

Caracterització biològica i citogenètica de la població retrobada de l'esperó de Bolòs (*Delphinium bolosii*) al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac

Cèsar Blanché, Maria Bosch, Jordi López-Pujol,
Sergi Massó, Joan Simon, Ana Maria Rovira i
Julià Molero
BioC, Laboratori de Botànica. Facultat de
Farmàcia. Institut de Recerca de la Biodiversitat.
Universitat de Barcelona

Resum

Es donen a conèixer els resultats de l'estudi sobre el retrobament d'un *Delphinium* prop de Mura (Bages). Es confirma la identitat de la troballa com a *Delphinium bolosii*. S'aporten dades sobre la micromorfologia de les granes i la biologia de la germinació, així com un nou citotip per a l'espècie ($2n = 16$) que permeten interpretar la nova població com un reservori de diversitat i una baula important en els patrons de diversificació de la sèrie *Fissa* a la Mediterrània occidental. Finalment, s'aporten diverses propostes de gestió per a l'administració del Parc.

Paraules clau

Delphinium, *Ranunculaceae*, espècies amenaçades i protegides, micromorfologia, nombre cromosòmic

Resumen

Caracterización biológica y citogenética de la población reencontrada del espolón de Bolòs (*Delphinium bolosii*) en el Parque Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac

Se dan a conocer los resultados del estudio sobre el reencuentro de un *Delphinium* cerca de Mura (Bages). Se confirma la identidad del hallazgo como *Delphinium bolosii*. Se aportan datos sobre la micromorfología de las semillas y la biología de la germinación, así como un nuevo citotipo para la especie ($2n = 16$), que permiten interpretar la nueva población como un reservorio de diversidad y un eslabón importante en los patrones de diversificación de la serie *Fissa* en el Mediterráneo occidental. Finalmente, se aportan varias propuestas de gestión para la administración del Parque.

Palabras clave

Delphinium, *Ranunculaceae*, especies amenazadas y protegidas, micromorfología, número cromosómico

Abstract

Biological and cytogenetic characterisation of the rediscovered population of *Delphinium bolosii* in Sant Llorenç del Munt i l'Obac Natural Park

The results are presented of the study of the rediscovery of a *Delphinium* near Mura (Bages). The identity of the find is confirmed as *Delphinium bolosii*. Data are provided on the micromorphology of the seeds and the biology of the germination, as well as a new cytotype for the species ($2n = 16$). This enables the new population to be interpreted as a reservoir of diversity and an important link in patterns of diversification of the series *Fissa* in the western Mediterranean. Finally, various management proposals for the Park administration are put forward.

Key words

Delphinium, *Ranunculaceae*, endangered and protected species, micromorphology, chromosome number

Introducció

El contingut d'aquesta comunicació inclou part dels resultats de l'estudi encarregat pel Servei d'Espais Naturals de la Diputació de Barcelona a l'Equip de Biologia de la Conservació de Plantes de la UB (BioC, <www.bioc.cat>) a través de la Fundació Bosch i Gimpera de la Universitat de Barcelona (Projecte 307118 [cf. MOLERO *et al.*, 2013]) per tal d'avaluar el retrobament de *Delphinium bolosii* al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. Joaquim Pérez Raventós i Àngel M. Hernández Cardona, del Centre Excursionista de Terrassa (PÉREZ-RAVENTÓS i HERNÁNDEZ-CARDONA, 2013), van fer aquesta notable troballa l'estiu del 2012, i durant el desenvolupament de la recerca que difonem es va treballar en tot moment amb la hipòtesi de l'existència d'un únic individu (metodologia, precaucions etc.). Afortunadament, un cop conclòs l'estudi, i fruit de l'extensa campanya d'exploració de l'estiu del 2013 (MAMPEL *et al.*, 2014), s'ha avançat molt en el coneixement de l'esperó de Bolòs al massís de Sant Llorenç del Munt, del qual es coneixen actualment més d'un centenar d'individus reproductors. Els resultats d'aquest projecte corresponents a diversitat genètica de l'esperó de Bolòs constitueixen un altre article d'aquesta monografia (LÓPEZ-PUJOL *et al.*, 2014).

La identitat taxonòmica de l'únic individu inicialment localitzat prop de Mura, gràcies a característiques morfològiques (BLANCHÉ i MOLERO, 1986), es correspon clarament amb el tàxon endèmic de Catalunya *Delphinium bolosii* C. Blanché & Molero, espècie legalment protegida a escala catalana (*Catàleg de flora amenaçada de Catalunya*, D. 172/2008, categoria *en perill d'extinció*) i estatal (*Catálogo Español de Especies Amenazadas*, RD. 139/2011, categoria *en peligro de extinción*), documentat anteriorment del massís de Sant Llorenç del Munt a partir d'un únic plec del 1912 de l'herbari Cadevall (cf. BLANCHÉ, 1991) no trobat fins ara, un segle més tard.

Material i mètodes

El material de què hem disposat per a l'estudi es limita a una col·lecció de 50 granes, que van ser recol·lectades a Mura per Joaquim Pérez Raventós i Àngel M. Hernández Cardona i que ens van ser lliurades el 9 d'octubre del 2012 amb l'autorització del Departament d'Agricultu-

ra, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM) de la Generalitat de Catalunya (Ref. FL-014/2012). Sobre aquestes granes, se n'ha comprovat la identitat taxonòmica, se n'han descrit les característiques biològiques i s'han fet els assaigs de germinació. Les radícules obtingudes han estat emprades per a l'estudi cromosòmic. A continuació, s'indica breument la metodologia i els resultats de cada part de l'estudi i s'acaba amb les conclusions principals i les recomanacions d'actuació per als gestors del Parc Natural.

Tot el treball s'ha plantejat considerant que aquestes 50 granes eren l'únic material biològic disponible i que, en cas que hi hagués qualsevol incidència demogràfica (cal recordar que un individu adult és una mida poblacional per sota de qualsevol estimació de MVP –mida mínima poblacional viable– i susceptible de qualsevol afectació per causes estocàstiques, demogràfiques o genètiques), podia seguir essent l'únic testimoni viu de l'espècie al massís. Per aquest motiu, calia concentrar-hi tota la cautela i prudència i, alhora, aconseguir el màxim rendiment en informació biològica, tal com pertoca als protocols de treball amb poblacions petites i amenaçades. El codi d'identificació de població atorgat és MUR (Bages, Mura, torrent de la Fontfreda [DG11], c. 500 msm *Leg. Joaquim Pérez Raventós i Àngel M. Hernández Cardona*, 18/VII/2012).

