

# Trabajo Fin de Grado

## Grado en Ciencias Ambientales

Efectos sobre la germinación de *Thymus vulgaris* (Linneo, 1753) y *Thymus zygis* subsp *gracilis* (Linneo, 1753) de tratamientos de hidratación y secado para la aplicación en restauración ecológica

Effects on germination of *Thymus vulgaris* (Linneo, 1753) and *Thymus zygis* subsp *gracilis* (Linneo, 1753) of hydration and drying treatments for application in ecological restoration

Marcos Encabo Casao

Jaume Tormo Blanes

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

2023



## Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	<b>7</b>
1.1 Restauración ecológica .....	7
1.1 Thymus vulgaris y Thymus zygis gracilis.....	8
1.2 Estudios previos.....	10
1.3 El proceso de germinación de semillas.....	10
<b>2. Material y método</b> .....	<b>11</b>
2.1 Área de estudio .....	11
2.2 Selección de especies y procedencia del material vegetal.....	11
2.3 Diseño experimental.....	12
2.3.1 Variables de germinación .....	13
2.3.2 Análisis estadístico .....	14
<b>3. Resultados</b> .....	<b>15</b>
3.1 Resultados para <i>Thymus vulgaris</i> .....	15
3.1.1 Resultados análisis estadísticos .....	16
3.1.2 Análisis tratamiento a tratamiento .....	17
3.2 Resultados para <i>Thymus zygis gracilis</i> .....	25
3.2.1 Análisis del grupo de control .....	25
3.3 Comparación entre <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis gracilis</i> .....	27
3.3.1 Comparación entre los controles de <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis gracilis</i> .....	27
<b>4. Discusión</b> .....	<b>28</b>
4.1 Problemas de vulgaris para la germinación .....	28
4.2 Comparación con otros experimentos.....	29
4.3 Comparación de grupos de control .....	29
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>31</b>
<b>6. Recomendaciones</b> .....	<b>32</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>34</b>
7.1 <b>Anexo 1.</b> Tablas de anotación de germinaciones .....	34
7.2 <b>ANEXO II.</b> Tablas resultados análisis estadísticos .....	36
7.3 <b>ANEXO III.</b> Gráficos de germinación .....	40
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>47</b>



## Resumen

El género *Thymus* comprende unas 220 especies repartidas por el entorno euroasiático. Son especies que, debido a su adaptación a ambientes de fuerte estrés hídrico, su gran capacidad de asilvestramiento y las características de su hábitat se usan de forma recurrente en restauración ecológica. Con este trabajo se pretende encontrar y estudiar variables desconocidas de la ecología y el comportamiento durante la germinación de *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* subsp *gracilis*. En este trabajo, se va a estudiar cómo encontrar el punto exacto donde la semilla hidratada pueda ser expuesta a una desecación total sin morir, las diferencias entre *T. vulgaris* y *T. zygis* durante la germinación y determinar si los tratamientos propuestos tienen efecto *priming* sobre las semillas. Para ello se ha desarrollado un experimento en laboratorio con diferentes tiempos de hidratación (desde 1 día hasta 9 días) seguidos de la interrupción del proceso germinativo sometiéndolas a un secado, viendo así hasta qué punto había avanzado la germinación y si esta puede reanudarse tras la desecación.

Los resultados para *T. zygis gracilis* no han sido los esperados, pues la mayoría de las semillas germinaron antes de la aplicación del secado. Para *T. vulgaris* se ha encontrado que el punto de no retorno se estima en los 10 – 11 días. Comparando resultados en laboratorio se ha llegado a la conclusión de que *T. zygis gracilis* es más apta para la restauración ecológica si buscamos una germinación rápida.

**Palabras clave:** Género *Thymus*, tratamientos hidratación, restauración ecológica, germinación.

## Abstract

The genus *Thymus* comprises about 220 species distributed throughout the Eurasian environment. Due to its adaptation to environments of high-water stress, its great capacity for feral growth and the characteristics of its habitat, the use of this genus is recurrent for ecological restoration. This work aims to find and study unknown variables of the ecology and behavior during germination of *Thymus vulgaris* and *Thymus zygis* subsp *gracilis*. So far, studies of hydration and dehydration cycles, known as pre-sowing treatments in which priming, is included, have been carried out. However, questions such as finding the exact point where the hydrated seed can be exposed to total desiccation without dying and can reactivate germination processes, understanding the significant differences between *T. vulgaris* and *T. zygis* during germination and determining whether the proposed treatments have priming effect on seeds with respect to germination speed and rate. For this purpose, a laboratory experiment was

developed with different treatment levels (from level 1 to 5, being level 5 the one with more days of exposure to continuous hydration), whereby seeds with continuous hydration underwent an interruption in the germination process by subjecting them to drying, to see to what extent they can reform germination.

Unfortunately, the results for *T. zygis gracilis* have not been as expected since most of the seeds germinated before the application of the treatments. For *T. vulgaris* it has been found that the point of no return is estimated at 10 - 11 days. Comparing laboratory results, it has been concluded that *T. vulgaris* is more suitable for ecological restoration if we are looking for a rapid formation of vegetation cover, these results should be verified in the field. Another conclusion to highlight from this work is that seeds collected in the field and in cultivation do not behave in the same way, so when carrying out research to compare two species it is advisable that both come from the same type of production system.

**Keywords;** genus *Thymus*, hydration treatments, ecological restoration, germination.

# 1. Introducción

## 1.1 Restauración ecológica

La degradación y destrucción de los ecosistemas acelera la crisis ambiental disminuyendo la provisión de servicios ambientales (Ríos & Sc, 2011) que son los servicios que proporciona la naturaleza a la sociedad y que otorga las condiciones para una vida saludable y segura (The Board of the millenium ecosystem assessment, 2005). En climas mediterráneos, la regeneración natural de especies leñosas en zonas degradadas está muy limitada, debido a las condiciones ambientales, siendo el stress hídrico el principal factor limitante (García-Fayos 2020). Esta limitación se ve incrementada, especialmente en ambientes mineros donde las propiedades del suelo son muy limitantes (Jorba et al., 2010). Las escasas plántulas se encuentran generalmente protegidas por plantas nodrizas ante herbívoros y condiciones abióticas adversas (Jordano et al., 2002).

Más allá del clima, otro factor limitante en ambientes mineros es la erosión. Por ello, la restauración en ambientes mineros debe priorizar la revegetación, ya que existe una relación entre la escorrentía y la vegetación presente en laderas erosionadas. Una cubierta vegetal óptima aumenta el agua retenida por la vegetación y disminuye la escorrentía y por tanto la erosión (Merino-Martín et al., 2012).

En zonas degradadas de clima mediterráneo la introducción de especies arbustivas adaptadas a condiciones de sequía como *Rosmarinus officinalis*, *Brachypodium retusum* o *Thymus vulgaris* puede suponer una mejora (Cortina et al., 2004). En concreto, en ambientes mineros, caméfitos como *Thymus vulgaris* o *Santolina chamaecyparissus* colonizan zonas degradadas de forma espontánea y tienen un papel clave en el control de la erosión (Merino-Martín et al., 2012). En climas mediterráneos, el uso de matorrales como especies nodriza en las repoblaciones mejora la supervivencia de plántulas sin reducir su crecimiento y presenta ventajas económicas y ecológicas (Castro et al., 2002). Esta técnica puede emplearse también en ambientes mineros donde se ha demostrado que algunas especies de arbustivas mejoran el establecimiento de *Quercus ilex* (Vicente et al 2022).

Las especies nodrizas sirven como refugio para las plántulas de especies leñosas en su fase de desarrollo más joven. La presencia de estas especies reduce la radiación solar en micrositios, como consecuencia la temperatura es menor y por tanto la demanda de evaporación disminuye

(Valiente-Banuet & Ezcurra, 1991). En conclusión, mejoran el estado hídrico de las especies de sotobosque (Wied & Galen, 1998).

Los investigadores del Área de Ecología, José Manuel Nicolau y Jaume Tormo trabajan actualmente en los proyectos TECMINE (LIFE 16ENV/ES/000159/TECMINE) y RIBERMINE (LIFE18 ENV/ES/000181) en restauración minera en el Alto Tajo y Teruel respectivamente. Ambos proyectos tienen un objetivo común, mejorar las técnicas disponibles para la restauración minera. LIFE TECMINE es un proyecto cuyo objetivo general es mejorar las actividades de restauración minera en zonas forestales mediante el ensayo de técnicas de restauración innovadoras y replicables. Uno de los problemas a resolver en este proyecto es la baja biodiversidad y falta de cobertura vegetal. Por otro lado, el proyecto LIFE RIBERMINE tiene como principal objetivo construir paisajes con una estructura que reproduzca geoformas, suelos y estructuras vegetales dinámicamente estables. En ambos proyectos se ha utilizado y se plantea la utilización para un futuro de *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis gracilis* que potencialmente podrían actuar como especies nodriza ya que modifican las condiciones ambientales en las laderas mineras (Merino-Martín et al. 2012). Pero el uso de estas especies resulta complicado porque se desconoce la ecología de germinación de estas y en restauración ecológica unos de los problemas más relevantes es el desconocimiento del comportamiento de muchas especies mediterráneas potencialmente útiles (Jorba et al., 2010).

### 1.1 *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis gracilis*

El género *Thymus* comprende unas 220 especies repartidas por el entorno euroasiático (Morales, 2010). En concreto, *T. vulgaris* es la especie con la distribución más amplia en la mitad oriental de la Península Ibérica. Esta amplia distribución es debida a su adaptación a ambientes de fuerte estrés hídrico (Belmonte & López, 2003), su gran capacidad de asilvestramiento y las características de su hábitat. Puede habitar en sustratos básicos como calizas, margas y terrenos yesíferos alcanzando cotas desde el nivel del mar hasta 2400 metros de altitud (Ferrer-gallego et al., 2013). *T. vulgaris* es el más cultivado en todo el mundo, en España el tamaño y distribución de las poblaciones varía dependiendo del sustrato y de la disponibilidad de agua (Morales, 2010). Por otro lado, *T. zygis gracilis* se distribuye por el sureste de la Península Ibérica y el norte de África desde los 20 hasta los 2030 m de altitud, ocupando matorrales altos o degradados, sotobosque de encinares y pinares costeros. Además puede crecer en sustratos calizos más o menos pedregosos, margas, esquistos micacíticos en suelos arenosos y en ocasiones en sustratos



ácidos (Salas et al., 2014). Tanto por su capacidad de adaptación, su variedad de hábitats y su abundante presencia en clima mediterráneo continental las especies del género *Thymus* son buenos colonizadores y por tanto especies recurrentes en la restauración ecológica en clima mediterráneo continental (Parra et al., 2019).

