eman ta zabal zazu
Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz
Vitoria-Gasteizko Udala

Bases científicas para la conservación de *Thymus loscosii* Willk, un endemismo ibérico de la CAPV.

Máster en Biodiversidad, Funcionamiento y Gestión de ecosistemas.

Sandra Aldaz del Burgo
12/09/2017

Agustí Agut Escrig

Javier Loidi Arregui

Bases científicas para la conservación de *Thymus loscosii* Willk., un endemismo ibérico protegido en la CAPV.

Sandra Aldaz del Burgo[1, 2], Agustí Agut Escrig[1] & Javier Loidi Arregui[2]

[1]Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olarizu. . Departamento de Medio Ambiente y Espacio Público. Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz. Casa de la Dehesa de Olarizu s/n; 01006; Vitoria-Gasteiz (Álava/Araba).

[2]Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Barrio Sarriena s/n; 48940; Leioa (Bizkaia).

1-Abstract

Thymus loscosii Willk. is an "Special Interest" species in the Basque Country (Uribe-Echebarría *et al*., 2006), in the Basque Catalogue of Threatened Species of Wild, Marine Fauna and Flora (BOPV, 2011), in the National Catalogue of Threatened Species (BOE, 2002) and in the Catalogue and LERSPE Spain (Gobierno de España. 2011). This chamaephyte is an endemism of the Ebro Valley. Years ago, this species has 29 grid UTM of 1km known in the south of the Basque Country. Nowadays, the population has decreased, thus it is a priority in conservation efforts in the Plant Germplasm Bank (BG) of Olarizu Botanical Garden (JBO).

The aims are: to update the existing information on known populations in the Basque Country, to test seed viability, findout if it is posible its *ex situ* conservation, to know the necessary conditions and to determinate the optimum germination protocol.

The statistical analysis using R software is based on the binomial logistic regression model. The results of this study are an extension of the existing information, germination percentages are around 50% at 15ºC of temperature in fresh seeds and the results show that germination is better after stratification in dry and cold preserved seeds. So, it was tested that the seeds are orthodox and can be preserved *ex situ.*

Key words: Binomial regression logistic, *Ex situ* conservation, Seed viability, Germination protocol, Germplasm Bank (BG), *Thymus loscosii*.

1-Resumen

Thymus loscosii Willk. Es una especie catalogada de "Especial Interés" en la CAPV (Uribe-Echebarría *et al*., 2006), en el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre y Marina (BOVP, 2011), en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (BOE, 2002) y en el Catálogo y LERSPE España (Gobierno de España, 2011). Este caméfito, endemismo del Valle del Ebro, contaba con poblaciones conocidas en 29 cuadrículas UTM de 1km de lado en el sur del País Vasco, en la Rioja Alavesa. La desaparición de alguna de ellas durante los últimos años, ha convertido a esta especie en objetivo prioritario de conservación para el Banco de Germoplasma Vegetal (BG) del Jardín Botánico de Olarizu (JBO).

Los objetivos del estudio eran: actualizar la información existente sobre las poblaciones conocidas de la CAPV, comprobar la viabilidad de las semillas, averiguar si es posible su conservación *ex situ*, conocer las condiciones necesarias y determinar el protocolo óptimo de germinación.

El análisis estadístico realizado, utilizando el software R, se ha basado en el modelo de regresión binomial logística. Los resultados de este estudio actualizan y amplían la información existente sobre las poblaciones conocidas, se han obtenido porcentajes de germinación del 50% a 15ºC en semillas frescas y en semillas conservadas y ultrasecas se ha visto que la estratificación ayuda la germinación, alcanzando porcentajes de germinación comparables. Así, se ha comprobado que son semillas ortodoxas y pueden ser conservadas *ex situ*.

Palabras clave: Banco de Germoplasma (BG), Conservación *ex situ*, Viabilidad de las semillas, Protocolo de germinación, Regresión binomial logística, *Thymus loscosii*.

2-Introducción

Este estudio se ha centrado en la conservación de *Thymus loscosii* Willk., en la conservación *ex situ* de sus semillas y en mejorar la información existente sobre su estado de conservación *in situ* desarrollando los siguientes objetivos:

1. Actualizar la información existente sobre poblaciones conocidas en la CAPV.

    1. a- Censos poblacionales

    1. b- Datos fenológicos

    1. c- Datos fitosociológicos

2. Determinar el protocolo óptimo de germinación para *Thymus loscosii* en cada estado (semillas frescas y tras el proceso de conservación *ex situ*).

3. Establecer la viabilidad de las semillas mediante distintas metodologías.

4. Averiguar si es posible conservar la especie *ex situ* y conocer las condiciones necesarias.

2.1-Contexto

Tanto la biodiversidad mundial como peninsular está disminuyendo a gran velocidad. En 8 años, comprendidos entre 1996 y 2004, alrededor de 8000 especies vegetales se incorporaron a la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). (Bachetta e*t al*., 2008). Estos datos, hicieron imprescindible disponer de herramientas para conservar la biodiversidad a largo plazo. Por ello, existen programas de conservación que almacenan a largo plazo el germoplasma vegetal (Ferrer e*t al*., 2013). Según Witt (1985) el germoplasma es cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra. Los centros encargados de la conservación de la biodiversidad se conocen como *banco de germoplasma* o *banco de semillas*, ya que el material a conservar se compone principalmente de semillas (Bachetta e*t al*., 2008), aunque existen centros que también conservan esporas de helechos y hongos, polen, cultivos de tejidos in vitro e incluso bancos de ADN, de reciente creación.

En este contexto, el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico de Olarizu (JBO) tiene como objetivo principal la conservación a largo plazo de la flora silvestre amenazada, endémica, rara y singular de la CAPV y territorios limítrofes, además de las especies estructurales y características de los Hábitat de Interés Comunitario del mismo ámbito geográfico (Agut *et al*., 2012).

2.2-Antecedentes

La idea de preservar semillas *ex situ* garantizando su viabilidad en un periodo largo de tiempo, nació en el periodo comprendido entre 1920 y 1930 gracias a la propuesta del científico ruso Nikolái Ivánovitch Vavílov (Koob *et al*., 2004). En un principio, la actividad estaba centrada en la conservación de la agrodiversidad, pero tras la Cumbre de la Tierra en Río de Janeiro, se creó el Convenio de Diversidad Biológica (CDB) para así evitar la pérdida de biodiversidad, convirtiendo la conservación de plantas silvestres raras o en riesgo de extinción en el objetivo de los bancos de germoplasma.

El Jardín Botánico de Olarizu (JBO) promovido por el Centro de Estudios Ambientales (CEA) del Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz constituyó en 2010 su Banco de Germoplasma Vegetal, donde se procedió a la conservación e*x situ* de semillas de *Thymus loscosii* y al estudio de sus protocolos de germinación, producción y cultivo. Teniendo en cuenta estudios germinativos previos sobre *Thymus loscosii* (Albert, MJ *et al*., 2002), que muestran la variabilidad existente entre poblaciones y distintas temperaturas de ensayo, se ha estudiado el protocolo óptimo de germinación para semillas frescas y conservadas procedentes de una misma población y profundizando en el estudio de dos parámetros germinativos: la temperatura y las estratificaciones, como pretratamientos necesarios para romper las dormiciones de las semillas y activar su germinación.

3-Objeto de estudio

3.1-Descripción de la planta.

Thymus loscosii, perteneciente a la familia de las *Lamiaceae*, es un caméfito rastrero de unos 15 cm de altura. Se le conoce como "Tomillo sanjuanero" o "Tomillo de Loscos". Es una mata cuyos tallos vegetativos crecen aplicados al suelo y son enraizantes (lo que la caracterizada frente a otros tomillos), mientras que los tallos floríferos son erectos y están cubiertos de pilosidad. Sus hojas lineares son opuestas dos a dos y con un solo nervio central, tienen los bordes revolutos y cilios en el margen de la porción basal. Su inflorescencia es terminal, el ápice de los tallos erguidos, y posee brácteas similares a las hojas en forma y tamaño (Castroviejo *et al*., 2009). Las flores tienen dos envolturas florales; la exterior o cáliz consta de un tubo acampanado formado por cinco piezas agrupadas en dos labios, el superior con tres dientes lanceolados y el inferior con dos dientes lineares y densamente ciliados. Este último carácter es diagnóstico frente a otras especies de tomillos rastreros. La corola es bilabiada, con un labio superior erguido y plano, y otro inferior dividido en tres lóbulos. Los estambres son cuatro y sobresalen del tubo de la corola. El fruto es una núcula de color marrón de apenas 1 mm. La floración se produce entre mayo y julio, lo que le ha valido el adjetivo de "sanjuanero" (Uribe-Echebarría e*t al*., 2006) y la fructificación a finales de verano principios de otoño (Aizpuru *et al*., 1999; Castroviejo *et al*., 2009)

3.2-Hábitat y ecología.