Caracterització de les llavors de *Delphinium bolosii*

Es desconeixen els criteris de selecció de les llavors mostrejades (posició en el fol·licle, potencialitat de dispersió, estat sanitari, grau de desenvolupament de l'embrió, origen genètic dels parents, nivells d'heterozigosi, etc.). Sobre aquesta mostra, se n'ha de fer la caracterització morfològica i de grau de maduració (bo i sabent que es tracta d'un punt crític en la viabilitat de granes de ranunculàcies i, en particular, del gènere *Delphinium* [cf. BLANCHÉ, 1991; BOSCH, 1999]).

Pes i mida de les granes

El pes de les llavors és indicatiu del grau de maduració (acumulació de substàncies de reserva, postmaduració i desenvolupament de l'embrió

[BOSCH, 1999; HERRANZ *et al.*, 2010]) i de la funcionalitat de la fecundació i el grau d'aborció (OREJUELA *et al.*, 2007, 2008; BOSCH, obs. pers.). Segons la nostra experiència prèvia, el pes de les llavors de *D. bolosii* és força variable ja que pot oscil·lar entre els 0,46-2,67 mg en un mateix any i població. A partir dels experiments previs duts a terme durant el curs 2002-2003 (OREJUELA, 2003), caldria esperar que les granes amb un pes més elevat tinguessin una taxa de germinació més gran a causa d'una acumulació més elevada de recursos, però això no es compleix del tot pel que fa a l'èxit o el fracàs del procés reproductiu: l'interval de pes en què l'èxit reproductiu és més alt se situa entre els 1,8-2,0 mg (BLANCHÉ *et al.*, 2002; OREJUELA, 2003). La mida de les granes és indicativa també del grau de maduració (amb relació, sobretot, al creixement mínim de l'embrió, que ha d'atènyer una certa mida crítica per permetre'n la germinació [cf. HERRANZ *et al.*, 2010]), al mateix temps que pot aportar informació de característiques diagnòstiques micromorfològiques (BLANCHÉ, 1991; BOSCH, 1999).

Metodologia

Des del mateix moment de la recepció, per evitar qualsevol canvi atribuïble a una càrrega d'humitat, totes les granes han estat pesades i mesurades de manera individualitzada amb una balança de precisió i un estereoscopi binocular amb micròmetre incorporat, respectivament.

Bo i assumint una forma acampanada, les dimensions s'han establert com a longitud (L) i amplada (A), aquesta darrera corresponent a l'amplada màxima de la regió basal.

Un cop pesades i mesurades, totes les granes s'han conservat en sobres de paper a la temperatura ambient del laboratori (20-22 °C) fins al moment del pretractament de l'estudi de germinació.

Resultats i discussió

Els resultats individuals del pes de les granes rebudes es mostren en la **figura 1a**. El pes mitjà és de $2,35 \pm 0,09$ mg (mitjana $\pm$ ES, $n = 46$), dins del marge indicat per OREJUELA (2003) per a *D. bolosii*. L'interval de valors obtinguts (mínim-màxim) oscil·la entre els 1,40 i 3,30 mg. Una bona part de les granes se situen per damunt de 1,8 mg (**figura 1a**), que és el límit observat per OREJUELA (2003) i a partir del qual disminueix l'èxit reproductiu. Les granes que es troben per sota d'aquest límit representen només el 26% del lot rebut. Tot i que ignorem els criteris de selecció de les llavors aportades per constituir la mostra, i amb molta precaució, podem afirmar que el pes de les llavors es troba dins de la normalitat, cosa que suggereix que s'han format adequadament (i que permet inferir un funcionament correcte dels sistemes reproductius i de la pol·linització). Seria esperable una correcta funcionalitat de les granes (dispersabilitat i germinabilitat).

Figura 1a. Pes de les granes (mg) de *D. bolosii* (MUR) rebudes el 9/10/2012

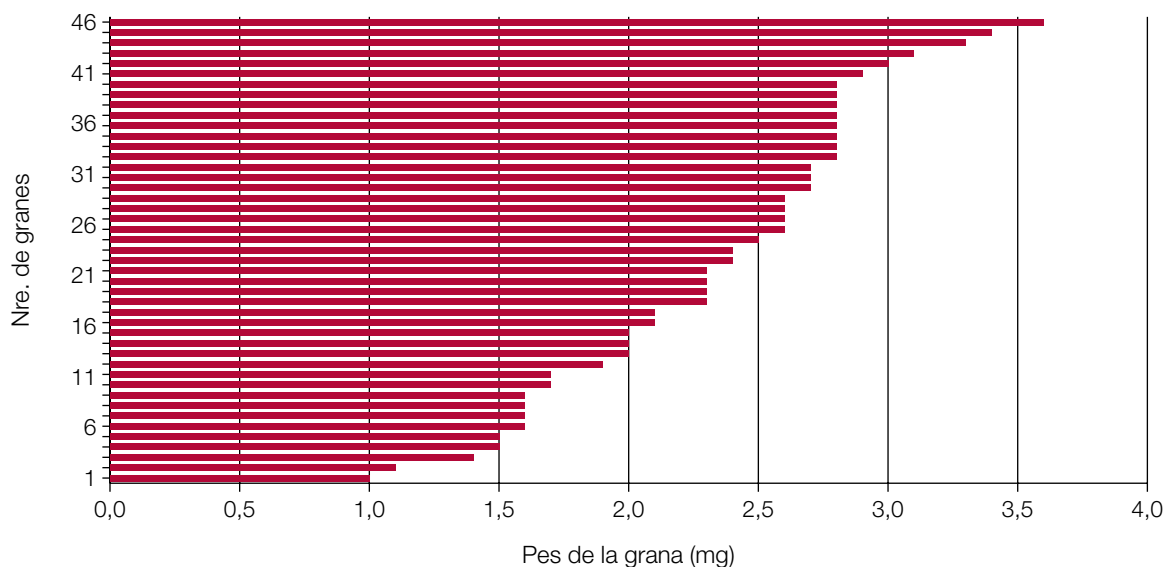
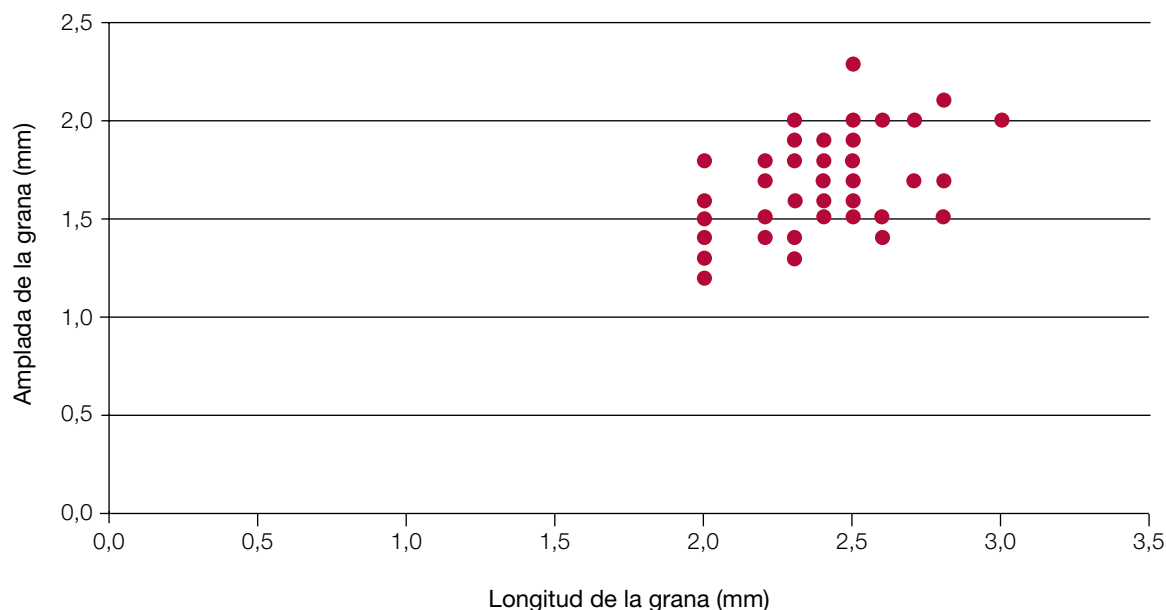