Hasta donde sabemos, y según la información bibliográfica consultada, se desconocen detalles sobre la ecología de germinación de *T. vulgaris* y *T. zygis gracilis*. Para poder usar estas especies en restauración de ecosistemas necesitamos conocer la ecología de su germinación, tanto para su producción en vivero como para su siembra en campo. Pero, detalles como la velocidad de germinación y la duración de las distintas fases de la germinación son desconocidas. Datos como los mencionados previamente son importantes para poder planificar revegetaciones en zonas mediterráneas continentales que pueden verse afectados por una acentuación del estrés hídrico y por un incremento de la aridez debido al cambio climático (Gil & López, 2011). También se desconocen las posibilidades de usar algunas técnicas presiembra como el priming que, en caso de funcionar, mejorarían tanto la producción en vivero como las siembras. El priming es una técnica aplicada previa a la siembra que consiste en hidratar parcialmente la semillas evitando que estas desarrollen la radícula para que no se complete el ciclo germinativo (Chen & Arora, 2013). Esta técnica puede conseguir que la semilla germine en condiciones de potencial hídrico reducido además de acortar el tiempo de germinación (Bradford, 2022). Casenave y Toselli (2007) determinaron que la aplicación de hydropriming (una técnica que consiste en hidratar las semillas en agua caliente o fría antes de la siembra) mejora los porcentajes de germinación y el vigor en condiciones de estrés hídrico y térmico en semillas de algodón. Las técnicas de priming se agrupan en dos categorías en función de si la absorción es controlada o no controlada. La absorción no controlada incluye aquellos tratamientos donde la disponibilidad de agua no es el factor limitante (Taylor et al., 1998).

Estas técnicas son utilizadas en agricultura, sin embargo, apenas se utilizan para semillas de plantas silvestres a pesar de los beneficios que pueden tener dichos tratamientos para mejorar la efectividad de las siembras en restauración ecológica (Pedrini et al., 2020).

## 1.2 Estudios previos

Hegarty (1978) realizó una revisión sobre la fisiología de la hidratación de las semillas y la relación entre el estrés hídrico y el control de la germinación. La conclusión de este trabajo reflejó que, en función del contenido de humedad de la semilla, se producen varios procesos fisiológicos, tanto el metabolismo como el deterioro de las semillas aumentan con el contenido de agua.

Más adelante, Vertucci (Vertucci, 1989) investigó la cinética de la imbibición de las semillas. Los resultados de este trabajo fueron: la imbibición de las semillas depende de las propiedades de la propia semilla y de las condiciones ambientales, la velocidad de entrada de agua es determinante para el éxito de la germinación ya que si es demasiado lenta la germinación de un lote se reduce, pero si es muy rápida la semilla sufre daños irreversibles.

Los efectos del estrés provocados por la salinidad y la sequía en *Thymus daenesis* y *Thymus kotschyanus* reduce las tasas de germinación en ambas especies (Ghorbanpour et al., 2011). De hecho, se puede detener la germinación de *Thymus maroccanus* y *Thymus broussonetii* a altas temperaturas y baja disponibilidad de agua (Abbad et al., 2011).

## 1.3 El proceso de germinación de semillas

La germinación de las semillas comienza con la absorción de agua y termina cuando el embrión crece con la fuerza suficiente para romper cualquier cubierta embrionaria (Koller et al., 1961). La germinación es considerada como la etapa más crítica en el ciclo de vida de las plantas debido a la elevada posibilidad de contraer enfermedades, aparición de hongos y el estrés hídrico y ambiental (Rajjou et al., 2012). En 1992 el experimento realizado por Taylor et al. (1992) concluyó que este proceso de absorción de agua puede ser dividido en 3 fases: imbibición (fase 1), absorción retardada (fase 2) y aparición de la radícula (fase 3) y que las semillas son tolerantes a la desecación durante las dos primeras fases, si esta desecación se produce durante la última fase la semilla muere ya que se han activado procesos metabólicos irreversibles, a lo que nos referimos como punto de no retorno. Más adelante Rajjou et al. (2012) determinó que el proceso germinativo se puede detener en condiciones de déficit hídrico, concluyendo que la germinación se puede retomar si se detiene antes de la fase 3.

En nuestro estudio la absorción no es controlada debido a que la disponibilidad de agua no es un factor limitante y la absorción dependerá directamente de la afinidad del tejido de las semillas por el agua (Taylor et al., 1998). Por lo tanto, tenemos que detener el proceso de germinación antes del inicio de la fase 3 para evitar la germinación completa. En los métodos controlados la cantidad de agua disponible es regulada mediante el potencial hídrico del medio donde germina la semilla, y así es como se controla que la semilla no complete el ciclo germinativo.

Los objetivos de este estudio son: encontrar el punto exacto donde la semilla hidratada pueda ser expuesta a una desecación total sin morir pudiendo reactivar los procesos germinativos, comprender las diferencias significativas entre *T. vulgaris* y *T. zygis* durante la germinación y determinar si los tratamientos propuestos tienen efecto *priming* sobre las semillas respecto a la velocidad y la tasa de germinación.

## 2. Material y método

### 2.1 Área de estudio

Este TFG no incluye trabajo de campo. Pero los resultados de este experimento se pueden aplicar en restauraciones en clima mediterráneo continental en la Península Ibérica que coincidan con la distribución de las especies de estudio. Los resultados serán de interés también para viveristas que necesiten producir plantas de las especies de interés.

### 2.2 Selección de especies y procedencia del material vegetal

Se seleccionaron 2 especies del género *Thymus*: *T. vulgaris* y *T. zygis* subsp *gracilis*. Las semillas de *T. zygis gracilis* procedían de cultivo y las de *T. vulgaris* fueron recolectadas en la Sierra de Baza (Granada) ambas suministradas por la empresa Semillas Cantueso. Se han seleccionado estas dos especies de *Thymus* porque debido a sus características óptimas para desarrollarse en el clima mediterráneo se han empleado en los proyectos TECMINE (LIFE 16ENV/ES/000159/TECMINE) y RIBERMINE (LIFE18 ENV/ES/000181) en restauración minera en el Alto Tajo y Teruel respectivamente. En los que trabaja el director del TFG y otro personal del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural.

## 2.3 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio 17 de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Zaragoza en Huesca. Este consistió en someter a distintos lotes de semillas de las especies de estudio a un periodo de deshidratación que interrumpía el proceso de germinación.

El experimento consistió en someter diversos lotes de 25 semillas a un ciclo de secado que interrumpía el proceso de la germinación con el objetivo de detenerlo y encontrar el punto de no retorno. Para cada especie se diseñaron 5 tratamientos y se separó un control para poder comparar los resultados obtenidos en los tratamientos con el comportamiento durante la germinación ininterrumpida de ambas especies.

Como es habitual en otros experimentos de germinación, todos los tratamientos se iniciaron con la siembra de semillas sobre papel de filtro hidratado con agua destilada en placas Petri de 9 cm. Las placas Petri se incubaron en una cámara a 23°C en completa oscuridad.

*Tabla 1. Tratamientos de hidratación y secado del experimento. Tiempo (días) indica los días de exposición a cada uno de los tratamientos, temperatura indica la temperatura presente durante los distintos tratamientos.*

Tratamiento	Tratamiento hidratación		Tratamiento secado	
	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Temperatura (°C)
1	1		2	
2	3	23	2	
3	5		2	30
4	7		2	
5	9		2	
CONTROL	23		0	

Dentro del tratamiento de desecación se definieron 5 niveles dependiendo del tiempo de duración de la hidratación previo al tratamiento de secado (1,3,5,7 y 9 días, ver tabla 1), se incluyó un grupo de control que estuvo expuesto a una hidratación continua para comparar los resultados de los tratamientos propuestos con un grupo de semillas cuya germinación fuese ininterrumpida. Para cada uno de los niveles definidos se prepararon 4 réplicas de 25 semillas, es decir un total de 100 semillas por tratamiento y 600 semillas por especie; 500 para los tratamientos y los 100 restantes serían el control.

Después de terminar el proceso de hidratación determinado para cada nivel de tratamiento (1,3,5,7 y 9 días) los lotes se sometieron a un secado que consistía en trasladar a las semillas a nuevas placas con un papel de filtro seco e introducirlas en la estufa a 30° C durante 48 horas para asegurar el secado completo de las semillas. Posterior a ese tratamiento de secado, se volvieron a colocar las semillas en placas Petri con papel de filtro hidratado y se llevó a cabo un seguimiento diario de las semillas durante 23 días contabilizando las nuevas germinaciones e hidratando el papel de filtro cuando fuera necesario para no detener de nuevo el proceso germinativo y que pudieran seguir germinando con normalidad.

Cuando alguna semilla había germinado, se anotaba (Tabla 1, ANEXO I) y se retiraba de la placa Petri. Este seguimiento se realizó con ayuda de una lupa binocular debido al tamaño de las semillas.

### 2.3.1 Variables de germinación

Una vez acabó el experimento, para poder ver qué efectos habían tenido los tratamientos sobre la germinación, se calcularon las siguientes variables para cada réplica de cada tratamiento y posteriormente se calcularon los promedios para cada tratamiento.

- Porcentaje de germinación (G), se calculó como el cociente de las semillas germinadas entre el total de las semillas sembradas.

$$G(\%) = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total semillas sembradas}}$$

- Total de semillas germinadas (T), se contó el total de semillas germinadas por réplica.
- Índice del primer día de germinación (I), se anotó el número del día de la primera germinación.
- Índice de germinación del 50% de la población (Aguiar et al., 2015), se calculó el tiempo que tardó cada réplica en alcanzar el 50% de semillas germinadas mediante la siguiente fórmula:

$$T_{50} = \frac{[\frac{N}{2} - N_1](T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1$$

Donde:

- N es el porcentaje final de semillas germinadas.

- N1, es el porcentaje de semillas germinadas  $< N/2$ .
- N2, es el porcentaje de semillas germinadas  $> N/2$ .
- T1, el tiempo (días) que corresponde a N1.
- T2, EL TIEMPO (días) que corresponde a N2.

### 2.3.2 Análisis estadístico

Después de calcular todas las variables definidas se realizó un análisis estadístico de los datos con el software estadístico R (R Core Team, 2023).

En la siguiente imagen (Ilustración 1) se pueden ver los pasos seguidos durante el análisis estadístico.

