou caules florais, que non implican a extracción de plantas.

No caso de *C. ulreiae*, que presenta unha taxa de propagación asexual moi elevada, a colleita e mantemento *ex situ* de individuos non representa unha perda significativa de xenotipos representativos da poboación polo que constitúe un material válido como material de partida cun grao de afectación mínimo á poboación natural.

5.5.2 Citoquininas na organoxénese adventicia en *C. ulreiae*

Neste traballo, os experimentos de organoxénese realizados sobre explantos de folla demostraron que TDZ resultou ser máis eficaz que BAP na produción de brotes, tanto en fragmentos foliares obtidos de clons xuvenís como a partir de clons adultos. Cómpre destacar

que non se observou formación de brotes con aspecto anormal ou hiperhídricos. Este traballo reporta por primeira vez o uso de TDZ como indutor da organoxénese adventicia en *C. ulreiae*.

Na maior parte de protocolos propostos para organoxénese adventicia en especies do xénero emprégase BAP. En *C. davidovii* a aplicación de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP proporcionou 4,5 brotes por explanto (Gorgorov et al., 2015), mentres que explantos foliares de *C. pseudaxillaris* deron lugar a 2,6 brotes por explanto como consecuencia da aplicación de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP (Traykova et al., 2015). Ademais, nalgúns especies o efecto combinado de BAP con ANA proporcionou os mellores resultados, como por exemplo en *C. lycanica*, cunha produción de 32 brotes por explanto cando se engadiron ao medio nunha concentración de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP + $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ANA (Atalay & Erisen, 2017).

Nas especies nas que se ensaiou o efecto de TDZ na estimulación da organoxénese adventicia observáronse resultados diferentes aos obtidos con BAP: en *C. amaena* e *C. lycanica*, o tratamento con TDZ, con concentracións entre $0,3\text{-}0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, resultou na produción de calo pero non na rexeneración de brotes. En *C. zeybekii*, TDZ foi utilizado en concentracións moito máis baixas ($0,001; 0,005; 0,01; 0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) xerando brotes hiperhídricos que presentaban malformacións (Kurt & Erdağ, 2009). Mallón (2008) pola súa parte só utilizou BAP no seu traballo sobre *C. ulreiae*.

Adoita considerarse que o uso de TDZ pode representar un maior risco de mutación somaclonal sobre os brotes obtidos que o uso de BAP (Huetteman & Preece, 1993). No estudo de Mallón (2008) sobre un único clon de *C. ulreiae*, demostrouse, mediante o uso de técnicas moleculares, que non se produciu mutaxénese en brotes xenerados adventiciamente con BAP. Neste traballo, formulárase a realización dunha análise comparativa de material obtido directamente das plantas nai con respecto ao material dos brotes obtidos a partir de organoxénese adventicia. Por causas alleas ao equipo de investigación estas análises non puideron realizarse. Será preciso verificar en posteriores estudos se se mantén a integridade xenética tras o uso de TDZ como indutor da formación de brotes adventicios na especie.

5.5.3 Factores que inflúen na produción de brotes de *C. ulreiae* mediante micropropagación

5.5.3.1 Influencia da luz na micropropagación

Neste traballo, observouse que, entre as diversas fontes de luz ensaiadas, a luz LED branca fría (6500 K) foi a máis eficiente na produción de brotes, observándose igualmente unha maior concentración de pigmentos fotosintéticos, no clon xuvenil ensaiado (clon X1). Algúns estudos apuntan a que a natureza da fonte luz afecta á propagación e á calidade das plantas propagadas (Djangalina et al., 2023). Na bibliografía consultada sobre micropropagación noutras especies do xénero non aparecen estudos que inclúan o efecto dos factores calidade de luz e temperatura de cor sobre a multiplicación *in vitro*.

En xeral, nas plantas propagadas *in vitro*, a concentración de clorofilas é maior cando os explantos medran baixo luces que conteñen no seu espectro a cor azul ($\lambda=450$ nm). En cambio, as fontes de iluminación monocromáticas vermellas están relacionadas con menores concentracións de clorofilas (Bello-Bello et al., 2017; Pawłowska et al., 2018). De feito, en *C. ulreiae* observouse unha redución no contido de pigmentos fotosintéticos (e nas variables de multiplicación) como resposta á iluminación monocromática vermella. Os brotes que creceron baixo luz brancas, azul ou azul + vermello presentaron, en xeral, concentracións de pigmentos e taxas de multiplicación máis altas.

O aumento na concentración pigmentos asociado á exposición a luz azul non sempre se produce. Nun estudo en pataca (Da Rocha et al., 2015) as luces LED vermellas inducían un incremento na concentración de clorofila A e clorofila B en comparación con iluminación que contiña luz azul.

A ratio entre clorofila A e clorofila B (ChlA/ChlB) indica a adaptación do aparello fotosintético ás condicións externas. En plantas que crecen en ambientes umbríos a ratio tende a ser máis baixa (2,5-3,0) que nas que crecen en zonas solleiras (3,0-3,5) (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). Nas plantas micropropagadas, a ratio tende a achegarse a 1,0 (Pawłowska et al., 2018). Existe algunha excepción: en cultivos de pataca supérase lixeiramente o valor de 2,0, independentemente do tipo de luz (Da Rocha et al., 2015), aproximándose aos valores que presentan as plantas na natureza en zonas umbrías. No caso de *C. ulreiae*, o único tratamento no que a ratio ChlA/ChlB supera o valor de 2,0 deuse cando os brotes medraron baixo luz azul + vermello.

5.5.3.2 Concentración de BAP en combinación co tipo de fonte luminosa

Os resultados obtidos neste traballo indican que non existe interacción entre a concentración de BAP e a fonte luminosa. Como se discutiu previamente, o tipo de luz máis axeitado foi unha vez máis a luz LED 6500 K. Agora ben, a concentración de BAP no medio de multiplicación afecta á produción de brotes de *C. ulreiae*. Os mellores resultados nas variables de multiplicación definidas neste traballo (taxa de multiplicación de brotes > 1 cm e taxa de multiplicación de brotes totais) déronse en medio con 1,0-2,0 mg·l⁻¹ BAP (~2,5 brotes >1 cm e ~4 brotes totais por explanto). As taxas de multiplicación obtidas foron inferiores ás obtidas por Mallón (2008) sobre brotes procedentes de embrións somáticos (4,66 brotes viables por explanto en brotes tratados con 1,0 mg·l⁻¹ BAP). Esta diferenza pode deberse a que se trata de dous xenotipos diferentes, ou aos diferentes tratamentos previos do material, xa que os explantos utilizados por Mallón derivaban dun proceso de embrioxénese somática, mentres que o clon X1, utilizado neste traballo, foi multiplicado mediante organoxénese axilar a partir dun aquenio establecido *in vitro*. Os resultados obtidos en *C. ulreiae* son similares aos acadados noutras especies do xénero nas que se realizou multiplicación de explantos axilares, establecidos a partir de aquenios xerminados *in vitro*, como en *C. davidovii* (3,6 brotes por explanto) (Gorgorov et al., 2015) e *C. pseudaxilaris* (2,6 brotes por explanto) (Traykova et al., 2015), ou ben a partir de caules florais, como en *C. paui* (4,6 brotes totais e 2,7 brotes >1 cm por explanto) (Cuenca et al., 1999). Nestes exemplos utilizouse en todos os casos un medio que contiña 0,5 mg·l⁻¹ BAP.

