

MÀSTER EXPERIMENTAL EN CIÈNCIES FARMACÈUTIQUES ESPECIALITAT: BOTÀNICA

Estudis de biologia de la reproducció i conservació *ex situ* de l'endemisme empordanès *Silene sennenii*



Laboratori de Botànica
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona



Sergi Massó i Alemán

Convocatòria: febrer de 2011
Tutor: Dr. Cèsar Blanché i Vergés
Sota la supervisió de la Dra. M. Carmen Martinell Andreu

El tutor d'aquest treball,
Dr. Cèsar Blanché i Vergés,
n'autoritza la defensa pública

Dr. Cèsar Blanché i Vergés

Sergi Massó i Alemán, 2011

Aquest treball ha estat realitzat en el marc del projecte de recerca finançat pel MCINN *Biología de la conservación de especies vegetales amenazadas de área extremadamente reducida* (GL2007-60475/BOS)

TAULA DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ GENERAL.....	4
PRIMERA PART: Biologia de la reproducció	11
1.1. Introducció	12
1.2. Material i mètodes	13
1.3. Resultats i discussió	15
1.4. Conclusions	19
SEGONA PART: Cultiu <i>ex situ</i>	21
2.1. Introducció	22
2.2. Material i mètodes	23
2.3. Resultats i discussió	26
2.4. Conclusions	34
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	36

INTRODUCCIÓ GENERAL

DESCRIPCIÓ I IDENTITAT TAXONÒMICA

Silene sennenii Pau, Bol. Soc. Arag. iv. 309 (1905) és un petit hemicriptòfit amb tiges floríferes ascendents entre 15 i 80 cm (Figura 1A). Fulles estretament elíptiques a lanceolades, agudes, atenuades en el pecíol, amb pèls no glandulars. Flors actinomorfes, pentàmeres, proteràndriques i agrupades en dicasis, amb la corol·la de color blanc o rosat on els pètals, que mesuren entre 7 i 9 mm, es repleguen en les hores de insolació (Figura 1B). Pedicels de 4 a 8 mm, glabres. Bràctees més curtes que els pedicels, ovadolanceolades. Calze d'entre 13 i 15 mm, amplament ovat o suborbicular, amb el marge escariós i ample. Càpsules 8-9 x 4-5 mm amb nombroses llavors (40-70 per fruit) de 0,9-1 x 1-1,3 mm.

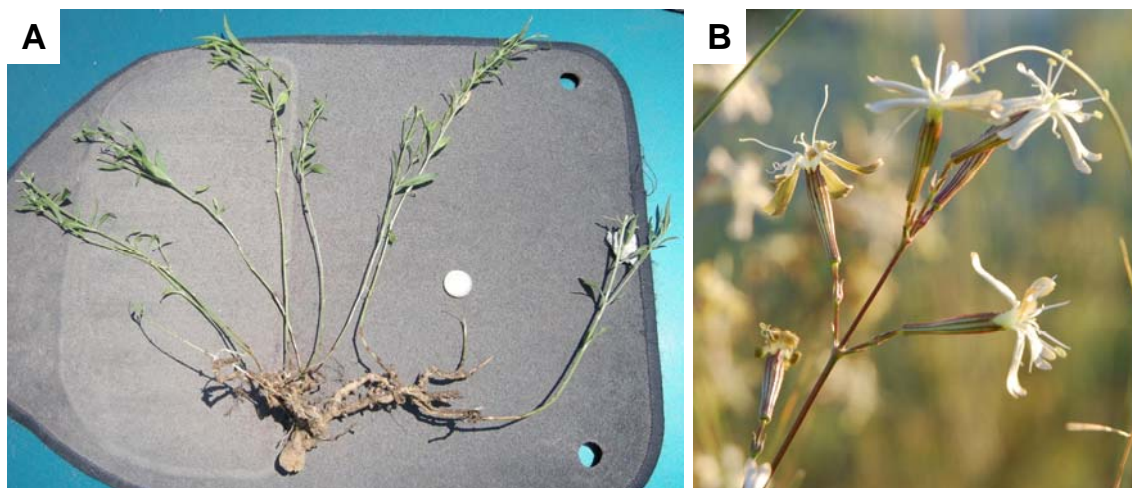


Figura 1: Individu desenterrat de *Silene sennenii* (A) i detall de les flors a primera hora del matí (B). [Fotografies: (A), M.C. Martinell; (B), S. Massó]

El període de floració s'estén des del mes de juliol fins al mes d'octubre, amb especial intensitat a finals d'estiu. Presenta pol·linització entomòfila, principalment per lepidòpters d'hàbits nocturns o crepusculars (*Rhodometra sacraria*, *Antigastra catalaunalis*, *Calophasia platyptera*, *Macdunnoughia confusa*, *Autographa gamma*, *Mythimna farrago*, *Herse convolvuli* i *Macroglossum stellatarum*), encara que també s'han observat casos aïllats de visites diürnes per part d'himenòpters (*Lassioglossum* sp.,

Amegilla sp. i *Apis mellifera*) (Martinell et al., 2010). Aproximadament un mes després de la pol·linització el fruit ja és madur.

Espècie diploide de $2n = 24$ (Simon & Blanché, 2010).

L'espècie va ser descrita pel botànic sogorbí Carlos Pau l'any 1905 i avui dia ofereix pocs dubtes respecte el seu rang específic (Chater & Walters, 1964; Jeanmonod, 1984; Talavera, 1990). Tot i això, existeixen dues flores (Malagarriga, 1976; Bolòs & Vigo, 1984) que la rebaixen a nivell de subespècie, considerant-la com *S. saxifraga* subsp. *sennenii* (Pau) Malag. i *S. italica* subsp. *sennenii* (Pau) O.Bolòs & J.Vigo respectivament. Jeanmonod (1984) rebutja les combinacions de Bolòs i Vigo i Malagarriga i referma la idea de que es tracta d'una espècie ben diferenciada.

DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA

Silene sennenii és un endemisme estricte de la zona de l'Alt Empordà (Figura 2). Actualment en trobem en cinc localitats a les rodalies de Figueres, en una de les quals (Castell de Sant Ferran, CSF) s'hi concentra més del 70% del total dels individus. El darrer cens complert data de 2008 (Martinell, 2010) i es van comptabilitzar un total de 4.308 individus. Les cinc localitats són les següents:

Castell de Sant Ferran (CSF): Situada al voltant d'aquesta fortalesa militar del segle XVIII a les afores de Figueres, és la població més nombrosa - 3097 individus l'estiu del 2008 (Martinell, 2010)-. *Silene sennenii* es troba als talussos artificials que envolten la fortalesa, saltant sovint als marges dels camps que l'envolten. Dins del castell es troba un petit nucli d'un centenar d'individus.

Baseia (BAS): És la segona població en nombre d'individus -1011 l'any 2008 (Martinell, 2010)-. Es troba dividida en cinc nuclis, dos dels quals força amplis, en prats no cultivats, marges de camps, i al llarg de pistes forestals i d'una carretera.

Riu Manol (RMA): Població lineal situada en un fenassar limitat per un camí a la riba esquerra del riu Manol, a l'alçada de Vilatenim. L'any 2008 aquesta població tenia 130 individus (Martinell, 2010).

El Far d'Empordà (FEM): Població situada en un ampli talús entre un camp de conreu i el nucli urbà. Entre aquesta població i l'anterior (RMA) es troben alguns individus aïllats en marges de camins rurals i camps de cultiu. La població comptava amb 69 individus l'any 2008 (Martinell, 2010).

Mas Renart (MRE): Població que al 2008 comptava únicament amb un únic individu (Martinell, 2010).