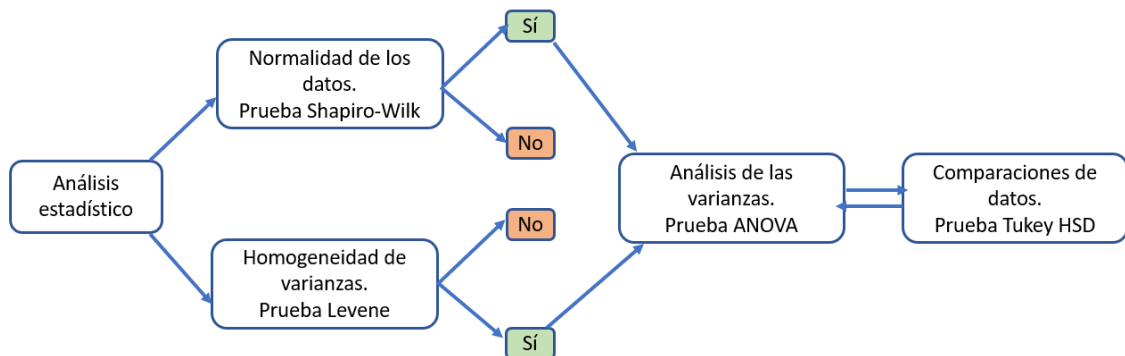


Ilustración 1. Esquema análisis estadístico para el tratamiento de datos de *T. zygis gracilis* y *T. vulgaris*

- Las pruebas realizadas fueron las siguientes: Test Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos, requisito para poder utilizar el método ANOVA. Los datos se tratarán como procedentes de una distribución normal si el p valor  $> 0,05$ .
- Prueba de homogeneidad de las varianzas de Levene, con esta prueba podemos determinar si las varianzas son homogéneas, requisito para poder utilizar el método ANOVA. Consideraremos varianzas no homogéneas si el p valor  $< 0,05$ .
- Prueba ANOVA para detectar diferencias entre los tratamientos aplicados a una misma especie. Si el p valor  $< 0,05$  existen diferencias significativas. Solo se llevó a cabo si se cumplen los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

- Test de Tukey HSD para realizar comparaciones múltiples entre las medias de los diferentes resultados. A diferencia del ANOVA que nos informa de si hay diferencias o no entre todos los tratamientos, el test de Tukey permite detectar diferencias estadísticas entre pares de tratamientos.
- T test, para comprobar si las diferencias observadas entre el comportamiento de ambas especies eran estadísticamente significativas.
- En todos los casos los datos cumplían con los requisitos del análisis ANOVA, por lo que no fue necesario transformar los datos ni usar pruebas no paramétricas.

### 3. Resultados

Tras la ejecución del experimento no se obtuvieron los resultados esperados para *T. zygis gracilis* debido a que la gran mayoría de semillas de esta especie germinaron antes de poder aplicar ningún tratamiento. Por eso, el efecto de los tratamientos en *T. zygis* subsp *gracilis* no se puede evaluar. Sí que se han obtenido resultados de las variables de germinación en las placas control los cuales sí que se podrán comparar entre ambas especies. Esto nos permitirá comparar la ecología de la germinación de estas especies.

La evolución de *T. vulgaris* durante el experimento sí que nos permite comparar resultados a pesar de que el éxito de germinación de estas poblaciones ha sido muy bajo en todos los tratamientos incluyendo el grupo de control.

A continuación, se muestran los resultados de los análisis estadísticos de *T. vulgaris* y *T. zygis gracilis* por separado y el análisis de los datos obtenidos tras la aplicación de los tratamientos.

#### 3.1 Resultados para *Thymus vulgaris*

Se han observado unos resultados más bajos para las variables de germinación de *T. vulgaris* tras la aplicación de los tratamientos respecto a los obtenidos en los grupos de control.

### 3.1.1 Resultados análisis estadísticos

A continuación, se muestran los resultados de los análisis estadísticos de todas las variables de germinación definidas (Tabla 2).

*Tabla 2. Resultados test de normalidad Shapiro-Wilk (p valor > 0.05 implica que los datos provienen de una población normalmente distribuida) para las variables G (porcentaje de germinación), T (total de semillas germinadas), I (índice de la primera germinación, día en el que aparece la germinación), T50 (índice de germinación del 50% de la población, tiempo en el que tarda en alcanzar el 50% de germinación respecto al total de semillas germinadas) y M (velocidad de germinación) de T. vulgaris.*

<b>VARIABLE</b>	<b>W</b>	<b>P-valor</b>
G	0.9397	0.1608
T50	0.9248	0.1577
I	0.9222	0.0654
T	0.9393	0.07474
M	0.9393	0.1577

Después de la realización del test Shapiro-Wilk (Tabla 2) comprobamos que no podemos rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una población con una distribución normal para ninguna de las variables de germinación.

*Tabla 3. Resultados de la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas para las variables G (porcentaje de germinación), T (total de semillas germinadas), M (velocidad de germinación), I (índice de la primera germinación, día en el que aparece la germinación) y T50 (índice de germinación del 50% de la población, tiempo en el que tarda en alcanzar el 50% de germinación respecto al total de semillas germinadas) de Thymus vulgaris.*

<b>VARIABLE</b>	<b>DF</b>	<b>F valor</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
G	5	1.273	0.318
T50	5	2.643	0.052
I	5	1.609	0.208
T	5	1.235	0.333

Por otro lado, tras realizar la prueba de Levene (tabla 3), se ha comprobado que no se puede rechazar la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas para ninguna de las variables (p valor > 0.05).

Una vez comprobados los requisitos para poder realizar un ANOVA este se aplicó a los datos de *Thymus vulgaris* (tabla 4).



Tabla 4. Resultados de ANOVA de un factor para las variables G (porcentaje de germinación), T (total de semillas germinadas), I (índice de la primera germinación, día en el que aparece la germinación) y T50 (índice de germinación del 50% de la población, tiempo en el que tarda en alcanzar el 50% de germinación respecto al total de semillas germinadas) de *T. vulgaris*. (Un p-valor < 0.05, indica que, al menos uno de los grupos presenta diferencias significativas respecto al resto)

VARIABLE	DF	SUMA CUADRADOS	MEDIA CUADRADOS	F valor	p-valor
G	5	1862.000	372.500	6.042	0.001
T50	5	69.330	13.867	1.521	0.232
I	5	35.710	7.142	1.831	0.158
T	5	113.800	22.767	5.854	0.002
M	5	0.285	0.056	5.854	0.002

Por último, dado que la prueba ANOVA indicaba que hay diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó el test de Tukey HSD para determinar si existían diferencias significativas entre pares de tratamientos para cada variable (ANEXO II).

Tras realizar la prueba de Tukey para las variables se han observado diferencias significativas. El control se diferencia de los tratamientos 3,4 y 5 (p valor<0.05), siendo la diferencia más clara con respecto al tratamiento más largo. Además, entre el tratamiento 1 y el 5 se observan diferencias significativas (ANEXO II).

### 3.1.2 Análisis tratamiento a tratamiento

#### *Variable porcentaje de germinación (G)*

La media de los resultados obtenidos de la variable G se muestran en la *tabla 5*.

Tabla 5. Media del porcentaje de germinación (G) y su desviación típica (SD).

Tratamiento	Media ± SD
T1	23.2 ± 8.1
T2	19.0 ± 11.0
T3	10.0 ± 8.0
T4	9.0 ± 5.0
T5	4.0 ± 4.6
CONTROL	29.3 ± 4.6

Tras aplicar los tratamientos ha habido gran variabilidad en los porcentajes de germinación respecto al grupo de control a pesar de que ningún tratamiento planteado haya superado al control. Al aplicar los tratamientos (Tabla 4) las diferencias entre los tratamientos son significativas y dependientes del tipo de tratamiento aplicado, siendo el T5 el que menos porcentaje de germinación a alcanzado (Figura 2 y 3).

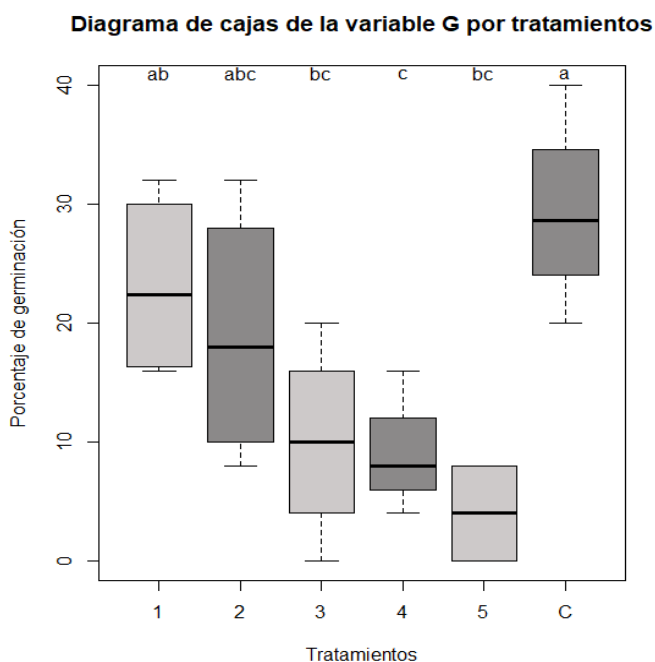


Figura 1. Gráfico de cajas y bigotes para variable G según los tratamientos para *T. vulgaris*. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos de la serie, la mediana señala el valor que ocupa la posición central de la serie de datos y los bordes de la caja indican los cuartiles en este orden de abajo hacia arriba: 1<sup>er</sup>cuartil, 2<sup>o</sup> cuartil y 3<sup>er</sup> cuartil.

Podemos asegurar que existen diferencias significativas entre los tratamientos 3, 4 y 5 respecto al grupo de control (Tabla 4). Además, también se observan diferencias entre el tratamiento 1 (Figura 2) el tratamiento tratamientos menos agresivo y los más agresivos, los tratamientos 4 y 5 (Figura 3). También la prueba de Tukey demuestra estas diferencias significativas (tabla 4, ANEXO II).

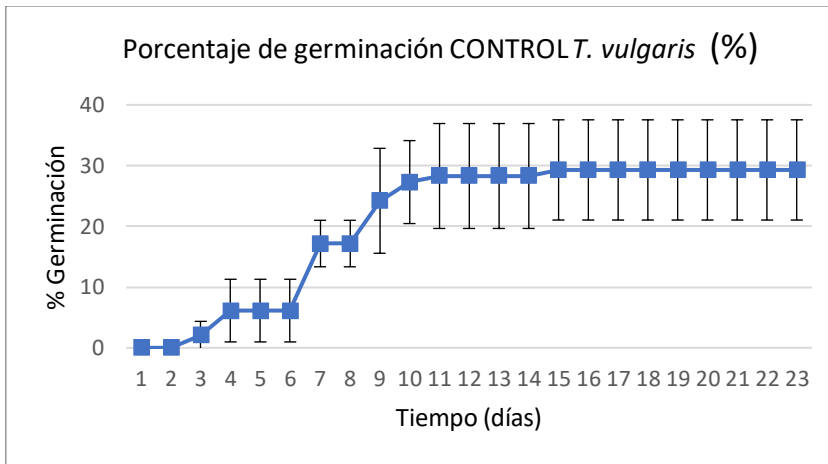


Figura 2. Gráfico del porcentaje de germinación acumulada del grupo de control por días con su desviación estándar representada por las barras de error.