Los materiales geológicos sobre los que se asienta este caméfito son predominantemente terciarios: calizas, margas y yesos. Por tanto, suelos carbonatados, básicos y a veces salinos. (Molero & Rovira, 1982; Massach, 1958). Soporta una sequía estival muy intensa y ocupa altitudes entre 400-700 m en los pisos mesomediterráneo y supramediterráneo (Gobierno de Aragón, 2007). Vive sobre suelos

esqueléticos, poco evolucionados formando parte de matorrales camefíticos mediterráneos como tomillares, salviares, romerales, aulagares, muchas veces en mosaico con lastonares o fenalares de *Brachypodium retusum*. También se encuentra formando parte de la vegetación de los yesares mediterráneos.

3.3-Encuadre fitosociológico.

Según los datos disponibles el Sistema de Información de la Vegetación Ibérica y Macaronésica (SIVIM, 2017), *Thymus loscosii* puede formar parte de 23 asociaciones o comunidades vegetales diferentes. Destacan las asociaciones de *Salvio lavandulifoliae-Ononidetum fruticosae*, *Teucrio-Thymetum angustifolii* y comunidades de la alianza *Aphyllantion*. Los salviares riojano-estelleses (asociación *Salvio lavandulifoliae-Ononidetum fruticosae*) con presencia de *Ononis fruticosa* se configuran en el horizonte superior del piso mesomediterráneo sobre suelos margosos y calizos. (Fernández-González, *et al*., 2000). Poseen una estructura formada por caméfitos y nanofanerófitos que configuran los matorrales de mediana talla y cobertura elevada. El estrato superior lo conforman *Ononis fruticosa*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia lavandulifolia*, y más esporádicamente *Genista scorpius* y *Cistus albidus*, mientras que el inferior está dominado por caméfitos postrados o de pequeña talla, compuesto sobre todo por labiadas (*Thymus*, *Teucrium*) y cistáceas (*Helianthemum*, *Fumana*). En algunas zonas la presencia de gramíneas duras como *Brachypodium retusum*, *Koeleria vallesiana* o *Phleum pratense* se hace muy notoria (Fernández-González et al., 1986). Se reconoce la subasociación *helianthemetosum italici*, transición hacia los matorrales de la alianza *Aphyllantion*, debido a que aparecen especies diferenciadoras como la presencia de *Helianthemum oelandicum subsp. italicum*, *Thymus fonqueri* y *Globularia cordifolia*; y la ausencia de *Thymus loscosii* y *Helianthemum cinerum subsp. rotundifolium*, presentes en la subasociación *salvietosum lavandulifoliae* que va desde las Conchas de Haro (La Rioja) hasta el meridiano con Ujué (Navarra). La asociación *Teucrio-Thymetum angustifolii* es la etapa de sustitución de la parte más xerófila de la serie de los carrascales somontanos-aragoneses en las sierras de Ujúe y las solanas de las peñas de San Pedro y Peña. Se distingue de los romerales riojanos por la presencia de *Helianthemum oelandicum subsp. italicum* y ocasionalmente de *Genista hispanica subsp. hispanica* (Fernández-González et al., 1986; Fernández-González et al. 2000; Mapa de vegetación 1:25.000 de Navarra, 2014). En el sector riojano, en nuestra área de estudio, la cabeza de serie está representada por un carrascal mesomediterráneo basófilo de *Quercetum rotundifoliae*, cuya o primera etapa de sustitución es un coscojar de *Rhamno lycioidis-Quercetumcocciferae*. Cuando el bosque se degrada se desarrollan matorrales del *Salvio lavandulifoliae-Ononidetum fruticosae* (Loidi et al, 2011; Peralta, 2013).

3.4-Distribución.

Thymus loscosii es un tomillo endémico de la Depresión del Ebro. Su límite de distribución noroccidental se encuentra en las proximidades del contacto entre Rioja, Álava y Navarra, extendiéndose de forma más abundante a lo largo del Valle del Ebro (García, 2006). Su área de distribución limita al noroeste con la Comunidad Autónoma del País Vasco (Castroviejo, 1986) y al sureste con Cataluña, integrando provincias como Teruel, Zaragoza, Lérida, Tarragona, Álava, Logroño, Navarra y Soria, como se puede observar en la Figura 1 (García, 2006).

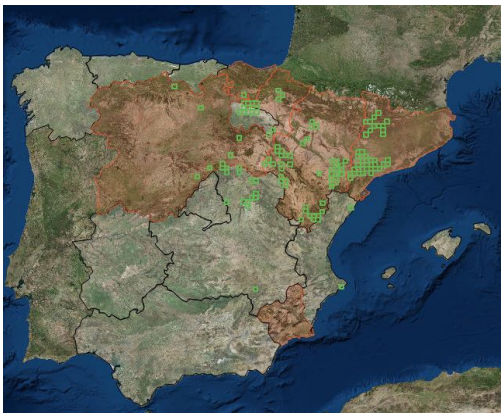


Figura 1. Distribución de *Thymus loscosii* en la Península ibérica, se señalan en rojo los territorios donde este taxón está protegido. Obtenido a partir de http://www.redbag.es/openredbag/index.php.

3.5-Grado de amenaza.

En el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas de 1990, *Thymus loscosii*, estaba catalogada como “En peligro de extinción”. Actualmente, su categoría ha sido rebajada a “De especial interés” (BOE, 1990, BOE, 2007).

A nivel autonómico, en el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas (CVEA), actualizado según la Lista Roja de la Flora Vascular de la Comunidad Autónoma del País Vasco siguiendo los criterios de la UICN (Gobierno Vasco, 2010; BOPV/EHAA, 2011), *Thymus loscosii* ha sido evaluada como especie “De especial interés”. En el catálogo de Aragón se encuentra incluida en la categoría “De interés especial”, en el de Navarra como “Vulnerable” y en el de Castilla y León como “Atención preferente”. Sin embargo, no se encuentra en el Libro Rojo de Flora Vascular Amenazada de España.

Los hábitats donde se instala la planta se encuentran bastante antropizados, habiendo sufrido muchos de ellos modificaciones para usos agrícolas, plantaciones forestales o creación de cantera, provocando una pérdida del hábitat. (Gobierno de Aragón, 2007; Gobierno Vasco, 2010)

3.6-Ciclo fenológico

Los datos fenológicos conocidos, obtenidos según la bibliografía existente, se muestran en la Tabla 1.

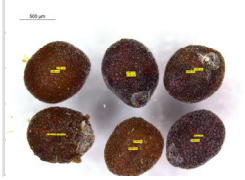
Tabla1. Datos fenológicos de *Thymus loscosii* Willk.

Floración	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Fructificación	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D

3.7- Descripción de la semilla como unidad de conservación.

Las semillas de *Thymus loscosii* utilizadas en el estudio fueron recolectadas el 13/07/2016 en San Quiles, Baños de Ebro/Mañueta (Rioja Alavesa, País Vasco), 30TWN2606, a una altitud de 470 m. Se recolectaron un total de 9674 semillas. En la Tabla 2, se muestra la caracterización de la semilla mediante los descriptores morfocolorimétricos básicos. Las imágenes se tomaron con un microscopio estereoscópico apocromático (Leica S8 APO).

Tabla 2. Caracterización de la semilla de *Thymus loscosii*, elaboración propia Jardín Botánico de Olarizu.