Figura 1b. Dimensions de les granes estudiades de la població MUR

Pel que fa a la mida, la mesura de les llavors (longitud $[L] \times$ amplada màxima de la base $[A]$) presenta una mitjana de $L = 2,404 \pm 0,011$ mm ($m \pm ES$) i $A = 1,652 \pm 0,004$ mm ($m \pm ES$). Les dimensions oscil·len, en paral·lel amb el grau de maduresa i el pes de les llavors, entre valors de $L = 2,0$ - $3,0$ mm (mínim i màxim) i valors de $A = 1,2$ - $2,2$ mm (mínim i màxim), amb el patró de dispersió que mostra la **figura 1b**. Els valors obtinguts, tant de mitjana ($L = 2,404$ i $A = 1,652$) com de dispersió, s'aproximen més als que la bibliografia reporta per a *D. bolosii* ($L = 2,21$ [2-2,5] $\times A = 1,69$ [1,5-2]) que no pas per a *D. fissum*, lleugerament més grosses ($L = 2,86$ [2,5-3,25] $\times A = 2,08$ [2-2,5]) (BLANCHÉ, 1991, p. 128).

Morfologia de les granes

Metodologia

L'observació de la morfologia s'ha dut a terme a l'estereoscopi binocular i la comprovació de detall s'ha fet mitjançant microscòpia electrònica. Així, s'han consumit dues de les llavors rebudes en l'estudi micromorfològic al microscopi electrònic de rastreig (MER), a fi de descartar anomalies i verificar la micromorfologia de l'episperma seminal. Les mostres, aplicades a l'*stub* amb cinta biadhesiva conductora, han estat metal·litzades per recobriments de micropartícules d'or amb un gruix de 400 Å i observades

amb un microscopi MER Jeol JSM-6510 al Servei de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, segons la metodologia descrita a BLANCHÉ (1991) i BOSCH (1999). L'observació i les fotografies s'han fet a acceleracions de 2-7 kV.

Resultats i discussió

S'ha observat a l'estereoscopi binocular que les llavors han assolit el grau de maduresa externa adient. L'estat de la seva coberta és correcte i no mostra signes que hagi estat atacada per patògens, infeccions fúngiques ni lesions de cap tipus. Al MER, s'observen llavors acampanades, de secció subtriangular, amb l'angle superior lleugerament obtús, que conformen una petita cavitat umbilical formada per les esquames inferiors (**figura 2**). Sobre una superfície basal llisa i negra, es disposa un seguit de cèl·lules allargades que s'agrupen formant esquames o lamel·les, translúcides o d'un to clar, fortament imbricades entre elles (**figura 2**). Aquestes esquames es disposen seguint un model helicoidal, en forma de banda contínua, que parteix del micròpil per acabar a la zona inferior, on constitueix una mena de cercle alat o fullós. Les esquames de les mostres observades són formades per diverses cèl·lules soldades i romanen ben individualitzades les unes respecte de les altres (a diferència d'altres grups de *Delphinium*); el nombre de cèl·lules/esquama és, en les granes observa-

