



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**DISPERSIÓN DE SEMILLAS EN
PAISAJES DE OLIVAR EN
ANDALUCÍA:
CARACTERIZACIÓN Y
EVALUACIÓN DE SU VIABILIDAD**

Alumno: David Perea Galián

Julio, 2023



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Trabajo Fin de Grado

DISPERSIÓN DE SEMILLAS EN PAISAJES DE OLIVAR EN ANDALUCÍA: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU VIABILIDAD



DAVID

P.G.

Alumno: David Perea Galián

Jaén, Julio, 2023

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1. Sistema de estudio, localización y zona de muestreo	6
4.1.1 <i>Caracterización inicial y criterios de selección de fincas</i>	7
4.1.2 <i>Sistema de recolección de muestras</i>	8
4.2. Extracción de ADN y recuperación de la semilla	9
4.3. Medición de las semillas	10
4.4. Evaluación de la viabilidad por técnica de flotación	12
4.5. Evaluación de la viabilidad mediante prueba del tetrazolio	14
4.6. Comparación con semillas sin proceso de extracción	16
4.7. Realización del banco de datos	18
4.8. Análisis estadístico de los datos recogidos	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Caracterización de especies dispersadas	19
5.2. Caracterización de especies dispersoras	19
5.3. Relación semilla-dispersor	20
5.4. Comparación de la viabilidad de semillas con y sin proceso de extracción de ADN	23
6. DISCUSIÓN	25
6.1. Resultados de las especies dispersadas, comunidad de dispersores y su relación	25
6.2. Alternativas frente al proceso de extracción de ADN	27
6.3. Fiabilidad de la metodología empleada	29
7. CONCLUSIONES	32
8. BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXO I. Tabla de semillas recolectadas por especie y finca sometidas a proceso de extracción de ADN	39
ANEXO II. Tabla de semillas recolectadas por especie y finca no sometidas a proceso de extracción de ADN y cuya viabilidad se comparó con sus semejantes pero sometidas a extracción (Anexo I)	39

1. RESUMEN

El paisaje de olivar es un agroecosistema que destaca por ser un importante reservorio para la biodiversidad en la región mediterránea. En particular, destaca su papel como lugar de invernada y paso de aves frugívoras. Esto se debe a la presencia de un alimento cargado de alto contenido lipídico para las especies frugívoras (especialmente las aves), el fruto de la aceituna, junto con otras especies mediterráneas de carácter arbustivo. El “efecto llamada” que realiza el olivar para las aves no es sólo para la actividad nutricional, sino que también es clave en las funciones de crecimiento y reproducción de las especies. Las aves frugívoras ejercen una labor de dispersión de semillas crucial para el desarrollo de los remanentes de vegetación natural existentes en el olivar, así como la creación de nuevas poblaciones que permitan crear paisajes diversos, compatibles con el agroecosistema y con el manejo del cultivo. Para evaluar dicho servicio ecosistémico y conectividad del paisaje, se requiere en muchos casos de la identificación del dispersor. Modernos métodos de determinación del dispersor (métodos moleculares) conllevan directamente un tratamiento agresivo de la semilla. En este trabajo se demuestra la incompatibilidad de los métodos moleculares para la identificación del dispersor y el mantenimiento de la viabilidad de la semilla y su potencial de germinación.

ABSTRACT

Olive grove landscape is an agro-ecosystem that stands out for being a highly important reservoir for the biodiversity of the Mediterranean region. In particular, it is an important winter quarter and stopover habitat for avian frugivores. This is due to the presence of a foodstuff with a high lipid content for frugivorous species (especially birds), the olive fruit, together with other Mediterranean fruit-bearing shrub species. The "call effect" of the olive grove for birds is not only for nutritional activity, but is also key to the growth and reproduction functions of the species. The frugivorous birds performs a crucial seed dispersal task for the development of the remnants of natural vegetation existing in the olive grove, as well as the creation of new populations that make it possible to create diverse landscapes, compatible with the agro-ecosystem and with crop management. In order to assess this ecosystem service and landscape connectivity, in many cases the identification of the animal responsible for seed dispersal is required.

Some modern techniques used for this end (molecular technique) leads directly to aggressive seed treatment. This paper demonstrates the incompatibility of molecular methods for disperser identification with the study of seed viability and germination potential.

2. INTRODUCCIÓN

La alteración de los paisajes naturales por el ser humano y los cambios en el uso del suelo son unos de los principales factores que contribuyen al Cambio Global y a la crisis de pérdida de biodiversidad (Sodhi & Ehrlich, 2010). En particular, la intensificación agrícola acaecida en las últimas décadas ha supuesto una homogeneización y simplificación de los paisajes agrícolas en toda Europa, incluyendo al olivar, con consecuencias ambientales negativas (Castro-Caro, 2015). La pérdida de los hábitats naturales y la disminución de recursos de frutos, causados por la eliminación no selectiva del sotobosque, ha desplazado a las aves frugívoras a los olivares durante el invierno (Rey, 1993), lo que ocasiona que las diferentes especies de aves frugívoras tengan escasos recursos alimenticios, siendo la aceituna el más abundante durante el invierno. Cabe resaltar que en el centro y alto valle del Guadalquivir (provincias de Córdoba y Jaén), el olivar forma prácticamente un monocultivo que da lugar a paisajes homogéneos, donde la vegetación autóctona representa menos del 1% de la superficie del Valle del Guadalquivir (Aparicio, 2008).

La diversidad de fruto es pobre en el olivar (Rey, 2011) siendo mayor en zonas de matorral mediterráneo (Herrera, 1984). Este hecho tiene consecuencias en las comunidades de aves invernantes debido a que una de las variables que explican la distribución invernal de las aves en la península ibérica es la estructura de la vegetación (Senar & Borrás, 2004). El contexto paisajístico determina las relaciones ecológicas (Tscharntke et al., 2012), y la presencia y distribución de estos parches de vegetación mediterránea en el paisaje del olivar favorece la diversidad de aves y el servicio ecosistémico de dispersión de semillas (Rey et al., 2021) cuya movilidad y viabilidad puede verse afectada por la fragmentación del paisaje (González-Varo, 2017) y por prácticas agrícolas intensivas. La selección artificial del fruto (la aceituna) junto con dichas prácticas provocan una simplificación del propio hábitat y del paisaje con la consecuente reducción de los recursos alimenticios de las aves en los campos de cultivo. Esta reducción causa efectos negativos en la dieta y la condición corporal de las aves, así como en su abundancia y diversidad. Algunas de estas limitaciones pueden superarse parcialmente con la presencia de pequeños setos y bosquetes en el paisaje agrícola (Rey, 2011).

Los setos y relictos de flora son cruciales para enriquecer, ya no sólo la comunidad de especies vegetales, sino también las de especies animales, concretamente la avifauna. Estos a su vez facilitan servicios ecosistémicos como la dispersión de semillas (Rey et al., 2021). Es por ello por lo que, dada la casuística y el estado de los agroecosistemas en la región mediterránea, hoy en día el consumo de frutos, dispersión y posterior germinación de semillas de la flora autóctona (ibérica y especialmente andaluza) por parte de las aves juega un papel fundamental en el modelado del paisaje, conectando remanentes de vegetación y facilitando la creación de nuevas poblaciones de especies vegetales, creando así pequeñas islas de biodiversidad. Estas islas de biodiversidad proporcionan refugio y alimento a la comunidad de especies presente en el ecosistema, lo que sin duda incrementa el pool de especies a nivel local. Así mismo, la dispersión de semillas constituye un proceso fundamental en un mundo cada vez más fragmentado, que promueve la conectividad de las poblaciones, la colonización y los cambios de distribución de las plantas (González Varo et al., 2017). Las interacciones indirectas entre especies de plantas mediadas por animales frugívoros pueden ser fundamentales para la dinámica de poblaciones y comunidades, ya que la dispersión exitosa de semillas de especies puede depender de interacciones facilitadoras o competitivas con plantas heteroespecíficas (Rumeu et al., 2019).

Las plantas de frutos carnosos pueden afectar el éxito de la dispersión de especies cofructíferas al aumentar (facilitar) o disminuir (competencia) su fuerza de interacción con los frugívoros compartidos (Carlo, 2005; Martínez et al., 2014; Albrecht et al., 2015). En el olivar, la causa de dicho fenómeno se debe a la predilección de las aves por los frutos de ciertas especies vegetales, concretamente del olivo, como consecuencia de la alta carga lipídica y nutricional de su fruto, y esta misma interacción puede interferir en la relación del dispersor con el resto del conjunto de especies del bosque mediterráneo. Las limitaciones de espacio y la selectividad de tamaño efectiva tienen consecuencias obvias para los patrones de dispersión de semillas, ya que las plantas con frutos grandes atraen menos especies de aves que las plantas con frutos pequeños (Wheelwright, 1985). Por otro lado, un problema metodológico que entraña los avances y estudios de dispersión de semillas por parte de animales frugívoros es identificar "qué especie dispersó las semillas". (González-Varo et al., 2014).