Talla (mm x mm)	0,833 x 0,635
Nº de cotiledones	Dicotiledónea
Contorno	Obovado
Sección	Circular
Color	Marrón
Ornamentación	Ninguna
Estado de conservación	Banco activo y Banco base
	

4-Material y métodos

En este apartado se presenta, por una parte, la metodología empleada para realizar los censos poblacionales, la cartografía y los inventarios fitosociológicos, obtener los datos fenológicos y se recogen, de forma breve, los protocolos seguidos en el BG del JBO para la recolección, post-maduración, cuarentena y limpieza, caracterización de la accesión de semillas, conservación e ingreso de las semillas de *Thymus loscosii* en el BG del JBO (Agut *et al*., 2012). Por otra parte, se define le metodología adoptada para el tratamiento experimental de las semillas con el fin de estudiar los protocolos de viabilidad y germinación de la especie objeto de estudio, así como en los análisis estadísticos de los datos de germinación obtenidos.

4.1-Censos poblacionales

Para conocer el número de individuos de las poblaciones *Thymus loscosii* en las distintas localidades presentes se procedió a la realización de censos poblacionales. La época óptima para realizarlos es la etapa de crecimiento, durante la floración y fructificación. Los censos se llevaron a cabo utilizando el procedimiento propuesto en la Metodología del Atlas de Flora Amenazada de España (AFA), durante los meses de junio y julio, tras haber realizado salidas previas durante invierno (diciembre) y primavera (mayo). Los censos han tenido lugar en la Rioja Alavesa y todos ellos mediante un recuento directo, ya que el número de individuos fue inferior a 2.500 en todos los casos (Iriondo, JM., 2011).

4.2-Cartografía

A partir de las 55 citas conocidas de *Thymus lososii* en el País Vasco, se obtuvieron un total 29 presencias en cuadrículas UTM de 1x1 km de lado, con las cuales se elaboró un mapa cartográfico utilizando el programa QGIS Dekstop V. 2.2. Linux.Ubuntu. A partir de distintos criterios de selección como el hábitat, la accesibilidad y la cercanía entre citas se seleccionaron distintas cuadrículas de muestreo donde realizar los censos y los inventarios, además de comprobar la presencia o ausencia de la especie.

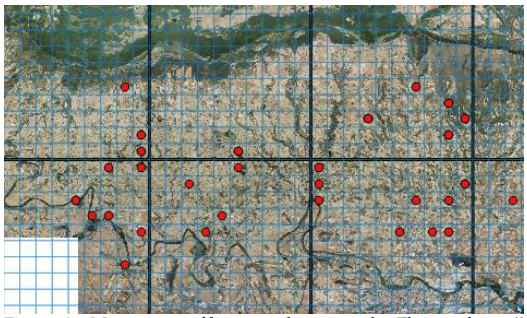


Figura 2. Mapa cartográfico con las citas de *Thymus loscosii* conocidas en el sur de la Rioja-Alavesa, realizado mediante QGIS.

4.3-Datos fenológicos

Para obtener los datos fenológicos se realizaron visitas sucesivas a las distintas poblaciones de *Thymus loscosii* durante todo el ciclo fenológico.

4.4- Datos fitosociológicos

Para caracterizar las comunidades vegetales en las que se encuentra *Thymus loscosii* se realizaron inventarios utilizando la escala de Braun-Blanquet siguiendo la metodología de escuela fitosociológica de Zurich-Montpellier (Braun-Blanquet, J., 1979; Ferriol & Merle, 2012).

4.5-Tratamiento de las semillas

Recolección. La recolección de las semillas de *Thymus loscosii*, se realizó en el mes de julio de 2016 en la población de Baños de Ebro/Mañueta (Rioja Alavesa, País Vasco). Se recogieron asegurando la mayor diversidad genética, sin comprometer la

viabilidad de la especie en su hábitat natural, teniendo en cuenta las características biológicas de la especie, su ciclo vital y biología reproductiva (Bacchetta, *et al*., 2008). Las semillas se recogieron junto a los frutos, para evitar la interrupción del proceso de maduración y a la vez, favorecer la adquisición de tolerancia a la deshidratación. El material se guardó en bolsas de papel, manteniéndolas en lugares sin altas temperaturas ni irradiación solar directa.

Post-maduración, cuarentena y limpieza. Una vez que el material llegó al banco, se depositó en una bandeja sobre papel de filtro dentro del armario de post-maduración, en condiciones de 20-22ºC y 40-45% HR durante 2-3 semanas. Esto permite a las semillas no maduras alcanzar la capacidad de germinación.
En el proceso de limpieza se separaron las semillas de ramas, hojas, frutos, cubiertas, impurezas, etc. Se utilizaron procedimientos manuales y mecánicos.

Conservación e ingreso de las semillas en el Banco de Germoplasma. Se separaron semillas frescas para los ensayos de germinación y el resto siguieron el protocolo de conservación: desecado, ultradesecado, encapsulado y almacenamiento a bajas temperaturas (-18ºC).
Las semillas, una vez limpias, se introdujeron en la sala de desecado, con condiciones ambientales controladas (10ºC y 15% HR) durante 2-3 semanas y en cajetines de plástico abiertos para que las semillas se equilibrasen con las condiciones de la sala. Después, se introdujeron en una vitrina de metacrilato bajo condiciones controladas (7-12% HR). Se monitorizó la disminución de su peso y su humedad en equilibrio (aw, actividad del agua), utilizando una microbalanza de precisión y un psicrómetro, respectivamente. Las semillas, una vez ultrasecas, se dosificaron en tubos de ensayo de vidrio conociendo la cantidad y el peso de cada submuestra, dedicando una de estas submuestras a estudiar el protocolo de germinación. Se añadió un tampón de algodón hidrófobo separando las semillas de las cápsulas de gel de sílice (agente desecante e indicador de humedad). Los tubos se etiquetaron y se termosellaron a la llama (encapsulado) para garantizar su viabilidad. Las condiciones de conservación fueron a temperatura de -18ºC y en el caso de *Thymus loscosii* se conservaron a largo plazo, excepto la submuestra utilizada para estudiar el protocolo de germinación que fue extraída después de mantenerla durante 3 meses en estas condiciones.

4.6- Tratamiento experimental

4.6.1-Ensayos de viabilidad

Se realizaron dos tipos ensayos de viabilidad. En el primero, el test del tetrazolio, se emplearon 25 semillas, las cuales fueron abiertas manualmente y después embebidas durante 24h en una solución al 1% de tetrazolio (Bachetta *et al*., 2008). Las semillas se clasifican como "viables" cuando el embrión y endospermo están teñidos uniformemente de rojo; como "no viables" cuando presentan embriones no teñidos o con la radícula y/o endospermo no teñidos; como "viabilidad limitada" para semillas cuya tinción no puede encuadrarse en ninguno de los grupos anteriores. El segundo fue el test de conductividad, que evalúa el grado de integridad de las membranas celulares, mediante la determinación de lixiviados hacia la solución de imbibición (Soto y Valiengo, 2010). Se prepararon 8 lotes de 25 semillas, 4 de ellos fueron sometidos a un envejecimiento acelerado (90ºC durante 1h) y se midió la conductividad cada 2h repitiendo las medidas pasadas 24, 48, 72 y 96 h, mediante un conductímetro modelo Crison Basic 30.

4.6.2-Ensayos de germinación

Los ensayos de germinación se realizaron con semillas frescas y con semillas conservadas durante 3 meses en condiciones de -18ºC. El número de semillas requerido para cada ensayo fue de 400 (4 placas de 25 semillas para cada temperatura de ensayo: 10, 15, 20, 25ºC y fotoperiodo 12/12 h). En los ensayos con las semillas conservadas se realizaron varias estratificaciones. Para realizar el primer ensayo con las semillas frescas se separaron 400 semillas y se sembraron en las placas correspondientes, realizando solo los tratamientos control, sin practicar ningún pretratamiento. El resto de semillas recolectadas y limpias, continuó el proceso de conservación a largo plazo y cuando la humedad hubo disminuido hasta niveles entre 5-10% (ultradesecado), después de conservarlas 3 meses a -18ºC se realizó otro ensayo con las semillas conservadas. Para ello, las semillas pasaron de la cámara de conservación a la de secado, donde estuvieron 24h. Pasando de temperaturas negativas a positivas. Tras este periodo, se abrieron y se mantuvieron durante otras 24h en la sala de secado para equilibrar su contenido de humedad con el de la sala. Después se extrajeron al laboratorio donde pasaron 24h a temperatura y humedad ambientales. Posteriormente, se introdujeron en un envase hermético en ambiente saturado de humedad y temperatura ambiente durante otras 24h donde las semillas completaron su rehidratación y por último, fueron sembradas. El medio de germinación empleado fue Agar al 1% (Bachetta e*t al*., 2008; Agut, 2013). El agar se esterilizó mediante autoclave (20 min a 121ºC). Se dejó enfriar y se procedió al montaje de las placas Petri ocn Agar en condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar. Una vez que solidificó el Agar, se procedió a sembrar las semillas.