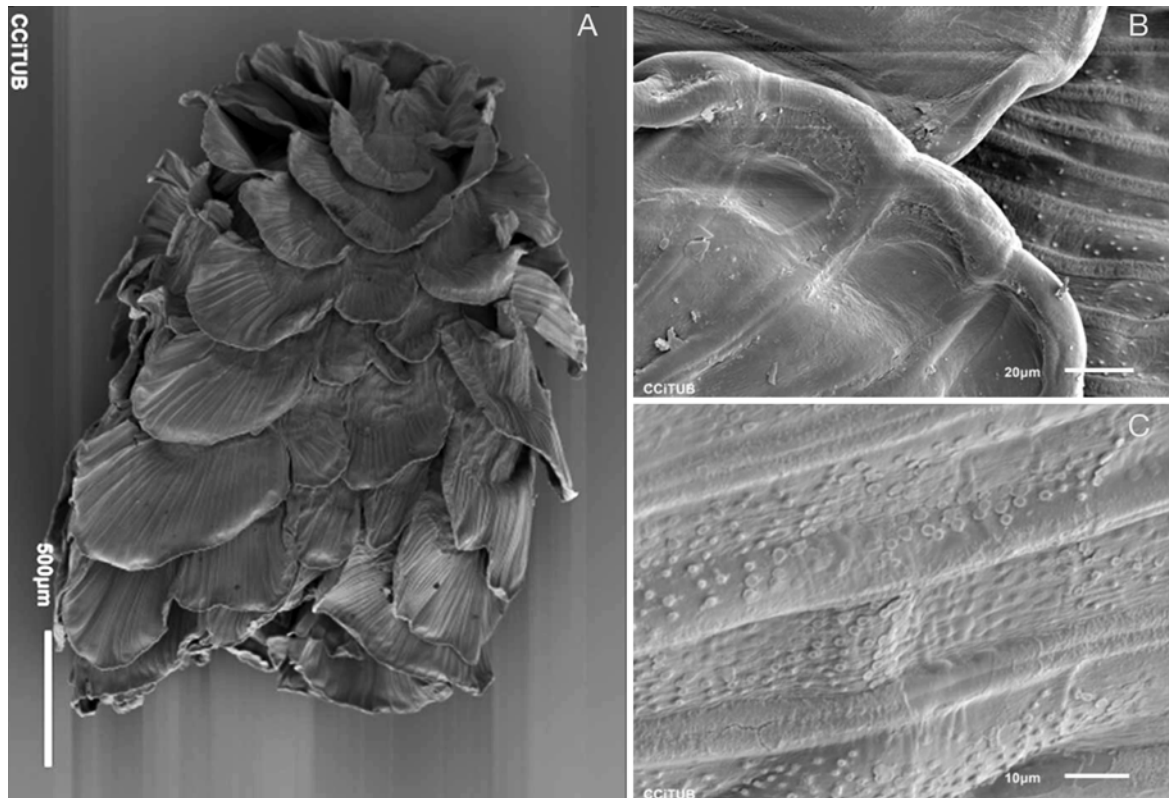


Figura 2. Granes de *D. bolosii* observades amb el MER. (A) visió general; detall de la superfície cuticular de l'episperma a la vora (B) i regió medial (C) de la lamel·la, amb cutícula engruixida i granulació de densitat variable.

des, de 15 a 20, i donen lloc a esquames amples, disposades entre 7 i 9 rengleres, amb unes 15 o 20 esquames per cara (figura 2). La microornamentació –relleu secundari– de les lamel·les o esquames mostra un granulat a la superfície de la cutícula, de densitat variable. Aquestes característiques corresponen a *D. bolosii* i a altres tàxons de la sèrie *Fissa* (BLANCHÉ, 1991).

Germinació de llavors

Delphinium bolosii pertany a una família relativament primitiva (ranunculàcies) que es caracteritza perquè dispersa les llavors amb els embrions subdesenvolupats, és a dir, petits –han de créixer dins de la llavor abans que la radícula emergeixi– i fisiològicament inactius, un tipus de dormició anomenada *morfofisiològica* (MPD, *Morpho-Physiological Dormancy*). A part dels mecanismes intrínsecs moleculars que determinen la latència de l'embrió, hi ha altres factors com ara la temperatura i la llum que poden alterar aquest procés; per això mateix, són importants els pretractaments per trencar la durada de la latència i accelerar la germinació o

assegurar-ne un percentatge satisfactori. La germinació de les llavors que es tenien perseguida diverses finalitats per maximitzar el rendiment en informació sobre la limitadíssima mostra disponible: en primer lloc, conèixer la viabilitat de la descendència produïda; en segon lloc, obtenir individus vivents per a l'establiment del nombre cromosòmic i de nivells de diversitat genètica en la descendència d'un suposat únic individu (i testar la hipòtesi d'autofecundació / autogàmia monoparental), i, finalment, obtenir individus *ex situ* per a hipotètiques mesures de conservació en cas que així ho aconsellessin els resultats obtinguts.

Metodologia

Atès el nombre limitat de granes disponibles (que, igualment, han de ser considerades material biològic de germoplasma destinat a la preservació en banc de llavors), i tot acceptant el risc de treballar amb mides mostrals mínimes, es preveia consumir aproximadament un 50% de llavors en aquest estudi, mentre que la resta seria traslladada al Jardí Botànic de Bar-

celona per a conservació *ex situ*, tal com finalment es va fer.

En *Delphinium fissum* spp. *sordidum* (una espècie filogenèticament molt propera a *D. bolosii*) el pretractament en fred a 5 °C i a les fosques promou els percentatges més elevats de germinació (HERRANZ *et al.*, 2010). L'abordatge metodològic consisteix, doncs, a establir una pauta de germinació que coincideixi tant com sigui possible amb el cicle anual de la planta i que aconseguixi trencar la dormició MPD i el desenvolupament adequat de l'embrió, partint del coneixement acumulat per l'equip d'HERRANZ *et al.* (2010). Esquemàticament, es tracta del següent:

a) Emmagatzemar les llavors en sobres de paper a temperatura ambient (20-22 °C) i a les fosques al laboratori fins al moment d'iniciar el pretractament.

b) Fer el pretractament per escarificació en fred a 5 °C, simulant la temperatura mitjana durant els mesos d'hivern, en condicions de foscor i humitat (fins a 60 dies).

c) Iniciar la germinació en condicions de foscor, humitat i fred en càpsules de Petri fins que aparegui la radícula (estimació de 30 dies).

d) Trasplantar en germinadors al SHV (Servei d'Hivernacles i Vivers) de la Facultat de Farmàcia les plàntules germinades i no consumides en altres estudis i traslladar-les finalment al Jardí Botànic de Barcelona.

El protocol detallat es descriu a MOLERO *et al.* (2013). Es van seleccionar 20 granes (les més pesants i grosses), i abans d'iniciar l'experiment es van submergir durant 15 minuts en una solució al 2% de l'antifúngic comercial *Captan*® (p.a. Captan 50%) per evitar el creixement de fongs. Es van utilitzar quatre càpsules de Petri de 9 centímetres de diàmetre amb una doble capa de paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada, i es van inocular en cada una cinc granes segons un gradient de pes.

La sembra es va fer el dia 21 de desembre del 2012. Les plaques, segellades amb parafilm i protegides de la llum amb dues capes de paper d'alumini, es van dipositar en una cambra frigorífica a una temperatura constant de 5 °C. El pretractament a 5 °C simula la temperatura mitjana durant els mesos d'hivern (desembre, gener i febrer) a la natura. El pretractament, seguint la pauta d'HERRANZ *et al.* (2010) dura 60 dies. Transcorregut aquest temps, al cap de dos mesos, el 21 de febrer (2013) es van iniciar els controls d'observació setmanals, que és

quan es considera que s'inicia pròpiament l'assaig de germinació. Es va treballar en cambra amb llum verda de seguretat (per evitar el trencament de les condicions de foscor). Les llavors estaven més inflades i les plaques no van mostrar cap contaminació fúngica. Es va repetir l'observació al cap d'una setmana amb el mateix resultat. En iniciar-se la germinació (figura 3), es va adequar la freqüència de controls.