Na grande maioría dos estudos consultados, os experimentos se levaron a cabo sobre un único xenotipo. Tan só en *C. rupestris*, o material consistiu nunha mestura de xenotipos que xerminaron en condicións *in vitro* (Perica, 2003). Neste caso o conxunto de xenotipos foi considerado como un todo a efectos da análise ao longo de 3 subcultivos. No noso estudo, a avaliación de sete xenotipos diferentes permitiu observar que a concentración óptima de BAP era a mesma para todos eles (0,5 mg·l⁻¹ BAP), independentemente do seu carácter xuvenil ou adulto.

Con respecto á calidade dos brotes producidos, a aparición de anomalías nos brotes en medios con concentracións relativamente altas de BAP (1,0-4,0 mg·l⁻¹), reportada no presente traballo, foi tamén observada por Mallón (2008), que mencionaba que unha parte de brotes eran

non viables, aínda que no seu caso este feito se observaba igualmente en concentracións relativamente baixas.

5.5.4 Enraizamento *in vitro* en brotes de *C. ulreiae*

Os brotes de *C. ulreiae* cultivados *in vitro* apenas enraízan de forma espontánea e precisan ser sometidos a un proceso de indución mediado por auxinas para o seu enraizamento. Pola contra, en *C. pseudaxillaris* o 100% dos explantos desenvolven raíces espontáneas en medios con citoquininas (Traykova et al., 2015). En todo caso, na maior parte das especies de *Centaurea* se precisa a aplicación dun estímulo auxínico para inducir o enraizamento (ver referencias en Táboa 7).

No presente estudo, a auxina AIB proporcionou mellores porcentaxes de enraizamento que ANA, a diferenza do afirmado por Mallón (2008), que obtiña mellores porcentaxes de enraizamento, traballando cun só xenotipo, utilizando ANA. Nas outras doce especies do xénero das que se teñen referencias, na maior parte delas se empregou AIB, e en tres delas unha combinación de AIB e AIA ou AIA separadamente.

As taxas de enraizamento obtidas no presente traballo, independentemente do método de indución empregado (*dipping* ou adición de auxina ao medio), variaron entre un 25% e un 90%, dependendo do xenotipo analizado. Os valores medios de enraizamento mantivéronse en torno ao 60%. Pola súa banda, Mallón, nun experimento sobre un único xenotipo, obtén porcentaxes de enraizamento que rondan o 90%. En xeral, noutras especies de *Centaurea*, as taxas de enraizamento *in vitro* son relativamente altas, a excepción de *C. zeybekii* (15%) (Aydoğan & Erdağ, 2015; Kurt & Erdağ, 2009).

Na xeneralidade dos estudos recompilados para a realización desta tese, os brotes foron postos a enraizar *in vitro* en medios que contiñan auxina. O uso de *dipping* como tratamento de indución foi proposto unicamente por Mallón (2008) para *C. ulreiae*. No seu caso, o tratamento auxínico mediante *dipping* proporcionou porcentaxes de enraizamento significativamente superiores ás obtidas en brotes introducidos nun medio con auxinas. Pola contra, no presente traballo, non se observaron diferenzas significativas entre ambos tratamentos en canto a porcentaxes de enraizamento. No que si coinciden ambos traballos é na maior lonxitude das

raíces obtidas despois do tratamento mediante *dipping*. Se o aspecto prioritario é obter unha porcentaxe de enraizamento o maior posible, baseándose nos resultados obtidos en 7 clons diferentes, a conclusión é que é preferible o uso de medios que conteñen AIB para enraizar os microbrotes de *C. ulreiae*.

5.5.5 A preaclimatación en cámara de crecemento maximiza a supervivencia das plántulas

A aclimatación de *C. ulreiae* en cámara de crecemento seguindo o protocolo descrito neste traballo permitiu a supervivencia aos 2 meses dun 96,4% das vitroplantas producidas. As altas porcentaxes de supervivencia obtidas en *C. ulreiae* cando se realizou unha preaclimatación en fitotrón son comparables coas obtidas en *C. davidovii* (Gorgorov et al., 2015) e *C. cineraria* subsp. *circae* (Valletta et al., 2016). En xeral, nas especies de *Centaurea* as porcentaxes de supervivencia na aclimatación son relativamente amplas, variando entre o 60% e o 100%, polo que esta fase, no aspecto produtivo, non parece representar un atranco, sempre e cando se respete o proceso gradual de aclimatación que se aplica nos protocolos de paso a condicións *ex vitro* de moitas outras especies.

Dende o punto de vista da conservación da especie, é importante dispoñer de protocolos de propagación *in vitro* que sexan válidos para diferentes xenotipos. Neste traballo determináronse unhas condicións estándar que posibilitan a produción dun número importante de plantas aclimatadas de *C. ulreiae* partindo de materiais obtidos en distintas localidades e utilizando diferentes fontes de material (aquenios e follas de exemplares adultos).

5.5.6 Conservación de propágulos vexetativos de *C. ulreiae* en bancos de xermoplasma

Neste traballo comprobouse como os explantos de *C. ulreiae* conservados a 8°C durante 6 meses podían recuperar taxas de multiplicación estándar despois de 3 subcultivos en medio suplementado con 0,5 mg·l⁻¹ BAP. O bo aspecto dos brotes despois da conservación, parece indicar que estes son susceptibles de ser conservados durante períodos superiores en condicións de conservación a 8°C en períodos máis longos. A dispoñibilidade de protocolos de conservación en frío (8°C) resulta útil no establecemento de bancos de xermoplasma de

propágulos vexetativos nos que é posible manter facilmente as accesións en condicións de crecemento ralentizado e dispoñer delas rapidamente cando se pretende producir novas plantas, para seren utilizadas, por exemplo, en reintroducións. Tratamentos como a criopreservación (Mallón et al., 2008) serían interesantes para manter coleccións base durante períodos máis prolongados sen necesidade de recorrer a elas para a produción de planta.