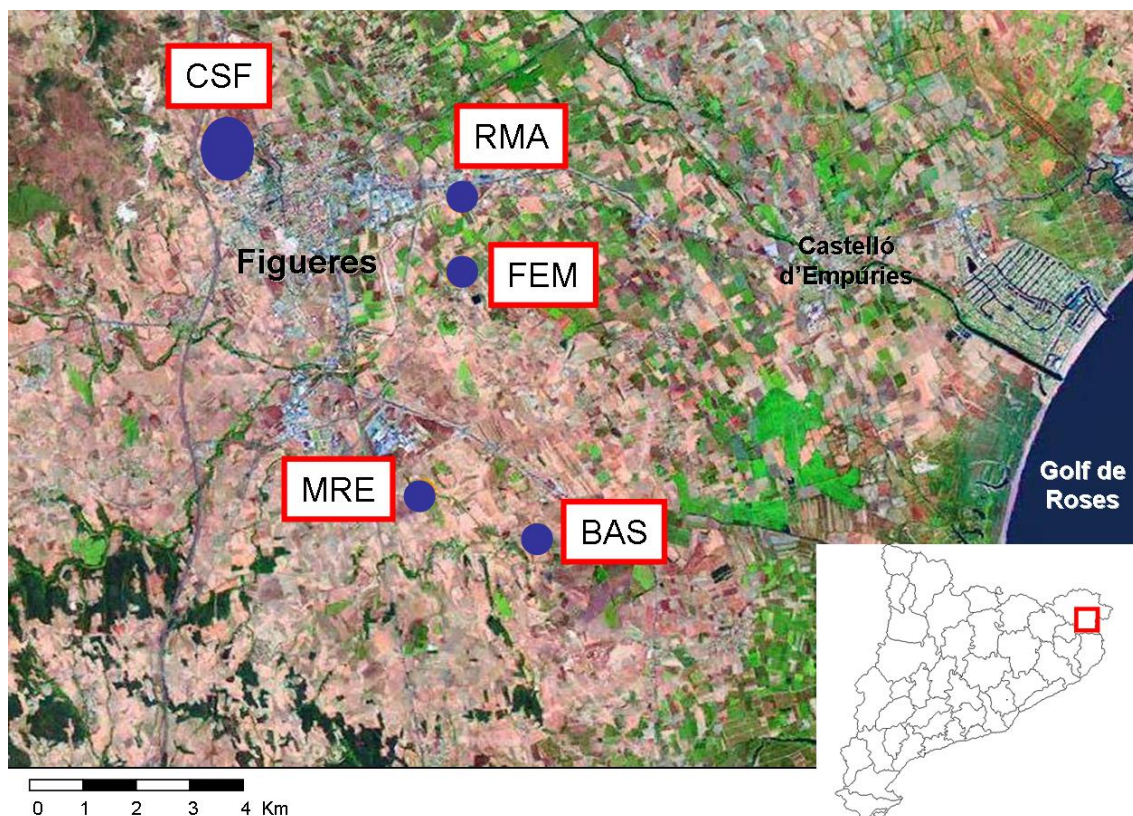


Figura 2: Mapa de les localitats de *Silene sennenii* [Cartografia de base: ICC]

HÀBITAT

Silene sennenii creix exclusivament en fenassars (*Brachypodium phoenicoides* Br.-Bl., Figura 3), comunitat que, en la majoria de casos, està associada als marges dels camps de cultiu, talussos i, excepcionalment, en

cultius abandonats. Pot aparèixer en altres ambients de manera secundària, tolerant una lleugera ruderalització del sòl; 15-100 m d'altitud. A part de *Brachypodium phoenicodes* (L.) Roem & Schult., es troba habitualment acompanyada de *Ononis tridentata* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Clematis flammula* L., *Dianthus* sp., *Rubus ulmifolius* Schott, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke i *Avena barbata* Link.



Figura 3: Fenassar al marge d'un camp a la població del Riu Manol (RMA). [Fotografia: M.C. Martinell]

DIVERSITAT GENÈTICA

S'ha estudiat la diversitat genètica d'aquesta espècie mitjançant electroforesi d'al·loenzims (Figura 4; López-Pujol *et al.*, 2007). D'entre els 21 *loci* interpretables es van detectar tan sols 30 al·lels. En les dues poblacions més grans es van detectar tots 30 al·lels, mentre que a RMA i FEM se'n van detectar 27 i 26 respectivament. Per la seva part, la població més petita (MRE) mostrava únicament 25 al·lels.

El grau d'endogàmia de les diferents poblacions és força elevat ($F_{IS} = 0,253$; López-Pujol *et al.*, 2007), cosa que pot empobrir genèticament les poblacions de l'espècie. Per la seva part, la divergència genètica entre les diferents poblacions és bastant elevada ($F_{ST} = 0,27$; López-Pujol *et al.*, 2007)

fet que es pot interpretar com una conseqüència de la fragmentació del seu hàbitat. Els seus nivells de diversitat ($P = 20,9\%$, $A = 1,31$, $H_e = 0,071$; López-Pujol *et al.*, 2007) són propers als recopilats per Hamrick & Godt (1990) per 100 espècies endèmiques ($P = 26,3\%$, $A = 1,39$, $H_e = 0,063$).

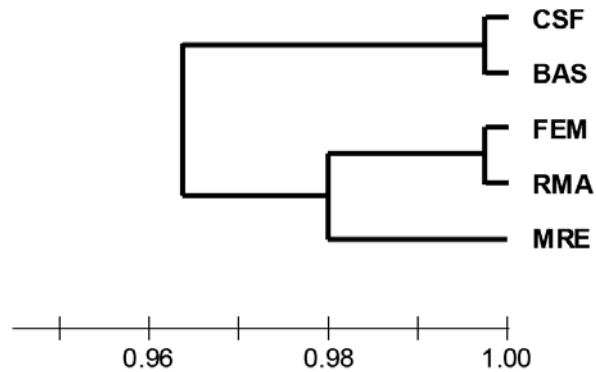


Figura 4.- Dendrograma UPGMA de similaritat genètica (I) entre poblacions (Figura extreta de López-Pujol *et al.*, 2007)

En l'actualitat s'estan desenvolupant estudis d'aquesta espècie amb microsatèl·lits, marcadors mol·leculars que s'espera puguin donar resultats més acurats sobre la seva diversitat genètica i les relacions entre les poblacions.

CONSERVACIÓ

Amenaces

La principal amenaça a la qual està sotmesa aquesta espècie és la disminució i pèrdua de qualitat del seu hàbitat per l'expansió de zones urbanitzades (López-Pujol *et al.*, 2008; Martinell, 2010) i per la transformació en cultius de regadiu d'alguns conreus al voltant dels quals creix (J. Font, com. pers.). Aquesta disminució i pèrdua de qualitat de l'hàbitat comporta una disminució de la població, fet que pot incrementar les taxes d'endogàmia o consanguinitat tal i com reflecteixen les dades genètiques.

Una altra afectació important són les estassades a les quals es sotmeten els marges de camins o carreteres a finals d'estiu. Aquestes estassades afecten de forma directa al cicle reproductiu de la planta, ja que en

l'època en què es fan no tots els fruits han madurat i no s'ha acabat de produir la dispersió de les granes.

També es troba amenaçada de forma important la xarxa de pol·linitzadors (Martinell *et al.*, 2010). La població RMA, per exemple, té un nombre més elevat de visites per pol·linitzadors diürns que la resta, degut al fet que es troba en una zona il·luminada artificialment i on no són tant freqüents els pol·linitzadors nocturns de *S. sennenii*. El resultat atribuïble a aquest fet és una menor producció de llavors.

Avaluació del grau d'amenaça segons criteris UICN

Categoria UICN mundial proposada (avaluació feta el 2010 per Sáez *et al.*): EN B1ab(i,ii,iii,iv,v)+2ab(i,ii,iii,iv,v), segons criteris UICN (2001).

Protecció legal

L'espècie és catalogada com a “en perill d'extinció” en el *Catàleg de flora amenaçada de Catalunya* (DOGC, 2008). No existeix cap mena de protecció legal a nivell estatal o europeu.

Mesures de conservació

Tal i com es demana des del Llibre Vermell de les plantes vasculares endèmiques i amenaçades de Catalunya (Sáez *et al.*, 2010), caldria elaborar un pla de conservació específic urgent a causa de la vulnerabilitat de les localitats que es conserven en l'actualitat. Una manera d'afavorir la conservació d'aquesta espècie podria ser el manteniment de l'hàbitat a través de la pastura extensiva a més d'una limitació en el canvi dels usos agrícoles de les finques properes. Igualment caldria afavorir la connectivitat dels nuclis poblacionals i aprofundir en el coneixement reproductiu d'aquesta espècie.

En l'actualitat s'estan aplicant les següents mesures de conservació i recuperació (Martinell, 2010):

- Protecció a Catalunya mitjançant la inclusió de l'espècie a l'Annex I del *Catàleg de Flora Amenaçada de Catalunya* (DOGC, 2008).

- Assajos de germinació i cultiu al Jardí Botànic Marimurtra de Blanes (Fundació Carl Faust), a través de la inclusió d'aquesta espècie dins el projecte Phoenix2014, de la Xarxa Iberomacaronèsica de Jardins Botànics. Així mateix, s'estan duent a terme la posada a punt de protocols de germinació i cultiu.
- Conservació de 16.750 llavors al banc de germoplasma del Jardí Botànic Marimurtra de Blanes (Fundació Carl Faust). Les llavors provenen de CSF (9.000), BAS (5.800), RMA (1.550) i FEM (400) i van ser totes collides l'any 2008.
- Cultiu de 43 individus al Jardí Botànic Marimurtra de Blanes (Fundació Carl Faust) i d'uns 250 al viver de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Aquests darrers han estat emprats per a la realització d'aquest estudi i, en acabat, seran donats a jardins botànics o vivers de conservació.
- Conservació de l'hàbitat al Castell de Sant Ferran (CSF) donat l'estatus militar del recinte, que impedeix la construcció i la intervenció en els talussos que l'envolten.
- Conservació preventiva de l'hàbitat a càrrec de la Generalitat de Catalunya, a través dels serveis territorials a Girona del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural, mitjançant la informació de l'existència d'aquesta espècie protegida a ajuntaments, particulars i empreses propietàries o gestores dels terrenys que ocupa.