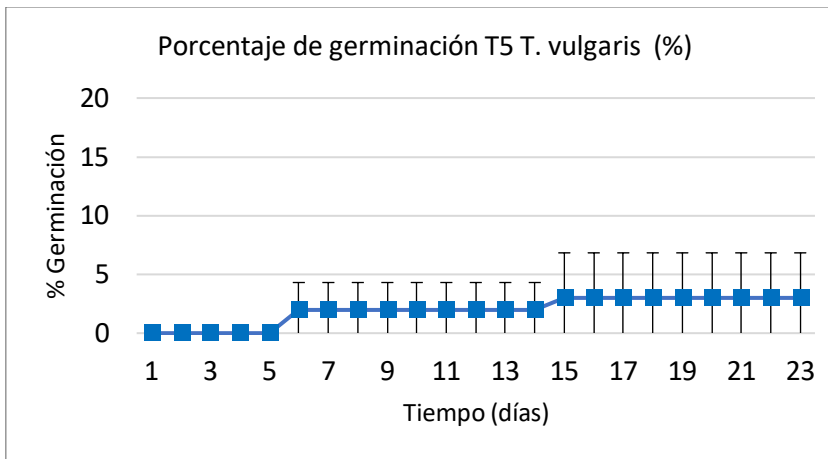


Figura 3. Gráfico del porcentaje de germinación acumulada del tratamiento 5 por días con su desviación estándar representada por las barras de error.

Para *T. vulgaris* se ha observado que la germinación se detiene tras la aplicación de los tratamientos, y tras el tratamiento, tarda un mínimo de 4 días en reiniciarse (Figura 9). Además, se observa que conforme el tratamiento aumenta, es decir la hidratación se prolonga previa al proceso de secado, el porcentaje de germinación disminuye (Tabla 5).

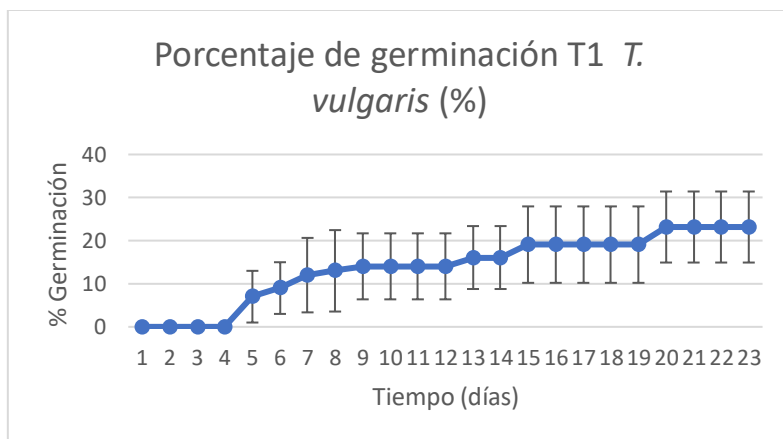


Figura 4. Gráfico del porcentaje de germinación acumulada del tratamiento 1 por días con su desviación estándar.

#### Variable índice de la primera germinación (I)

La media de los resultados de la variable índice de primer día de germinación I se muestran en la *tabla 6*.

Tabla 6. Media del índice del día de la primera germinación (días) y desviación típica (DS)

Tratamiento	Media $\pm$ DS
T1	4.75 $\pm$ 1.50
T2	4.00 $\pm$ 2.31
T3	1.25 $\pm$ 0.96
T4	4.00 $\pm$ 2.45
T5	2.00 $\pm$ 2.31
CONTROL	3.25 $\pm$ 1.89

En algunos tratamientos (T3 y T5) el momento de la primera germinación se adelanta respecto al grupo de control. Sin embargo estadísticamente hablando no se observan diferencias significativas ( $p$ -valor  $>$  0.05, tabla 4) . La aplicación de la prueba de comparación por pares de Tukey HSD (tabla 2, ANEXO II) confirma que no existen diferencias significativas tampoco entre pares de tratamientos. Por tanto, la aplicación de los tratamientos no ha conseguido adelantar la germinación de las poblaciones pero tampoco ha tenido un efecto perjudicial.

**Diagrama de cajas de la variable I por tratamiento**

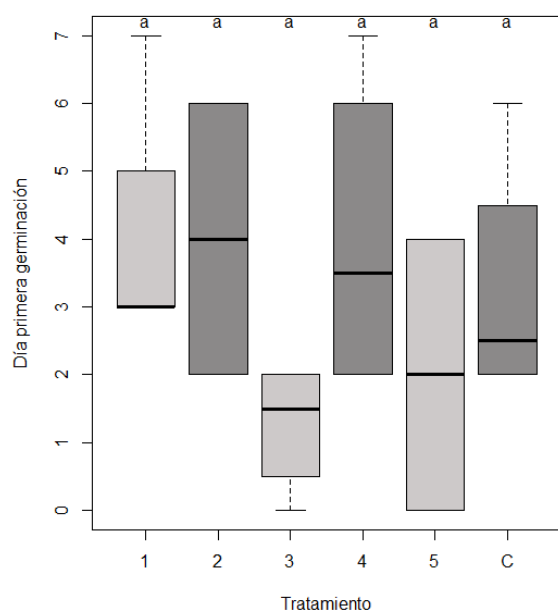


Figura 5. Diagrama de cajas de la variable I (índice de la primera germinación, día en que aparece la primera semilla germinada) por tratamiento. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos de la serie, la mediana señala el valor que ocupa la posición central de la serie de datos y los bordes de la caja indican los cuartiles en este orden de abajo hacia arriba: 1<sup>er</sup> cuartil, 2<sup>o</sup> cuartil y 3<sup>er</sup> cuartil.

#### Variable tiempo de germinación del 50% de la población ( $T_{50}$ )

La media de los resultados de la variable tiempo de germinación del 50% se muestra en la *tabla 9*.

Tabla 7. Media de la variable tiempo de germinación del 50% para *Thymus vulgaris* y su desviación típica (DS).

Tratamiento	Media $\pm$ DS
T1	7.96 $\pm$ 3.45
T2	8.00 $\pm$ 1.68
T3	4.50 $\pm$ 3.70
T4	5.13 $\pm$ 1.65
T5	4.00 $\pm$ 4.69
CONTROL	6.50 $\pm$ 1.22

A pesar de que se ha observado (Tabla 9) una reducción de la variable  $T_{50}$  respecto al grupo de control conforme los tratamientos se alargaban, con la prueba ANOVA se ha comprobado que no existen diferencias significativas tras la aplicación de los diferentes tratamientos, pero para poder asegurarlo aplicamos de nuevo una comparación por pares de Tukey HSD (tabla 3, ANEXO

II). La prueba de Tukey confirma de nuevo que no existen diferencias entre pares de tratamientos aplicados.

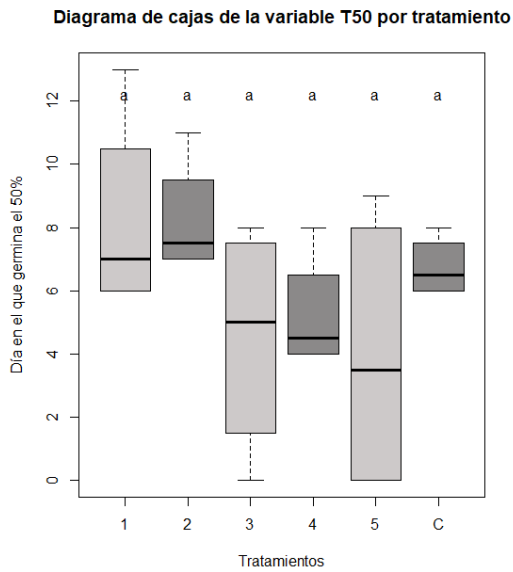


Figura 6. Diagrama de cajas de la variable T50 (tiempo que se tarda en alcanzar el 50% de germinación del total de semillas germinadas) por tratamiento. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos de la serie, la mediana señala el valor que ocupa la posición central de la serie de datos y los bordes de la caja indican los cuartiles en este orden de abajo hacia arriba: 1<sup>er</sup> cuartil, 2<sup>o</sup> cuartil y 3<sup>er</sup> cuartil.

Respecto a la variable T50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y entre tratamientos y control a pesar de que se hayan obtenido diferentes resultados (Figura 6).

#### Variable germinaciones totales (T)

En la tabla 11 se observan las medias de los resultados de los tratamientos para la variable T (germinaciones totales)

Tabla 8. Media de la variable germinaciones totales (T) para *T. vulgaris*.

Tratamiento	Media ± DS
T1	5.75 ± 2.06
T2	4.75 ± 2.75
T3	2.5 ± 2.08
T4	2.25 ± 1.26
T5	1.00 ± 1.16
CONTROL	7.25 ± 2.06

Respecto a la variable T, el tratamiento que mejor resultado ha producido es el tratamiento 1, sin embargo, ninguno de los tratamientos propuestos ha conseguido aumentar el número de germinaciones totales por encima del grupo de control (Tabla 11). Estas diferencias se han reflejado en los resultados del ANOVA que sí que encuentra diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 4) ( $p$  valor  $< 0,05$ ). Dado que el ANOVA indicaba diferencias significativas, se realizó una comparación por pares para estudiar las diferencias entre los pares de tratamientos, el test de Tukey HSD (tabla 6, ANEXO II) confirmó las diferencias entre los tratamientos demostrando que el descenso en T desde el T1 al T5 que se aprecia visualmente es estadísticamente significativo (Figura 7).

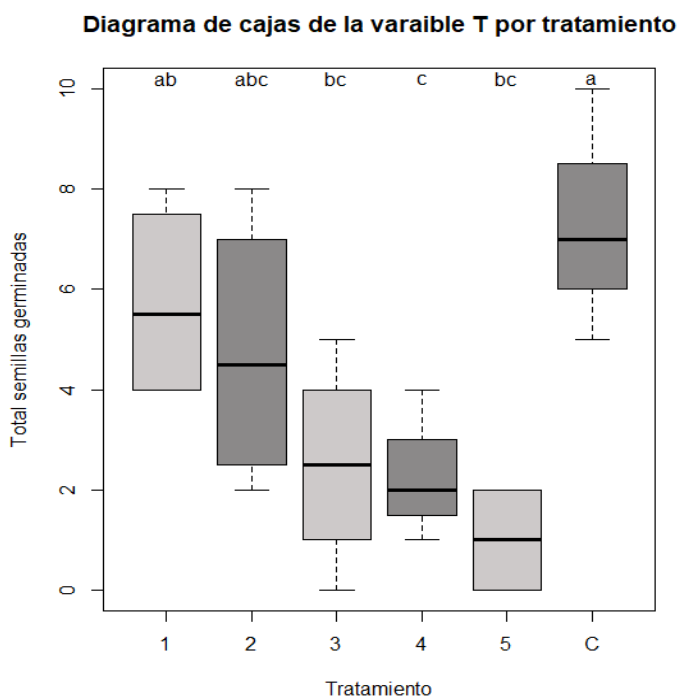


Figura 7. Diagrama de cajas de la variable T (total de semillas germinadas) por tratamiento. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos de la serie, la mediana señala el valor que ocupa la posición central de la serie de datos y los bordes de la caja indican los cuartiles en este orden de abajo hacia arriba: 1<sup>er</sup> cuartil, 2<sup>o</sup> cuartil y 3<sup>er</sup> cuartil.