En base aos estudos xenéticos (García-Jacas et al. 2023), un número relativamente pequeno de xenotipos, seleccionados nos núcleos que presentaban alelos privados, conservados *in vitro*, é suficiente para manter a maior parte da diversidade xenética da poboación de *C. ulreiaae* e pode ser utilizado de forma permanente como fonte de planta para reintrodución, diminuindo a presión sobre as accesións compostas por aquenios, para a finalidade de produción de planta.

5.5.7 Indución da floración en *C. ulreiaae*

A observación de floración espontánea en brotes do clon X1 derivados de organoxénese adventicia en medio con TDZ non puido ser reproducida de maneira controlada nos distintos ensaios realizados neste traballo.

A aparición espontánea de capítulos en cultivo *in vitro* é un fenómeno que se ten reportado en varias ocasións noutras especies de *Centaurea*. En concreto, en *C. tchihatcheffii* (Ozel et al., 2006) e en *C. davidovii* (Gorgorov et al., 2015), nas que apareceron capítulos en brotes rexenerados de forma indirecta, mediante embrioxénese somática ou organoxénese a partir de follas. En *C. cyanus*, conseguiron inducir a floración mediante a incubación en medio suplementado con vitamina B5 en 3-4 semanas, utilizando brotes obtidos mediante multiplicación axilar (Alaiwi et al., 2012).

6 CONCLUSIONES

1. Do total de aquenios dispoñibles nun capítulo, unicamente un 9% dos mesmos (que representan o material a conservar) son aparentemente viables (14,46 aquenios/capítulo), dos que un 70% son realmente viables (9,8 aquenios/capítulo), segundo as probas de viabilidade postas a punto neste traballo. Empregando o mellor protocolo de xerminación entre ensaiados, que inclúe tratamentos previos para romper o letargo (condición que presentan os aquenios de *C. ulreiae*, verificada neste traballo), practicamente se consegue que xerminen todos os aquenios viables. Desta maneira, cada capítulo podería proporcionar 9 plántulas xerminadas.
 - 1.1. O protocolo de viabilidade que proporcionou os resultados máis fiables consistiu na incubación dos embrións durante 48 h nunha solución de 0,1% Tz a 30°C.
 - 1.2. O letargo dos aquenios de *C. ulreiae* puido eliminarse mediante tratamento prexerminativo de choque térmico en estufa a 60°C (5 min) seguido da retirada das cubertas.
 - 1.3. O protocolo de desinfección dos aquenios máis eficiente consistiu no mergullado nunha solución de 4% NaClO (15 min) e a posterior retirada das cubertas antes do establecemento en condicións *in vitro*.
2. Os protocolos propostos neste traballo permitiron establecer coleccións activas en multiplicación estable en condicións *in vitro* de cinco clons procedentes de plantas adultas (M1-M5) e nove clons procedentes de aquenios que xerminaron *in vitro* (X1-X9). Estas coleccións poden manterse en condicións de frío durante períodos de ao menos 6 meses, intercalados con ciclos de multiplicación de 3 meses en condicións estándar. O excelente aspecto que presentaban os brotes despois de seis meses en frío e a súa boa recuperación nos períodos de crecemento en condicións estándar, fai pensar que estes poderían conservarse en frío durante períodos significativamente máis longos. Os fenómenos de floración espontánea observados non puideron ser reproducidos en condicións controladas.

CONCLUSIÓNS

- 2.1. O protocolo óptimo de organoxénese adventicia sobre fragmentos de folla de clons adultos e xuvenís de *C. ulreiae* consistiu no cultivo dos explantos nun medio MS con $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ TDZ. Trátase da primeira especie do xénero no que esta citoquinina proporciona resultados positivos.
3. Os protocolos aplicados aos clons conservados *in vitro* proporcionan taxas de multiplicación medias superiores a 3 brotes por explanto. Isto permite obter un número de brotes moi elevado en períodos de tempo moi curtos. As altas taxas de enraizamento (70%) e aclimatación (94,6%) obtidas aseguran que a maior parte dos brotes postos a enraizar chegarán a formar plantas completas listas para o establecemento en campo.
 - 3.1. As condicións óptimas de multiplicación a partir de xemas axilares, en cinco clons adultos e dous clons xuvenís, consistiron no cultivo dos brotes en medio MS suplementado con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, baixo iluminación fluorescente ou LED cunha temperatura de cor de 6500 K. Validouse o uso da iluminación LED para a propagación de *C. ulreiae*, máis eficiente desde o punto de vista enerxético que a luz fluorescente.
 - 3.2. O protocolo de enraizamento mediante adición de $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ da auxina AIB no medio de cultivo resultou acaído para todos os clons, o que contrasta cos resultados obtidos previamente nun clon da mesma especie, no que se propuña o uso de ANA.
 - 3.3. A aclimatación de *C. ulreiae*, como a de outras especies do xénero, é relativamente sinxela, véndose favorecida pola realización dunha preaclimatación en cámara de crecemento durante 30 días.
4. Os resultados das investigacións desta memoria doutoral establecen as bases para a conservación de *Centaurea ulreiae* Silva-Pando *ex situ* (sementes e cultivo *in vitro* en banco de xermoplasma) e *in situ* (reintrodución de planta procedente de xerminación de sementes ou cultivo *in vitro*, preaclimatación e aclimatación).