Figura 3. Granes de la població MUR en plena germinació (radícula > 5 mm). Escala: 1 mm. (Foto: M. Bosch i A. Rovira, 14/3/2013.)

Resultats

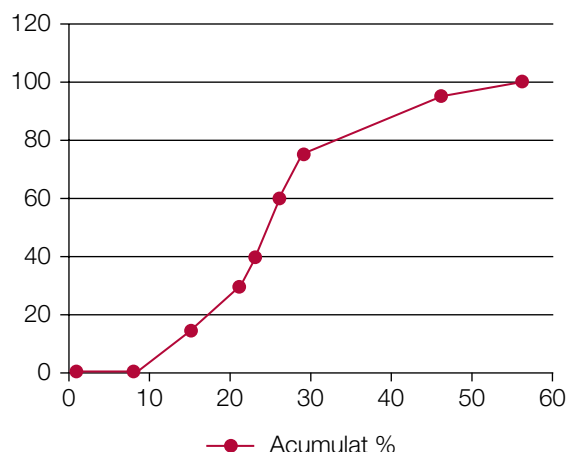
Es considera germinada una grana quan ha emès una radícula de dimensions > 1 mm. La germinació es va iniciar el dia 21 de febrer i va atènyer el 100% de les 20 granes sembrades el 17 d'abril, amb una durada total, doncs, de 56 dies. La dinàmica de germinació, sota les condicions experimentals assajades (que miren de simular les condicions naturals), es mostra en la figura 4.

S'observa un petit tram d'una setmana d'iniciació, a partir de la qual comencen a emergir les radícules a un ritme acumulatiu de 2-4 granes (10-20%) cada setmana, fins que a les vuit setmanes (2 mesos) s'ha atès el 100% d'èxit germinatiu.

Aquesta dada, al camp, equival a mitjan abril. Així doncs, la simulació de condicions efectiva identifica aquesta data com el període d'elecció per verificar al camp la germinació en poblacions naturals (data que era desconeguda

fins a l'actualitat i que, de manera empírica, se situava entre els mesos de març i abril).

Figura 4. Dinàmica de la germinació de les llavors de *D. bolosii* expressada en tant per cent acumulat de grans germinades (experiments duts a terme entre els dies 21/2/2013 [dia 1] i 17/4/2013 [dia 56] en les condicions descrites en el text)



Discussió i conclusions

La simple obtenció d'individus nous o de radícules per a l'estudi cromosòmic (com és el cas present) demostra que si es confereix caràcter d'experiment a l'acció, amb la metodologia adequada i el seguiment oportú, es poden obtenir dades rellevants per a la biologia de les espècies amenaçades. Gràcies a la metodologia emprada al laboratori, ha germinat el 100% de les llavors assajades. Si es té en compte que en cap cas s'havia superat anteriorment el 10% (els assaigs d'anys previs mai no havien superat el 10%, amb mitjanes del 3-4%), cal considerar els assaigs que presentem com un èxit indubtable. S'ha aconseguit una millora molt significativa del rendiment, i el resultat d'aquest projecte aporta, indirectament, un increment substancial del coneixement sobre germinació d'espècies endèmiques i amenaçades amb dificultats per a la conservació *ex situ* a Catalunya.

La germinació al 100% és indicativa que les llavors recol·lectades estaven perfectament formades i que són el resultat d'un procés d'encreuament sexual (pol·linització, fecundació, maduració) satisfactori i eficient que no mostra símptomes de depressió atribuïbles a endogàmia resultant d'autogàmia monoparental, en cas que només hi hagués un únic individu, hipòtesi amb què es treballava en el plantejament inicial del treball.

Estudi cromosòmic

Material

El material vegetal emprat per fer els estudis citogenètics han estat els meristemes radiculars, obtinguts dels individus que han germinat de *D. bolosii* (cf. apartat anterior). Atès el risc de perdre algun individu per mortalitat sobrevinguda, la presa de mostra s'ha avançat fins als primers dies postemergència de la radícula a la càpsula de Petri (longitud de la radícula > 2 mm, [figura 4]). Els meristemes radiculars han servit per cercar mitosis somàtiques que, quan la qualitat de les plaques obtingudes és l'adient, han permès fer el recompte del nombre cromosòmic i l'estudi del cariotip.

Metodologia

L'escurçament s'ha fet amb una solució de col·quicina durant dues hores a 4 °C i s'ha rentat posteriorment amb aigua destil·lada durant 5 minuts. La fixació s'ha dut a terme amb el reactiu de Farmer (mescla d'etanol absolut i àcid acètic glacial [3:1 V/V]) i l'estovament mitjançant una hidròlisi àcida amb àcid clorhídric 1N (a una temperatura de 60 °C durant 10 minuts). La tinció de les radícules es fa mitjançant la immersió en orceïna acètica al 2%, a temperatura ambiental (maceració de 24 hores, segons KAWANO, 1965). Es poden trobar els detalls del procediment a BOSCH (1999) i MOLERO *et al.* (2013). Les observacions i fotografies s'han fet amb un microscopi Zeiss Axioplan, i els cariotips, a partir d'un mínim de cinc plaques metafàsiques de bona qualitat. Els paràmetres calculats s'indiquen en la taula 1 i es descriuen amb detall a BOSCH (1999).