PRIMERA PART

Biologia de la reproducció

1.1. Introducció

Per tal de conèixer la biologia reproductiva d'una espècie és fonamental estudiar-ne els mecanismes de pol·linització, així com la fenologia, el desenvolupament floral i la distribució de l'espècie. S'han realitzat estudis previs i part d'aquesta informació està àmpliament detallada a l'obra de Martinell (2010). Les flors de *S. sennenii* presenten un calze estretament tubular, cinc pètals blancs o rosats, dos verticils amb cinc estams i un ovari tristil (Talavera, 1990). Aquestes s'obren al crepuscle i els pètals es retrauen durant el dia, fenomen comú amb d'altres espècies del mateix gènere (Jürgens *et al.* 2002). Aquest cicle dia-nit no afecta únicament als pètals, si no també al desenvolupament del gineceu i l'androceu, en un clar fenomen de proteràndria. En la primera nit de l'antesi té lloc la dehiscència del verticil extern d'estams. Al matí següent els estams es marceixen a l'hora que els pètals es repleguen. Durant la segona nit té lloc el mateix procés però amb el verticil intern d'estams. De nou, els pètals es repleguen al matí, amb la marcescència de les anteres del verticil intern. Per últim, durant la tercera nit es desenvolupen els tres estils ja receptius. Si les flors no són fecundades el període de vida d'aquestes s'allarga entre dues i tres nits més, on es va repetint aquest cicle d'obertura i replegament dels pètals. D'aquesta manera s'evita l'autopol·linització a l'estar separades les dues fases dins l'antesi.

Resultats obtinguts prèviament (Martinell, 2010; Martinell *et al.* 2010) mostraven que la pol·linització de *S. sennenii* es produïa a la nit i que la autopol·linització era molt limitada. No obstant, quedaven alguns interrogants per resoldre. En primer lloc, es desconeix si l'absència d'autopol·linització espontània és només conseqüència de la proteràndria o si es deu a una autoincompatibilitat. Per resoldre això, és necessari realitzar un estudi complet del sistema reproductiu de *S. sennenii*. En segon lloc, es va observar que, malgrat la seva presència, els visitants florals diürns no duïen a terme una pol·linització efectiva. Una de les hipòtesis per explicar aquest fenomen era que el pol·len perdés viabilitat al llarg del dia, de tal manera que el pol·len romanent fins al matí, i per tant transportat pels visitants diürns, ja no fos capaç de fecundar els òvuls.

Per tant, els objectius d'aquesta primera part han estat:

- a) Valorar la viabilitat del pol·len al llarg de la nit.
- b) Conèixer el sistema reproductiu de *Silene sennenii*.
- c) Esbrinar la capacitat d'autopol·linització espontània.

1.2. Material i mètodes

1.2.1. Germinació de pol·len

Per avaluar la capacitat germinativa del pol·len s'ha seguit el protocol descrit a Dafni *et al.* (2005), fent servir petites gotes de solució de germinació, amb petites variacions. S'ha realitzat un assaig previ consistent en posar a germinar el pol·len d'un estam en una solució amb un percentatge conegut de sacarosa i 100 mg/l de nitrat càlcic o d'àcid bòric o de sulfat magnèsic o, alternativament, una concentració de 100 mg/l de cadascun d'aquests compostos. A les 24 hores s'ha tenyit amb verd de metil (*Phloxine Methyl Green*) per tal d'observar i comptar al microscopi els grans de pol·len germinat. Aquesta tinció permet distingir els grans de pol·len viables dels morts. Es compten com a grans de pol·len germinats aquells als quals el tub pol·línic ha emergit del gra. De totes les combinacions testades, s'ha escollit per la següent fase d'experimentació la que va donar millor resultats en aquests assajos previs.

Un total d'11 flors en estadis masculins (bé sigui la primera o la segona nit) han estat seleccionades i s'han mantingut a la planta, fins que cada estam s'ha recollit, a una temperatura constant (25°C) i humitat ambiental. Al vespre, entre les 19 i les 21 hores, s'han recollit anteres dehiscentes. El pol·len s'ha deixat germinar 24 hores en condicions de laboratori (*room conditions*) amb la solució al 30% de sacarosa i 100 mg/l de nitrat càlcic. Passades les 24 hores s'ha tenyit amb verd de metil i s'ha comptat el pol·len germinat. Algunes de les rèpliques, però, s'han hagut d'eliminar ja que durant la nit es va assecar la gota amb la solució.

Les dades de viabilitat del pol·len al llarg de la nit han estat comparades mitjançant la prova HSD de Tukey. Totes les anàlisis estadístiques s'han realitzat amb el programa Statgraphics Plus 5.1.

1.2.2. Encreuaments

Entre els mesos de juny i agost es van seleccionar un total de 50 parcel·les formades per parcel·les situades a la mateixa planta i amb una floració simultània.

En una de les flors de la parella s'ha aplicat un dels tractaments descrits a continuació, mentre que l'altra s'ha mantingut com a control (Kearns & Inouye, 1993). En els casos en que s'esqueia, s'han exclòs les potencials visites de pol·linitzadors mitjançant l'ús de bosses de gasa, que s'han col·locat a les parcel·les abans de l'antesi.

- **AE:** Autopol·linització espontània. Es mantenen les bosses durant l'antesi. No es pol·linitza manualment.
- **AF:** Autopol·linització forçada. Es mantenen les bosses durant l'antesi. Es pol·linitza manualment amb pol·len de la mateixa flor.
- **AG:** Agamospèrmia. Es mantenen les bosses durant l'antesi. S'emasculen les flors abans de la dehiscència dels estams i no es pol·linitza manualment,
- **EX:** Pol·linització únicament creuada. Es mantenen les bosses durant l'antesi. S'emasculen les flors abans de la dehiscència dels estams . Es pol·linitza manualment amb pol·len d'una altra planta.
- **SB:** Control sense bossa. No s'embossa en cap moment.
- **Control:** Pol·linització creuada. Es retiren les bosses durant l'antesi. Es pol·linitza manualment amb pol·len d'una altra planta.

La pol·linització manual es realitza al vespre, quan les flors ja s'han obert i els estams comencen a alliberar pol·len, triant la flor donadora i agafant amb pinces un dels estams. Tot seguit es posa en contacte l'antera diverses vegades per sobre el pistil de la flor receptora.

Un cop pol·linitzades, s'ha esperat unes hores per tal d'extreure els estigmes de les flors i comptar-ne els grans de pol·len al microscopi fixats en gelatina fucsina (*Gelatine – Fuchsie Jelly*) (Dafni *et al.*, 2005) (Figura 5), tot deixant que es produís la fecundació dels òvuls (experiments previs havien demostrat que després de 12 hores ja no hi havia afectació a la producció de llavors). Els fruits s'han deixat madurar (aproximadament un mes), moment en que s'ha comptat el nombre de llavors madures, avortades i òvuls sota la lupa binocular (10x).

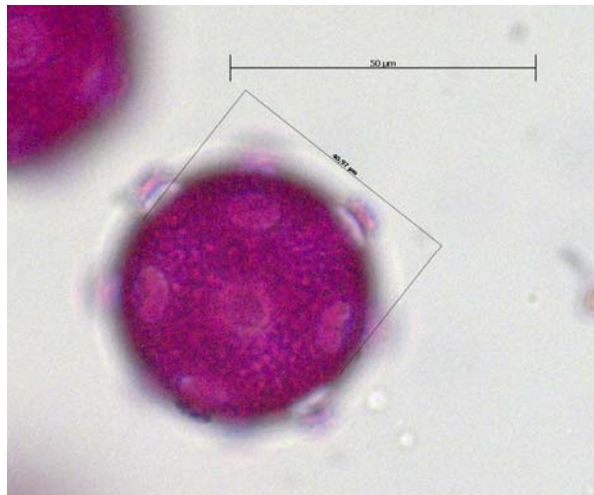


Figura 5: Gra de pol·len de *Silene sennenii* teixit amb gelatina fucsina i observat al microscopi.

Les dades de viabilitat del pol·len al llarg de la nit han estat comparades mitjançant la prova HSD de Tukey. Les dades dels encreuaments s'han comparat amb la prova de Kruskal – Wallis, ja que s'ha comprovat que les dades no segueixen una distribució normal, i la prova de la Xi quadrat. Totes les anàlisis estadístiques s'han realitzat amb el programa Statgraphics Plus 5.1.

1.3. Resultats i discussió

1.3.1. Germinació de pol·len

S'han assajat un total de 20 combinacions de composició de medi de cultiu amb diferents concentracions de sacarosa i un enriquiment d'àcid bòric, nitrat càlcic o sulfat magnèsic. Per cada combinació es van realitzar dues rèpliques, cadascuna amb entre 50 i 200 grans de pol·len.

La que presenta un percentatge d'èxit més elevat és la solució al 30% de sacarosa amb 100 mg/l de nitrat càlcic (Taula 1). És per això que els assajos de germinació de pol·len s'han realitzat amb aquesta combinació.