De nuevo se han observado diferencias significativas entre los tratamientos más agresivos, el grupo de control y los menos agresivos.

#### Variable velocidad de germinación

En la tabla 13 se muestran los resultados de la variable velocidad de germinación (M)

Tabla 9. Resultados de las medias de velocidad de germinación (M) y su desviación típica (SD) para *T. vulgaris*.

Tratamiento	Media $\pm$ DS
T1	0.29 $\pm$ 0.12
T2	0.24 $\pm$ 0.11
T3	0.125 $\pm$ 0.09
T4	0.11 $\pm$ 0.03
T5	0.05 $\pm$ 0.15
CONTROL	0.36 $\pm$ 0.01

Ningún tratamiento a conseguido aumentar la velocidad de germinación de *T. vulgaris* por encima de la del grupo control (Tabla 13). De nuevo, como ocurre con la variable T (total de semillas germinadas), se observa un gradiente de respuesta a los tratamientos, la velocidad de germinación oscila entre 0.05 germinaciones por día del T5 y 0.29 del T1, es decir a medida que el periodo de hidratación es más largo la velocidad de germinación disminuye (Figura 8 y Tabla 13). El ANOVA indica que estas diferencias que se perciben en la gráfica son estadísticamente significativas (tabla 4) entre los tratamientos en función del tratamiento que se aplique.

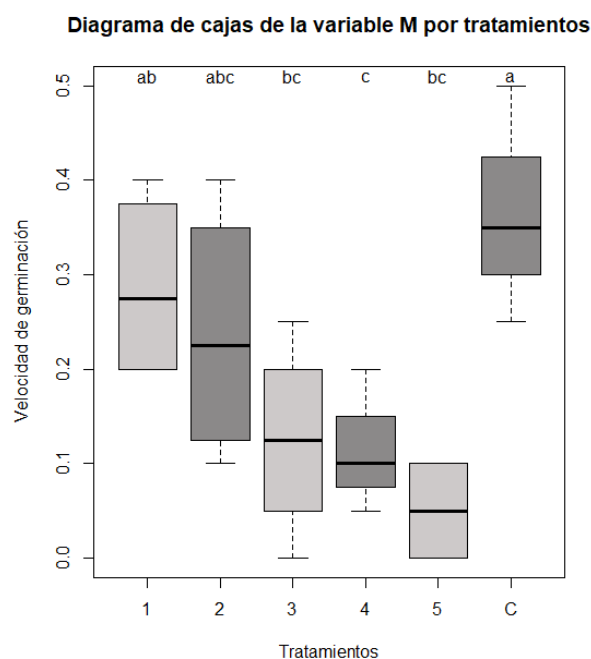


Figura 8. Diagrama de cajas de la variable M (velocidad de germinación, germinaciones día) por tratamiento. Los bigotes indican los valores máximos y mínimos de la serie, la mediana señala el valor que ocupa la posición central de la serie de datos y los bordes de la caja indican los cuartiles en este orden de abajo hacia arriba: 1<sup>er</sup> cuartil, 2<sup>o</sup> cuartil y 3<sup>er</sup> cuartil.



### 3.2 Resultados para *Thymus zygis gracilis*

Como se ha explicado previamente no se pueden comparar los tratamientos empleados en esta especie, sin embargo, podemos analizar los datos del grupo de control y comparar ambas especies.

#### 3.2.1 Análisis del grupo de control

##### 3.2.1.1 Resultados para las variables del grupo de control

En la tabla 14 se muestran los resultados del seguimiento del grupo de control de *T. zygis gracilis*.

Tabla 10. Resultados de las medias para las variables del grupo de control de *T. zygis gracilis* y su desviación típica (SD).

Tratamiento	Variable	G	T	I	T50	M
CONTROL		94 ± 6.92	2.50 ± 1,73	2.00 ± 0	5.75 ± 1.5	4.7 ± 0.36

Se ha observado unos porcentajes de germinación muy elevados (94%) germinando, en promedio, 23 de las 25 semillas sembradas y por tanto el número de germinaciones en el grupo de control de *T. zygis gracilis* (Tabla 14), además esta germinación ha sido rápida. La primera germinación surge al segundo día de la siembra y el 50% de germinación se alcanza a los 6 días.

A pesar de que los tratamientos realizados no son comparables entre las especies se ha observado que las pocas semillas de *T. zygis* que quedaban por germinar antes de la aplicación del tratamiento germinan antes que el control, es decir la aplicación de los tratamientos adelanta el tiempo en alcanzar la máxima germinación. En el tratamiento 1 el máximo de germinación se alcanza a los 12 días desde la siembra (Figura 9), mientras que en el grupo de control (Figura 10) la máxima germinación se alcanza a los 17 días desde la siembra.

Figura 9. Gráfico de la variable G (porcentaje de germinación) para el tratamiento 1.

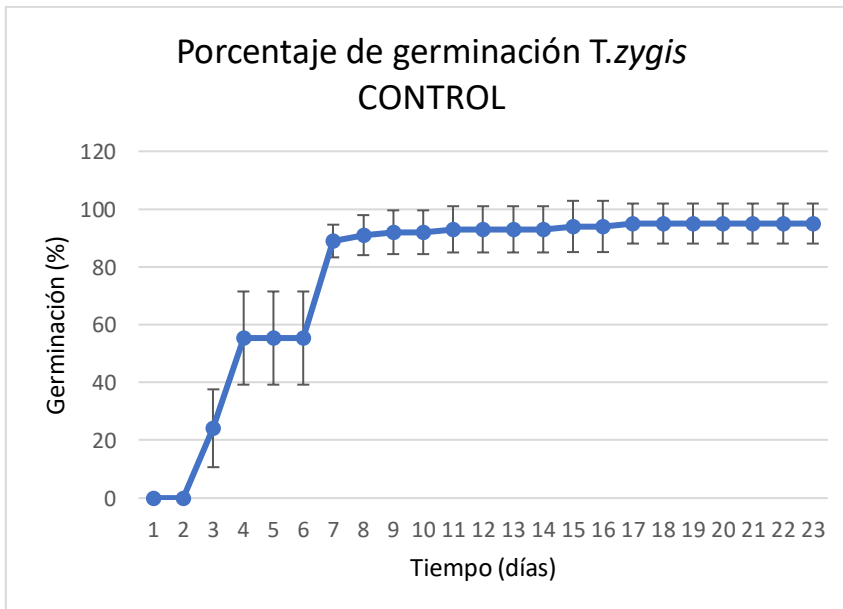
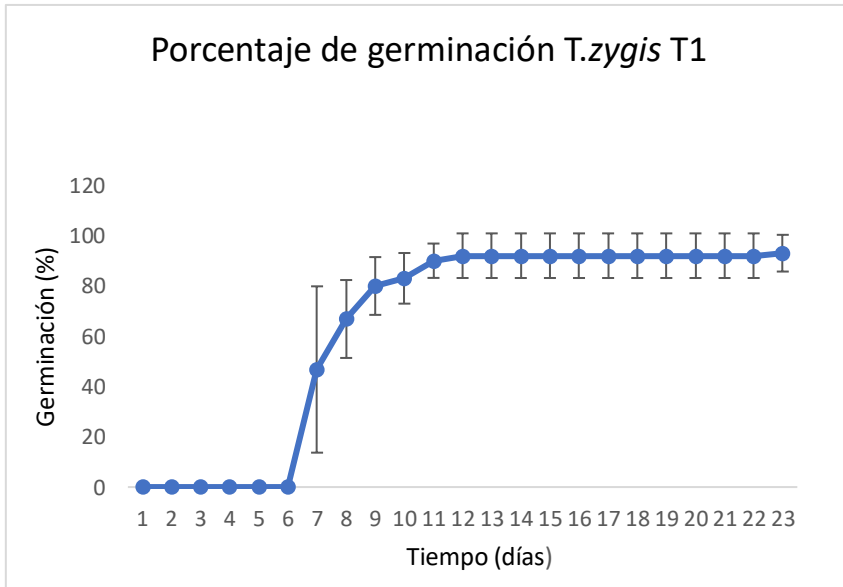


Figura 10. Gráfico de la variable G (porcentaje de germinación) para grupo de control T. zygis gracilis

### 3.3 Comparación entre *T. vulgaris* y *T. zygis gracilis*

#### 3.3.1 Comparación entre los controles de *T. vulgaris* y *T. zygis gracilis*

No se han podido comparar los resultados de los tratamientos entre *T. vulgaris* y *T. zygis gracilis* sin embargo podemos comparar los resultados obtenidos en los tratamientos control. Para ello se ha realizado un T test para cada variable (tabla 17). Existen diferencias entre el porcentaje de germinación (G), las germinaciones totales (T) la velocidad de germinación (p valor < 0,05), sin embargo, las primeras germinaciones y el índice del 50% de la población no se diferencian (p valor > 0.05).

*Tabla 11. Resultados T test para los grupos de control de T. vulgaris y T. zygis gracilis para las variables G (porcentaje de germinación), T (total de semillas germinadas), I (índice de la primera germinación, día en el que aparece la germinación), T50 (índice de germinación del 50% de la población, tiempo en el que tarda en alcanzar el 50% de germinación respecto al total de semillas germinadas) Y M (velocidad de germinación)*

VARIABLE	P valor
G	2.441 x 10 <sup>-5</sup>
T	2.424 x 10 <sup>-5</sup>
I	0.278
T50	0.311
M	4.911 x 10 <sup>-5</sup>

*Tabla 12. Comparación resultados de las variables de germinación para los grupos de control de T. vulgaris y T. zygis gracilis.*

	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis gracilis</i>
Variable	Media ± SD	Media ± SD
G	29.3 ± 4.618	94 ± 6.928
T	7.25 ± 2.061	23.5 ± 1.732
I	3.25 ± 1.893	2 ± 0.000
T50	6.5 ± 1.224	5.75 ± 1.500

M             $0.36 \pm 0.011$     $4.7 \pm 0.346$

*T. zygis gracilis* ha alcanzado un porcentaje de germinación, un total de germinaciones y una velocidad de germinación mucho mayor que el de *T. vulgaris* (Tabla 18). Sin embargo, comparando el índice de la primera germinación y el tiempo en alcanzar el 50% de las germinaciones las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas (Tabla 17).

## 4. Discusión

### 4.1 Problemas de *vulgaris* para la germinación

A diferencia de las semillas de *T. zygis gracilis* los resultados muestran un muy bajo porcentaje en la germinación de las semillas de *T. vulgaris*, a pesar de que ambas especies tardan un tiempo similar en germinar, en torno a las dos semanas (Chura & Zirena, 2018).