Resultats i discussió

El nombre cromosòmic obtingut de la població de *D. bolosii* de Mura (MUR) ha resultat ser de $2n = 16$ cromosomes (figura 5), el mateix nombre que predomina en el gènere *Delphinium* i en la tribu *Delphinieae* (SIMON *et al.*, 1999) i que correspon al nivell diploide del nombre de base del grup ($x = 8$). Aquest citotip de $2n = 16$ difereix de l'obtingut en les altres dues poblacions d'aquesta espècie, en què s'ha examinat aquest paràmetre (RBO, Rubió de Baix i ULL-1, Ullde-

Taula 1. Característiques cromosòmiques de *Delphinium bolosii* (MUR: Mura, Bages)

Parell	Longitud del braç llarg (m ± ES)	Longitud del braç curt (m ± ES)	Longitud total (m ± ES)	R = L/C	Tipus de Levan	Índex Bazzichelli		IC
						L (%)	C (%)	
I	7,80 ± 0,15	6,26 ± 0,28	14,07 ± 0,37	1,25	m	12,19	9,79	44,54
II	7,60 ± 0,19	3,78 ± 0,44	11,38 ± 0,32	2,01	sm	11,87	5,91	33,23
III	6,44 ± 0,21	1,36 ± 0,05	7,80 ± 0,20	4,72	st	10,06	2,13	17,47
IV	6,03 ± 0,10	1,33 ± 0,05	7,37 ± 0,12	4,52	st	9,43	2,08	18,11
V	5,37 ± 0,12	1,42 ± 0,05	6,79 ± 0,13	3,78	st	8,38	2,22	20,94
VI	4,84 ± 0,11	1,36 ± 0,07	6,21 ± 0,09	3,55	st	7,57	2,13	21,96
VII	4,29 ± 0,09	1,36 ± 0,04	5,66 ± 0,10	3,15	st	6,71	2,13	24,10
VIII	3,57 ± 0,11	1,16 ± 0,00	4,73 ± 0,11	3,08	st	5,57	1,81	24,54
Σ 63,99						Σ 71,19	Σ 28,21	

molins), que presenten $2n = 18$ cromosomes (BLANCHÉ, 1991; BOSCH, 1999). Fins ara el nombre cromosòmic era considerat un dels caràcters diagnòstics per diferenciar *D. bolosii* dels tàxons propers, especialment de les espècies i subespècies del complex de *D. fissum* – *D. mansanetianum* (sèrie *Fissa*), però aquest resultat indica que en *D. bolosii* coexisteixen almenys tots dos citotips. Això obre les portes a una nova interpretació dels patrons de diversitat citogenètica del grup, que a partir d'ara caldrà verificar mitjançant un estudi de la variabilitat cromosòmica a escala poblacional.

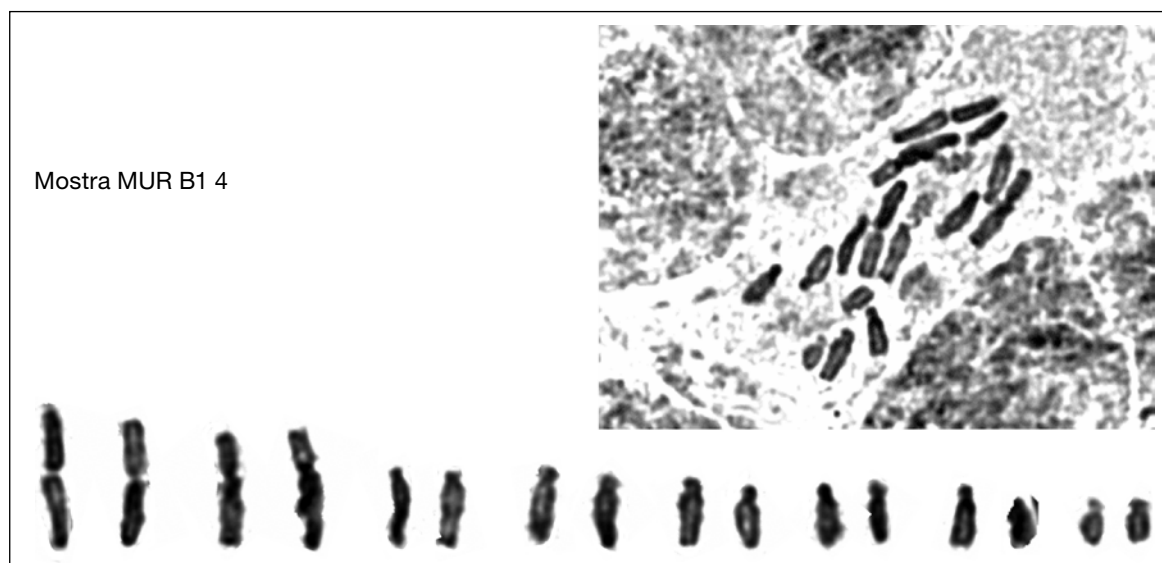
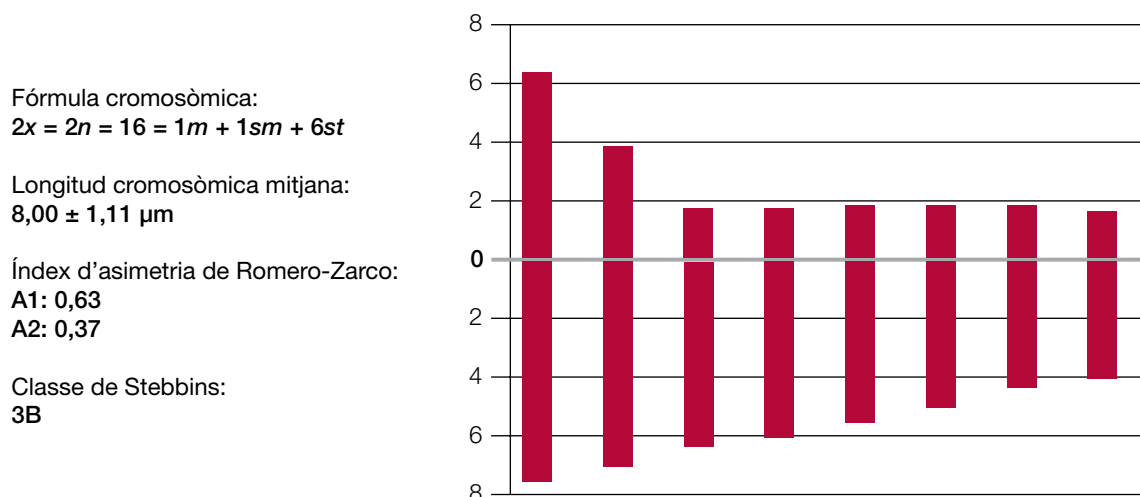
Estudi del cariotip – Els resultats del càlcul dels diversos índexs i paràmetres del cariotip i l'idiograma haploide es mostren en la **taula 1** i la **figura 6**. La població de Mura presenta un cariotip bimodal amb dues parelles de cromosomes més llargs i més simètrics (una parella de metacèntrics i l'altra de submetacèntrics) i sis parelles de cromosomes gradualment més curts i més asimètrics, que en aquest cas són acrocèntrics. Es tracta de característiques cromosòmiques típiques del gènere *Delphinium*. Per estudis realitzats en diferents espècies de la tribu *Delphinieae* (GIMÉNEZ, 1995), el segon parell de cromosomes presenta una major variabilitat, fet que ens ha portat a fer hipòtesis sobre la fragilitat del centròmer del segon parell i, subsegüentment, un possible trencament del braç curt d'aquest cromosoma seguit de reorganitzacions posteriors que haurien donat lloc a la formació dels cariotips de 18 cromosomes (ORELLANA, inèd.) a partir dels de $2n = 16$. Els mecanismes moleculars implicats en els canvis,