% Sacarosa	Àc. bòric (100 mg/l)			Nitrat càlcic (100 mg/l)			Sulfat magnèsic (100 mg/l)			Combinació de les tres anteriors		
	Germ	No germ	% germ	Germ	No germ	% germ	Germ	No germ	% germ	Germ	No germ	% germ
0	Gota seca			72	128	36,0	26	174	13,0	23	177	11,5
	Gota seca			56	144	28,0	14	186	7,0	Gota seca		
10	77	123	38,5	46	65	41,4	16	184	8,0	21	35	37,5
	135	65	67,5	155	45	77,5	81	119	40,5	154	46	77,0
20	126	74	63,0	91	109	45,5	27	173	13,5	144	16	90,0
	144	56	72,0	121	79	60,5	32	168	16,0	113	87	56,5
30	13	42	23,6	190	10	95,0	77	123	38,5	76	84	47,5
	158	42	79,0	184	16	92,0	84	116	42,0	175	25	87,5
40	11	189	5,5	7	193	3,5	31	129	19,4	2	59	3,3
	19	200	8,7	Gota seca			1	199	0,5	31	169	15,5

Taula 1: Resultats dels diferents protocols de germinació de pol·len. Enquadrat en groc, el que s'ha usat (30% de sacarosa i 100 mg/l de nitrat càlcic).

Els experiments de germinació de pol·len *in vitro* (Taula 2) mostren un increment de la germinabilitat a mesura que l'antesi avança (entre les 8 del vespre i mitjanit) una important davallada conforme va avançant la nit (entre la mitjanit i les 4 de la matinada) i una petita recuperació al matí següent moment en que els pètals es tornen a tancar (a partir de les 8 del matí).

HORA	% GERMINACIÓ	SD
20.00	69,3	8,4
0.00	82,1	8,7
4.00	16,4	3,7
8.00	21,3	4,0
12.00	41,5	15,4

Taula 2: Percentatge de germinació del pol·len al llarg de la nit

Aplicant el mètode HSD de Tukey (Taula 3) es veuen diferències estadísticament significatives entre tots els grups excepte entre les dades de les 4 de la matinada i les 8 del matí.

HORA	MITJANA	GRUPS HOMOGENIS
4.00	16,03	X
8.00	21,96	X
12.00	41,47	X
20.00	69,35	X
0.00	84,59	X

Taula 3: Resultats de la prova HSD de Tukey per al percentatge de germinació de pol·len al llarg de la nit. Nivell de confiança del 95%. Horari d'estiu (UTC + 2).

Els resultats obtinguts semblen indicar que els grans de pol·len estan acabant de madurar quan la flor s'obre al capvespre i que el seu punt àlgid (quan tenen més probabilitat de germinar) el tindrien al voltant de mitjanit (Figura 6). És en aquest moment quan els potencials pol·linitzadors de *S. sennenii* visiten les flors al camp (Martinell, 2010). A mesura que avança la nit, la viabilitat del pol·len va disminuint i el pol·len que ja no és viable molt probablement es desprèn de l'antera. És difícil explicar el repunt de germinació de les 12 hores i seria necessari estudiar-ho millor, ja que en el present estudi s'ha trobat molt poc pol·len a les mostres de les 12 (fet que podria explicar-se si el pol·len que ja no és viable es desprèn de l'antera).

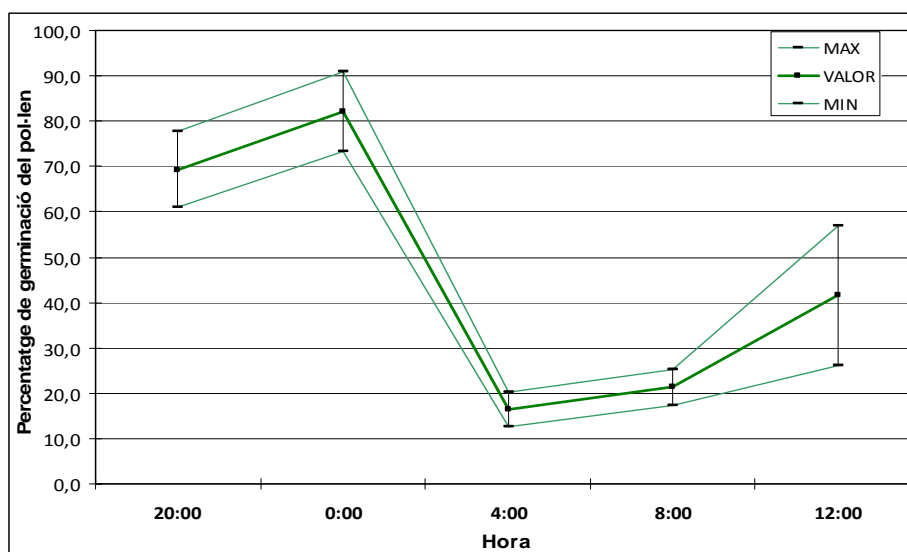


Figura 6: Percentatge de germinació del pol·len al llarg de la nit. Horari d'estiu (UTC + 2).

1.3.2. Encreuaments

Observant el nombre de fruits madurs que s'han produït en cada encreuament (Taula 4) observem com en l'agamospèrmia (AG), tal i com era d'esperar, no es produeixen fruits. En l'altre extrem, aquelles que havien romàs sense bossa (SB) assolien un percentatge de fruits madurs del 90%. Entremig de tots dos valors hi trobem l'autopol·linització forçada (AF) amb un 70%, la pol·linització únicament creuada (EX) amb un 60% i l'autopol·linització espontània (AE) amb un 30%. El percentatge de fruits madurs presenta diferències significatives entre tots els encreuaments (Xi quadrat, $X = 57, 56$, $p = 0,0000$), amb la qual cosa es pot deduir que *S. sennenii* no s'autopol·linitza gaire sovint de manera espontània però que aquest mecanisme és viable quan es produeix.

Els percentatges de fecundació i de llavors madures entre els diferents encreuaments (Taula 4) no presenten diferències significatives (Percentatge de fecundació: Kruskal – Wallis, $p = 0,138$; percentatge de llavors madures: Kruskal – Wallis, $p = 0,199$). L'absència de diferències entre els tractaments, exceptuant AG, ens mostra que, tot i que la autogàmia es troba limitada per la proteràndria, quan es dona es poden assolir percentatges de fecundació d'òvuls i de maduració de llavors similars als de la alogamia, sent una evidència de l'absència de mecanismes d'autoincompatibilitat. A jutjar per la comparació entre els valors de SB i Control, no sembla que la col·locació de bosses de gasa per a realitzar l'experiment afecti a la maduració dels fruits.

Això confirma que l'autofecundació és perfectament viable pel que fa a quantitat de llavors, encara que la marcada proteràndria que presenta aquesta espècie evita aquest mecanisme de reproducció i, per tant, que cal considerar-la com a espècie autocompatible, almenys parcialment.

ENCREUAMENT		LLAVORS				FECUNDACIÓ	MADURES
		Madures	Avortades	Òvuls	TOTAL		
AE (N = 3)	TOTAL	30	1	156	187		
30% dels fruits són madurs	MITJANA	10,0	0,3	52,0	62,3	16,6%	16,2%
	EE	4,04	0,3	5,7	4,2	6,5	6,1
AF (N = 7)	TOTAL	180	14	267	461		
70% dels fruits són madurs	MITJANA	25,7	2	38,1	66,5	40,8%	37,5%
	EE	7,6	0,9	6,5	5,5	9,6	8,9
AG (N = 0)	TOTAL	0	0	0	0		
0 fruits madurs	MITJANA	-	-	-	-	0%	0%
EX (N = 6)	TOTAL	173	12	214	399		
60% dels fruits són madurs	MITJANA	28,8	2	35,7	66,5	45,2%	41,9%
	EE	8,2	1,0	7,1	6,5	10,1	9,2
SB (N = 9)	TOTAL	335	28	311	674		
90% dels fruits són madurs	MITJANA	37,2	3,1	34,6	74,9	53,6%	48,3%
	EE	7,1	1,5	5,5	5,6	7,3	7,5
Control (N = 38)	TOTAL	1456	164	1225	2845		
76% dels fruits són madurs	MITJANA	37,3	4,2	31,4	72,9	57,0%	51,2%
	EE	3,5	0,7	3,5	2,1	4,6	4,5

Taula 4: Nombre de llavors, percentatges de fecundació i de llavors madures en cada encreuament. N = nombre de fruits madurs.

1.4. Conclusions

1. El pol·len de *Silene sennenii* té una elevada germinabilitat al capvespre. Aquesta germinabilitat, però, disminueix dràsticament a les primeres hores de la matinada.
2. Aquesta dada confirma la sincronia de la fenologia general de la flor de *S. sennenii* amb la dels insectes pol·linitzadors nocturns també a la micro-escala de la cronobiologia dels processos metabòlics implicats en la germinació del gra de pol·len a través d'un sistema que minimitza la probabilitat de fecundació efectiva de pol·len transportat en hores diürnes.
3. Tal i com feien sospitar els resultats fenològics, *S. sennenii* té una baixa capacitat de realitzar l'autofecundació de forma autònoma,

encara que quan es produeix és perfectament viable i força equiparable a la reproducció creuada.

Caldria estudiar, però, què passa amb el pol·len a l'alba i durant les primeres hores del matí per tal d'intentar explicar el poc èxit que tenen les visites dels pol·linitzadors diürns.