Conocer la identidad del dispersor es clave para analizar el conjunto de especies que puede realizar el proceso de ingestión de fruto y dispersión de la semilla. Para ello, se emplean técnicas moleculares, con las que mediante la secuenciación del ADN de los restos del epitelio intestinal del dispersor que permanecen adheridos a la semilla dispersada se puede identificar la especie a la que corresponden (González-Varo et al., 2014).

Esta técnica resulta de una gran utilidad para caracterizar el valor funcional de especies de frugívoros dentro de diversos ensamblajes mutualistas, así como la evaluación de cómo múltiples especies de frugívoros contribuyen claramente a los eventos críticos de dispersión, como puede ser la distancia o la colonización de nuevos hábitats (González-Varo et al., 2014). Sin embargo, este proceso de análisis y extracción de ADN sobre la semilla dispersada requiere de un procedimiento altamente invasivo, al ser tratada con productos químicos y altas temperaturas, condiciones que no encuentra la semilla de forma natural y que pueden afectar a la viabilidad y germinación de esta. Se desconoce a ciencia cierta si estos procedimientos merman el potencial de viabilidad de las semillas estudiadas. Es por esto, por lo que consideramos importante estudiar el efecto de la extracción de ADN sobre la viabilidad de las semillas procesadas con el fin de poder emitir una serie de recomendaciones de cara a futuros trabajos que aborden de forma complementaria el estudio de la viabilidad de las semillas dispersadas a la vez que la identificación del dispersor.

3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene por objetivos (1) caracterizar la comunidad de aves frugívoras que consumen frutos carnosos de especies vegetales leñosas en los remanentes de vegetación seminatural en paisajes de olivar, relacionando el tamaño de la semilla con la especie dispersora y (2) evaluar si los procesos de extracción de ADN al que se somete la semilla para identificar al dispersor degradan la viabilidad de esta.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sistema de estudio, localización y zona de muestreo

El sistema de estudio sobre el que se realizó el trabajo fue el agroecosistema del olivar. Se seleccionaron 14 fincas localizadas en el sur peninsular, concretamente en la comunidad autónoma de Andalucía (España) repartidas entre las provincias de Jaén (6), Córdoba (3), Sevilla (2), Málaga (1), Cádiz (1) y Granada (1) (ver Fig. 4.1). Los olivares y lugares de estudio forman parte del diseño y sistema de estudio del proyecto LIFE Olivares Vivos (ver Rey et al. 2019, para detalles).



Figura 4.1. Mapa de localización de las fincas. Google Earth 2023.

A continuación, se adjuntan las abreviaturas empleadas de cada finca (ver Tabla 4.1) junto con las coordenadas (ver Tabla 4.2).

Tabla 4.1. Abreviaturas de los nombres de las fincas.

Ar	Ardachel	Tos	La Tosquilla
Be	Benzalá	Mon	Monva
CA	Casilla Aranda	Mo	Moraleta de Zafayona
CG	Cortijo Guadiana	Olu	Olivar de La Luna
To	El Tobazo	PG	Peña del Gallo
Lt	Finca La Torre	PC	Piedras Cucas
Ga	Gascón	RH	Rancho del Herrador

Tabla 4.2. Coordenadas de referencia para cada una de las fincas seleccionadas.

Coordenadas UTM				Coordenadas UTM			
FINCA	X	Y	HUSO	FINCA	X	Y	HUSO
Ardachel	530728	4249711	30S	La Tosquilla	373554	4157950	30S
Benzalá	409364	4188210	30S	Monva	446345	4190902	30S
Casilla Aranda	367435	4167078	30S	Moraleda de Zafayona	413689	4115062	30S
Cortijo Guadiana	479031	4195792	30S	Olivar de La Luna	346729	4225334	30S
El Tobazo	410052	4156591	30S	Peña del Gallo	280629	4096868	30S
Finca La Torre	350749	4097893	30S	Piedras Cucas	276573	4075094	30S
Gascón	296947	4136415	30S	Rancho del Herrador	276573	4075094	30S

4.1.1 Caracterización inicial y criterios de selección de fincas

La selección de las fincas se estableció en base a un gradiente de complejidad de paisaje, desde paisajes simples, donde el olivar es un monocultivo que da lugar a un paisaje homogéneo sin apenas remanentes de vegetación seminatural, a paisajes complejos, donde el olivar es un uso del suelo más y una buena proporción del suelo está ocupada por masas forestales (Fig. 4.2).



Figura 4.2. A la izquierda un paisaje prácticamente homogéneo correspondiente a Casilla Aranda (CA) (olivar como cultivo mayoritario sin remanentes de vegetación natural) y a la derecha un paisaje complejo, finca Rancho del Herrador (RH) (olivar con la presencia de parches y setos de vegetación natural). Google Earth (2023).

4.1.2. Sistema de recolección de muestras

La recolección de las semillas se realizó mensualmente de julio de 2021 hasta marzo de 2022, periodo del ciclo anual con máxima actividad de aves frugívoras. Usamos para ello de bandejas colectoras de semillas (Fig. 4.3) que consistían en un recipiente de base rectangular, con unas medidas de 57x42x8 centímetros y, en la parte superior, contaban con una malla metálica para evitar la depredación de las semillas, una vez caídas en la bandeja, por otras especies como micromamíferos o aves. Las bandejas se colocaron en las zonas improductivas, tratándose éstas de pequeños parches de vegetación natural, que sirven como zona de alimentación y descanso para las aves. En estas zonas se produce activamente el fenómeno conocido como “lluvia de semillas”.

Este concepto se define como el conjunto de semillas dispersadas desde su progenitor por factores bióticos o abióticos (Martínez Orea et al., 2009), determinando la distribución espacial futura de las poblaciones de las plantas dentro de una comunidad (Cardona, 2004). Cada semilla (o conjunto de semillas pertenecientes a un mismo excremento) se almacenó independientemente en microtubos de 2 ml. y se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.



Figura 4.3. Bandeja de semillas situada en una zona improductiva.

4.2. Extracción de ADN y recuperación de la semilla

Una selección de las semillas recolectadas en campo fue sometida a extracción de ADN y posterior secuenciación para identificación del dispersor ('barcoding' a partir de la región COI de ADN mitocondrial), a partir de los restos epiteliales del ave que la semilla arrastra al ser defecada o regurgitada (ver por ej. González-Varo et al. 2014). En el proceso de extracción, la semilla está expuesta a reactivos químicos y temperaturas no habituales en la naturaleza, que pueden dañarla y comprometer su viabilidad. En concreto estas semillas, en la fase de incubación, estuvieron inmersas en un buffer de extracción denominado tampón de Longmire (compuesto por 0.1 M Tris-HCl pH 8; 0.1 M EDTA pH 8; 0.01 M NaCl y 0.5% SDS) durante 1h 40 min a 50°C en termoagitación y posteriormente sufrieron una centrifugación a 9600 g durante 2 minutos. La recuperación de la semilla se realizó mediante lavado con agua destilada en un colador para retirar la parte orgánica procedente del excremento y reactivos químicos de la extracción (Fig. 4.4) y posterior secado primero con papel absorbente y posteriormente en estufa a 37°C durante 48 horas.