Los ensayos duraron 60 días y la siembra se realizó en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas en las placas preparadas, que posteriormente fueron selladas con Parafilm. Los recuentos de germinación se realizaron tres veces por semanas (lunes, miércoles y viernes).

Las semillas germinadas en Agar durante los ensayos se sembraron en bandejas de alveolo forestal con sustrato universal. Estas bandejas se mantuvieron en las cámaras de germinación durante las primeras fases de desarrollo de las plántulas y posteriormente se transportaron al invernadero del JBO, con fotoperiodo solar y riego automático.

Para obtener el protocolo óptimo de germinación se sembraron 25 semillas por placa y 4 placas por tratamiento. En el ensayo con las semillas

conservadas, a diferencia de las semillas frescas, además de los tratamientos control, se realizaron pretratamientos. Se establecieron cuatro pretratamientos, practicando una estratificación o la combinación de dos y un tratamiento control: Estratificación cálida (P1) (60 días a 20ºC); Estratificación fría (P2) (60 días a 4ºC); Estratificación cálida (P1) + estratificación fría (P2) (30+30 días 20ºC/4ºC); Estratificación fría (P2) + estratificación cálida (P1) (30 +30 días 4ºC/20ºC) y Control (sin pretratamiento). Las condiciones de ensayo establecidas fueron las siguientes: 10ºC, 15ºC, 20ºC y 25ºC con un fotoperiodo 12/12 h de luz/oscuridad en todos los casos.

4.7-Análisis de datos

Una vez finalizados los ensayos, los resultados se expresaron gráficamente mediante la curva de germinación obtenida en cada una de las condiciones de ensayo y se calcularon los siguientes parámetros germinativos, con el objetivo de establecer el protocolo óptimo de germinación.

-Velocidad de germinación (T50): corresponde al tiempo necesario para obtener el 50% de la capacidad germinativa del lote (Come, 1970).

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

Donde: N= porcentaje final de semillas germinadas, N1=porcentaje de semillas germinadas por debajo de N/2, N2= porcentaje de semillas germinadas por encima de N/2, T1= número de días que corresponden a N1, y T2= número de días que corresponden a N2.

-Retardo germinativo: tiempo necesario para observar la primera semilla germinada (Bachetta e*t al*., 2008).

-Tiempo medio de germinación (GMT): permite conocer el tiempo medio de la germinación de las semillas analizadas (Bachetta *et al*., 2008)

$$GMT = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{N}$$

Donde: *n1*= nº de semillas germinadas en el día *d,* = nº de días desde el inicio del ensayo de germinación, y *N* = nº total de semillas germinadas al final del ensayo.

-Valor Pico: porcentaje de germinación en un punto T respecto al número de días necesario para alcanzar este punto.

$$Vp = \frac{\%\text{Germinación en T}}{\text{Punto T (días)}}$$

Donde el punto T es el punto en que se corta la curva de germinación y una recta tangente a la misma desde el origen, e indica el momento en que la velocidad de germinación comienza a descender (Bachetta *et al*., 2008).

-Germinación Media Diaria: indica el porcentaje de semillas que germina cada día (Bachetta *et al*., 2008).

$$GMD = \frac{\%\text{Germinación total}}{\text{Duración del ensayo}}$$

-Vigor de Germinación o Valor Germinativo: relaciona los parámetros Valor Pico (VP) y Valor de Germinación media diaria (GMD) y mide la calidad germinativa resultante de ambas variables. Un mayor valor indica mejor calidad germinativa (Bachetta *et al*., 2008).

$$VG = GMD \cdot VP$$

4.8-Herramientas estadísticas

Para comparar las condiciones de ensayo y generar los modelos estadísticos correspondientes se empleó el software de análisis de estadísticos R (R development core team, 2015).
El procedimiento seguido atiende a un modelo de ensayo de Bernoulli:
1. La variable aleatoria se ajusta a dos resultados posibles: éxito o fracaso. Donde p es la probabilidad de éxito (valor esperado de la variable aleatoria) y su varianza es p (1-p).
2. El resultado de cada ensayo es independiente de los obtenidos en ensayos anteriores (los ensayos de Bernoulli carecen de memoria). Por tanto, la germinación o no de cada semilla se considera como un éxito o fracaso respectivamente.
3. La probabilidad de éxito, p, es constante, modelando el cambio de p a lo largo de un gradiente de temperatura.
Dados n ensayos de Bernoulli (γi, donde i = 1, 2, 3,…, n), el modelo de regresión logístico con independencia de la probabilidad del éxito pi [P (Yi = 1)] en los valores correspondientes a las k variables explicativas x_{i1}, x_{i2},… x_{ik} puede ser descrito como (Hosmer, D.W. & Lemeshow, S., 1989):

$$Ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \alpha + \sum_{j=i}^{k} \beta_j x_{ij}$$

Donde: P (*Y*i=0) = 1- (*Y*i=1) = 1 – pi

Las variables explicativas pueden ser continuas o categóricas. En este estudio, la variable continua es la temperatura, y las categóricas son los estados de las semillas y los tratamientos.
La relación *p*i/1-*p*i es conocida como *odds* de éxito o simplemente *oddso*. El log-odds es también conocido como "logit (*p*i)". Por lo tanto, simplificando y expandiendo la parte derecha del modelo se tiene (Dalgaard, 2008):

$Ln\,(odd) = \beta 0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots + \beta_k x_k$
Nota: Observar la sustitución de α por $\beta 0$.

4.9-Protocolo óptimo de germinación

A través de los modelos estadísticos se extraen las conclusiones para establecer el protocolo óptimo de germinación.

4.10-Conservación *ex situ*

Mediante los porcentajes de germinación se comprueba si las semillas mantienen una capacidad germinativa aceptable después de todo el proceso de conservación.

5-Resultados

5.1- Censos directos y cartografía

Se realizaron 5 censos directos en poblaciones conocidas de *Thymus loscosii*, donde pudimos ver que el número de individuos es muy variado según el área donde se realizó el censo, encontrando una densidad poblacional baja en Elciego, densidades medias en las dos localidades de Laguardia, una densidad elevada en Villabuena y la máxima en Oyón (Tabla 3). Con estos datos se amplía la información recogida en otros trabajos que estudian la dinámica poblacional de de *Thymus loscosii* en su límite de distribución, donde se recoge una estimación de la densidad de sus poblaciones similar en el sur de Navarra (García MB, 2006),

Además se actualizó la información corológica sobre la presencia/ausencia de la especie en cuadrículas UTM de 1x1 km de lado (Figura 3). De las 29 citas de presencia históricas, se visitaron 14, comprobando su presencia en 13 de ellas y su ausencia solamente en una. Por otro lado, se visitaron 22 cuadrículas nuevas, no citadas, donde se observó la presencia de la especie. Estas observaciones quedan respaldadas por pliegos de herbario depositados en el Herbario del Jardín Botánico de Olarizu. Se actualiza de este modo el conocimiento sobre la distribución de *Thymus loscosii* en el País Vasco, que se consideraba bastante más reducida, pese a no haber recorrido la totalidad de su área potencial, comprobando la presencia de la especie en un total de 35 cuadrículas UTM de 1 x1 km de lado, en la Rioja Alavesa. (Ver anexo I, Tabla 8).