SEGONA PART

Cultiu ex situ

2.1. Introducció

Encara que se sol admetre que la millor manera de conservar la biodiversitat és fer-ho *in situ*, cal tenir sistemes alternatius que permetin assegurar una bona resposta davant situacions adverses com serien el declivi de les poblacions naturals o una alteració dràstica de l'hàbitat natural de l'espècie. El manteniment de llavors en bancs de germoplasma o d'individus vius en jardins botànics i vivers (conservació *ex situ*), són una eina imprescindible per la gestió de la biodiversitat (Font *et al.*, 2010; Bachetta *et al.*, 2008). A més, el coneixement de les tècniques de manipulació (germinació, transplantaments, etc.) poden permetre intervenir *in situ* en una estratègia integrada (Gradaille, 2001).

Els estudis de germinació de llavors, a més, són absolutament necessaris a l'hora de posar en pràctica un correcta gestió i conservació d'una espècie. El treball de camp que comporta, però, no sempre és fàcil de dur a terme a per causes diverses, com serien la dificultat de monitoritzar els diferents factors biòtics o abiòtics o problemes pràctics a l'hora de dur a terme aquest tipus d'experiments. Si bé els resultats dels estudis de germinació *ex situ* no són directament comparables amb la germinació al camp, poden donar informació orientativa útil i són una bona eina per a desenvolupar una correcta estratègia de conservació *ex situ*. Existeixen nombrosos estudis de germinació amb diferents espècies de *Silene* (com *S. diclinis* (Lag.) M. Laínz, Prentice (1976) o *S. regia* Sims (Menges & Dolan, 1998; Menges, 2000)), però els únics realitzats fins al moment amb *S. sennenii* es resumeixen a l'obra de Martinell (2010) i mostren unes elevades taxes de germinació, una taxa de supervivència diferent segons les condicions en què es va mantenir la plàntula una vegada havia germinat i uns requeriments de conservació poc exigents.

Els objectius del present estudi són:

- a) Determinar les condicions òptimes per la germinació de *S. sennenii*.
- b) Avaluar la supervivència a curt termini (1 – 3 anys) de les llavors.
- c) Establir les taxes de supervivència de les plantes en cultius *ex situ*.
- d) Determinar el període reproductiu en funció de les condicions ambientals.

2.2. Material i mètodes

2.2.1. Germinació de llavors

S'han posat a germinar un total de 215 llavors de diferents orígens i recol·lectades en diversos anys (Taula 5). Les llavors provenien de fruits madurs recol·lectats durant l'estiu al camp (a diferents poblacions) i al Viver de la Facultat de Farmàcia (UB). Un cop al laboratori, s'han extret les llavors, que han estat conservades en sobres de paper amb gel de sílice a temperatura ambient fins al moment de la sembra.

PROCEDÈNCIA	ANY RECOL·LECCIÓ	LLAVORS
Baseia	2007	25
	2008	24
Castell de Sant Ferran	2007	25
	2008	25
Far d'Empordà	2008	23
Riu Manol	2007	25
	2008	25
Viver Fac.Farmàcia	2009	43
TOTAL		215

Taula 5: Lloc d'origen, any de recol·lecció i nombre de llavors sembrades de *S. sennenii*.

Les llavors s'han posat a germinar la primera setmana de març de 2010 (onzena setmana de l'any) en plaques de Petri amb agar al 1% (Figura 7). En cada placa de Petri s'hi ha col·locat un màxim de 25 llavors. Per tant, les llavors provinents del Viver de la Facultat de Farmàcia (UB) s'han col·locat en dues plaques diferents. Totes les plaques s'han mantingut en condicions de laboratori (*room conditions*) d'entre 20 i 25 °C. Les llavors s'han observat un cop al dia a la lupa binocular (10x) durant els primers 5 dies, a més del quinzè dia. S'ha considerat que una llavor havia germinat a partir de l'emergència de la radícula (ISTA, 2006). A partir d'aquestes dades, s'han estudiat diferents paràmetres (detallats a continuació).

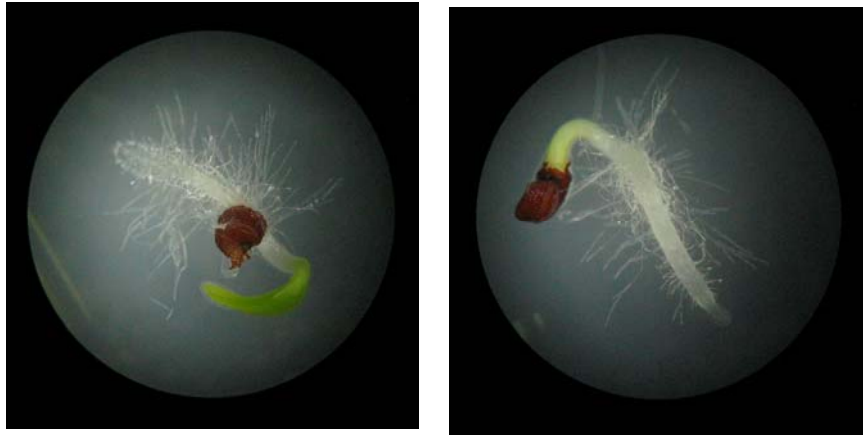


Figura 7: Dues llavors de *S. sennenii* als 2 dies d'haver germinat. [Fotografies S. Massó]

Els percentatges de germinació (G) es calculen per a cada rèplica i venen donats per la següent relació:

$$G = \frac{N_G}{N_T}$$

On:

N_G = nombre total de llavors germinades al final de l'assaig

N_T = nombre total de llavors sembrades

El retard germinatiu es defineix com el temps necessari (en dies) per observar la primera llavor germinada. El TMG (temps mitjà de germinació), es calcula determinant el nombre de llavors germinades cada dia i considerant el total de llavors germinades (Tompsett & Pritchard, 1998):

$$TMG = \frac{\sum n_i d_i}{N_G}$$

On:

n_i = nombre de llavors germinades el dia d .

d_i = nombre de dies des de l'inici del test de germinació.

N_G = nombre total de llavors germinades al final de l'assaig.

Les dades de percentatge de germinació han estat comparades mitjançant la prova de la χ^2 quadrat i s'ha fet ANOVA per avaluar les diferències en el TMG. Totes les anàlisis estadístiques s'han realitzat amb el programa Statgraphics Plus 5.1.

2.2.2. Cultiu *ex situ*

Les llavors germinades a les plaques de Petri (veure apartat 2.1) han estat traspassades a safates amb torba i perlita (3:1) i traslladades a l'hivernacle entre un i tres dies després d'haver germinat. Posteriorment, a principis d'abril (setzena i dissetena setmana de l'any), s'han transplantat a tests de 20 cm de diàmetre amb el mateix substrat. Un cop els individus han estat transplantats en test, s'han tret a l'exterior i s'ha mantingut una freqüència de reg de 2 a 3 cops per setmana, en funció de la temperatura i pluviositat de cada moment, sense controlar les condicions ambientals.

S'ha fet un seguiment setmanal de cada individu, apuntant l'estat en que aquest es trobava segons estigués en roseta basal (R); vara (V); poncella (P), a partir de que aparegués la primera poncella; flor (Fl), quan la primera flor de l'individu s'obre; i fruit (Fr), quan el primer fruit ja s'ha format.

A mode de comparació, s'han inclòs en l'estudi dades equivalents de plantes cultivades durant l'any 2009, (M.C. Martinell, dades inèdites); aquests individus es van posar a germinar en plaques amb agar al març de 2009 i es van transplantar la primera setmana d'abril (setzena setmana de l'any). La freqüència i la quantitat de reg ha estat aproximadament la mateixa tots dos anys.

Per explicar les possibles diferències fenològiques entre 2009 i 2010, s'han fet servir dades climàtiques preses de l'Estació Meteorològica Automàtica (EMA) de Barcelona – Zona Universitària (X8), situada a 1,5 km al sud-oest del Viver de la Facultat de Farmàcia (UB) (Figura 8), obtingudes gràcies al Servei Meteorològic de Catalunya.



Figura 8: Situació de l'EMA Barcelona – Zona Universitària (A) en relació amb el Viver de la Facultat de Farmàcia de la UB (B). [Fotografies: (A), Servei Meteorològic de Catalunya; (B), S. Massó; imatge de fons, ICC]

Les dades estudiades corresponen als registres diaris de dos períodes de temps diferents. El primer període correspon a l'interval entre l'1 de maig de 2009 i el 30 de setembre de 2009, mentre que el segon període correspon a l'interval entre l'1 de maig de 2010 i el 30 de setembre de 2010. Els paràmetres considerats són la temperatura màxima, mínima i mitjana, la precipitació acumulada i la humitat relativa mitjana.

2.3. Resultats i discussió

2.3.1 Germinació de llavors

De les 215 llavors sembrades, 187 (86,98% del total) havien germinat al cap de 5 dies (Taula 6). L'observació es va allargar 10 dies més, fins arribar al quinzè dia, encara que únicament van germinar 3 llavors més, arribant a un total de 190 llavors germinades (88,37% del total). Per aquest motiu, s'han pres les dades al dia 5 pel càlcul del TMG si bé per a les anàlisis estadístiques dels altres paràmetres s'han pres les dades del dia 15.