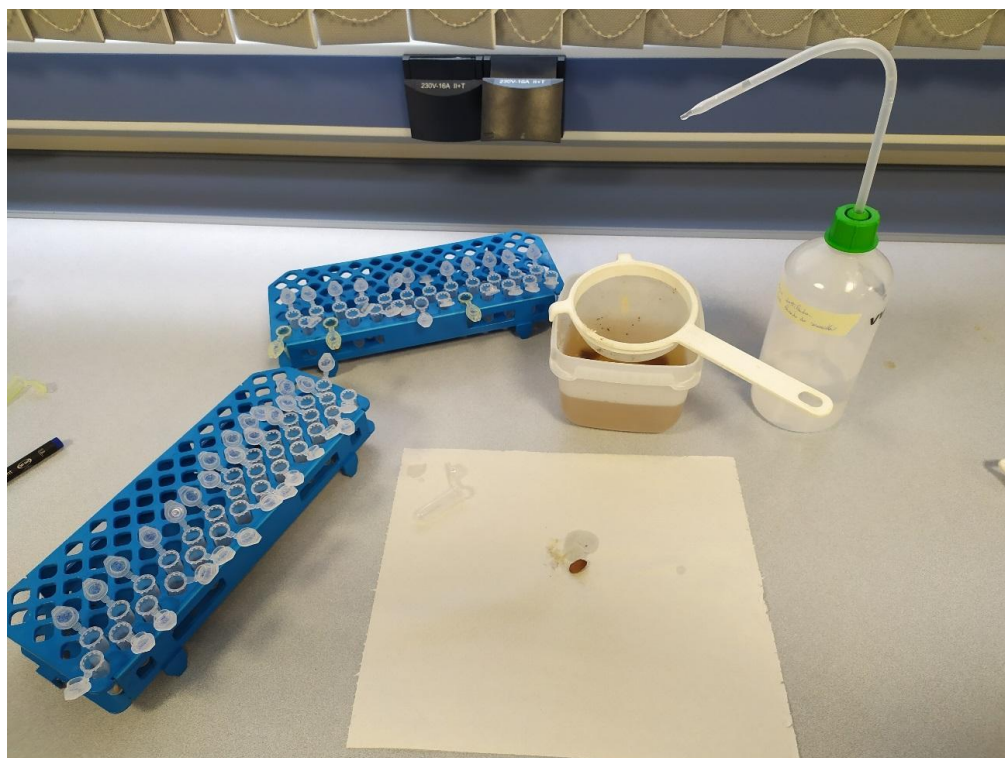


Figura 4.4. Lavado de semillas tras el proceso de extracción de ADN

4.3. Medición de las semillas

En la mayoría de los animales, especialmente en aquellos que deben tragar alimentos enteros, el tamaño de la presa está relacionado con el tamaño del depredador. (Wheelwright, 1985). La medición de las semillas se realizó con el fin de caracterizar los rasgos fenotípicos de la misma y relacionarlos con el dispersor. En caso de haber más de una semilla por excremento, se individualizaron para poder asociar los valores de tamaño de las semillas y posterior prueba de viabilidad a cada una de las semillas. (Fig. 4.5).

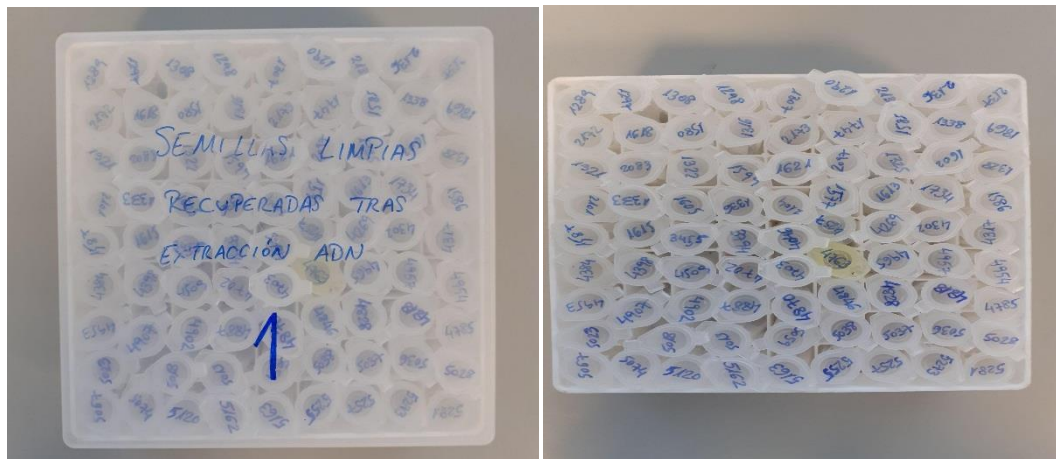


Figura 4.5. Semillas limpias y recuperadas tras la extracción de ADN.

Para el proceso de medición de las semillas, se establecieron tres componentes y/o atributos a medir (Fig. 4.6):

Eje 1: largo/longitud/altura

Eje 2: anchura

Eje 3: grosor

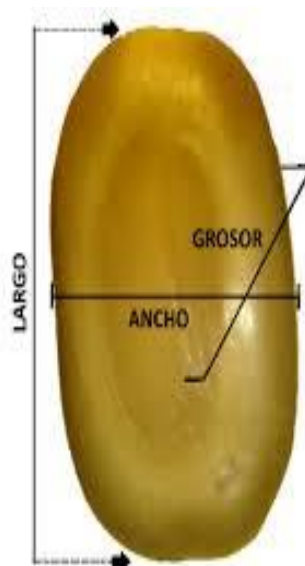


Figura 4.6. Representación de tres atributos medibles para determinar el tamaño de las semillas, largo, ancho y grosor de las semillas. (Romero-Saritama & Pérez-Ruíz, 2016).

Para ello se usó un calibre, nonio o “Pie de rey” digital (Fig. 4.7). Este instrumento tiene tres tipos de salientes distintos para medir las dimensiones de un cuerpo, tanto las exteriores como las interiores y, además, la escala principal se divide en milímetros. El pie de rey también está equipado con un freno para, una vez ajustado al cuerpo, evitar el deslizamiento del nonius durante la lectura (Miret et al., 2010). Este instrumento es usado para medir grosores pequeños, dimensiones interiores pequeñas y profundidades de pequeñas cavidades (Fernández & Pérez, 2002).

Como ventaja a destacar, el calibre digital permitió determinar las medidas de las semillas con una gran precisión, obteniendo una buena calidad de los resultados, incluyendo aquellas semillas de tamaño mínimo que hubo que considerar. Esto es gracias a la sensibilidad del instrumento (0.01 mm) y a la precisión que ofrece ($\pm 0,03$ mm).

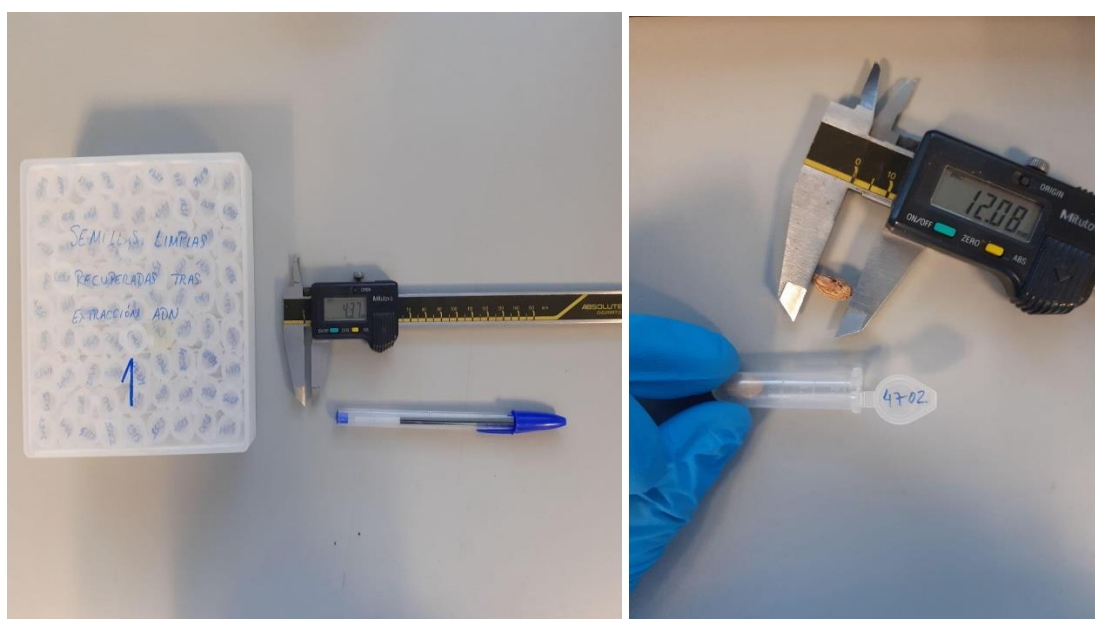


Figura 4.7. Tamaño del calibre utilizado (izquierda) y comparativa del mismo frente a una semilla de olivo (derecha).

Se anotaron las medidas de los atributos de cada una de las semillas (Fig. 4.8), descartando así aquellas muestras que sólo contenían cápsulas o restos de endocarpio sin semilla. En el caso de las semillas de *Rhamnus alaternus/lycioides*, sólo se midió la altura de la cápsula que envuelve al endocarpio y que está relacionada con la altura (eje 1) de la drupa.

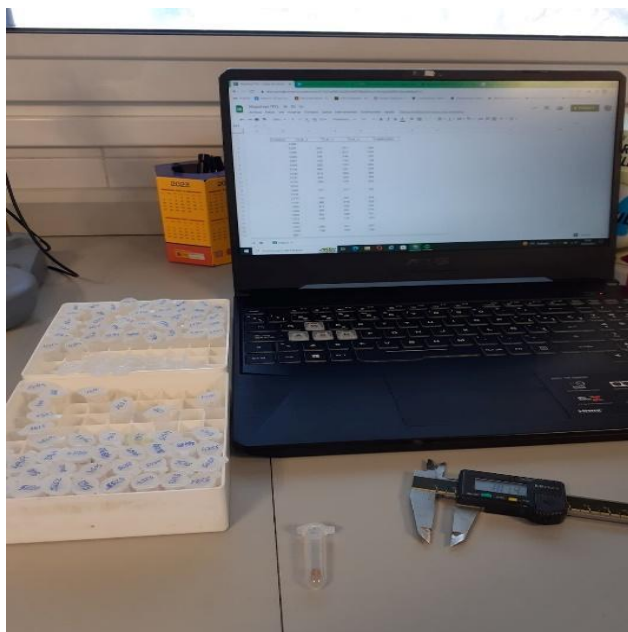


Figura 4.8. Instrumentación empleada para este apartado inicial de semillas junto con archivo de anotación.