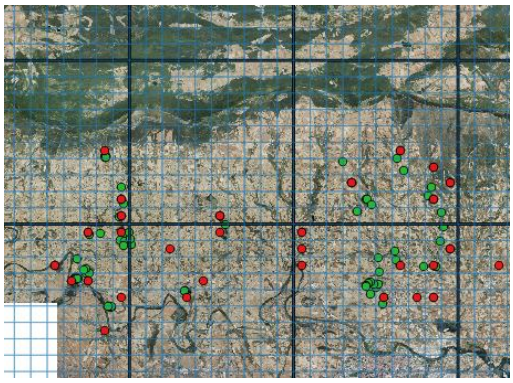


Figura 3. Mapa cartográfico con las nuevas citas (puntos verdes) y las antiguas (puntos rojos) de *Thymus loscosii* en el sur de la Rioja-Alavesa realizado mediante QGIS.

Tabla 3. Censos poblacionales de *Thymus loscosii* en distintas cuadrículas UTM 1x1 km.

Localización	Cuadrículas UTM	Área ocupación (m^2)	Nº individuos	Densidad (Nºind/m^2)
Laguardia	30TWN2814	33166	97	$2{,}92*10^{-3}$
Villabuena	30TWN2611	17914	100	$5{,}58*10^{-3}$
Oyón	30TWN4411	32209	526	$7{,}95*10^{-3}$
Laguardia	30TWN3509	9829	27	$2{,}75*10^{-3}$
Elciego	30TWN3205	9373	12	$1{,}28*10^{-3}$

5.2- Datos fitosociológicos

En la Tabla 9 (Anexo I) se presentan dos inventarios realizados para caracterizar las comunidades vegetales de las que forma parte *Thymus loscosii* en las localidades de el Domen de Layaza, base del Puerto de Herrera, Laguardia (Rioja Alavesa, País Vasco) y en la laguna Carralogroño, Laguardia (Rioja Alavesa, País Vasco). En ambos casos son comunidades que se ajustan a la descripción de la asociación *Salvio lavandulifoliae-Ononidetum fruticosae* y por ello se propone su inclusión en esta.

5.3- Parámetros germinativos

Los resultados obtenidos en el estudio actual se presentan en las siguientes tablas (Tabla 4 y 5). Los parámetros son: Ensayo (Código), Temperatura (Tª), Velocidad de germinación (T50), Tiempo medio de germinación (GMT), Valor Pico (Vp) Germinación media diaria (GMD), Retardo germinativo (RG), Vigor germinativo (VG), Porcentaje de germinación final (%) y Error Estándar (GERM+/-ES).

Tabla 4. Datos de los parámetros germinativos para los ensayos con semillas frescas.

ENSAYO	Tª	T50 (Días)	GMT(Días)	VP	GMD(Días)	RG(Días)	VG	GERM+/- ES
E99	10ºC	20	32,3	0,75	0,63	18	0,47	30+/-6.2
	15ºC	5,4	9,01	1,16	1,08	5	1,26	52+/-6,9
	20ºC	12,4	21,9	1,04	1,04	5	1,08	50+/-7,39
	25ºC	23,4	25	0,38	0,38	5	0,14	18+/-4,24

Tabla 5. Datos de los parámetros germinativos para los ensayos con semillas conservadas.

ENSAYO	Tª	T50 (Días)	GMT(Días)	VP	GMD(Días)	RG(Días)	VG	GERM+/- ES
E103	10ºC	13	4	0,183	0,183	9	0,03	11+/-4,5
	15ºC	14	4	0,07	0,01	9	0	1+/-1,91
	20ºC	14	11,3	0,07	0,05	12	0,004	3+/-2,15
	25ºC	0	0	0	0	0	0	0
P1	10ºC	23	38,9	0,27	0,19	-	0,05	23+/-9,95
	15ºC	16,9	35,7	0,5	0,35	-	0,18	43+/-11,7
	20ºC	19,7	39,5	0,44	0,31	-	0,13	38+/-9,01
	25ºC	22,2	37,4	0,53	0,38	-	0,2	40+/-10,3
P2	10ºC	34,7	40,9	0,51	0,36	-	0,184	44+/-16,8
	15ºC	33,8	45,4	0,21	0,15	-	0,03	16+/-7,83
	20ºC	22,4	39,1	0,57	0,4	-	0,23	49+/-12,6
	25ºC	18	28,2	0,35	0,25	-	0,08	30+/-8,12
P1+P2	10ºC	9,33	46,3	0,33	0,23	-	0,07	28+/-10,0
	15ºC	20	42,61	0,13	0,09	-	0,01	12+/-3.04
	20ºC	22,5	44,2	0,56	0,39	-	0,21	48+/-12,4
	25ºC	22,5	44,5	0,523	0,37	-	0,19	45+/-11,2
P2+P1	10ºC	28,4	,45,5	0,43	0,29	-	0,126	36+/-13,1
	15ºC	17,3	55,42	0,523	0,37	-	0,19	45+/-15,6
	20ºC	18,7	37,4	0,53	0,34	-	0,2	46+/-12,4
	25ºC	17	33,7	0,29	0,21	-	0,06	25+/-9,48

5.4- Protocolo óptimo de germinación

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de germinación y teniendo en cuenta los parámetros germinativos, con las semillas frescas se han obtenido porcentajes de germinación alrededor del 50% en las temperaturas de ensayo intermedias, 15ºC y 20ºC. En el caso de las semillas conservadas, los pocentajes de germinación del ensayo control fueron muy bajos, pero tras practicar las estratificaciones como pretratamiento germinativo, los porcentajes obtenidos superaban el 40% y eran cercanos al 50% en distintas temperaturas. Las curvas de germinación, representación gráfica de los resultados de germinación obtenidos en este estudio se presentan en las figuras 4, 5 y 6.

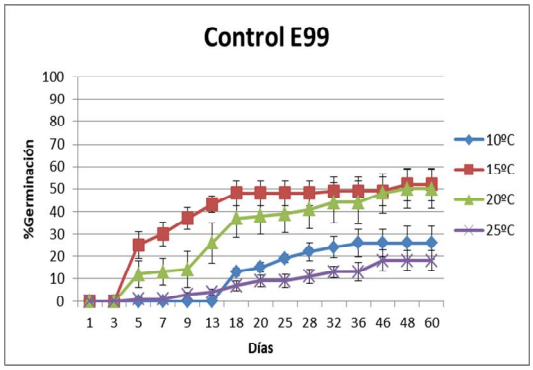


Figura 4. Porcentajes de germinación final de los ensayos con semillas frescas (E99) en función a la temperatura (10, 15, 20 y 25ºC).

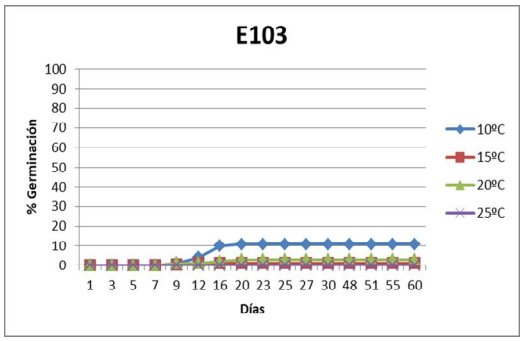


Figura 5.Porcentajes de germinación finl de los ensayos con semillas conservadas (E103 Control) en función a la temperatura .(10,15,20,25ºC).

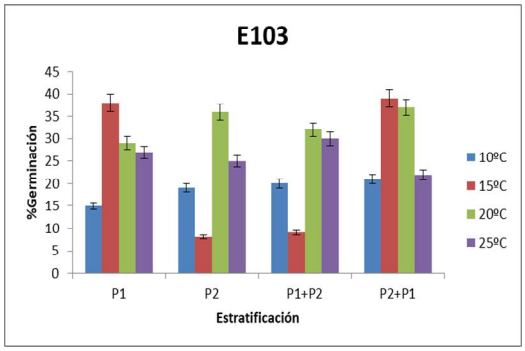


Figura 6. Porcentajes de germinación final de las estratificaciones del ensayo con semillas conservadas; donde P1 es la estratificación cálida, P2 es la fría y P1+P2 y P2+P1, la combinación de ambas

.5.5- Ensayos de viabilidad

a) Test del Tetrazolio

Después de realizar el corte transversal para exponer el embrión y demás estructuras a la sal del tetrazolio (ISTA, 2003), se obtuvo un porcentaje del 100% en cuanto a semillas teñidas, lo que quiere decir que todas ellas eran semillas viables.

b) Test de conductividad

En todos los lotes pudimos ver como hubo un aumento de los lixiviados a medida que transcurría el período de imbibición. También se observa, como es normal, que la conductividad es más alta en las semillas muertas que en las vivas, 70 µ S/cm en muertas y 50µ S/cm en vivas (Castellión, 2008). La diferencia entre ambas no es muy elevada como en otros casos (Soto y Valiengo, 2011), donde los iones lixiviados por las semillas muertas eran mucho mayores.