LLOC i ANY	N	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 15
BAS2007 **	25	0 0,00%	15 60,00%	15 60,00%	15 60,00%	15 60,00%	15 60,00%
CSF2007	25	0 0,00%	9 36,00%	21 84,00%	24 96,00%	25 100,00%	25 100,00%
RMA2007	25	0 0,00%	7 28,00%	15 60,00%	16 64,00%	18 72,00%	21 84,00%
BAS2008	24	0 0,00%	19 79,17%	24 100,00%	24 100,00%	24 100,00%	24 100,00%
CSF2008	25	6 24,00%	25 100,00%	25 100,00%	25 100,00%	25 100,00%	25 100,00%
FEM2008	23	0 0,00%	20 86,96%	22 95,65%	22 95,65%	22 95,65%	22 95,65%
RMA2008	25	1 4,00%	23 92,00%	23 92,00%	23 92,00%	23 92,00%	23 92,00%
Viver2009	43	8 18,60%	31 72,09%	34 79,07%	35 81,40%	35 81,40%	35 81,40%
TOTAL	215	15 6,98%	149 69,30%	179 83,26%	184 85,58%	187 86,98%	190 88,37%

Taula 6: Nombre (N_G) i percentatge de llavors germinades (G) per placa. Amb dos asteriscs la població amb uns valors estadísticament diferents.

Els percentatges de germinació (G, Taula 6) són més elevats per a les mostres procedents del Castell de Sant Ferran (CSF) i, per anys, les del 2008 són les que han germinat en més nombre. Es poden observar diferències significatives tan sols en BAS2007 (*Xi quadrat*, $X = 33,33$, $p = 0,00$) on han germinat només el 60% de les llavors. Aquestes diferències poden venir donades, probablement, per una baixa qualitat de la mostra, ja sigui per problemes de les llavors d'aquesta població aquest any en concret o per problemes de mostratge (recol·lecció tardana, fruits poc madurs, etc.). La resta de mostres no presenten diferències significatives.

Resumint les dades de la Taula 6 en anys de recol·lecció (Taula 7) es pot observar, tal i com s'intuïa en la Taula 6, com la germinació al 2008 és

estadísticament més elevada que els altres dos anys, amb un 96,91% de llavors germinades (*Xi quadrat*, $X = 12,54$, $p = 0,0019$). Les llavors dels anys 2007 i 2009 tenen un percentatge de germinació pràcticament idèntic de 81,33% i 81,40% respectivament, cosa que ens permet afirmar que les llavors de *S. sennenii* es poden conservar en *room conditions* durant, com a mínim, tres anys sense que s'observin davallades en la capacitat germinativa. A més, també podem considerar les llavors d'aquesta espècie com ortodoxes, ja que no tenen requeriments especials a l'hora de germinar. Seria interessant seguir treballant en la capacitat germinativa de les llavors de *S. sennenii* al llarg del temps, ja que d'aquesta manera es podria realitzar un protocol de conservació de les llavors d'aquesta espècie molt més acurat i es comprovaria la viabilitat de la conservació a llarg llarg terme.

ANY	N	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 15
2007	75	0,00%	41,33%	68,00%	73,33%	77,33%	81,33%
2008 **	97	7,22%	89,69%	96,91%	96,91%	96,91%	96,91%
2009	43	18,60%	72,09%	79,07%	81,40%	81,40%	81,40%
TOTAL	215	6,98%	69,30%	83,26%	85,58%	86,98%	88,37%

Taula 7: Percentatges de germinació de les llavors (G) segons l'any de recol·lecció. Amb dos asteriscs l'any amb uns valors estadísticament diferents.

Si s'agrupen per localitat d'origen de les llavors (Taula 8) i deixant fora de les anàlisis estadístiques les llavors de provinents de Baseia (BAS), a causa de la baixa qualitat abans comentada, i del Viver de la Facultat de Farmàcia, al ser una població completament artificial, veiem que existeixen diferències significatives únicament en la població del Riu Manol (RMA) (*Xi quadrat*, $X = 6,80$, $p = 0,0333$), on el percentatge de germinació (88,00%) és menor. Per la seva banda, la població artificial del viver té una taxa de germinació molt més baixa que qualsevol de les naturals excepte Baseia, cosa que podria indicar que l'època en que es recol·lecten els fruits pot afectar al percentatge de germinació. Cal seguir experimentant en aquest sentit per tal de confirmar aquestes diferències i esbrinar-ne les causes.

LOCALITAT	N	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 15
BAS	49	0,00%	69,39%	79,59%	79,59%	79,59%	79,59%
CSF	50	12,00%	68,00%	92,00%	98,00%	100,00%	100,00%
FEM	23	0,00%	86,96%	95,65%	95,65%	95,65%	95,65%
RMA	50	2,00%	60,00%	76,00%	78,00%	82,00%	88,00%
Viver	43	18,60%	72,09%	79,07%	81,40%	81,40%	81,40%
TOTAL	215	6,98%	69,30%	83,26%	85,58%	86,98%	88,37%

Taula 8: Percentatges de germinació de les llavors (G) segons la localitat d'origen.

El valor TMG permet comparar els resultats obtinguts en llavors testades just després de la recolecció i després de diversos anys de conservació (Bacchetta *et al.* 2008). En els nostres experiments, el valor de TMG mitjà és de 2,18 dies. Considerant la variabilitat en el temps, però, s'observa que aquest valor va incrementant a mesura que l'edat de la llavor augmenta (Taula 9), tot presentant diferències significatives entre anys (ANOVA, $p = 0,0000$). El TMG no depèn només de les característiques de l'espècie, sino també de l'estat d'envelliment de les llavors. Els resultats del TMG van lligats a l'increment del retard germinatiu, que també és major a mesura que l'edat de la llavor és més gran i a la disminució de la velocitat de germinació (Figura 9) en aquelles llavors de més edat. No sembla probable que les llavors dels anys 2008 i 2009 germinin en més nombre si s'allarga la durada de l'experiment, ja que el gràfic mostra que s'assoleix l'asíptota al cinquè dia (Figura 9). En canvi, les de l'any 2007 encara podrien seguir germinant, tal i com mostra la Taula 6 on al quinze dia han germinat 3 llavors més. Podem concloure, per tant, que les llavors de *S. sennenii* tarden més en germinar a mesura que envelleixen, encara que seria bo prosseguir amb aquesta sèrie d'experiments per tal d'afinar en aquesta conclusió i assegurar-ne la conservació a més llarg termini. Per altra banda, l'emmagatzematge a baixa temperatura de les llavors, habitual en bancs de germoplasma, podria evitar el retard en la germinació associat a l'envelliment. Aquesta hipòtesi, però, caldria testar-la en un futur.

ANY	TMG	RETARD
2007	2,53	2
2008	2	1
2009	1,91	1

Taula 9: Temps mitjà de germinació (TMG) i retard germinatiu (en dies) segons l'any de recol·lecció de les llavors

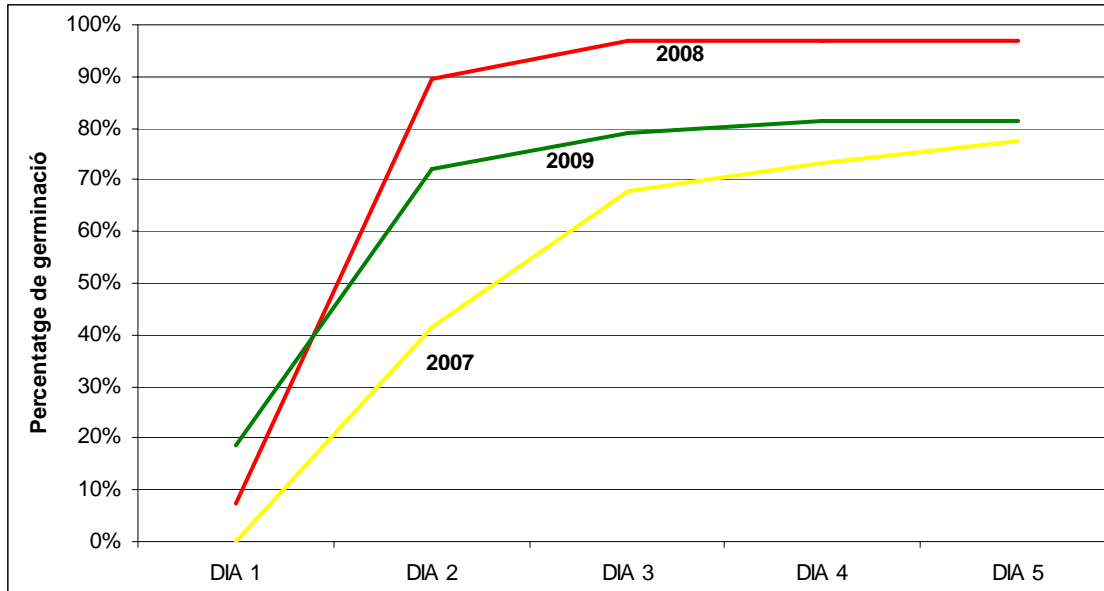


Figura 9: Percentatge de germinació al llarg dels 5 primers dies des de la sembra segons l'any de recol·lecció de la llavor.