que es poden seguir a través del marcatge selectiu dels fragments de cromosomes (grup de tècniques GISH/FISH), aportarien llum sobre aquesta qüestió essencial de l'evolució cromosòmica, un procés que té a Catalunya un exemple tan extraordinari com és ara l'esperó de Bolòs i que, en tot cas, són un objectiu de recerca que cal desenvolupar en un futur.

Encara que el genoma de l'espècie es pugui agrupar en 16 o 18 empaquetaments (= cromosomes), cal indicar aquí que la longitud cromosòmica total (**taula 1**) del complement cromosòmic de la població MUR és del mateix ordre que el trobat per les altres dues poblacions de *D. bolosii* estudiades (BOSCH, 1999).

L'obtenció del citotip de $2n = 16$ en aquesta població permet interpretar d'una manera totalment nova els patrons de variació del grup sencer i identificar del massís de Sant Llorenç del Munt i l'Obac com a refugi de formes ancestrals o de reservori de biodiversitat. Així, coexistirien citotips diploides ($2n = 16$) i aneuploides ($2n = 18$) en *D. bolosii*, situació relativament comuna en molts gèneres, en què diversos nombres cromosòmics coexisteixen en una espècie o, fins i tot, en una mateixa població. El mòdul CromoCat del Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya en recull centenars d'exemples, i el nostre propi equip ho té identificat en la nostra flora (per exemple, a *Euphorbia*, cf. SIMON i VICENS, 1999).

A partir d'aquesta informació, ara cal fer una prospecció de la variabilitat cromosòmica a escala poblacional. Tanmateix, podem dir que el nou citotip de $2n = 16$ de *D. bolosii*, evolutivament més antic (ORELLANA, inèd.), suggereix que

Figura 5. Placa metafàsica i cariograma de *Delphinium bolosii* (Mura, Bages)**Figura 6.** Idiograma haploide (en μm) de *Delphinium bolosii* (Mura, Bages)

la nova població (re)descoberta podria tenir caràcter relict ancestral a escala del grup de *D. fissum* i que la preservació de la població de Sant Llorenç i l'Obac estaria contribuint a la conservació d'una part antiga de l'estirp que hauria trobat refugi a les valls de Mura. Per tant, una de les funcions dels espais naturals protegits –mantenir hàbitats disponibles per tal de permetre l'evolució natural dels components de la biodiversitat– es veuria aquí completament justificada. Aquesta característica cromosòmica dona un valor suplementari a la població (citotip de *D. bolosii*, ara per ara exclusiu del massís, vegeu LÓPEZ-PUJOL *et al.* [2014] per a genotips també exclusius), tot i que caldria verificar, en futurs estudis, si es tracta d'un nombre constant o variable al Parc, segons la visió nova que suggerim.

Propostes de gestió

De les conclusions precedents, se'n poden derivar aquestes recomanacions de gestió per a la població de l'esperó de Bolòs de Mura:

- Aplicació, en el marc normatiu competencial de la Diputació de Barcelona, de la normativa derivada de la inclusió de *Delphinium bolosii* a les llistes del *Catálogo Español de Especies Amenazadas* (RD 139/2011, categoria *en peligro de extinción*) i en el Catàleg de flora amenaçada de Catalunya (D 172/2008, categoria *en perill d'extinció*), en coordinació amb els serveis de Biodiversitat del DAAM de la Generalitat de Catalunya.
- Després del coneixement dels diversos rodals i de la seva sensibilitat al trepig, sobre-

tot després de períodes plujosos, es recomana aplicar els principis de precaució més elementals, que consisteixen en les accions següents:

- Protecció i vigilància estricta de les localitats conegudes on s'han localitzat els individus, tot evitant el desarrelament, el trepig, la freqüentació i l'alteració de l'hàbitat.

- Seguiment continuat dels entorns dels nuclis amb freqüència adaptada a la fenologia de l'espècie. Aquesta prospecció s'ha de fer evitant el trepig i l'alteració de l'hàbitat amb la màxima cura i reduint l'afluència de persones (tècnics, interessats, etc.) tant com sigui possible.

- Manteniment dels nivells d'informació estàndards sobre l'espècie a l'ENP que inclogui:

- Programació d'una campanya anual extensiva de prospecció i cens a tots els hàbitats del massís compatibles, per tal de mantenir actualitzat el cens d'efectius al Parc.

- Manteniment d'una base de dades georeferenciada o sistema GIS equivalent dels resultats anuals del punt anterior i de qualsevol altra incidència (incendis, despreniments, etc.) que permetin fer un seguiment documentat en el temps de l'evolució de la població i els seus nuclis.

- Regulació/limitació preventiva de l'escalada i desviació d'itineraris i d'altres mesures de gestió de l'afluència a les localitats on s'ha descobert el tàxon al Parc. Tot i que no s'ha descrit cap afectació dels nuclis de Sant Llorenç, les alteracions detectades a les poblacions de la Noguera (Rubió de Baix, Camarasa) en els darrers deu anys com a conseqüència d'aquesta activitat justifiquen aquesta mesura cautelar.

- Inclusió de les localitzacions dels diversos rodals de l'espècie als plans d'intervenció d'emergències (incendis, etc.) amb una guia d'instruccions als responsables de les actuacions.

- Programa de conservació *ex situ*, mitjançant la recol·lecció de granes i la conservació en bancs de germoplasma.

- Programa d'educació ambiental i gestió de la informació.

- Continuació dels estudis, que incloguin un estudi demogràfic i de biologia reproductiva (inclosos el seguiment i la verificació que els insectes pol·linitzadors no estiguin subjectes a amenaces) i un estudi de la variabilitat dels citotips.