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., & Aizen, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: Review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9(8), 968-980.
- Alaiwi, W. A., Sairam, R. V., Josekutty, P. C., Potlakayala, S. D., Karelia, D., & Goldman, S. L. (2012). In vitro regeneration, flowering, and cell culture of *Centaurea* species. *African Journal of Biotechnology*, 11(9), 2296-2302.
- Arpaguş, H. Ö., Okay, F. Y., & Gümüş, C. (2017). Micropropagation Studies on Critically Endangered Mediterranean Knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch Et. Mey). *The Eurasian Agriculture and Natural Sciences*, 240-243.
- Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos. (s. f.). *REDBAG: RED ESPAÑOLA DE BANCOS DE SEMILLAS*. Recuperado 14 de mayo de 2024, de <https://www.redbag.es/1redbag.htm>
- Atalay, E., & Erisen, S. (2017). High frequency regeneration of critically endangered endemic plant *Centaurea lycaonica*. *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 26(11), 6356-6363.
- Atasagun, B., & Aksoy, A. (2018). Autecology and conservation biology of *Centaurea amaena* (Asteraceae). *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 28(1), 208-214.
- Aydoğan, S., & Erdağ, B. (2015). Callus Induction and Adventitious Shoot Regeneration of *Centaurea zeybekii* Wagenitz: Endangered Endemic Plant. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(2), 1-8.
- Bachetta, G., Bueno Sánchez, A., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B., & Virevaire, M. (Eds.). (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias / La Caixa.
- Bañares Baudet, Á. (Ed.). (2004). *Atlas y Libro Rojo de la flora vascular amenazada de España: Taxones prioritarios*. Organismo Autónomo Parques Nacionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Barclay, G. (2002). Plant Anatomy. *Electronic Library of Science*, 1-14.
- Barres, L., Sanmartín, I., Anderson, C. L., Susanna, A., Buerki, S., Galbany-Casals, M., & Vilatersana, R. (2013). Reconstructing the evolution and biogeographic history of tribe *Cardueae* (*Compositae*). *American Journal of Botany*, *100*(5), 867-882.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, *14*(1), 1-16.
- Becher, S., Steinmetz, K., Weising, K., Boury, S., Peltier, D., Renou, J.-P., Kahl, G., & Wolff, K. (2000). Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*, *101*, 643-651.
- Bellanger, S., Guillemin, J.-P., & Darmency, H. (2014). Pseudo-self-compatibility in *Centaurea cyanus* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *209*(7), 325-331.
- Bello-Bello, J. J., Pérez-Sato, J. A., Cruz-Cruz, C. A., & Martínez-Estrada, E. (2017). Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. En E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Chlorophyll*. InTech.
- Belokurova, V. B. (2010). Methods of biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review). *Cytology and Genetics*, *44*(3), 174-185.
- Bermejo, J. E. H., Molina, F. H., (AIMJB), on behalf of the I.-M. A., Aguilera, J. A., Bramwell, D., Gómez-Campo, C., Elvira, R., Estrellés, E., Gradaille, J. L., Iriondo, J. M., Membrives, N., de la Vega, B. L., Pedrola, J., Pérez, C., Roca, A., & Velayos, M. (2005). REDBAG: The Spanish Network of genebanks for wild plants. *BGjournal*, *2*(2), 18-20.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Germination. En J. D. Bewley, K. J. Bradford, H. W. M. Hilhorst, & H. Nonogaki, *Seeds* (133-181). Springer New York.
- Boracchia, M., Viegi, L., Bedini, G., Ansaldi, M., Vangelisti, R., & Garbari, F. (2007). *Centaurea montis-borlae* (Asteraceae), endemic of the Apuan Alps (Tuscany, Italy): Biosystematic analyses. *Abstracts, XII Optima meeting*, 10-16 September 2007. Pisa, Italy, 103

- Christianson, M. L., & Warnick, D. A. (1985). Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. *Developmental Biology*, 112(2), 494-497.
- Coelho, N., Gonçalves, S., & Romano, A. (2020). Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. *Plants*, 9(3), 345.
- Colas, B., Olivieri, I., & Riba, M. (2001). Spatio-temporal variation of reproductive success and conservation of the narrow-endemic *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). *Biological Conservation*, 99(3), 375-386.
- Copeland, L. O., & McDonald, M. B. (1999). Seed Viability Testing. En L. O. Copeland & M. B. McDonald, *Principles of Seed Science and Technology* (111-126). Springer US.
- Cuenca, S., & Amo-Marco, J. B. (2000). In vitro propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant growth regulation*, 30, 99-103.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J. B., & Parra, R. (1999). Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). *Plant Cell Reports*, 18(7-8), 674-679.
- Da Rocha, P., de Oliveira, R. P., & Scivittaro, W. B. (2015). New light sources for in-vitro potato micropropagation. *Biosci. J., Uberlândia*, 31(5), 1312-1318.
- Debergh, P. C., & Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 14(4), 335-345.
- Decreto 88/2007 do 19 de abril, polo que se regula o Catálogo galego de especies ameazadas., 88/2007, Xunta de Galicia- DIARIO OFICIAL DE GALICIA, N°89 7.416 (2007).
- Devesa, J. A. (2016). *Las especies del género Centaurea en la Península Ibérica y Baleares*. Universidad de Córdoba.
- Devesa, J. A., Lopez-Nieto, E., Arnelas, I., Blanca, G., Muñoz, A. F., Suárez-Santiago, V. N., & Rodríguez-Invernón, V. (2014). *Centaurea* L. En *Flora Ibérica* (Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.), (Vol. 16). Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- Djangalina, E., Kapytina, A., Kaigermazova, M., Mamirova, A., & Shadenova, E. (2023). Influence of light-emitting diodes on the efficiency of valuable woody plants micropropagation. *International Journal of Biology and Chemistry*, 16(1), 49-57.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., & Sangwan, R. S. (2011). De novo shoot organogenesis: From art to science. *Trends in Plant Science*, 16(11), 597-606.
- Ehlers, B. K. (1999). Variation in fruit set within and among natural populations of the self-incompatible herb *Centaurea scabiosa* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany*, 19(6), 653-663.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 5-16.
- ENSCONET, Royal Botanic Gardens, Kew (UK), & Universidad Politécnica de Madrid (Spain). (2009). *ENSCONET Seed Collecting Manual FOR WILD SPECIES*. ENSCONET.
- FAO. (2019). *The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments; (<http://www.fao.org/3/CA3129EN/CA3129EN.pdf>).
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
- Ferrandiz, C. (2011). Fruit Structure and Diversity. En Wiley, *Encyclopedia of Life Sciences* (1.^a ed.).
- Font, M., García-Jacas, N., Vilatersana, R., Roquet, C., & Susanna, A. (2009). Evolution and biogeography of *Centaurea* section *Acrocentron* inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. *Annals of Botany*, 103(6), 985-997.
- França-Neto, J. de B., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: An important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41, 359-366.
- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Robinson, H. (2009). Classification of Compositae. En *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae* Funk, Vicki Ann, Susana, A., Stuessy, T. F., and Bayer, Randall J. (Eds) (pp. 171-189). International Association for Plant Taxonomy