Las semillas tienen un origen distinto, las de *T. vulgaris* fueron recolectadas en campo, concretamente en la Sierra de Baza (Granada), mientras que las de *T. zygis gracilis* procedían de cultivo. Las semillas recolectadas en campo pueden tener problemas durante la germinación in vitro debido a varios factores: (1) la presencia de aceites aromáticos que resultan oxidantes en los cultivos in vitro (Chura & Zirena, 2018) (2) las diferencias interanuales, en diferentes años las condiciones ambientales serán diferentes y eso influirá en la calidad de las semillas (3) el tiempo de almacenamiento.

En teoría ambas especies tardan lo mismo en germinar (Chen & Arora, 2013, en torno a las dos semanas, sin embargo *T. zygis gracilis* ha demostrado responder mejor a los tratamientos.

Siguiendo la bibliografía buscada, los consejos del tutor y sabiendo que las semillas eran proporcionadas por una empresa no se llevó a cabo un test de germinación o de TTC para evaluar el número de semillas viables presentes en cada lote, asumiendo que la germinación sería óptima. Se debería haber realizado el test ya que nos habría avisado de la baja germinación de *T. vulgaris* y podríamos haber aumentado la cantidad de semillas en cada réplica.

## 4.2 Comparación con otros experimentos

Sería interesante comparar los resultados de nuestro experimento con otros similares, sin embargo, tras la búsqueda bibliográfica, no se han encontrado experimentos con la misma metodología que este. La gran mayoría de experimentos encontrados aplican varios ciclos de hidratación-deshidratación donde se busca aumentar la producción y a la velocidad de germinación (Del Rocío Contreras-Quiroz et al., 2016). Nosotros por otro lado estamos intentando encontrar el punto de no retorno en las semillas de *T. vulgaris* y *T. zygis* subsp *gracilis*.

A pesar de las diferencias experimentales, se ha observado en varias ocasiones que la exposición a un ambiente húmedo y su posterior deshidratación de las semillas pueden aumentar la germinación siempre y cuando no se supere la tercera fase de la germinación donde si la semilla se deshidrata ya no es viable (Rajjou et al., 2012). La deshidratación de la semilla es un proceso natural (Lima & Meiado, 2017), si la semilla se deshidrata con el ciclo de germinación ya comenzado es posible que aparezca un efecto priming sobre la semilla (Parera & Cantliffe, 2010). Por eso sería necesario probar nuevos tratamientos disminuyendo los rangos de días de diferencias entre los tratamientos que se han empleado en este experimento. De esta manera podríamos llegar a una conclusión más certera en cuanto a si estos tratamientos desarrollan un efecto priming sobre la semilla.

## 4.3 Comparación de grupos de control

Las especies arbustivas cuentan con semillas capaces de germinar en gran número en suelos afectados ya sea por incendios o erosión continuada incluso después de un largo periodo de dormancia (Vaca, 2005). Tras la comparación de los resultados obtenidos en las variables de germinación de los grupos de control de ambas especies hemos observado mejores resultados para *T. zygis gracilis*. Tanto *T. vulgaris* como *T. zygis gracilis* son especies aptas para la restauración en ambientes mediterráneo continental, además comparten la misma función en el ecosistema proporcionando, fijación de sustrato, comportamiento como especie nodriza, dan estructura al propio ecosistema y aportan diversidad biológica (Jorba et al., 2010). Con este experimento se ha observado que *T. zygis gracilis* tiene una germinación muy rápida y alcanza unos elevados porcentajes de germinación. Como se ha comentado previamente los resultados de los tratamientos para *T. zygis gracilis* no han podido compararse con los de *T. vulgaris* debido

a que la gran mayoría de las semillas germinaron antes de aplicar el tratamiento. Sin embargo, los datos recogidos que no se han analizado debido a la problemática, muestran que a pesar de que las semillas de *T. zygis gracilis* restantes se sometiesen a un secado agresivo, conseguían germinar pasadas 24 horas desde que volvían a tener disponibilidad de agua (Figura 2, ANEXO III). Para una restauración plena es importante que se forme una cobertura vegetal lo antes posible (Jorba et al., 2010), *T. zygis gracilis* ha mostrado una rapidez mayor, resultado que habría que comprobar en condiciones de campo.

El mayor problema encontrado en restauración minera es la erosión provocada por la escorrentía, este problema se agrava en el clima mediterráneo continental donde las fluctuaciones climáticas son cada vez más intensas debido al cambio climático. Una solución contra la erosión y reducción de la escorrentía es la creación de una cubierta vegetal que sujete al sustrato (Jorba et al., 2010). Ambas especies de *Thymus* estudiadas tienen las mismas funciones ecosistémicas, por tanto, podemos confirmar que *T. zygis* subsp *gracilis* es una especie más adecuada para repoblaciones en climas continentales, pues los resultados vistos en laboratorio muestran mayor resistencia a cambios bruscos de disponibilidad de agua y un asentamiento más rápido y homogéneo de las poblaciones de *T. zygis* subsp *gracilis*. Se han seleccionado estas especies arbustivas además de por sus características de colonización y germinación porque pueden adelantar lo que se conoce como sucesión ecológica. La sucesión ecológica secundaria es un proceso secuencial y lento sobre ambientes modificados por el ser humano y determinado por los cambios en el ambiente (Carvajal, 2020), como se observa en la *ilustración 2* si conseguimos formar un tomillar en un ecosistema alterado es posible que se acelere la sucesión ecológica (Vaca, 2005).

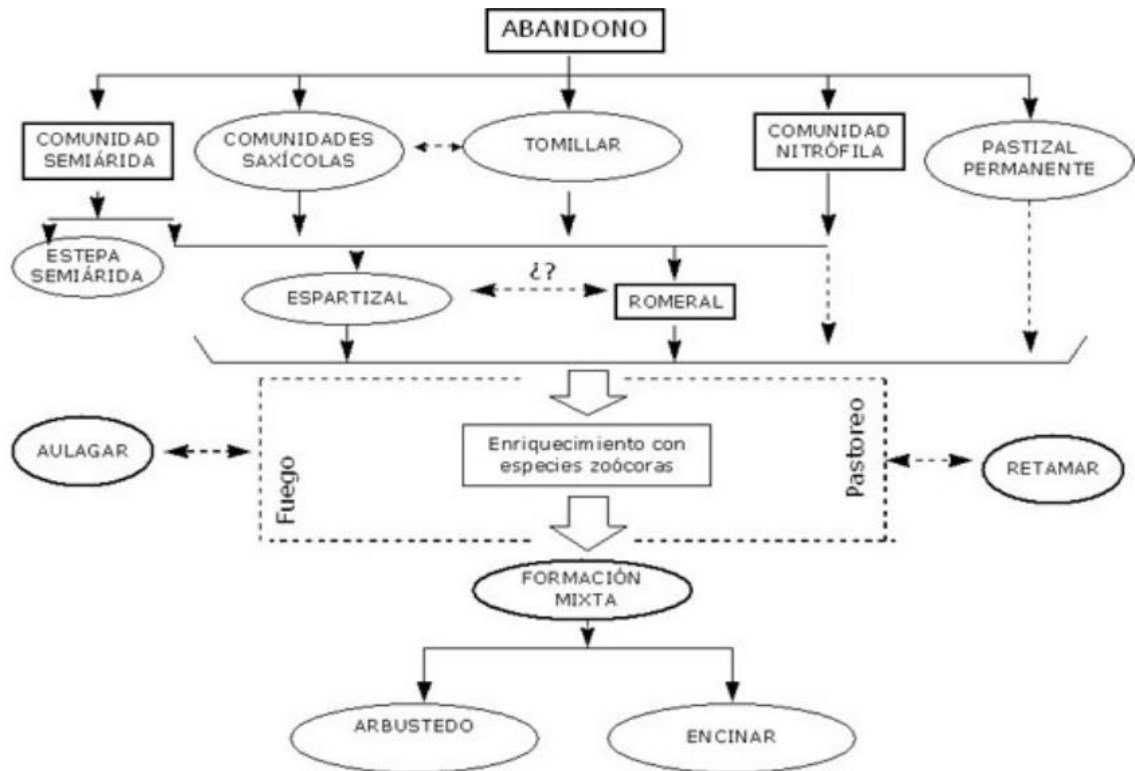


Ilustración 2. Esquema sucesión ecológica (Vaca, 2005)

En la imagen anterior se muestra la importancia del tomillar durante la sucesión ecológica, si se consigue el asentamiento de un tomillar estable en una cantera abandonada adelantamos esta sucesión habilitando la entrada del romeral y más adelante una formación mixta más rica en diversidad y por tanto más funcional ecológicamente.

A pesar de todas las afirmaciones a las que hemos llegado tras el análisis y discusión de los resultados no podemos confirmar si existen realmente diferencias significativas debido a las diferencias de viabilidad entre *T. vulgaris* y *T. zygis*. Por ello sería conveniente repetir el experimento con un estudio previo de viabilidad de las semillas y que estas tengan el mismo origen.

## 5. Conclusiones

- A pesar de tratarse de especies distintas se ha observado que las semillas provenientes de un cultivo muestran mejores resultados en las variables de germinación que las

recolectadas en campo, siempre y cuando no se apliquen tratamientos previos a la siembra.

- Se ha encontrado el punto expresado en días donde las semillas de *T. vulgaris* pueda ser expuesta a un secado completo tras haber sido hidratada sin morir pudiendo reactivar los procesos de germinación. Este proceso germinativo se reactivó, pero muy débilmente lo que nos indica que el punto de no retorno está cerca, en torno a los 10 días.
- Las semillas de *T. zygis gracilis*, a pesar de someterse a un secado tras 9 días de exposición a una hidratación continua son capaces de recuperar el ciclo germinativo.
- *T. zygis gracilis* ha mostrado con los resultados obtenidos una mejor adaptabilidad a cambios bruscos de disponibilidad de agua.
- Las semillas de *T. zygis gracilis* son más resilientes, es decir tienen una mayor capacidad para superar situaciones de gran estrés hídrico, cuando han vuelto a tener disponibilidad de agua han germinado incluso más rápido.
- No se ha podido confirmar que al someter a las semillas a estos tratamientos haya habido un efecto priming, sin embargo, sí que hemos observado indicios con una germinación más rápida en los lotes tratados que en comparación con los controles.
- Una vez obtenidos los resultados podemos afirmar que la calidad de las semillas es importante a la hora de trabajar en restauración ecológica y puede mejorar los resultados (Kildisheva et al., 2016).

## 6. Recomendaciones

A pesar de haber alcanzado alguno de los objetivos propuestos se puede mejorar el experimento y se debería repetir para poder confirmar algunas de las conclusiones a las que se han llegado.

Se debería repetir el experimento disminuyendo los tiempos de hidratación en *T. zygis gracilis*, de esta forma se podrán aplicar los tratamientos a la mayoría de las semillas antes de que germinen, pudiendo demostrar así si la aplicación de los tratamientos tiene efecto sobre las variables de germinación y si existe un efecto priming. Además, si se repite el experimento se debería hacer un estudio de viabilidad de las semillas, en esta ocasión y bajo recomendación del tutor se decidió no hacerlo debido a que eran compradas de una empresa y no recolectadas



directamente por los investigadores. Otro aspecto a tener en cuenta si se repite el experimento es aplicar un tratamiento previo por si la presencia de aceites esenciales interfiere en la germinación al tener propiedades oxidativas. Por eso se propone repetir el experimento con las mismas especies, esta vez, ambas provenientes del mismo método de producción, es decir, recolectadas las dos especies en el campo o en cultivo.