Totes aquestes mesures que poden emprendre el Parc Natural i la Diputació de Barcelona no tenen ple sentit si no formen part d'un pla de recuperació per al conjunt de l'espècie,

que és preceptiu en aplicació del RD 139/2011 i, especialment, del D 172/2008 per tal com *D. bolosii* consta en l'annex 1 com a espècie *en perill d'extinció* que ha de tenir un pla de recuperació que englobi la problemàtica i les poblacions de tot Catalunya, ja que es tracta d'un endemisme amb un important component patrimonial. La preparació d'aquest pla és responsabilitat de la Direcció General de Boscos i Biodiversitat del DAAM.

Agraïments

Al personal del Parc Natural (A. Miño, J. Torrentó, T. Mampel i I. Bachs) i del Servei d'Espais Naturals (C. Castell, D. Carrera) per l'ajut en la recol·lecció de mostres i el suport en tot moment en la realització del treball. Al Servei de Biodiversitat i Protecció dels Animals del DAAM de la Generalitat de Catalunya per l'autorització de treball amb l'espècie. Aquest treball ha estat finançat pel Servei d'Espais Naturals de la Diputació de Barcelona (FBG-307118). Sergi Massó gaudeix d'una beca ADR de la Universitat de Barcelona i Jordi López Pujol, d'un contracte postdoctoral Beatriu de Pinós (Generalitat de Catalunya).

Bibliografia

BLANCHÉ, Cèsar (1991): *Revisió biosistemàtica del gènere Delphinium L. a la Península Ibèrica i a les Illes Balears*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans. Arxius de la Secció de Ciències, núm. 98. 290 pàgines.

BLANCHÉ, Cèsar; MOLERO, Julià (1986): «*Delphinium L.*». Dins: CASTROVIEJO, Santiago; LAÍNZ, Manuel; LÓPEZ GONZÁLEZ, Ginés; MONTSERRAT, Pedro; MUÑOZ-GARMENDIA, Félix; PAIVA, Jorge; VILLAR, Luis (ed.): *Flora Ibérica*. Madrid: Real Jardín Botánico-CSIC. Vol. 1; p. 242-251.

BLANCHÉ, Cèsar; MOLERO, Julià; ROVIRA, Ana Maria; SIMON, Joan; BOSCH, Maria; LÓPEZ-PUJOL, Jordi; ORELLANA, Maria Renée; OREJUELA, Laura (2002): *Establiment del Pla de recuperació in situ i ex situ de Delphinium bolosii*. Document tècnic inèdit. Barcelona: Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya - Fundació Bosch i Gimpera (UB). 97 pàgines.

BOSCH, Maria (1999): *Biologia de la reproducció de la tribu Delphinieae a la Mediterrània occidental*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans. Arxius de la Secció de Ciències, núm. 120. 375 pàgines.

GIMÉNEZ, Maria del Mar (1995): *Estudios citogenéticos en especies anuales de la tribu Delphinieae en Turquía*. Tesi de llicenciatura. Barcelona: Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia. 142 pàgines.

HERRANZ, José María; FERRANDIS, Pablo; MARTÍNEZ-DURO, Esmeralda (2010): «Seed germination ecology of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae)». *Plant Ecology*, núm. 211; p. 89-106.

KAWANO, Shigeyuki (1965): «Application of pectinase and cellulase in an orcein squash method». *Botanical Magazine* (Tòquio), núm. 78; p. 36-42.

LÓPEZ-PUJOL, Jordi; BOSCH, Maria; MASSÓ, Sergi; MOLERO, Julià; SIMON, Joan; ROVIRA, Ana Maria; BLANCHÉ, Cèsar (2014): «Estudi preliminar de variabilitat isoenzimàtica de *Delphinium bolosii* al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac». Dins: *VIII Monografies de Sant Llorenç del Munt i l'Obac*. Barcelona: Diputació de Barcelona; p. 207-217.

MAMPEL, Toni; BACHS, Iseta; CARRERA, David; TORRENTÓ, Josep (2014): «Prospecció de l'esperó de Bolòs (*Delphinium bolosii*) al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. Algunes dades preliminars sobre la seva fenologia». Dins: *VIII Monografies de Sant Llorenç del Munt i l'Obac*. Barcelona: Diputació de Barcelona; p. 219.

MOLERO, Julià; ROVIRA, Ana Maria; SIMON, Joan; BOSCH, Maria; LÓPEZ-PUJOL, Jordi; MASSÓ, Sergi; BLANCHÉ, Cèsar (coord.) (2013): *Avaluació del retrobament de Delphinium bolosii al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i de l'Obac* (Fa-

ses 1 i 2). *Propostes de gestió*. Document tècnic inèdit. Barcelona: Diputació de Barcelona - Fundació Bosch i Gimpera (UB). 88 pàgines.

OREJUELA, Laura (2003): *Estudis preliminars per al pla de reintroducció de Delphinium bolosii C. Blanché & Molero: germinació i diversitat genètica*. Màster experimental en Ciències Farmacèutiques. Barcelona: Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. 100 pàgines.

ORELLANA, Maria-Renée; LÓPEZ-PUJOL, Jordi; BLANCHÉ, Cèsar; BOSCH, Maria (2007): «Relationships between heterozygosity and fitness in the Iberian threatened larkspur *Delphinium bolosii*». *Flora*, núm. 202; p. 161-168.

ORELLANA, Maria-Renée; ROVIRA, Ana Maria; BLANCHÉ, Cèsar; BOSCH, Maria (2008): «Effects of local abundance on pollination and reproduction in the narrow endemic *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae)». *Orsis*, núm. 23; p. 27-46.

PÉREZ-RAVENTÓS, Joaquim; HERNÁNDEZ-CARDONA, Àngel M. (2013): «L'esperó de Bolòs, una planta endèmica de Catalunya, retrobada a Sant Llorenç del Munt i l'Obac». *Vacarisses, Balcó de Montserrat*, núm. 534; p. 26-29.

SIMON, Joan; VICENS, Josep (1999): *Estudis biosistemàtics en Euphorbia L. a la Mediterrània occidental*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans. Arxius de la Secció de Ciències 122. 704 pàgines.

SIMON, Joan; BOSCH, Maria; MOLERO, Julià; BLANCHÉ, Cèsar (1999): «A conspect of chromosome numbers in tribe *Delphinieae* (Ranunculaceae)». [En línia] <www.ub.es/botanica/greb/cromodel.pdf>.