4.4. Evaluación de la viabilidad por técnica de flotación

Una técnica rápida usada para descartar semillas inviables, por ausencia de embrión o dañadas, es la técnica de flotación. Consiste en la inmersión de la semilla en medio acuoso para comprobar si flota o no. Si la semilla es viable, ésta absorbe el agua, aumenta su peso y se hunde en el fondo del tubo/recipiente empleado, en un tiempo que puede abarcar desde varios minutos hasta varias horas. Si la semilla no tiene embrión, queda una cavidad en su interior no ocupada que favorece su flotación. Este procedimiento se aplicó una vez medidos los rasgos fenotípicos de las semillas.

Dicha técnica consistió en verter 500 μ l de agua destilada en cada uno de los microtubos donde se encontraban las semillas, mediante el uso de una micropipeta Labmate+ (Fig. 4.9), dejando posteriormente un reposo de 24 horas hasta su comprobación al día siguiente. Su función fue realizar una primera criba, para el descarte de las semillas no viables, ya que éstas al no superar la técnica de flotación, no podían llegar a germinar. Las semillas que flotaron una vez transcurridas las 24 horas se consideraron no viables, mientras que aquellas que se situaron en el fondo del microtubo fueron clasificadas como viables. Adicionalmente, la técnica de flotación sirvió de preparación de la muestra para la prueba de viabilidad por tetrazolio.

La mayor parte de las semillas estudiadas poseen un endocarpio duro. Al humedecer la semilla en su conjunto, la retirada del endocarpio y la extracción del embrión fue más sencilla y eficaz (Fig. 4.10). Con este proceso se facilitó la extracción de los embriones de las semillas. Se comprobó que en dicha técnica las semillas desprendieron una coloración propia. Esto también sirvió como lavado previo para evitar interferencias con la coloración de la prueba de tetrazolio.



Figura 4.9. Instrumentación empleada para la prueba de flotación.



Figura 4.10. Detalle de la separación entre el endocarpio y el embrión.

4.5. Evaluación de la viabilidad mediante prueba del tetrazolio

La aplicación de la prueba de tetrazolio se realizó con el fin de establecer la proporción de semillas viables y con capacidad de germinación. El Tetrazolio es un indicador redox empleado para diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos inactivos (Berridge et.al., 2005). Las células vivas del embrión de las semillas respiran activamente por lo que las deshidrogenasas (enzimas implicadas en la respiración celular) reaccionan con la solución de Tetrazolio, formando un compuesto insoluble de color rojo (Rodríguez et al., 2008). Esto se debe a que las soluciones de estas sales (cloruro o bromuro de 2-3,5-trifeniltetrazolio) son incoloras, pero cuando se reducen se transforman en trifenilformazan, una sustancia estable, no difusible y de un color rojo intenso (García et al., 2001). Esta tinción del embrión es la que diferencia aquellas con capacidad de germinación (coloración completa pardo-rojiza) de las que no alcanzan la posibilidad de germinar (aquellas con coloración parcial, incompleta o completamente incoloras) y que indican la presencia de células muertas en el embrión de la semilla.

Como punto a destacar, la prueba del Tetrazolio es una prueba bioquímica que se emplea típicamente para evaluar de forma rápida la viabilidad de la semilla cuando (ISTA, 2003):

- Las semillas presentan latencia profunda.
- Las semillas son de germinación lenta.
- En casos donde se requiere una estimación muy rápida del potencial de germinación.

Una vez realizada la técnica de flotación, se procedió a la microrrotura de la semilla, retirando las partes sobrantes del endocarpio y consiguiendo la obtención del embrión para someterlo a la prueba del tetrazolio. La microrrotura del endocarpio y separación del embrión de la semilla se realizó con la ayuda de un tornillo de banco, una pareja de pinzas de laboratorio y unos alicates (Fig. 4.11 y Fig. 4.12). Por otro lado, los microtubos se limpiaron para retirar el colorante y restos de materia orgánica desprendido por las semillas, evitando así su interferencia en la prueba del tetrazolio.

Posteriormente, mediante el uso de una micropipeta Labmate+ se vertió la solución tetrazolio al 1% en cada uno de los microtubos, comprobando que el conjunto de semillas quedara inmerso dentro del reactivo (Fig. 4.13). Se dejó un intervalo de 24 horas hasta su revisión, ya que se pretendía obtener la coloración más completa posible.



Figura 4.11. Tornillo de banco (izquierda) y pareja de pinzas junto con alicates (derecha).



Figura 4.12. Instrumentación empleada en la prueba de tetrazolio.

Una vez pasado este tiempo, se hizo la comprobación de la tinción de las semillas. Esto se hizo mediante el corte transversal y retirada del tegumento que recubría cada embrión, ya que en esta prueba se daba la posibilidad de coloración de la disolución, pero no del embrión, llegando a poder errar en la obtención de resultados.

Para ello se extrajo dicho embrión del microtubo, se limpió y retiró la parte residual de coloración, comprobando la tinción interna del mismo (Fig. 4.13).

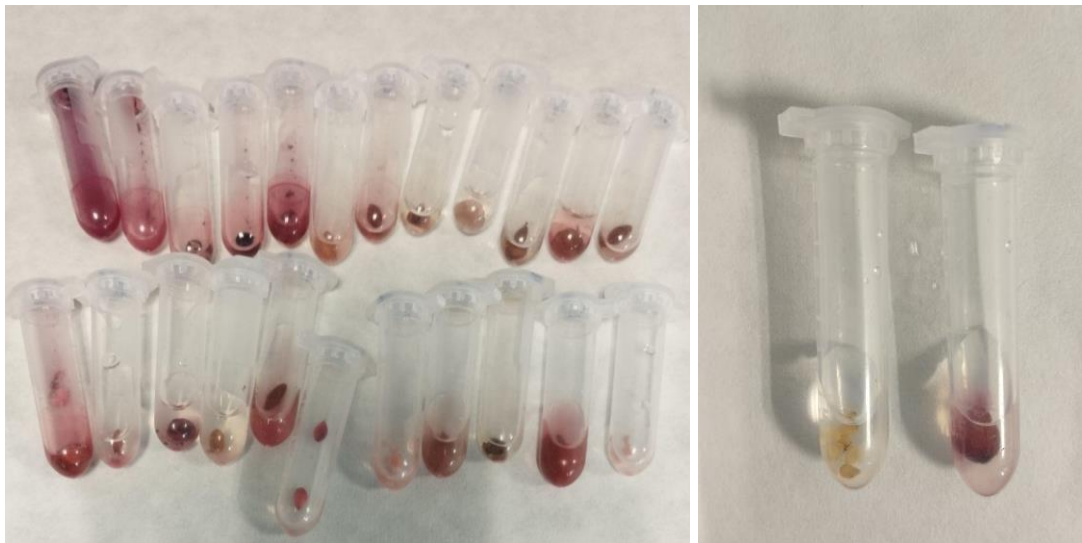


Figura 4.13. Conjunto de microtubos con coloración propia de tetrazolio (izquierda) y comparativa entre una semilla teñida frente a otra sin teñir (derecha).

4.6. Comparación con semillas sin proceso de extracción

Para evaluar si el proceso de extracción de ADN para identificación del dispersor genera una pérdida de viabilidad de la semilla, se seleccionaron 3 de las especies de semillas que con mayor abundancia fueron dispersadas y de las cuales se disponía de stock suficiente de semillas no empleadas en identificación del dispersor. Estas son *Olea europaea* (Fig. 4.14), *Phillyrea angustifolia* (Fig. 4.15) y *Asparagus sp.* (en el caso del género *Asparagus* no es posible la identificación a nivel de especie mediante la observación visual de la semilla) (Fig. 4.16).

De estas 3 especies se seleccionó un subconjunto de semillas recolectadas en el mismo muestreo pero que no fueron sometidas al proceso de extracción pertenecientes a las mismas fincas que las semillas procesadas. Estas semillas fueron limpiadas de restos fecales y se procedió a determinar su viabilidad por ambas pruebas mediante los procedimientos anteriormente mencionados.



Figura 4.14. Semillas recolectadas de *Olea europaea*.



Figura 4.15. Semillas recolectadas de *Philirea angustifolia*.

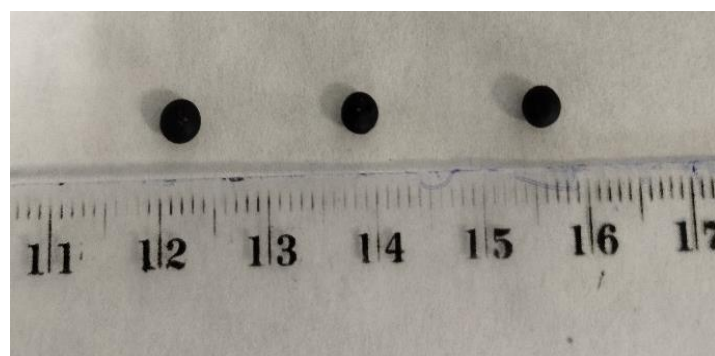


Figura 4.16. Semillas recolectadas del género *Asparagus* sp.