- García-Jacas, N. (2001). Generic Delimitation and Phylogeny of the Subtribe Centaureinae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis. *Annals of Botany*, 87(4), 503-515.
- García-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A., & Vilatersana, R. (2002). Tribal and Subtribal Delimitation and Phylogeny of the *Cardueae* (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(1), 51-64.
- García-Jacas, N., & Susanna, A. (1992). Karyological notes on *Centaurea* sect. *Acrocentron* (Asteraceae). *Plant systematics and evolution*, 179, 1-18.
- García-Jacas, N., Susanna, A., Bakagianni, L., & Silva-Pando, F. (2023). *Estudio Genético de Centaurea ultraeae INFORME FINAL*. Instituto Botánico de Barcelona.
- Gautheret, R. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *CR Hebd. Seances Acad. Sc*, 208, 118-120.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2007). Micropropagation: Uses and Methods. En E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 29-64). Springer Netherlands.
- Godefroid, S., Van de Vyver, A., & Vanderborght, T. (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodiversity and Conservation*, 19(5), 1365-1383.
- González-Benito, M. E., & Martín, C. (2011). In Vitro Preservation of Spanish Biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 46-54.
- Gorgorov, R., Traykova, B., & Stanilova, M. (2015). Ex situ conservation of *Centaurea davidovii* Urum.: An in vitro approach. *Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 68(10), 1265-1270.
- Haberlandt, G. (1902). Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen, sitz-ungsber. *Akad. D. wissensch. Mathematisch-naturwissenschaftlicher 169*.
- Heywood, V. H. (2014). An overview of in situ conservation of plant species in the Mediterranean. *Flora Mediterranea*, 24, 5-24.

BIBLIOGRAFÍA

- Heywood, V. H. (2015). In situ conservation of plant species – an unattainable goal? *Israel Journal of Plant Sciences*, 63(4), 211-231.
- Heywood, V. H. (2019a). Conserving plants within and beyond protected areas – still problematic and future uncertain. *Plant Diversity*, 41(2), 36-49.
- Heywood, V. H. (2019b). Recovering threatened plant species and their habitats: The need for integrated action. *Plant Diversity*, 41(2), 33-35.
- Hu, S., Dilcher, D. L., & Taylor, D. W. (2011). Pollen evidence for the pollination biology of early flowering plants. En S. Patiny (Ed.), *Evolution of Plant-Pollinator Relationships* (pp. 165-236). Cambridge University Press.
- Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2), 105-119.
- Işık, K. (2011). Rare and endemic species: Why are they prone to extinction? *Turkish Journal of Botany* 35(4), 411-417.
- IUCN. (2023, mayo 16). *The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org>.
- Izco, J., Rodríguez Oubiña, J., Romero Buján, M. I., Amigo Vázquez, J., Pulgar-Lugo, I., & Gómez, M. (2003). *Flora endémica de A Coruña (España): "Centaurea borjae" y "Centaurea ultreiae"*. Deputación da Coruña.
- Koppen, W. (1936). Das geographische System de Klimate. Handbuch der klimatologie.
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., & Saxena, P. (2022). In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants*, 11(4), 503.
- Kurt, S., & Erdağ, B. (2009). In vitro germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. *Biologia*, 64(1), 97-101.
- Lakon, G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant physiology*, 24(3), 389.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.

- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-3.
- López, E. & Devesa, J. A. (2013). Estudio taxonómico de *Centaurea* sect. *Acrocentron* (Cass.) DC. (*Asteraceae*) en la Península Ibérica y Baleares. *Lagasalia*, 33(1), 75-173.
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (2006). An introduction to plant cell culture: Back to the future. *Plant cell culture protocols*, 3-8.
- Mallón, R. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas a la conservación de germoplasma de especies de interés conservacionista: «*Splachnum ampullaceum*» Hedw. y «*Centaurea ultreiae*» Silva Pando. Universidade de Santiago de Compostela.
- Mallón, R., Bunn, E., Turner, S. R., & González, M. L. (2008). Cryopreservation of *Centaurea ultreiae* (*Compositae*) A Critically Endangered Species from Galicia (Spain). *Cryoletters*, 29(5), 363-370.
- Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J., & González, M. L. (2010). In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ultreiae*: Assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(1), 31-39.
- Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J., & González, M. L. (2011). Shoot regeneration from in vitro-derived leaf and root explants of *Centaurea ultreiae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3), 523-530.
- Manole-Paunescu, A. (2014). Biotechnology for Endangered Plant Conservation. En M. R. Ahuja & K. G. Ramawat (Eds.), *Biotechnology and Biodiversity* (Vol. 4, pp. 181-202).
- Márquez García, F. (2016). *Centaurea de Tentudía. Estudios para su conservación*. Universidad de Extremadura
- Moreno-Álvarez, M. T., Benito Matías, L. F., Herrero Sierra, N., Domínguez Lerena, S., & Peñuelas Rubira, J. L. (2001). Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: Test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del

BIBLIOGRAFÍA

- tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. *Actas del III Congreso Forestal Español*, 653-658.
- Morrone, J. J. (2008). Endemism. En *Encyclopedia of Ecology* (pp. 81-86). Elsevier.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nobécourt, P. (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissues végétaux. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil*, 130, 1270-1271.
- Ozel, C. A., Khawar, K. M., Mirici, S., Ozcan, S., & Arslan, O. (2006). Factors affecting in vitro plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). *Naturwissenschaften*, 93(10), 511-517.
- Patil, V., & Dadlani, M. (2009). Tetrazolium test for seed viability and vigour. *Handbook of seed testing*, 209, 241.
- Pawłowska, B., Żupnik, M., Szewczyk-Taranek, B., & Cioć, M. (2018). Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59, 115-123.
- Penet, L., Marion, B., & Bonis, A. (2012). Impact of capitulum structure on reproductive success in the declining species *Centaurea cyanus* (Asteraceae): Small to self and big to flirt? *Journal of Pollination Ecology*, 8, 52-58.
- Perica, M. (2003). In vitro propagation of *Centaurea rupestris* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2), 127-130.
- Pyke, G. H. (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350(6313), 58-59.
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 1-