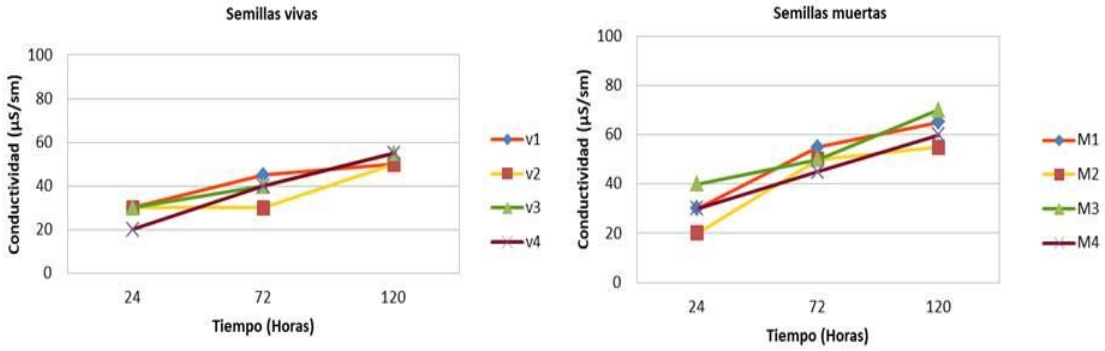


Figura 7. Diferencias entre la conductividad de semillas vivas y muertas a lo largo de los días.

5.6- Modelos estadísticos

Para comparar los distintos tratamientos y pretratamientos se han definido los modelos estadísticos de las germinaciones obtenidas en cada uno de los estados de conservación estudiados (semillas frescas y conservadas), según el Modelo de Regresión Binomial Logístico. En las semillas frescas (Tabla 6) se observan diferencias estadísticamente significativas debido a las temperaturas. En cambio, los ensayos con semillas conservadas (Tabla 7), que siguen un modelo cuadrático, muestran diferencias significativas en los porcentajes de germinación debido a los pretratamientos ($p<0.001$), pero no existen diferencias debido a las temperaturas de incubación. Es decir, las diferencias detectadas se deben a los pretratamientos, pero no a las distintas temperaturas de ensayo.

Tabla 6. Modelo de Regresión Binomial para los ensayos con las semillas en fresco (E99).

	Parámetros estadísticos	**Error estándar**	**Valor de z**	**Pr (>|z|)**
β0(temp)	0.811238	0.153291	-5.292	1.21e-07***
β1(temp^2)	-0.024340	0.004407	-5.523	3.34e-08***

$LnOdds= \beta 0 + \beta 1 * temp^2$

$LnOdds=0.811238 -0.024340 * temp^2$

R^2= 0.9938359 ***Nivel de significancia 0,001

En las figuras 4 y 8, curva de germinación y curva de la probabilidad de germinación, respectivamente, se observa como la germinación de las semillas frescas alcanza su máximo a 15ºC, con valores muy cercanos a los obtenidos en 20ºC, a diferencia de los bajos valores obtenidos a 10ºC y los mínimos a 25ºC, condiciones en que las semillas casi no son capaces de germinar y la probabilidad de que se produzca una germinación es mínima.

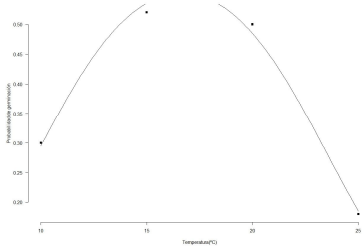


Figura 8. Resultados de la probabilidad de germinación de las semillas frescas en relación a la temperatura.

Tabla 7. Modelo de Regresión Binomial para los ensayos de las semillas conservadas (E103 control y estratificación).

	Parámetros estadísticos	Error estándar	Valor de z	Pr (>|z|)
β0(pret)	0.329350	0.06565	9.007	< 2e-16 ***
β1(temp))	0.080906	0.071258	1.135	0.256
β2(temp^2)	-0.001953	0.002013	--0.970	0.332

LnOdds= β0+β1*temp+ β2* temp^2

LnOdds=0.329350 +0.080906 *temp-0.001953 * temp^2

R^2= 0.273143 ***Nivel de significancia 0,001

En las figuras 5 y 9 se observa la curva de germinación y la curva de probabilidad de germinación del control y los distintos pretratamientos para los ensayos realizados con las semillas conservadas (1: control; 2: estratificación cálida; 3: estratificación fría; 4: combinación estratificación cálida+fría; 5: combinación estratificación fría+cálida). Se puede observar como los resultados del control son los más bajos y que los pretratamientos ayudan a aumentar los porcentajes, alcanzado el mayor porcentaje con la estratificación fría, que con todos los pretratamientos se alcanzan porcentajes entre el 40 y el 50% en algunas de las distintas temperaturas ensayadas. Es evidente la necesidad de los pretratamientos para superar dormiciones inducidas por el desecado y la conservación a bajas temperaturas.

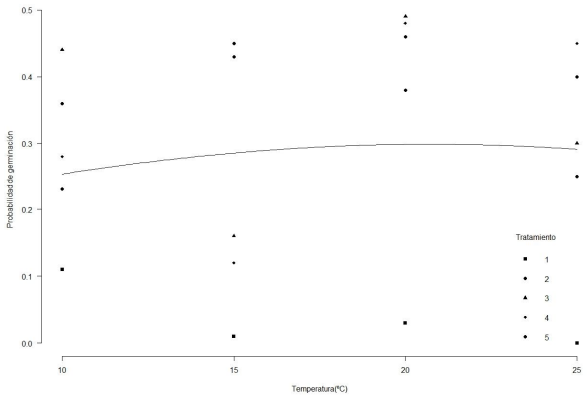


Figura 9. Probabilidad de germinación de las semillas conservadas en función a la temperatura (1: control; 2: estratificación cálida; 3: estratificación fría; 4: combinación estratificación cálida+fría; 5: combinación estratificación fría+cálida).

5.7- Conservación *ex situ*

Como se ha podido observar, comparando los resultados de semillas frescas frente a las semillas conservadas, aunque los porcentajes de germinación son algo menores a medida que transcurre el proceso de conservación las diferencias son mínimas y los porcentajes que se alcanzan son suficientes para poder conservar y almacenar la semilla en un Banco de Germoplasma. Además, queda claro que los pretratamientos ayudan a la germinabilidad de las semillas, rompiendo las dormiciones propias e inducidas por el proceso de conservación. De modo que, podemos concluir que las semillas de *Thymus loscosii* tienen un comportamiento ortodoxo y pueden ser conservadas *ex situ* (Figura 10).