4.7. Realización del banco de datos

Una vez realizadas las medidas de las semillas, se recopilaron en un archivo Excel usado como base de datos. En el archivo al código numérico que identificaba cada semilla se le asociaron datos de los tres rasgos fenotípicos medidos (longitud, anchura y grosor), la variable de viabilidad (Prueba del tetrazolio), además de la especie identificada como dispersora e información correspondiente a la zona de muestreo, concretamente el nombre de la finca. También se adjuntaron las columnas de tipo de tratamiento (con/sin extracción de ADN) y la fecha de recolección de cada semilla. Todas se ordenaron por fecha de recogida, en una enumeración ascendente correspondiente al número asignado a cada muestra según recolección en campo (Tabla 4.3). Este banco de información recopilada sirve de soporte y cribado de datos para los análisis estadísticos que se mencionan y explican en apartados siguientes.

Tabla 4.3. Ejemplo de información recopilada de cada semilla.

Número muestra	Finca	Fecha	Planta	Tratamiento	Código viabilidad	eje_1	eje_2	eje_3	Viabilidad tetrazolio	Dispersor_id
633	Olu	27/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	633_1	6,02	3,45	2,12	1	Turdus_merula
132	Toq	19/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	132_2	3,18	1,26	0,73	0	Turdus_merula
132	Toq	19/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	132_3	3,03	1,37	0,91	0	Turdus_merula
132	Toq	19/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	132_4	3,12	1,34	0,82	0	Turdus_merula
3000	DI	15/11/2021	Asp_sp	ADN_extraction	3000	3,46	3,97	3,98	1	S._atricapilla
171	PG	20/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	171_1	4,41	2,64	1,96	0	Turdus_merula
171	PG	20/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	171_2	3,91	2,57	1,79	0	Turdus_merula
171	PG	20/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	171_3	4,51	2,7	1,88	0	Turdus_merula
181	PG	20/07/2021	Rha_sp	ADN_extraction	181_1	3,76	2,41	1,69	0	Turdus_merula
1213	FT	08/09/2021	Ole_eur	No_extraction	1213	NM	NM	NM	0	NA
1500	TA	16/09/2021	Phi_ang	No_extraction	1500	NM	NM	NM	1	NA
1549	To	20/09/2021	Asp_sp	No_extraction	1549_1	NM	NM	NM	1	NA
5769	FT	09/03/2022	Ole_eur	No_extraction	5769	NM	NM	NM	1	NA

4.8. Análisis estadístico de los datos recogidos

Para evaluar las diferencias de viabilidad de las semillas entre tratamientos, se realizó un modelo lineal generalizado (GLM) con el paquete glmmTMB (Brooks et al., 2017) del programa de software estadístico R (versión 3.6.3; R Core Team 2019). Se consideró la variable “viabilidad” (con distribución binomial) como variable respuesta mientras que el tratamiento (“sometida a extracción de ADN” o “no sometida”) como efecto fijo categórico.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de especies dispersadas

Las especies que se recolectaron se adjuntan en el ANEXO I y ANEXO II (aquellas sometidas a proceso de extracción y sin proceso de extracción, respectivamente).

Las semillas con mayor frecuencia de dispersión fueron las correspondientes a *Olea europaea* (286 semillas), *Asparagus sp.* (97 semillas) (Fig. 5.16), *Phillyrea angustifolia* (81 semillas) y *Pistacia lentiscus* (589 semillas). *Rhamnus alaternus/lycioides* también es una de las especies más dispersadas, sin embargo, no se dispuso de la semilla (por ser acarreada por las hormigas tras la defecación por el ave) para hacer las pruebas de viabilidad.



Figura 5.17. Planta perteneciente al género *Asparagus sp.* (Fuente: iNaturalist).

5.2. Caracterización de especies dispersoras

A partir de los datos obtenidos con la identificación de las especies dispersoras por extracción de ADN, en la siguiente imagen (Fig. 5.18) se muestra el número de semillas dispersadas por especie, destacando principalmente las especies de aves frugívoras con mayor cantidad de semillas diseminadas.

Las especies de aves frugívoras que en base a la identificación de ADN dispersaron más semillas fueron la curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*), mirlo común (*Turdus merula*), curruca cabecinegra (*Curruca melanocephala*), zorzal común (*Turdus philomelos*), petirrojo europeo (*Erithacus rubecula*) y el rabilargo ibérico (*Cyanopica cooki*).

Por otro lado, como dato a destacar, aparece una semilla dispersada por una garduña (*Martes foina*), un mamífero mustélido que también realiza la función de frugivoría en el olivar. No sólo las aves tienen la capacidad de dispersión, ya que dentro del gremio de frugívoros en el ecosistema podemos encontrar a otros mamíferos como el jabalí (*Sus scrofa*), tejón (*Meles meles*), o el zorro (*Vulpes vulpes*), los cuales también realizan una dispersión efectiva de las semillas.

En base a los resultados obtenidos, destaca como frugívoro y dispersor más significativo la curruca capirotada (*S. atricapilla*) como especie con mayor número de semillas diseminadas.

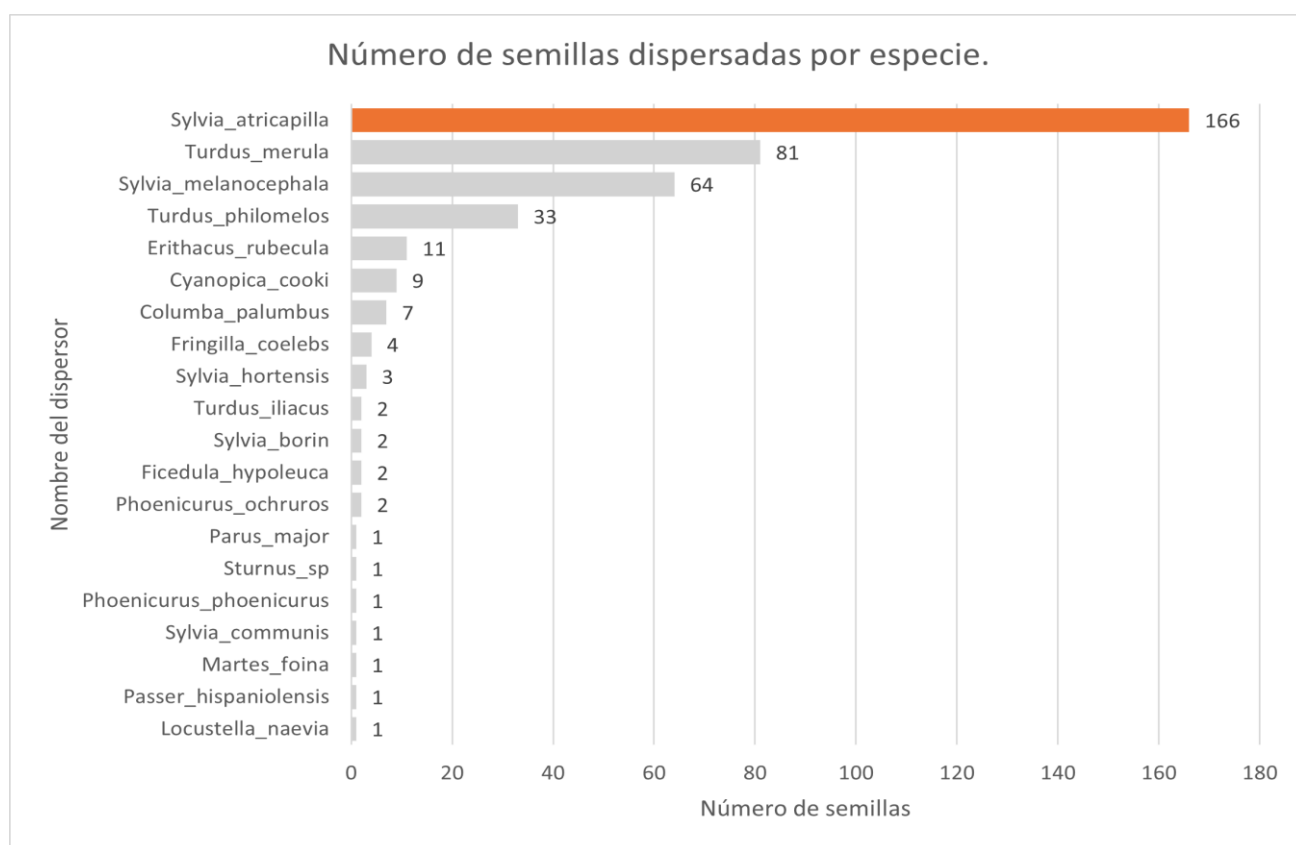


Figura 5.18. Gráfica del número de especies y de semillas dispersadas por cada una de ellas.