- Riba, M., Mignot, A., Fréville, H., Colas, B., Imbert, E., Vile, D., Virevaire, M., & Olivieri, I. (2005). Variation in Dispersal Traits in a Narrow-endemic Plant Species, *Centaurea corymbosa* Pourret. (*Asteraceae*). *Evolutionary Ecology*, *19*(3), 241-254.
- Richards, A. J. (1997). *Plant breeding systems*. Garland Science.
- Sajeev, N., Koornneef, M., & Bentsink, L. (2024). A commitment for *life*: Decades of unraveling the molecular mechanisms behind seed dormancy and germination. *The Plant Cell*, *36*(5), 1358-1376.
- Sanjurjo, M. J. F., Corti, G., & Ugolini, F. C. (2001). Suelos policíclicos en el Macizo Gabroico de Monte Castelo (Galicia, España): Estudio de su evolución edáfica. *EDAFOLOGIA*, *8*, 61-73.
- Silva-Pando, F. (1987). *Centaurea ultreiae* Silva-Pando, *sp. nov* (*Compositae*) del noroeste de España. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* *44*(2), 421-427.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *11*, 118-130.
- Snow, A. A., & Whigham, D. F. (1989). Costs of flower and fruit production in *Tipularia discolor* (*Orchidaceae*). *Ecology*, *70*(5), 1286-1293.
- Street, H., & Henshaw, G. (1966). Introduction and methods employed in plant tissue culture. En *Cells and Tissues in Culture Methods, Biology and Physiology* (pp. 459-532). Elsevier.
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology*, *2*(1), 61-64.
- Sun, M., & Ritland, K. (1998). Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. *Heredity*, *80*(2), 225-232.
- Susanna, A., & García-Jacas, N. (2009). *Cardueae* (*Carduoideae*). En *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae* Funk, Vicki Ann, Susana, A., Stuessy, T. F., and Bayer, Randall J. (Eds) (pp. 293-313). International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- Susanna, A., García-Jacas, N., Soltis, D., & Soltis, P. (1995). Phylogenetic Relationships in Tribe *Cardueae* (*Asteraceae*) Based on ITS Sequences. *American Journal of Botany*, *82*, 1056-1068.
- Taji, A., Dodd, W. A., & Williams, R. R. (1992). *Plant tissue culture practice*. University of New England.

BIBLIOGRAFÍA

- Traykova, B., Bancheva, S., Gorgorov, R., Delcheva, M., & Stanilova, M. (2015). Ex situ and in situ conservation of *Centaurea pseudaxillaris* (Asteraceae) by means of plant biotechnology. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 137-145.
- Turkoglu, N., Ozdemir, F. A., Keskin, N., Khawar, K. M., & others. (2018). Efficient protocol for multiple micro-shoot regeneration from endanger, endemic and ornamental plant *Centaurea fenzlii* Reichardt. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(2), 1076-1080.
- Uysal, I., Celik, S., & Özkan, K. (2006). Studies on the germination of an endemic species *Centaurea tomentella* Hand.-Mazz. *Pak. J. Bot*, 38, 983-989.
- Uzun, S., Ekinci, E., Özkatan, H., & Atasagun, B. (2020). In vitro shoot regeneration of a *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa- A critically endangered and endemic plant. *Applied Ecology & Environmental Research*, 18(2), 2285-2293.
- Valletta, A., Santamaria, A. R., Fabrini, G., Tocci, N., Filho, V. C., Wagner, T., Brasili, E., & Pasqua, G. (2016). Strategies for ex situ conservation of *Centaurea cineraria* subsp. *Circae* (Asteraceae), an endemic plant from Lazio (Italy). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 150(2), 323-332.
- Van Der Pijl, L. (1969). *Principles of Dispersal in Higher Plants*. Springer.
- Vitales Serrano, D. (2015). Filogeografía genética de poblacions i citogenética molecular del gènere *Cheirolophus* (Asteraceae, Cardueae). Universitat de Barcelona.
- VV. AA. (2000). Lista Roja de Flora Vascular Española (valoración según categorías UICN). *Conservación Vegetal*, 6 (extra):, 11-38.
- White, P. R. (1939). Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. *American Journal of Botany*, 26(2), 59-64.
- Xunta de Galicia. (2020). *Estudio corológico y demográfico de Centaurea ultreiae en la zona de Monte Castelo (Coristanco, Santa Comba, Tordoia, Val do Dubra)- Proyecto Greenalia*.
- Yankova-Tsvetkova, E., Ilieva, I., Stanilova, M., Stoyanov, S., & Sidjimova, B. (2018). Reproductive biology of the endangered Bulgarian endemic *Centaurea achtarovii* (Asteraceae). *Biologia*, 73(12), 1163-1175.

- Yücel, G. (2021). Seed propagation, adaptation to cultivation conditions, determination of ornamental plant properties, and ex situ conservation of the endemic species *Centaurea hermannii* F. Hermann. *BioResources*, *17*(1), 616-633.
- Yücel, G., & Erken, K. (2023). Germination Methods and Characteristics of Endemic *Centaurea olympica* DC. Koch Grown in Cultural Conditions. *BioResources*, *18*(2), 3768-3782.
- Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan, E., Mehmet, B., & Gül, Ö. (2012). In vitro propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. Taxa. *European Journal of Biology*, *71*(2), 121-127.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The plant cell*, *5*(10), 1411-1423.

Índice de Figuras

Figura 1. Vástagos de <i>C. ultreiae</i> ilustrando a variabilidade na morfoloxía das follas (Fonte: elaboración propia).	3
Figura 2. (a) Aspecto dos capítulos de <i>C. ultreiae</i> antes de abrirse por completo e amosando as diferenzas nas súas cores, coas (b) corolas amarelas da especie tipo, (c) rosadas, da variedade de bazar e (c) un individuo con coloración intermedia (Fonte: elaboración propia).	4
Figura 3. Mapa de localización de <i>C. ultreiae</i> por concellos (Fonte: elaboración propia).	6
Figura 4. Distribución no espazo de vástagos de <i>C. ultreiae</i> nun noiro marcados con círculos brancos (Fonte: elaboración propia).	6
Figura 5. Climograma do período 2006-2023 da Estación meteorolóxica Río do Sol (Coristanco) representando a precipitación media mensual acumulada fronte á temperatura mensual media (°C) (Fonte: elaboración propia).	7
Figura 6. Distribución espacial dos individuos colleitados dos oito núcleos de poboación para realizar a análise xenética no Instituto Botánico de Barcelona (Fonte: García-Jacas et al., 2023. Autorización para o uso no ANEXO I).	10
Figura 7. Varios exemplares de <i>Bombus</i> spp. polinizando capítulos de <i>C. ultreiae</i> (Fonte: elaboración propia).	20
Figura 8. Planta de <i>Centaurea ultreiae</i> limpa antes do establecemento en maceta (a). Planta establecida en maceta (b) (Fonte: elaboración propia).	41
Figura 9. Aspecto dos aquenios con aspecto de viables (puros), os abortados e as flores estériles ou non fecundadas de <i>Centaurea ultreiae</i> (Fonte: elaboración propia).	42
Figura 10. Aspecto xeral dos embrións despois da tinguidura con Tz (0,1%) 24 h a 30°C, os viables amosando unha coloración burdeos, os semi-viables, parcialmente tinguidos e, por último, os non viables (Fonte: elaboración propia).	43
Figura 11. Aspecto xeral dos embrións despois da tinguidura con índigo carmín (0,15%) a temperatura ambiente durante 3 h, os viables sen coloración, os semi-viables, parcialmente tinguidos e por último, os non viables amosando unha tinguidura de cor azul intensa (Fonte: elaboración propia).	44
Figura 12. Tratamentos de desinfección utilizados no ensaio. EtOH: etanol, ADE: auga destilada estéril (Fonte: elaboración propia).	46
Figura 13. Aspecto dos brotes empregados para os ensaios (Fonte: elaboración propia).	49
Figura 14. Porcentaxe de flores estériles ou fecundadas, aquenios abortados e aquenios con aspecto de viables por localidade e ano de colleita: (a) 2020, (b) 2021, (c) 2022 (Fonte: elaboración propia).	57
Figura 15. (a) Porcentaxe de xerminación e (b) tempo medio de xerminación (\pm desviación típica) baixo catro tratamentos de choque térmico e establecemento en placas Petri baixo condicións de escuridade ou 16 h/10 h fotoperíodo. Nos tratamentos de choque térmico en auga (1 ou 5 min) os aquenios intactos foron postos a xerminar. No caso do control e do choque térmico en aire (5 ou 15 min), as cubertas dos aquenios foron retiradas antes da colocación en placa. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	60
Figura 16. Porcentaxe media de xerminación (a) e porcentaxe media de contaminación (b) (\pm desviación típica) baixo cinco tratamentos de desinfección (A-E, ver detalles na Figura 12), cultivados en botes que contiñan MB sen sacarosa. O valor de p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)... ..	61