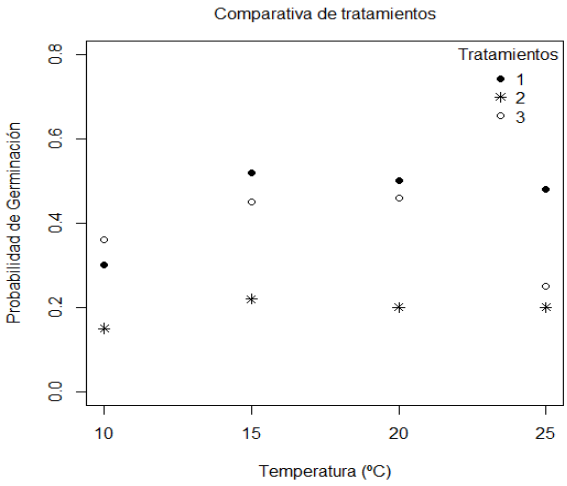


Figura 10. Probabilidad de germinación de cada ensayo control (1: semillas frescas; 2: semillas ultrasecas; 3: semillas conservadas)

6-Discusión

6.1- Ensayos de viabilidad

La realización de los ensayos de viabilidad es una alternativa más rápida y económica a la realización de ensayos de germinación, en la que se establece la calidad del material en base a la realización de pruebas que reflejan alguna actividad biológica, y permiten utilizar un menor número de semillas

6.2- Censos poblaciones

De las 5 cuadrículas censadas, 3 de ellas eran nuevas localidades. La cuadrícula 30TWNN2814 fue citada en 2006 por J. Sesma & P.M. Uribe-Echebarría y la cuadrícula 30TWN3509 a principios de la década de 1980 (Aseginolaza C., *et al.*, 1984). Esto indica que a pesar de que algunas citas son antiguas, la planta se conserva en la actualidad en los mismos lugares donde fue observada, excepto en algunos casos. Tras la visita a las antiguas y nuevas cuadrículas, se ha observado que la población de *Thymus loscosii* en la Rioja Alavesa no ha disminuido tan drásticamente como se había apuntado hasta ahora debido a la transformación de muchas zonas marginales y con aterrazamientos antiguos con gran presencias de ribazos y zonas incultas en grandes planicies dedicadas al cultivo vitivinícola. Sin embargo, es cierto que muchos lugares en los que habita están sufriendo una importante transformación, están siendo antropizados, está desapareciendo su hábitat que continua siendo su principal amenaza, de ahí la importancia que tiene conservar estos lugares para preservar la especie.

6.3- Parámetros germinativos

En las tablas 4 y 5 se recogen todos los parámetros germinativos para los ensayos realizados (semillas frescas y conservadas) donde podemos observar como el porcentaje germinativo disminuye después de la conservación pero que con el estímulo adecuado se pueden obtener porcentajes similares al descongelar y rehidratar adecuadamente las semillas aplicando pretratamientos (50-52% en fresco; 48-49% conservadas).

T50. El general el T50 menor se obtiene a temperaturas medias (15-20ºC), lo que nos indica que se requieren este tipo de temperaturas para obtener porcentajes de germinación elevados o máximos.

GMT. Se ha obtenido una gran variación entre las diferentes temperaturas y para cada ensayo. No sigue un patrón pero el tiempo medio de germinación más bajo es de 9,01 días a 15ºC en semillas frescas.

VP. Por lo general, los valores pico más altos se encuentras a temperaturas de 20-25ºC

GMD. Se observa que solo se supera la unidad con las semillas frescas y a temperaturas de 15-20ºC, lo que nos indica que estas son las temperaturas idóneas para realizar estos ensayos.

RG. Observando los controles podemos decir que es aconsejable utilizar temperaturas medias (15ºC) para realizar los ensayos de germinación, pensando en el cultivo y producción de planta. Pero no podemos afirmarlo con total seguridad, debido a no contar con este parámetro para los ensayos con estratificaciones realizados con semillas conservadas.

VG. El índice de vigor de germinación refuerza la conclusión de que la temperatura óptima para *Thymus loscosii*, es por lo general, 15ºC.

De todos modos, debemos señalar que es posible que las conclusiones que se obtienen de las comparaciones estén afectadas en cierto grado porque los ensayos fueron realizados en distintos periodos de tiempo.

6.4- Protocolo óptimo de germinación

Como ya se ha comentado este estudio engloba dos experimentos (ensayos de germinación con semillas frescas y semillas conservadas) donde se quería comparar la germinación para afirmar si es posible conservar *ex situ* semillas de *Thymus loscosii*. Para las semillas frescas el protocolo óptimo, con el que se obtienen porcentajes de germinación máximos, entorno al 50%, es 15ºC y fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad, con el menor Retardo germinativo y el menor T50. Estos porcentajes son muy similares a los que se han obtenido después del proceso de conservación. Pero se ha comprobado que las semillas aumentan su germinabilidad después de romper y superar las dormiciones. Esto se comprueba gracias a las estratificaciones, ya que los porcentajes del ensayo control después del proceso de conservación no fueron muy buenos pero gracias a las estratificaciones se ha visto que la semilla es capaz de alcanzar los mismos porcentajes que en fresco. Así que en el caso de las semillas conservadas es imprescindible practicar estratificaciones frías o cálidas o la combinación de ambas para poder llegar a obtener porcentajes máximos, aunque en temperaturas diferentes en cada caso.

6.5- Conservación *ex situ*

Los porcentajes de germinación de las semillas antes y después de proceso de conservación son prácticamente similares con semillas frescas que con las conservadas, lo que nos indica que los porcentajes son suficientes para conservar y almacenar la semilla en un Banco de Germoplasma. Podemos concluir que las semillas de *Thymus loscosii* tienen un comportamiento ortodoxo y puede ser conservada *ex situ*.

De cara al futuro, se podría mejorar este estudio teniendo en cuenta los efectos de otras variables como la población, recolectando semillas en distintas poblaciones y realizando los mismos ensayos, así como la época de recolección, ya que el estudio actual solo tiene una población y una única fecha de recolección. Puesto que como se ha observado en otros trabajos previos en los que sí estudiaron la

variabilidad interpoblacional, existen diferencias significativas en los porcentajes de germinación debido a este factor (Albert, M.J. *et al*., 2002), pero tan solo con semillas frescas y sin practicar pretratamientos.

7-Conclusión

Se han obtenido datos nuevos que amplían y actualizan la información existente sobre poblaciones conocidas, se ha definido el protocolo óptimo de germinación y los protocolos de viabilidad y se ha determinado que las semillas son viables y pueden ser conservadas *ex situ*.

Por último, a la luz de los resultados habría que evaluar si el taxón tiene que mantenerse en la Lista Roja de Flora Vascular del País Vasco o al menos, incoroporar la nueva información que se ha generado en futuras reevaluaciones, ya que ha aumentado el número de cuadrículas UTM 1x1 km conocidas. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el área de ocupación de la especie es reducida en nuestro territorio, sus poblaciones son pequeñas y con baja densidad de individuos, por lo general, y que las poblaciones son frágiles. Por lo tanto, sería conveniente hacer un seguimiento de la especie a lo largo del tiempo para comprobar los efectos de la antropización y la conversión de su hábitat en terrenos de cultivo, además de estudiar con mayor detalle su distribución real en el territorio, que parece ser mayor que la considerada históricamente.

8-Agradecimientos

Agradecer, en primer lugar a Agustí Agut, responsable del BG del JBO, su gran acogida para la realización de este proyecto, su implicación y su dedicación a lo largo del mismo. En segundo lugar, a Asier Jáñez, técnico del BG del JBO, por su gran ayuda cuando lo he necesitado.

A Javier Loidi, director del máster y cotutor de este proyecto, reconocerle su papel institucional y personal.

Por último, a la familia y amigos agradecerles la paciencia y el cariño en los momentos que se necesitaban.

9-Bibliografía

Agut, A., Del Canto, A. & Mira, S.(2012). *Memoria final del proyecto. "Programa de conservación y reintroducción de la flora amenazada y característica de los robledales isla de la Llanada Alavesa.* Centro de Estudios Ambientales, Vitoria-Gasteiz.

Albert, MJ., Iriondo, JM. & Pérez-García, F. 2013. *Effects of temperature and pretreatments on seed germination of nine semiarid species from NE Spain.*Departamento de Biología Vegetal, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

Aseginolaza, C., Gómez, D. Lizaur, X., Montserrat, G., Morante, G., Salaverria, M.R., Uribe-Echebarria, P.M. & Alejandre, J.A. (1984). Catálogo florístico de Álava, Vizcaya y Guipúzcoa. Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.

Bachetta, G., Bueno, A., Fenu, G., Jimenez, B., Mattana, E., Piotto, B., & Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres.* La Caixa, Principado de Asturias.
Braun-Blanquet.

BOE, 1990. Real Decreto 439/1990, Catálogo de Especies Amenazadas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

BOPV/EHAA, (2011) Orden de 10 de Enero de 2011, de la Consejera de Medio Ambiente Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, por la que se modifica el Catálogo Vasco de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre y Marina y se aprueba el texto único. VitoriaGasteiz. (Nº37 ZK.) Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.
Castroviejo, S. (1986-2012). *Flora iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e islas Baleares*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, 1-21.

Côme, D. (1970). *Les obstacles a la germination.* Masson, París, 162 pp.