Otra propuesta interesante, sería repetir de nuevo el experimento en condiciones de campo sobre sustrato extraído de canteras abandonadas para comparar el comportamiento en campo y poder ver diferencias significativas entre los resultados de campo y laboratorio.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Anexo 1. Tablas de anotación de germinaciones

Tabla 1. Tabla de anotación de germinaciones para *T. zygis gracilis*

CHA DE SIEMBRA	REPLICAS		FECHAS DE SIEMBRA																																
	0	REP. TOTAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
11/04/2023	1	25	0	0	0	0	0	0	18	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	2	25	0	0	0	0	0	0	11	0	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	3	25	0	0	0	0	0	0	17	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	4	25	0	0	0	0	0	0	18	2	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14/04/2023	1	24	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14/04/2023	2	24	0	0	0	0	0	0	12	0	0	3	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14/04/2023	3	25	0	0	0	0	0	0	10	0	0	2	4	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14/04/2023	4	25	0	0	0	0	0	0	12	0	0	1	5	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12/04/2023	1	25	0	0	0	8	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12/04/2023	2	25	0	0	0	1	0	0	17	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12/04/2023	3	25	0	0	0	8	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12/04/2023	4	25	0	0	0	7	0	0	16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	1	25	0	0	6	17	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	2	25	0	0	2	13	0	0	5	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	3	25	0	0	5	16	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	4	25	0	0	6	5	0	0	12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	1	25	0	0	13	7	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	2	25	0	0	6	10	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	3	25	0	0	4	6	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	4	25	0	0	3	5	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	1	25	0	0	4	12	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	2	25	0	0	5	7	0	0	11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	3	25	0	0	11	7	0	0	4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11/04/2023	4	25	0	0	4	5	0	0	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SIEMBRA																																			
FIN SECADO																																			
FINAL																																			

Tabla 2. Tabla de anotación de germinaciones para *T. vulgaris*

FECHA DE SIEMBRA	RÉPLICAS	TOTAL	11/04/2023	12/04/2023	13/04/2023	14/04/2023	15/04/2023	16/04/2023	17/04/2023	18/04/2023	19/04/2023	20/04/2023	21/04/2023	22/04/2023	23/04/2023	24/04/2023	25/04/2023	26/04/2023	27/04/2023	28/04/2023	29/04/2023	30/04/2023	01/05/2023	02/05/2023	03/05/2023		04/05/2023	05/05/2023	06/05/2023	07/05/2023	08/05/2023	09/05/2023		
0	0		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		24	25	26	27	28	29		
11/04/2023	1	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	2	25	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	3	25	0	0	0	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	4	25	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	1		
0	1	25	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
0	2	25	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
0	3	25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0		0	0	0	0	0	0		
0	4	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
12/04/2023	1	25	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
12/04/2023	2	25	0	0	0	0	0	0	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0		
12/04/2023	3	25	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
12/04/2023	4	25	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	1	25	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	2	25	0	0	0	4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	3	25	0	0	0	2	0	0	4	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0		
11/04/2023	4	25	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	1	25	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	0		
11/04/2023	2	25	0	0	1	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0		
11/04/2023	3	24	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	1		
11/04/2023	4	25	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	1	25	0	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	0	1	0		
11/04/2023	2	25	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	3	25	0	0	1	0	0	0	4	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
11/04/2023	4	24	0	0	1	2	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		
SIEMBRA																																		
FIN SECADO																																		
FINAL																																		

## 7.2 ANEXO II. Tablas resultados análisis estadísticos

Tabla 1. Resultados de la prueba de comparaciones por pares de Tukey HSD ( $p$  valor  $< 0.05$  indica que las diferencias entre el par de tratamientos son significativas) para T (variable total de germinaciones de *T. vulgaris*).

### RESULTADOS PRUEBA DE TUKEY PARA T

<b>PARES</b>	<b>p adj</b>
2 -1	0.975
3 -1	0.231
CONT - 1	0.881
4 - 1	0.173
5 - 1	0.033
3 - 2	0.600
CONT - 2	0.492
4 - 2	0.492
5 - 2	0.134
CONT - 3	0.031
4 - 3	0.993
5 - 3	0.880
4 - CONT	0.020
5 - CONT	0.003
5 - 4	0.940

Tabla 2. Resultados de la prueba de comparaciones por pares de Tukey HSD ( $p$  valor  $< 0.05$  indica que las diferencias entre el par de tratamientos son significativas) para I (variable día de la primera germinación) de T. vulgaris.

**RESULTADOS PRUEBA DE TUKEY PARA I**

<b>PARES</b>	<b>p adj</b>
2 -1	0.99
3 -1	0.17
CONT - 1	0.88
4 - 1	0.99
5 - 1	0.39
3 - 2	0.39
CONT - 2	0.99
4 - 2	1.00
5 - 2	0.70
CONT - 3	0.70
4 - 3	0.39
5 - 3	0.99
4 - CONT	0.99
5 - CONT	0.94
5 - 4	0.70

Tabla 3. Resultados de la prueba de comparaciones por pares de Tukey HSD ( $p$  valor  $< 0.05$  indica que las diferencias entre el par de tratamientos son significativas) para T50 (tiempo que se tarda en alcanzar el 50% de germinación del total de semillas germinadas) de *T. vulgaris*

**RESULTADOS PRUEBA DE TUKEY PARA**

**T50**

<b>PARES</b>	<b>p adj</b>
2 -1	1.00
3 -1	0.51
CONT - 1	0.98
4 - 1	0.72
5 - 1	0.38
3 - 2	0.51
CONT - 2	0.97
4 - 2	0.72
5 - 2	0.38
CONT - 3	0.89
4 - 3	0.99
5 - 3	0.99
4 - CONT	0.97
5 - CONT	0.78
5 - 4	0.99

Tabla 4. Resultados de la prueba de comparaciones por pares de Tukey HSD ( $p$  valor  $< 0.05$  indica que las diferencias entre el par de tratamientos son significativas) para G (variable del porcentaje de germinación total)

**RESULTADOS PRUEBA DE TUKEY PARA G**

<b>PARES</b>	<b>p adj</b>
2 -1	0.97
3 -1	0.23
CONT - 1	0.88
4 - 1	0.17
5 - 1	0.03
3 - 2	0.60
CONT - 2	0.49
4 - 2	0.49
5 - 2	0.13
CONT - 3	0.03
4 - 3	0.99
5 - 3	0.88
4 - CONT	0.02
5 - CONT	0,003
5 - 4	0.94

### 7.3 ANEXO III. Gráficos de germinación

Figura 1. Gráficos de germinación para *T. vulgaris* donde se la germinación acumulada por días de los lotes sometidos a los siguientes tratamientos. En este caso el día 1 indica el mismo día que las semillas salieron del tratamiento de secado.

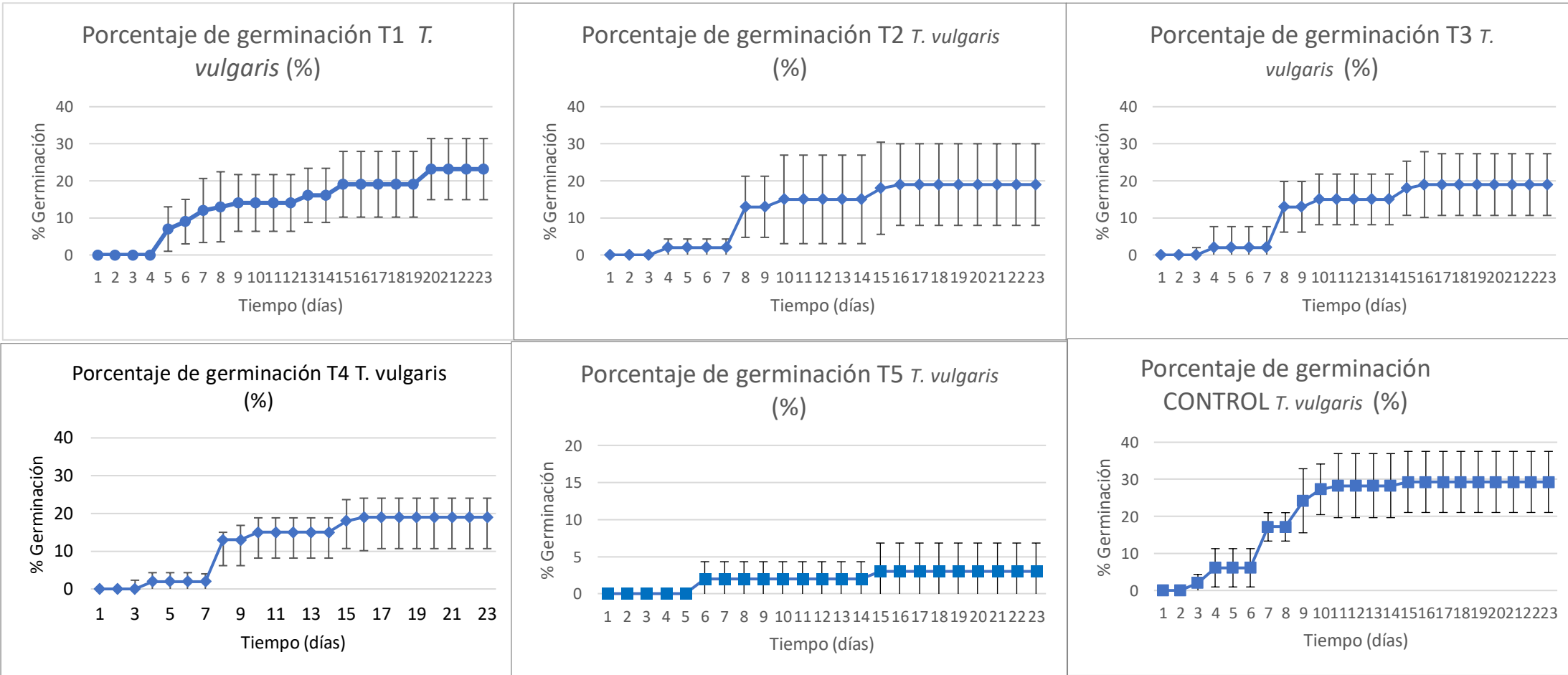
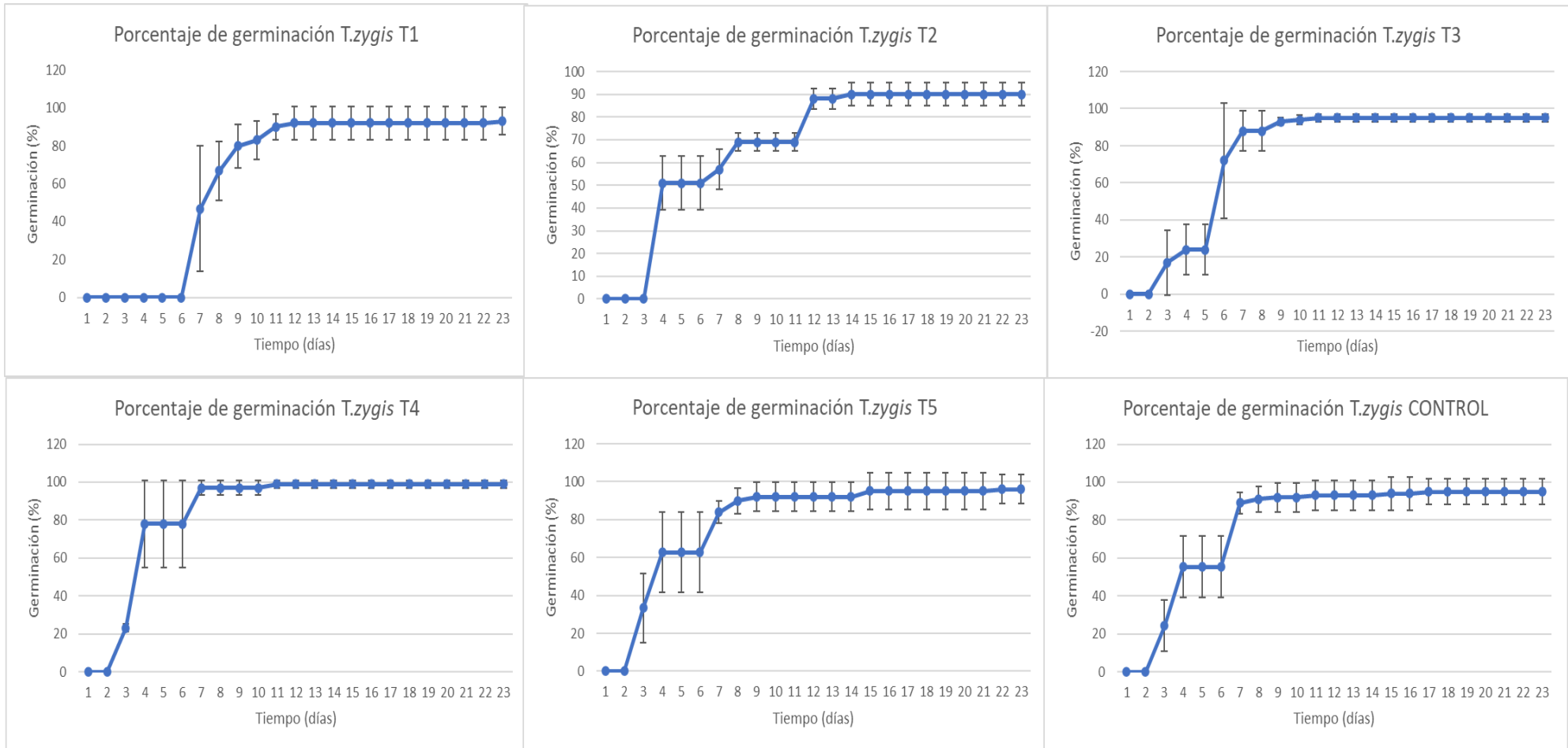