Figura 17. (a) Porcentaxe media de xerminación, (b) tempo medio de xerminación, (c) porcentaxe media de contaminación (\pm desviación típica) e (d) aspecto das plántulas aos 14 días (esquerda) e das plántulas necrosadas despois de realizar os tratamentos de desinfección (E e D) sobre aquenios, que foron embebidos en auga destilada estéril (ADE) ou AX3 ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) durante 24 h a temperatura ambiente, desprovistos de cubertas e postos a xerminar en MB sen sacarosa. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 63

Figura 18. Aspecto de dous explantos foliares que produciron brotes adventicios despois do tratamento con TDZ (Fonte: elaboración propia)..... 65

Figura 19. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (\pm desviación típica) despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP baixo luz branca fluorescente 4000 K, ou LED 4000 K, 5500 K, 6500 K ou azul (A), azul e vermello (A+V) ou vermello (V). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 68

Figura 20. (a) Concentración de clorofila A (Chl A), (b) de clorofila B (Chl B), (c) de carotenoides (\pm desviación típica) e (d) ratio entre clorofila A e clorofila B (ChlA/ChlB) cuantificados a partir da extracción con Acetona 80% dos pigmentos de follas de brotes que creceron baixo iluminación LED branca, temperatura de cor 4000 K, 5500 K e 6500 K ou baixo luces LED azuis (A), azul+vermello (AV) ou vermello (V). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 69

Figura 21. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (\pm desviación típica) no clon X1 despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, ou $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo luz fluorescente ou LED 6500 K. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 70

Figura 22. Aspecto de brotes hiperhídricos (esquerda) comparados cun brote normal (dereita) (Fonte: elaboración propia)..... 71

Figura 23. Aspecto dos brotes do clon X1 despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, ou $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP baixo luz fluorescente ou LED 6500 K (Fonte: elaboración propia)..... 72

Figura 24. (a) Taxa de multiplicación de brotes maiores de 1 cm; (b) taxa de multiplicación de brotes totais (\pm desviación típica) en clons seleccionados de *Centaurea ulreia*, cinco procedentes de material maduro (M1-5) e dous de material xuvenil (X1-2), despois de 35 días en cultivo sobre MB suplementado con 0,1, 0,2 ou $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP baixo luz fluorescente 4000 K. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 73

Figura 25. (a) Produción de brotes $>1 \text{ cm}$, e (b) produción de brotes totais (\pm desviación típica) durante 2 subcultivos consecutivos en medio suplementado con 0,2 ou $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, despois de ser mantidos en neveira a 8°C durante 3 ou 6 meses. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p\leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 74

Figura 26. Aspecto dos brotes despois da conservación durante (a) 3 ou (b) 6 meses a 8°C (Fonte: elaboración propia)..... 75

Figura 27. (a) Número de capítulos observados cada mes durante os anos 2021, 2022 e 2023. (b) aspecto de brotes que presentan floración espontánea (Fonte: elaboración propia)..... 77

Figura 28. (a) Porcentaxe de enraizamento, (b) número de raíces por explanto enraizado, e (c) lonxitude da raíz máis longa (cm) (\pm desviación típica) de brotes de X1 sometidos a distintos tratamentos de indución do enraizamento: Adición ao medio (cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIB ou ANA), ou *dipping* (inmersión basal durante 60 s nunha solución de $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIB ou ANA e

posterior cultivo en MB). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)... 78

Figura 29. (a) Porcentaxe de enraizamento, (b) número de raíces por explanto enraizado, e (c) lonxitude da raíz máis longa (cm) por explanto enraizado (\pm desviación típica) de brotes de seis clons de *Centaurea ulreiae* (clons maduros: M1-4, e clons xuvenís: X1-2) despois dun tratamento de adición ao medio (cultivo en MB suplementado con $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB) ou un tratamento de *dipping* durante 60 s nunha solución de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de AIB e posterior cultivo en MS, cultivados ambos durante 35 días. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)..... 79

Figura 30. Aspecto das vitroplantas de *C. ulreiae* enraizadas despois de 35 días en cultivo (Fonte: elaboración propia)..... 79

Figura 31. (a) Porcentaxe de supervivencia de vitroplantas de *Centaurea ulreiae* aclimatadas a condicións *ex vitro* mediante 2 tratamentos de aclimatación. O p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$). (b) aspecto das vitroplantas no momento do paso a terra; (c) aos 30 días, (d) 60 días e (e) despois de 2 anos en condición de invernadoiro (Fonte: elaboración propia). 81