5.3. Relación semilla-dispersor

La relación semilla-dispersor depende íntegramente del tamaño de la apertura del pico (en términos de avifauna) y del grosor de la semilla dispersada. Con las semillas cuyo dispersor fue identificado, se realizó una comparación entre el dispersor y la semilla para comprobar la relación existente entre el tamaño de la misma y la capacidad dispersiva del ave.

A continuación, mediante comparativa Fig. 4.19 y la Tabla 5.4 se ilustra el contraste del tamaño (grosor) de aceituna dispersada y de la abertura bucal de sus principales dispersores: curruca capirotada (*S. atricapilla*), curruca cabecinegra (*C. melanocephala*), zorzal común (*T. philomelos*) y petirrojo europeo (*E. rubecula*); junto con la tabla situada posteriormente que refleja los tamaños medios de apertura del pico en milímetros para esas mismas especies.

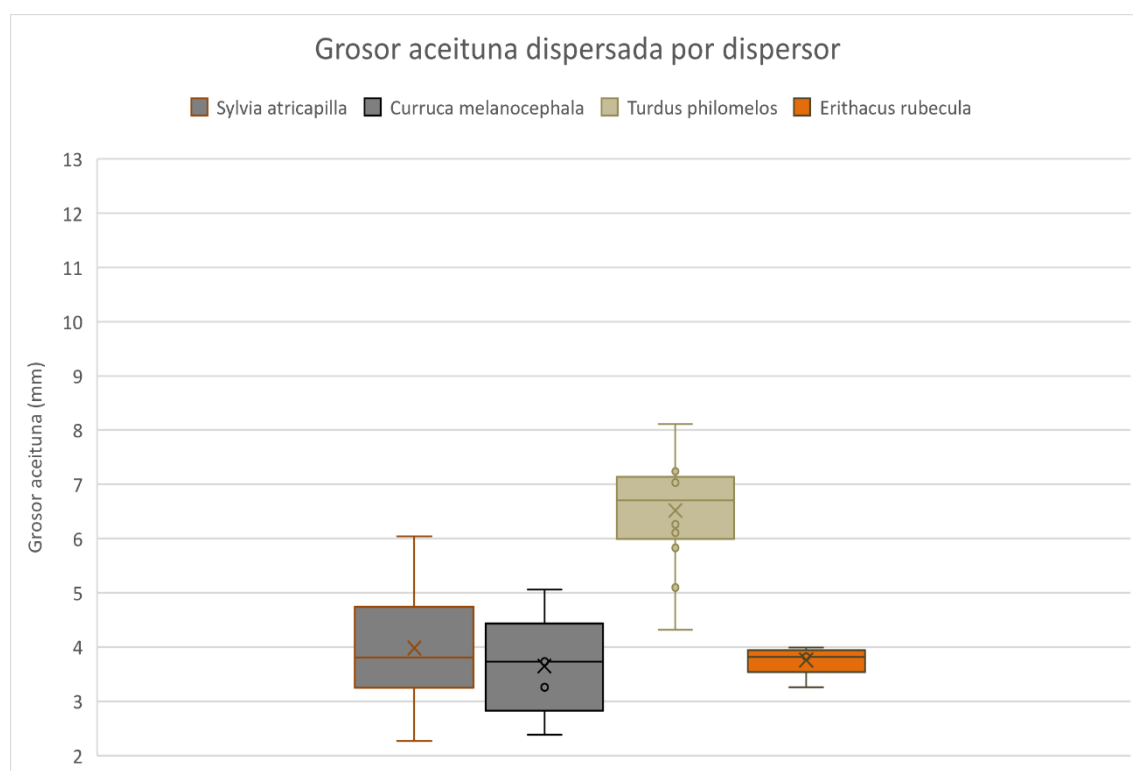


Figura 5.19. Gráfica de grosor medio (valor central) y su variación (cajas) y rango (valores extremos) de fruto dispersado por las principales especies de aves frugívoras del olivar.

Tabla 5.4. Tabla de abertura media de pico (mm) por especie.

Especie (nombre científico)	Abertura media pico (mm)
<i>Turdus philomelos</i>	12,35
<i>Erithacus rubecula</i>	8,38
<i>Sylvia atricapilla</i>	8,16
<i>Curruca melanocephala</i>	7,04

Se muestran dos gráficas comparando el tamaño de las semillas de diversas especies dispersadas por sus principales aves dispersoras. La Fig. 5.20 compara el tamaño de semilla de *Rhamnus alaternus/lycioides* dispersadas por sus dos principales dispersores, el mirlo común (*T. merula*) y la curruca cabecinegra (*C. melanocephala*).

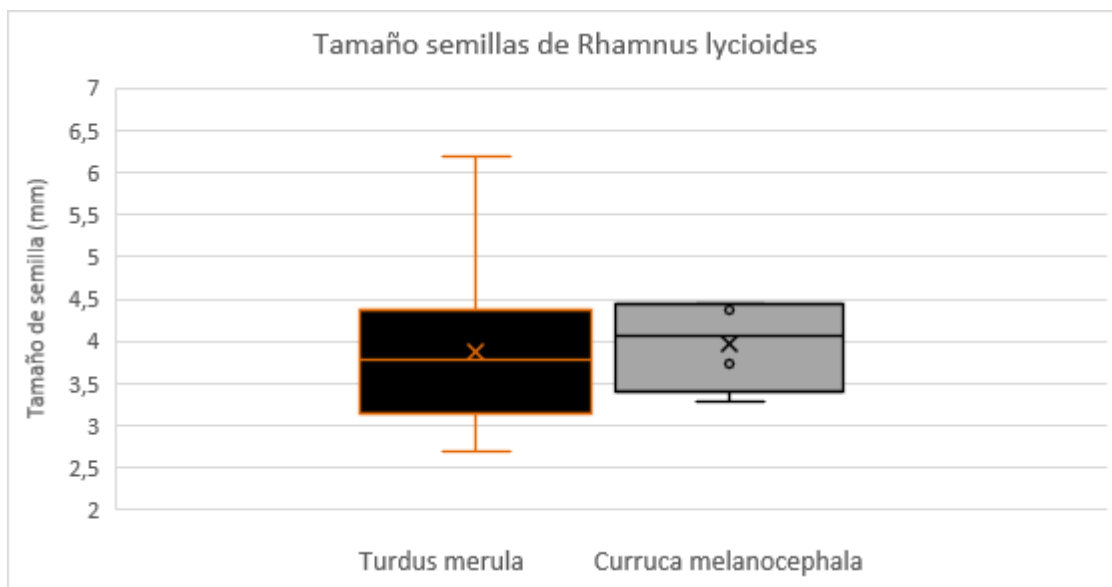


Figura 5.20. Gráfica de tamaño medio (valor central) y su variación (cajas) y rango (valores extremos) de semillas de *Rhamnus alareus/lycioides* dispersadas por sus principales dispersores.

En la Fig. 5.21 se muestran los tamaños de semilla de lentisco (*Pistacea lentiscus*), cuyo espectro de especies de aves dispersoras es mucho más amplio, dispersadas por sus principales dispersores. Estas aves son el petirrojo europeo (*E. rubecula*), curruca capirotada (*S. atricapilla*), mirlo común (*T. merula*), curruca cabecinegra (*C. melanocephala*), zorzal común (*T. philomelos*) y las especies del género *Phoenicurus*.

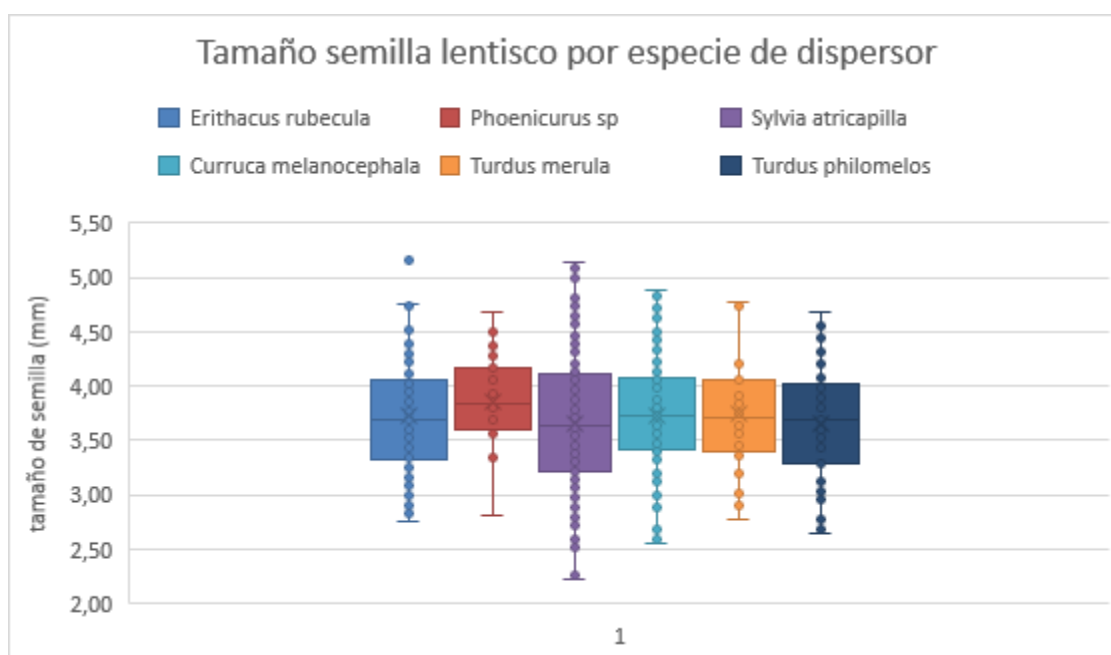


Figura 5.21. Comparativa de distintos tamaños de semilla de lentisco (*Pistacia lentiscus*) dispersadas por su correspondiente dispersor. Se muestran media (valor central) y su variación (cajas) y rango (valores extremos) de semillas