Pel que fa a possibles implicacions en condicions naturals és difícil arribar a una conclusió, ja que les observacions de camp indiquen que els individus rebroten d'un any a l'altre i que el reclutament mitjançant noves germinacions és escàs en no haver-se trobat plàntules al camp. Donat que al laboratori ja s'ha comprovat que les llavors de *S. sennenii* germinen amb un percentatge superior al 80%, el fet de no haver trobat plàntules al camp es pot deure a altres factors que no siguin les llavors, com podrien ser climàtics o possibles al·lelopaties. De tota manera, i a causa de la longevitat dels individus, la supervivència al camp no sembla dependre de la germinació en condicions de normalitat (en un any molt dolent, o per una plaga o un incendi, sí que podria ser determinant). Encara que germinessin poques llavors o sobrevisquessin poques plàntules al camp seria suficient per tal de mantenir la població, mentre que el reclutament de nous individus podria ser episòdic i les llavors germinarien ràpidament en condicions favorables.

2.3.2. Cultiu *ex situ*

De les 190 llavors que van germinar es van transplantar en tests un total de 153, ja que 37 plàntules van morir mentre estaven en les safates dins l'hivernacle. Això implica una supervivència del 80,5%, molt proper al 80,6% dels estudis de Martinell (2010), realitzats en condicions experimentals equivalents.

Dels 153 individus seguits, un total de 111 (72,55%) van sortir de l'estat vegetatiu, formant almenys una vara florífera, encara que tan sols 28 van produir flors (18,30% del total). Aquest valor està molt allunyat dels trobats per Martinell (2010) en les mateixes èpoques de l'any: 70,6% i 80,6% de floració en 2008 i 2009 respectivament.

La comparació de la fenologia entre els anys 2009 i 2010 (Taula 10) reflecteix un important retard d'entre 5 i 8 setmanes en el segon any, tant en el desenvolupament de l'individu com en el període de floració. Això és degut, molt probablement, a les diferents condicions meteorològiques entre els dos anys.

	2009	2010
50% dels individus ja formen vares	21	26
Primera poncella	25	33
Primera flor	26	33
Primer fruit	27	34

Taula 10: Comparació del temps necessari des de la germinació (en setmanes de l'any) per assolir cada fase entre els anys 2009 i 2010.

Si ens centrem en la relació entre la temperatura i la fenologia (Figura 10 i Figura 11), s'observa que l'any 2009 la floració es va produir uns 40 dies després de sobrepassar la temperatura de 20°C. Al 2010 aquesta xifra és força similar. Igualment, pel que fa a les temperatures mínimes, en tots dos anys *S. sennenii* va florir aproximadament 40 dies després de sobrepassar la mínima de 15°C. Sembla, per tant, que *S. sennenii* necessitaria una temperatura superior als 20°C per tal d'iniciar el cicle de floració.

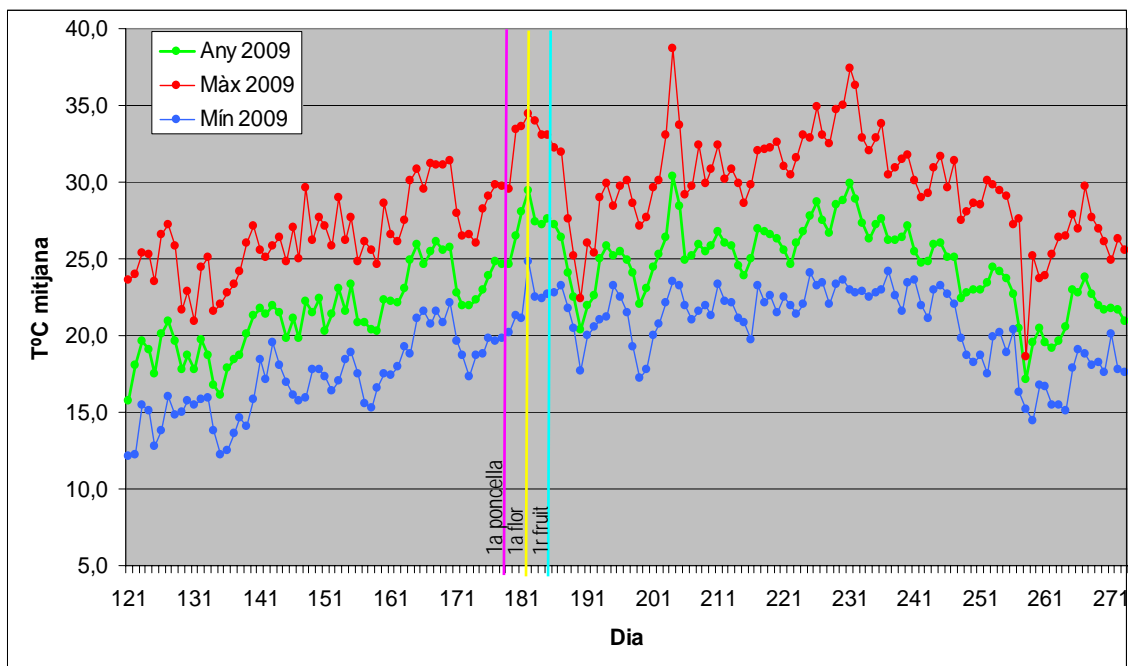


Figura 10: Evolució de les temperatures del període comprès entre l'1 de maig de 2009 (dia 121) i el 30 de setembre de 2009 (dia 271). Les línies verticals indiquen els dies (± 1 dia) de l'aparició de la primera poncella (color lila), l'obertura de la primera flor (color groc) i l'aparició del primer fruit (color blau). Les dades de temperatura han estat servides pel Servei Meteorològic de Catalunya.

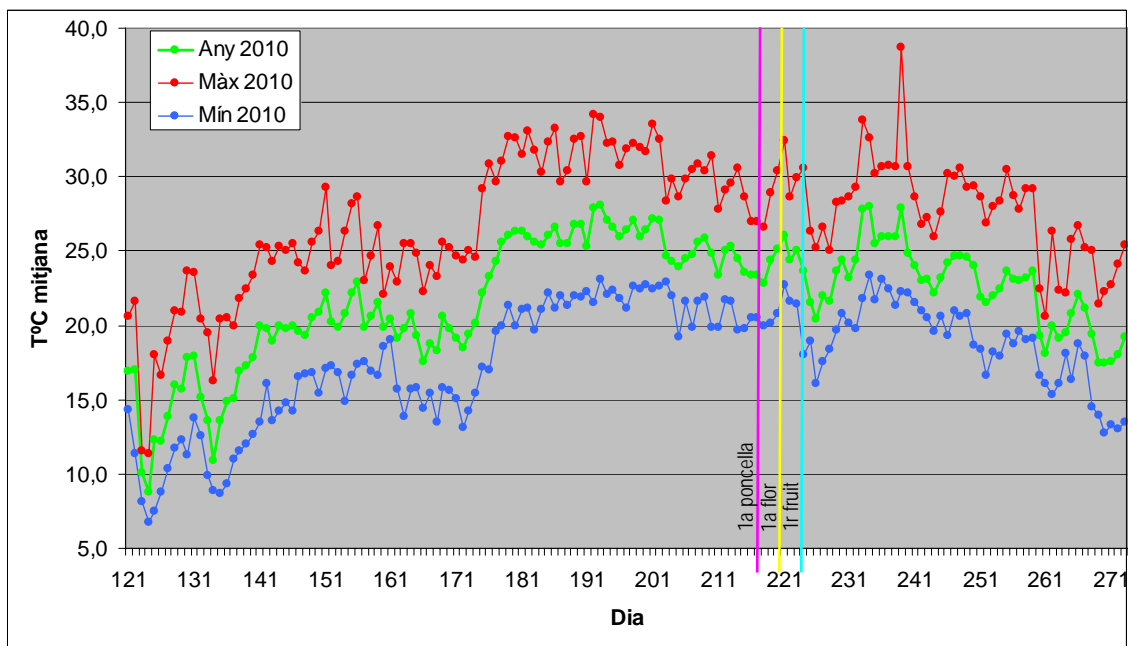


Figura 11: Evolució de les temperatures del període comprès entre l'1 de maig de 2010 (dia 121) i el 30 de setembre de 2010 (dia 271). Les línies verticals marquen els dies (± 1 dia) de l'aparició de la primera poncella (color lila), l'obertura de la primera flor (color groc) i l'aparició del primer fruit (color blau). Les dades de temperatura han estat servides pel Servei Meteorològic de Catalunya.

Les dues figures anteriors (Figura 10 i Figura 11) mostren un pic de temperatura màxima de 38,7°C el 27 d'agost de 2010 i el 23 de juliol de 2009, respectivament. El 2010 van morir 21 individus (18,26% dels individus vius en aquell moment) entre el 27 d'agost i el 6 de setembre. De tota manera, aquests individus van rebrotar al cap de pocs dies i alguns van realitzar una segona floració a mitjans d'octubre (Figura 12). Dels individus del 2009, però, no se'n tenen dades de rebrot.