Índice de Táboas

Táboa 1. Número de individuos de <i>Centaurea ulreiae</i> no período 1997-2008 (Fonte: Xunta de Galicia, 2020).....	8
Táboa 2. Bancos de xermoplasma da REDBAG, as súas coleccións principais, ano de establecemento e número de taxons e accesións que albergan (Fonte: Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos. Elaboración propia).	14
Táboa 3. Tratamentos de xerminación en especies endémicas do xénero <i>Centaurea</i> (DS: desinfección superficial, ADE: auga destilada estéril, MS medio de Murashige e Skoog, 1962). A pesar de non estar mencionado de forma explícita na bibliografía, considerouse que os aquenios presentaban letargo cando se aplicaron tratamentos para superalo (estratificación, tratamentos con xiberelinas, escarificación química). Refléctense unicamente as condicións que aparecían recollidas nas publicacións consultadas (Fonte: elaboración propia).	19
Táboa 4. Ensaio de xerminación realizados en <i>Centaurea ulreiae</i> . Os aquenios foron separados en 3 clases de peso: lixeiros (<17,5 mg), medios (17,5-22,5 mg) e pesados (>22,5 mg), que se distribúen na natureza nas seguintes proporcións: 52,82% lixeiros, 32,78% medios e 14,38% da clase pesada (ADE: auga destilada estéril; DS: desinfección superficial) (Mallón, 2008) (Fonte: elaboración propia).	21
Táboa 5. Condicións e resultados de diferentes tratamentos de tinguidura con Tz realizados en especies endémicas do xénero <i>Centaurea</i> . (n: número de aquenios utilizados, Tz: tetrazolio). Cando non se dá un valor de tempo ou temperatura de incubación, estes non se mencionaron no estudo (Fonte: elaboración propia).	23
Táboa 6. Protocolos propostos na fase de multiplicación de diferentes especies endémicas do xénero <i>Centaurea</i> . (RCV: reguladores do crecemento vexetal; TM: taxa de multiplicación; sac: sacarosa; PF: peso fresco). ¹ % de rexeneración ² brotes(5-6 g PF calo) (Fonte: elaboración propia).	31
Táboa 7. Protocolos dispoñibles para a fase de enraizamento de diferentes especies endémicas do xénero <i>Centaurea</i> (RCV: reguladores do crecemento vexetal; sac: sacarosa) (¹ non se dan datos sobre o enraizamento pero se menciona que o enraizamento foi lento; ² non se dan datos sobre o enraizamento pero o tratamento foi considerado como o que produce “mellores resultados”) (Fonte: elaboración propia).	33
Táboa 8. Condicións de preaclimatación e aclimatación e resultados de supervivencia en condicións de invernadoiro de especies endémicas do xénero <i>Centaurea</i> (Fonte: elaboración propia).	35
Táboa 9. Protocolos de rexeneración de brotes propostos por Mallón, (2008); Mallón et al. (2010, 2011) (Fonte: elaboración propia).	36
Táboa 10. Relación do número de plantas nas que se realizou a colleita de capítulos por ano de colleita (Fonte: elaboración propia).	40
Táboa 11. Procedencia dos diferentes clons establecidos en condicións <i>in vitro</i> e correspondencia cos núcleos diferenciados por García-Jacas et al. (2023) (Fonte: elaboración propia).....	41
Táboa 12. Porcentaxe media (\pm desviación típica) de embrións viables, semi-viáveis e non viables procedentes de aquenios de <i>C. ulreiae</i> conservados durante 1 ou 2 anos a 4°C. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	58
Táboa 13. Porcentaxe media (\pm desviación típica) de embrións viables, semi-viáveis e non viables na proba de tinguidura con cloruro de tetrazolio (0,1% e 1,0%) sobre aquenios de <i>C. ulreiae</i> conservados durante 1 ou 2 anos a 4°C. O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia)...	59
Táboa 14. Media da porcentaxe de aquenios viables, semi-viáveis e non viables (\pm desviación típica) despois da tinguidura con 0,15% índigo carmín durante 3 horas sobre aquenios de <i>C. ulreiae</i> conservados 2 anos (Fonte: elaboración propia).	59

Táboa 15. Valores de p correspondentes á proba ANOVA de dúas vías para as variables de enraizamento en función dos diferentes tratamentos empregados ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	64
Táboa 16. Porcentaxe de resposta (\pm desviación típica) de explantos foliares de dous clons xuvenís (X1, X2) e cinco clons adultos (M1 a M5) tratados con diferentes concentracións de citoquininas (BAP ou TDZ). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas (minúsculas por filas, maiúsculas por columnas) segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	66
Táboa 17. Media do número de brotes por explanto reactivo producidos (\pm desviación típica) a partir de explantos foliares de dous clons xuvenís (X1, X2) e cinco clons adultos (M1 a M5) tratados con diferentes concentracións de citoquininas (BAP ou TDZ). O valor p correspóndese co valor da proba ANOVA dunha vía. Diferentes letras indican diferenzas significativas (minúsculas por filas, maiúsculas por columnas) segundo a proba LSD ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	67
Táboa 18. Valores de p correspondentes á proba ANOVA de dúas vías para as variables de enraizamento en función dos diferentes tratamentos empregados ($p \leq 0,05$) (Fonte: elaboración propia).	79

ANEXO I



Francisco Javier Silva Pando con DNI35.426.801-Q, xefe do Departamento de Ecosistemas Forestais do Centro de Investigación Forestal de Lourizán-XERA-AGIF, como Investigador principal do proxecto “Contrato de colaboración entre a Axencia Galega da Calidade Alimentaria (AGACAL), a través do Centro de Investigación Forestal de Lourizán e a Universidade de Santiago de Compostela e a empresa, GREENALIA Wind Power Monte Toural, S.L.U., GREENALIA Wind Power Campelo, S.L.U., GREENALIA Wind Power Bustelo, S.L.U., e Acivro Consultoría de Medioambiente S.L., para realizar os traballos necesarios para a elaboración e seguimento do Plan de Conservación e Recuperación de *Centaurea ulreiae* no entorno do Monte Castelo”

AUTORIZO:

a Dña. Ana Couso Viana, con DNI 45.962.000-L a utilizar o “Mapa 6. Zonificación do territorio para a recollida de mostras de ADN *Centaurea ulreiae*”, correspondente ao informe Parcial de Mazo de 2022, na súa tese de doutoramento, que leva por título “Estudo da capacidade reprodutiva e aplicación de técnicas biotecnolóxicas para a conservación e restauración da especie endémica en perigo *Centaurea ulreiae* Silva-Pando”.

En Pontevedra a 11 de setembro de 2024



Centaurea ultreiae Silva-Pando (*Asteraceae*) é unha planta endémica en perigo de extinción que habita o afloramento de rochas ultrabásicas que aparece na área do Monte Castelo (A Coruña). Os obxectivos desta tese consistiron en avaliar o éxito reprodutivo de *C. ultreiae*, a súa viabilidade e capacidade xerminativa, establecer coleccións de propágulos vexetativos en condicións in vitro derivados de material adulto e xuvenil, e desenvolver un protocolo eficiente e aplicable a diferentes xenotipos, que permita producir plantas completas mediante micropropagación para o seu uso en reintroducións.