Dalrgaard, P. "Introductory Statistics with", 2008. Tema 13, © Springer Science+Business
Media, LLC. 227-248pp

Fernández-González, F., Loidi, J. & Molina, A. 1986. *Contribución al estudio de los matorrales aragoneses: los salviares riojanoestelleses*. Anales Jard. Bot. Madrid. 42 (2): 451459 pp.

Ferrer, PP., Ferrando, I., Gago, C., y Laguna, E. (2013). *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada.* Colección Manuales Técnicos Biodiverisdad, 3.Conselleria d´infraestructures, Territori i MediAmbient. Generalitat Valenciana. Valencia.

Ferriol, M. & Merle, H., 2012 El Inventario Fitosociológico. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. E.T.S.I.A.M.N. Universidad Politécnica de Valencia. España [Último acceso 20/08/2017:
https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16818/El%20inventario%20Fitosociol%c3%b3gico.pdf?sequence=3]

García, MB. (2006). *Demografía y viabilidad de poblaciones periféricas del tomillo sanjuanero (Thymus loscosii Willk.), endemismo del Valle del*

Ebro. Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), Zaragoza.

Gobierno de Aragón. (2007). Catálogo de Especies Amenazadas en Aragón. Flora. Departamento de Medio Ambiente.

Gobierno de España, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2011). Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y Catálogo Español de Especies Amenazadas.

Hosmer, D.W. & Lemeshow, S. "Applied Logistic Regression", 1989. Segunda edición. John Wiley&Sons. Capítulo 7, 392pp. ISBN: 0-471-35632-8.

Iriondo, JM. (2011). *Atlas y Libro rojo de la Flora vascular Amenazada de España Manual de metodología de trabajo corológico y demográfico.* Dirección General de Medio natural y Política forestal (Ministerio de Medio ambiente y Medio rural y Marino)- Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid, 70 pp. NIPO: 770-11-066-5

Koob, B., Pardey, P. & Wright, B. (2004).Saving seeds.IPGRI and IFPRI.CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 209-217.
Massach, V. (1958) El clima, *In: Geografía de Catalunya,* I: 163-186. Barcelona.

Molero, J. &Rovira, A. (1982).Contribución al estudio biotaxonómico de *Thymus loscosii* Wilk.y *Thymus Fontqueri* (Jalas) Molero&Rovira, stat. nov.AnalesJard. Bot. Madrid 39 (2): 279-296.

Uribe-Echebarría, P.M., Zorrakin, I., Campos. J.A., y Dominguez, A. (2006). *Flora vascular amenazada de la Comunidad Autónoma del País Vasco.* Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.

WITT, S. (1985).*Biotechnology and genetic diversity*. California Agricultural Lands Project, San Francisco. 145 pp.

Páginas Web

Gobierno de Aragón. Departamento de Medio Ambiente.
http://floragon.ipe.csic.es/ficha.php?genero=Thymus&especie=loscosii&subespecie=

Gobierno Vasco/Euskojaularitza.
http://www.euskadi.eus/gobierno-vasco/departamento-medio-ambiente-politica-territorial/inicio/

Herbario Digital de Xabier de Arizaga (21/02/2017. http://www.herbario.ian-ani.org/
SIVIM (Sistema de Información de la Vegetación Ibérica y Macaronésica) 21/02/2017 http://www.sivim.info/.

Programas informáticos.

Programa QGIS Dekstop V. 2.2. Linux. Ubuntu

R Depelopment core team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org 20/08/2017

10-Anexo I

Tabla 8. Resumen de las cuadrículas UTM con citas históricas comprobadas y las nuevas citas, indicando presencia/ausencia de *Thymus loscosii*.

Cuadrícula 10x10	Cuadrícula 1x1	Cita	Presencia
	30TWN2611	Nueva	Sí
30TWN21	30TWN2814	Comprobada	Sí
	30TWN2912	Nueva	Sí
	30TWN2911	Comprobada	Sí
	30TWN2910	Comprobada	Sí
30TWN31	30TWN3510	No comprobada	-
30TWN41	30TWN4614	Comprobada	Sí
	30TWN4213	Nueva	Sí
	30TWN4613	Nueva	Sí
	30TWN4813	No comprobada	-
	30TWN4312	No comprobada	-
	30TWN4812	Nueva	Sí
	30TWN4912	No comprobada	-
	30TWN4411	Nueva	Sí
	30TWN4811	Comprobada	Sí
	30TWN4310	Nueva	Sí
	30TWN4910	Nueva	Sí
30TWN20	30TWN2709	Comprobada	Sí
	30TWN2809	Nueva	Sí
	30TWN2909	Comprobada	Sí
	30TWN2908	Nueva	Sí
	30TWN2507	No comprobada	-
	30TWN2607	Nueva	Sí
	30TWN2707	Nueva	Sí
	30TWN2606	Comprobada	Sí
	30TWN2706	No comprobada	-
	30TWN2905	Comprobada	No
	30TWN2804	Nueva	Sí
	30TWN2803	No comprobada	-
30TWN30	30TWN3509	Comprobada	Sí
	30TWN3208	No comprobada	-
	30TWN3406	No comprobada	-
	30TWN3305	Comprobada	Sí
	30TWN3205	Nueva	Sí
30TWN40	30TWN4009	No comprobada	-
	30TWN4909	Nueva	Sí
	30TWN4008	No comprobada	-
	30TWN4608	Nueva	Sí
30TWN40	30TWN4808	Nueva	Sí
	30TWN4908	No comprobada	-
	30TWN4007	No comprobada	-
	30TWN4507	Nueva	Sí
	30TWN4607	Comprobada	Sí
	30TWN4707	Nueva	Sí
	30TWN4807	Comprobada	Sí
	30TWN4406	Nueva	Sí
	30TWN4506	Nueva	Sí
	30TWN4405	Nueva	Sí
	30TWN4505	Comprobada	Sí
	30TWN4605	No comprobada	-
	30TWN4705	No comprobada	-

Tabla 9. Inventario 1: Laguardia (Rioja Alavesa, Álava/Araba), Ladera abajo del dolmen de Layaza, base del Puerto de Herrera. Romeral-tomillar rodeado de cultivos cerealistas; 30TWN2814; 650 m; Área: 20 m^2, Cobertura: 70%, Orientación: Sur, Pendiente: 25º. Fecha; 08/07/2016; Autores: Agustí Agut y Asier Jáñez. Inventario 2: Laguardia (Rioja Alavesa, Álava/Araba); Laguna de Carralogroño. Romeral-salviar en ladera rocosa de grandes bloques, rodeado de viñedos; 30TWN3509; 550 m; Área: 30 m^2; Cobertura: 70%; Orientación: Norte; Pendiente: 45º; Fecha 23/06/2017; Autores: Agustí Agut, Asier Jañez y Sandra Aldaz.

Especie	**Inventario 1**	**Inventario 2**
Rosmarinus officinalis	3	3
Salvia lavandulifolia	-	3
Brachypodium retusum	3	2
Aphyllanthes monspeliensis	1	3
Genista scorpius	1	2
Coronilla minima	1	2
Avenula bromoides	-	3
Quercus coccifera	-	2
Bupleurum furticescens	-	2
Thymus loscosii	1	1
Dorycnium pentaphyllum	1	1
Coris monspeliensis	1	1
Juniperus oxycedrus	1	+
Arctostaphyllos uva-ursi	1	-
Carex halleriana	1	-
Festuca hystrix	1	-
Koeleria vallesiana	1	-
Gaudinia fragilis	1	-
Erica vagans	1	-
Fumana thymifolia	-	1
Fumana ericoides	-	1
Lavandula latifolia	-	1
Thymus vulgaris	+	1
Cistus albidus	+	1
Helichrysum stoechas	+	+
Blackstonia perfoliata	+	-
Linum narbonense	+	-
Linum appresum	+	-
Anthoxanthum odoratum	+	-
Phelipanche sp.	+	-
Lithospermum fruticosum	-	+
Rhamnus alaternus	-	+
Helianthemum cinereum subsp. Rotundifolium	-	+
Galium parisiense	-	+
Asperula aristata subsp. Longifolia	-	+
Staehelina dubia	-	+
Censo *Thymus loscosii*	**97 individuos**	**27 individuos**