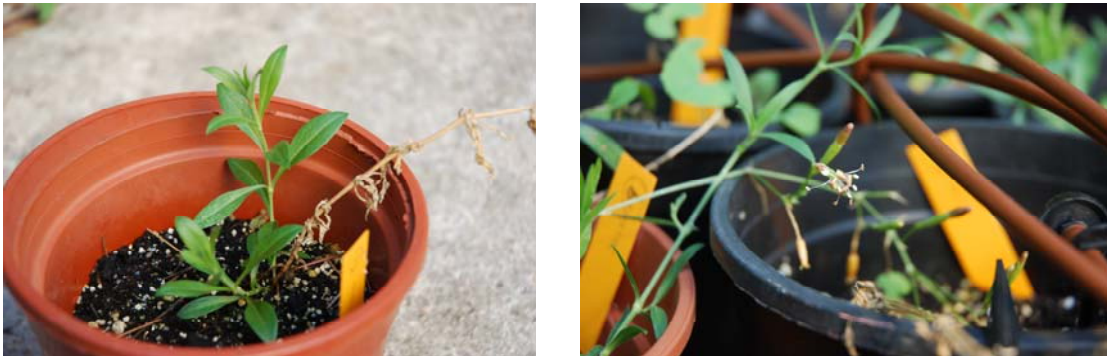


Figura 12: Rebrot de *S. sennenii* després del cop de calor del 27 d'agost de 2010 (esquerra) i segona floració d'un individu rebrotat (dreta) el 15 d'octubre de 2010 [Fotografies: S. Massó].

Les dades de pluviometria i les dades de humitat relativa no semblen guardar relació amb la fenologia i supervivència de les plantes de *S. sennenii* al viver. De les dades climàtiques, per tant, en podem treure dues conclusions força clares. La primera és que tant la floració com la mortalitat depenen de la temperatura. És a dir, que és necessària una temperatura mínima que iniciï el període de floració però que si se sobrepassa una temperatura màxima l'individu s'asseca. L'altra conclusió que podem extreure'n és que un cop iniciada la floració, aquesta perdura fins la mort de l'individu. De fet, s'han observat individus en floració, al viver, fins al mes de novembre, mentre que al camp no s'observen individus madurs en aquesta época.

2.4. Conclusions

1. Les llavors de *S. sennenii* tenen un èxit germinatiu superior al 80% com a mínim els 3 primers anys posteriors a la seva recol·lecció. Tot i això, la velocitat de germinació va disminuint mica en mica a mesura que envelleixen, cosa que podria condicionar la seva conservació a llarg terme en bancs de germoplasma.
2. Aquest estudi corrobora els resultats de Martinell (2010) de supervivència dels individus en viver, que han resultat satisfactoris. No obstant això, la fenologia ha resultat ser força variable, en relació amb les condicions climàtiques, tot i que caldria seguir realitzant estudis en aquest camp per tal d'obtenir resultats més clars.

A la vista dels resultats obtinguts en aquest treball, es proposa un protocol inicial per la conservació de *S. sennenii* en bancs de germoplasma i cultiu, tot i que serien necessaris alguns estudis complementaris. Una proposta de model de conservació i de germinació de les llavors de *S. sennenii* consistiria en recollir fruits madurs i conservar-los en sobres de paper amb gel de sílice. Experimentalment s'ha comprovat que les llavors són viables un mínim de tres anys. Per tal de germinar aquestes llavors es pot seguir el següent protocol:

1. Es col·loquen les llavors en plaques de Petri amb agar a l'1% a una temperatura d'entre 20 i 25°C.
2. Entre 1 i 3 dies després de germinar, es traspassen les plàntules en safates amb torba i perlita (3:1) i es mantenen en viver.
3. A les cinc o sis setmanes es poden començar a transplantar a tests de 20 cm de diàmetre amb el mateix substrat i treure'ls a l'exterior.
4. La baixa supervivència entre el primer i segon estiu recomanaria trasplantar els individus a recipients més grans durant la fase de repòs del seu primer hivern.

Com a propostes de futurs treballs amb *Silene sennenii* caldria estudiar si la viabilitat de les llavors és superior als 3 anys. També seria una bona tasca el fet de estudiar com disminueixen la velocitat de germinació i el retard germinatiu en el temps i en funció de les condicions de conservació de les llavors.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- 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.
- Bolòs, O. & Vigo, J., 1984. **Flora dels Països Catalans**. Barcino, Barcelona.
- Chater, O. & Walters, S.M., 1964. **Silene L.** In: Tutin, T.G.; Heywood, V.H.; Burges, N.A.; Moore, D.M.; Valentine, D.H.; Walters, S.M. & Webb, D.A. (eds.). *Flora Europaea*. Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 158-181.
- Côme, D., 1970. **Les obstacles à la germination**. Masson & CIE, Paris.
- Dafni, A., Pacini, E. & Nepi, M., 2005. **Pollen and stigma biology**. In: Dafni, A., Kevan, P. G. & Husband, B. C. (eds.). *Practical pollination biology*. Enviroquest, Ltd., Cambridge (Ontario, Canada). pp. 83-146.
- DOGC, 2008. **Decret 172/2008, de 26 d'agost, de creació del Catàleg de flora amenaçada de Catalunya**. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya 5204: 65881-65895.
- Font, J.; Canalias, F.; Rosselló, J.; Colom, A.; Gifre, C.; Pujol, X. & Sala, E., 2010. **Estratègia catalana de conservació ex situ de la flora vascular**. In: López-Pujol, J.; Montserrat, J.M. & Susanna, A. (eds.) *Llibre de resums de les II Jornades Catalanes de Conservació de Flora*. Barcelona.
- Gradaille, J. Ll., 2001: **Integración de métodos in situ y ex situ en la conservación de la flora balear**. In: Gómez-Campo, C. (ed.), *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental. Una perspectiva de fin de siglo*. Fundación Ramón Areces, Madrid: 175-197.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W., 1990. **Allozyme diversity in plant species**. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. & Weir, B.S. (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland (MA, USA): 43-63.
- Jeanmonod, D., 1984: **Révision de la section Siphonomorpha Otth du genre Silene L. (Caryophyllaceae) en Méditerranée occidentale. IV: Species caeterae**. *Candollea*, 40: 5-34.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W., 1993: **Techniques for pollination biologists**. University Press of Colorado, Niwot (CO, USA)..
- ISTA, 2006. **International rules for seed testing**. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland.
- López-Pujol, J.; Font, J.; Simon, J. & Blanché, C., 2007. **Can the preservation of historical relicts permit the conservation of the endangered plant species? The case of Silene sennenii (Caryophyllaceae)**. *Conservation Genetics*, 8: 903-912.
- López-Pujol, J.; Bosch, M.; Simon, J. & Blanché, C., 2008. **Diversitat isoenzimàtica de la flora vascular silvestre dels Països Catalans**. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*. 74: 5-28.
- Malagarriga, R., 1976. **Catálogo de las plantas superiores del Alt Empordà**. *Acta Phytotaxonomica Barcinonensia*, 18: 1-146.

- Martinell, M.C., 2010. **Biología de la conservación de especies amenazadas de área de distribución restringida en Cataluña.** Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Martinell, M.C.; Dötterl, S.; Blanché, C.; Rovira, A.; Massó, S. & Bosch, M., (2010) **Nocturnal pollination of the endemic *Silene sennenii* (Caryophyllaceae): as endangered mutualism?** *Plant Ecology*, 211 (1): 203-218.
- Menges, E.S., 2000. **Population viability analyses in plants: challenges and opportunities.** *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 51-56.
- Menges, E.S. & Dolan, R.W., 1998. **Demographic viability of populations of *Silene regia* in midwestern prairies: relationships with fire management, genetic variation, geographic location, population size and isolation.** *Journal of Ecology (Oxford)*, 86: 63-78.
- Pau, C., 1905. **Plantes observées dans l'Ampourdan (surtout aux environs de Figueras) pendant l'année 1905 par le frère Sennen.** *Boletín de la Sociedad Aragonesa de Ciencias Naturales*, 4: 303-332.
- Prentice, H.C., 1976. **A study in endemism: *Silene diclinis*.** *Biological conservation*, 10: 15-30.
- Sáez, L.; Aymerich, P. & Blanché, C., 2010. **Llibre vermell de les plantes vasculars endèmiques i amenaçades de Catalunya.** Argania Edicions, Barcelona
- Simon, J. & Blanché, C. 2010. **Mòdul CromoCat. Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya i Universitat de Barcelona.** [<http://biodiver.bio.ub.es/biocat/homepage.html>].
- Talavera, S., 1990. ***Silene* L.** In: Castroviejo, S. (Ed.). *Flora iberica*. Real Jardín Botánico de Madrid, Madrid, pp. 313-406.
- Tompsett, P.B. & Pritchard, H.W., 1998. **The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanus* L. seed.** *Annals of Botany*, 82: 249-261.
- UICN, 2001. **Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1.** Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN., Gland, Suiza & Cambridge, Reino Unido.