5.4. Comparación de la viabilidad de semillas con y sin proceso de extracción de ADN

Los resultados de los modelos que testan la viabilidad de las semillas en función del tratamiento mostraron que para las tres especies estudiadas (elegidas por su alto grado de representatividad en número de muestras) hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos, siendo mayor la probabilidad de ser viable una semilla que no ha sido sometida a proceso de extracción de ADN que aquellas que fueron sometidas.

Por especies, de las 160 semillas de *O. europaea* con tratamiento, 27 de ellas fueron viables (16.9%), mientras que de las 123 sin tratamiento, 58 fueron viables (47.2%), lo que supone diferencias significativas entre ambos grupos ($p=9.85 \times 10^{-8}$) (Fig. 5.22a). Igualmente, se dieron diferencias significativas ($p=9.20 \times 10^{-5}$) para las semillas de *P. angustifolia*. (Fig. 5.22b). En este caso el 15% (8 de 51) de las semillas con extracción fueron viables frente al 70% (19 de 27) de las semillas no tratadas que mostraron viabilidad.

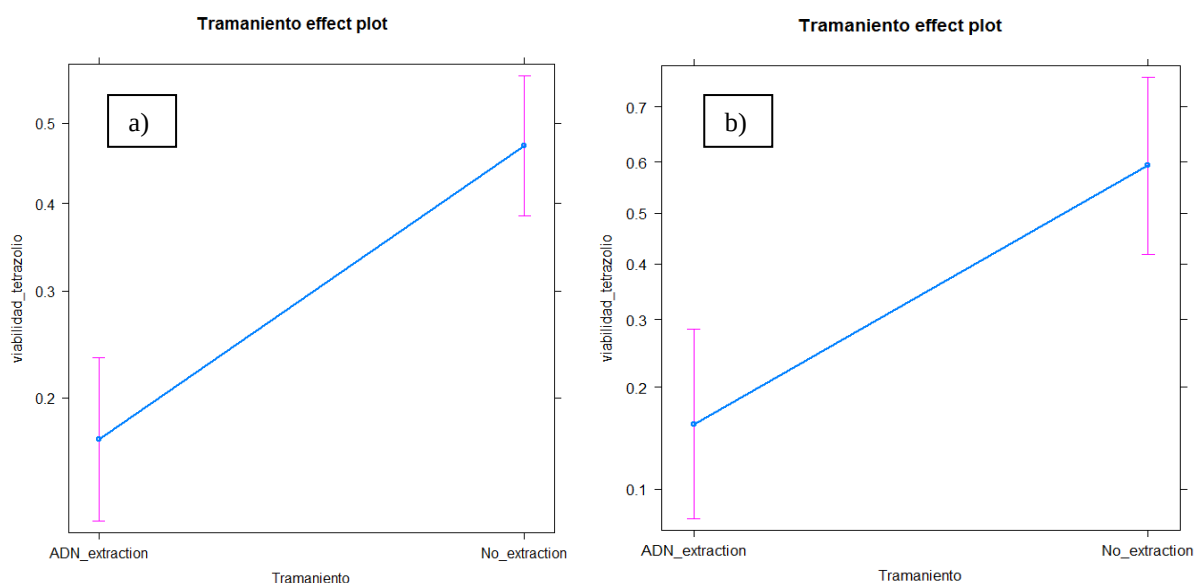


Figura 5.22. a) Variación de la viabilidad en semillas de *Olea europaea* en función del tratamiento a la semilla. b) Efecto similar sobre las semillas de *P. angustifolia*

Respecto a las semillas del género *Asparagus* se observa también que la probabilidad de ser viable sin ser sometida a proceso de extracción es mayor que la sometida a extracción de ADN. ($p=0.022$) (Fig. 5.23)

En este caso encontramos una mayor proporción de semillas viables en comparación de las especies comentadas anteriormente, un 52% (30 de 57) para el caso de las semillas con proceso de extracción, mientras que la viabilidad para las semillas no sometidas a extracción fue del 76% (29 de 38).

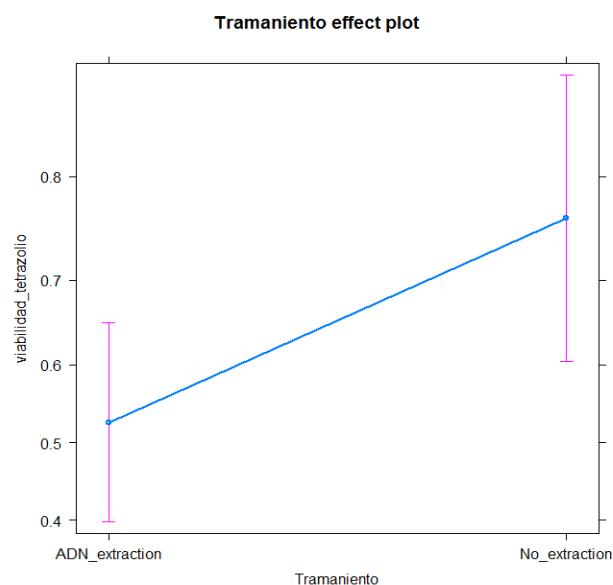


Fig. 5.23. Variación de la viabilidad de *Asparagus sp.* en función del tratamiento de la semilla.

A continuación, se muestra la comparativa visual de la viabilidad entre dos embriones de semillas de espárrago (*Asparagus sp.*) (Fig. 5.24).



Figura 5.24. Comparativa de semillas de espárrago. (*Asparagus sp.*). A la derecha, embrión teñido en la prueba de tetrazolio y viable, a la izquierda embrión no teñido y, por tanto, no viable.

6. DISCUSIÓN

6.1. Resultados de las especies dispersadas, comunidad de dispersores y su relación

El concepto de endozoocoria designa el proceso de dispersión de las semillas a través de animales frugívoros (Nogales & Valido, 2000). Es un proceso mutualista en el cual el dispersor (ave frugívora en este caso) se alimenta del fruto y posteriormente expulsa por defecación o regurgitación la semilla, mientras que a su vez la semilla (especie vegetal dispersada) se ve favorecida al establecerse en una ubicación diferente, provocando la colonización de nuevos espacios en el caso de ser viable y tener la capacidad de germinar, a la vez que evita la competencia con el individuo progenitor. Además, la relación entre aves frugívoras y plantas con flores (y posterior fruto) ocurre al menos desde hace 90 millones de años (Fleming & Kress, 2011). El recurso alimenticio que proporcionan las especies mediterráneas vegetales (y en especial el fruto) como gran reserva energética a las especies frugívoras, concretamente a las aves; hace que diversas especies muestren una clara predilección por ellas. Dependiendo de la época del año y del desarrollo del fruto, las aves muestran ciertas variaciones en su dieta. Por otro lado, dependiendo del número de especies y de individuos de estas, las plantas con fruto se verán mayor o menormente favorecidas por la dispersión.

Los resultados muestran que especies vegetales como el olivo (*Olea europaea* spp. *domestica* / *sylvestris*), el lentisco (*Pistacia lentiscus*), especies pertenecientes a la familia Asparagaceae (*Asparagus* sp.), o a los géneros *Phillyrea* (*P. angustifolia* y *latifolia*) y *Rhamnus* (*R. alaternus* y *lycioides*) son las especies autóctonas del bosque mediterráneo con mayor presencia dispersiva en los remanentes de vegetación seminatural presentes en los paisajes de olivar. Hay estudios que reflejan una clara y directa relación entre el tamaño del fruto y la apertura del pico (Wheelwright, 1985). Las plantas con frutos grandes (y tamaño de semilla mayor) atraen menos especies de aves que las plantas con frutos pequeños; mientras que por otro lado la dieta de las aves de abertura de pico mayor no está compuesta diferencialmente por especies de frutas grandes, sino que también ingieren tamaños de fruto menor, es decir, el espectro de tamaños de fruto consumido por aves grandes es mayor que el de las aves pequeñas, que por su morfología presentan limitaciones innatas (González-Varo & Traveset, 2016).