Figura 2. Gráficos de germinación para *T. zygis gracilis*, en los siguientes gráficos se muestra la germinación acumulada por días de las semillas sometidas a los siguientes tratamientos. En este caso el día 1 representa el día de la siembra.





## 8. Bibliografía

- Abbad, A., Belaqziz, R., Bekkouche, K., & Markouk, M. (2011). Influence of temperature and water potential on laboratory germination of two Moroccan endemic thymes: *Thymus maroccanus* ball. And *thymus broussonetii* boiss. *African Journal of Agricultural Research*, 6(20), 4740–4745. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.574>
- Aguiar, N., Meira, D., & Raquel, S. (2015). Study on the efficacy of the Portuguese cooperative taxation. *REVESCO Revista de Estudios Cooperativos*, 121, 7–32. <https://doi.org/10.5209/rev>
- Belmonte, F., & López, F. (2003). Estimación de la biomasa de una especie vegetal mediterránea (Tomillo, *Thymus Vulgaris*) a partir de algunos parámetros de medición sencilla. *Ecologia*, 17, 145–151.
- Board, M. E. A. (2005). Ecosystems and human well-being: desertification synthesis.
- Bradford, K. J. (2022). Manipulation of Seed Water Relations Via Osmotic Priming to Improve Germination Under Stress Conditions. *HortScience*, 21(5), 1105–1112. <https://doi.org/10.21273/hortsci.21.5.1105>
- Carvajal, V. (2020). *Fotos y texto: Vladimir Carvajal L. 2*, 12–14.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J. A., & Gómez, J. M. (2002). Use of shrubs as nurse plants: A new technique for reforestation in Mediterranean Mountains. *Restoration Ecology*, 10(2), 297–305. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2002.01022.x>
- Chen, K., & Arora, R. (2013). Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.005>
- Chura, L. L., & Zirena, V. F. (2018). Aplicación del cultivo de tejidos in vitro (CTV) para la propagación de especies leñosas. *Revista Investigaciones Altoandinas*, 1(1), 1–58. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8801475>
- Cortina, J., Bellot, J., Vilagrosa, A., Caturla, R. N., Maestre, F. T., Rubio, E., Ortíz de Urbina, J. M., & Bonet, A. (2004). Restauración en semiárido. *Avances En El Estudio de La Gestión Del Monte Mediterráneo*, 345–406.
- Del Rocío Contreras-Quiroz, M., Pando-Moreno, M., Flores, J., & Jurado, E. (2016). Effects of wetting and drying cycles on the germination of nine species of the Chihuahuan Desert. *Botanical Sciences*, 94(2), 221–228. <https://doi.org/10.17129/botsci.457>

- Ferrer-gallego, P. P., Peris, A. N., Laguna, E., & Sanz, G. M. (2013). *Thymus Vulgaris Subsp . Mansanetianus Subsp . Nov . 149*, 144–149.
- Ghorbanpour, A., Mami, Y., Ashournezhad, M., Abri, F., & Amani, M. (2011). Effect of salinity and drought stress on germination of fenugreek. *African Journal of Agricultural Research*, 6(24), 5529–5532. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.861>
- Gil, S., & López, F. (2011). Tendencia de las precipitaciones y temperaturas en una pequeña cuenca fluvial del sureste peninsular semiárido. *Boletín de La Asociación de Geógrafos Españoles*, 56, 349–371.
- Jorba, M., Vellejo Calzada, V. R., G., O., R., J., J. M., A., A., H., J., C., O., C., & J. M., N. (2010). *Manual para la restauración de canteras de roca caliza en clima mediterráneo*. [http://cba.fc.ul.pt/about/news/Guia\\_canteras.pdf](http://cba.fc.ul.pt/about/news/Guia_canteras.pdf)
- Jordano, P., Zamora, R., Marañón, T., & Arroyo, J. (2002). Claves ecológicas para la restauración del bosque mediterráneo. Aspectos demográficos, ecofisiológicos y genéticos. *Ecosistemas*, 11(1).
- Kildisheva, O. A., Erickson, T. E., Merritt, D. J., & Dixon, K. W. (2016). Setting the scene for dryland recovery: an overview and key findings from a workshop targeting seed-based restoration. *Restoration Ecology*, 24(August), S36–S42. <https://doi.org/10.1111/rec.12392>
- Lima, A. T., & Meiado, M. V. (2017). Discontinuous hydration alters seed germination under stress of two populations of cactus that occur in different ecosystems in Northeast Brazil. *Seed Science Research*, 27(4), 292–302. <https://doi.org/10.1017/S0960258517000241>
- Merino-Martín, L., Breshears, D. D., Moreno-de Las Heras, M., Villegas, J. C., Pérez-Domingo, S., Espigares, T., & Nicolau, J. M. (2012). Ecohydrological Source-Sink Interrelationships between Vegetation Patches and Soil Hydrological Properties along a Disturbance Gradient Reveal a Restoration Threshold. *Restoration Ecology*, 20(3), 360–368. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00776.x>
- Morales, R. (n.d.). 21. *Thymus L. \**.
- Parera, C. A., & Cantliffe, D. J. (2010). Presowing Seed Priming. *Horticultural Reviews*, June, 109–141. <https://doi.org/10.1002/9780470650561.ch4>
- Parra, A., Raúl, T., Belmonte, Z., Faz, Á., María, C., Gómez-López, D., Adrián, F., & Aguilar, R. (2019). *GUÍA DE ESPECIES VEGETALES DE LA CUENCA MEDITERRÁNEA APTAS PARA REVEGETACIÓN Adecuación para zonas degradadas y contaminadas Autores Encarna*

*Conesa Gallego.*

- Pedrini, S., Balestrazzi, A., Madsen, M. D., Bhalsing, K., Hardegree, S. P., Dixon, K. W., & Kildisheva, O. A. (2020). Seed enhancement: getting seeds restoration-ready. *Restoration Ecology*, 28(S3), S266–S275. <https://doi.org/10.1111/rec.13184>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
- Ríos, O. V., & Sc, M. (2011). RESTAURACIÓN ECOLÓGICA : BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN Ecological Restoration : Biodiversity and Conservation. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 221–246.
- Salas, J. B., Téllez, T. R., María, F., Pardo, V., Capdevila, D. L. Á. C., & Pérez-alonso, M. J. (2014). *zygis s . l . en Extremadura ( España ) Introducción*. 55–64.
- Taylor, A. G., Allen, P. S., Bennett, M. A., Bradford, K. J., Burris, J. S., & Misra, M. K. (1998). Seed enhancements. *Seed Science Research*, 8(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/s0960258500004141>
- Vaca, J. A. B. (2005). La práctica de las claras forestales y su influencia en los ciclos de nutrientes en dos bosques de pino silvestre del Pirineo navarro. *Ecosistemas*, 14(2), 182–188.
- Valiente-Banuet, A., & Ezcurra, E. (1991). Shade as a Cause of the Association Between the Cactus *Neobuxbaumia Tetetzo* and the Nurse Plant *Mimosa Luisana* in the Tehuacan Valley, Mexico. *The Journal of Ecology*, 79(4), 961. <https://doi.org/10.2307/2261091>
- Vicente E, Heras MM las, Merino-Martín L, Nicolau JM, Espigares T. 2022. Assessing the effects of nurse shrubs, sink patches and plant water-use strategies for the establishment of late-successional tree seedlings in Mediterranean reclaimed mining hillslopes. *Ecological Engineering* 176: undefined-undefined. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2021.106538
- Vertucci, C. W. (1989). Controlling Factors and Relevance to Seedling Vigor. *Crop Science Society of America*, 14, 93–115.