Este hecho se constata en este trabajo a través de los resultados de las medidas realizadas a las semillas dispersadas (Fig. 4.19) y (Fig. 5.20). Las especies con menor abertura de pico (ver tabla 5.4) como la curruca capirotada (*S. atricapilla*) o curruca cabecinegra (*C. melanocephala*) presentan limitaciones en el consumo de frutos seleccionando los de menor tamaño, mientras que especies con mayor abertura de pico como las del género *Turdus*, siendo en este caso zorzal común (*T. philomelos*) y mirlo común (*T. merula*), consumen un espectro mayor de tamaños de frutos, alimentándose desde frutos del mismo tamaño que consumen las aves de menor tamaño anteriormente citadas y de aquellos de mayor tamaño que sólo estas especies son capaces de ingerir.

Concretamente, en la gráfica que refleja el tamaño de semillas de *Rhamnus* dispersadas por sus principales dispersores (Fig. 5.20), se observa que las especies con mayor abertura de pico dispersaron un rango de tamaños mayor de semillas de esta especie (abarcando desde los 2,5 milímetros hasta 6 milímetros), mientras que las de menor abertura de pico abarcan una horquilla de variación de tamaño semilla dispersada menor (valores entre 3,5 milímetros y 4,5 milímetros). Dependiendo de la especie vegetal dispersada, el rango de variabilidad entre tamaños de fruto consumidos puede no variar entre los dispersores. Este hecho se da simplemente porque el fruto de determinadas especies vegetales tiene un tamaño medio (y máximo) que los hace potencialmente ingeribles por todas las aves frugívoras. Este es el caso del lentisco (*P. lentiscus*).

Por otro lado, existen estudios que sugieren y demuestran que las comunidades más diversas de aves son capaces de diversificar la dispersión de frutos, tanto en distancia (migración) (Rumeu et al., 2021; González-Varo et al., 2022) como en tamaño del fruto. Este trabajo concluye que la mayoría de las especies de plantas (86%) en estas comunidades son dispersadas por aves que migran hacia el sur, mientras que el 35% son dispersadas por aves que migran hacia el norte. Esta relación se debe a que la comunidad de aves dispersoras de fruto no tiende a minimizar el número de especies dispersadas, sino que cada frugívoro tiende a especializarse en una serie de géneros o especies vegetales que guardan relación con las necesidades nutritivas dependiendo de la época del año y con el tamaño del ave (y, por consiguiente, con la abertura del pico).

La conservación de parches de vegetación seminatural ricos en diversidad de especies vegetales que aporten fruto carnoso a lo largo de casi todo el año (de junio a marzo principalmente) favorece la atracción de un gran espectro de especies de aves. Esto da lugar a una diversificación de fruto a escala temporal como consecuencia de la fenología de cada especie, generando así el sustento necesario a lo largo de todo el proceso migratorio (paso postnupcial, invernada y preparación a la migración prenupcial). Todo esto posibilita desarrollar y potenciar los procesos de dispersión de semillas; servicio ecosistémico de gran relevancia a nivel local y paisajístico.

Pero la conservación de estos parches de vegetación natural, no solo tienen consecuencias inmediatas (p.e. atracción de individuos y movilización de semillas) sino que también puede determinar los procesos reproductivos de la primavera siguiente. Un estudio reciente (González-Varo et al., 2021) demuestra que la disponibilidad de fruto durante el invierno determina la condición corporal de las hembras de curruca cabecinegra (*C. melanocephala*) en primavera. Esto tiene implicaciones a nivel de reproducción en las zonas las cuales habita, pudiéndose extrapolar al resto de especies frugívoras que habitan en el olivar, y especialmente a las estivales que crían en la región mediterránea. Favorecer la presencia de frugívoros facultativos mediante la disponibilidad de fruto en el olivar puede suponer mantener buenas poblaciones de las especies que en primavera se reproducen en este agrosistema, que se comportan como insectívoros y que podrían ejercer otros servicios ecosistémicos sobre el olivar como el control de plagas.

6.2. Alternativas frente al proceso de extracción de ADN

Una vez demostrado que el método de extracción de ADN degrada la viabilidad de las semillas, se concluye firmemente que identificar al dispersor y evaluar la viabilidad de esas semillas bajo extracción de ADN son incompatibles de cara a futuros estudios sobre este tema. Esto es como consecuencia de que, en cualquier proceso de extracción de ADN, el buffer de extracción tiene por objetivo romper las paredes celulares durante la incubación, para liberar así las cadenas de ADN. Esto provoca el deterioro de la semilla rompiendo las paredes celulares de la estructura de la semilla y del embrión, aunque a simple vista no se observen cambios estructurales en el endocarpio de la semilla.

Resultados de trabajos existentes en los cuales se evalúa la cantidad de semillas dispersadas y la calidad de la germinación (González-Varo et al., 2019) podrían estar infraestimados al emplear semillas cuyo dispersor fue identificado mediante barcoding.

Dada la notable diferencia entre la viabilidad de semillas con y sin proceso de extracción de ADN, debido a lo invasiva que es dicha técnica; surge la necesidad de buscar alternativas y métodos más favorables, que interfieran en menor grado en trabajos que puedan necesitar del estudio de la viabilidad/germinación de la semilla y de la identificación del dispersor a su vez.

Puesto que el ámbito de estudio es el olivar, y un objetivo a destacar es el de hallar y comprender la relación existente entre la presencia de las aves que ejercen la dispersión y el éxito de las semillas del bosque mediterráneo de cara a su germinación, habría que utilizar otros métodos como por ejemplo la captura de las aves para obtener la semilla del ave capturada, con lo que se llegaría a conocer la especie dispersora sin utilizar una técnica que afecte a la viabilidad de la semilla. Esto se resume en la comprobación del dispersor *in situ* mediante el anillamiento científico de aves. No obstante, la ventaja de usar técnicas moleculares de identificación de dispersor de semillas caídas a bandejas, es también notoria, ya que nos describe el patrón de deposición de semillas, o sea dispersión realmente realizada. Puesto que aclarar cuántas de las semillas dispersadas por cada dispersor son realmente viables es un avance fundamental, parece apropiado combinar ambas técnicas y combinar la viabilidad de semillas defecadas/regurgitadas por aves capturadas con la identificación de los dispersores de semillas depositadas en lugares finales de destino (dispersión realizada).

Por último, el anillamiento es un método de plena vigencia para el estudio científico de las aves (Villarán, 2002) y a su vez no sólo se centra exclusivamente en los individuos o especies, sino que gracias al marcaje y anillamiento de estas (con anillas codificadas alfanuméricamente y/o dispositivos de seguimiento y posicionamiento remoto), se pueden estudiar los movimientos que realizan a escala local y regional, llegando a poder relacionarlos con la capacidad dispersiva de los mismos, en este caso, los frugívoros.

Esto conlleva una gran relevancia a la hora de entender los patrones de las especies a escala de paisaje, junto con la relación de factores de estado (como la biota potencial) y controladores interactivos como las condiciones ambientales o el régimen de perturbación al que se enfrentan las especies como resultado del manejo en las fincas. Por el contrario, esta técnica tiene también sus limitaciones, y puede dar lugar a importantes sesgos debidos a la dificultad en la capturabilidad de las diferentes especies frugívoras.

6.3. Fiabilidad de la metodología empleada

Durante el proceso de comprobación de la viabilidad, se obtuvieron dos semillas que resultaron germinadas bajo distinta casuística y que dieron lugar a una explicación y búsqueda de la fiabilidad del método usado en este estudio. El primer caso se produjo en una semilla que había tenido el proceso de extracción de ADN, mientras que a la segunda no se le realizó.

En uno de los microtubos revisados, se halló que una semilla de palmera washingtonia (*Washingtonia filifera*) la cual había sido sometida al proceso de extracción de ADN y germinó durante las 24 horas que estuvo sumergida en agua (Fig. 6.24). Se descubrió el caso una vez realizada la técnica de flotación, pero no se le realizó la posterior prueba de tetrazolio, ya que resultaba germinada. La germinación de esta semilla se produjo por unas condiciones de humedad y temperatura adecuadas para dicho proceso, aunque resultó interesante desde el punto de vista de tratamiento de muestra ya que todas estuvieron bajo las mismas condiciones y siguieron el mismo protocolo.

Al ser la única semilla procesada de esta especie, no nos permite considerar si es un hecho aislado o, por el contrario, la mayor parte de las semillas de esta especie son capaces de germinar en bajo estas condiciones, resultando que el potencial de germinación se debiera a la especie.



Figura 6.24. Semilla de *Washingtonia filifera* ya germinada.

El segundo caso se trató de una semilla de espárrago (*Asparagus sp.*) cuya extracción del ADN del dispersor no se le realizó (a diferencia del caso anterior). Esta semilla germinó la noche que estuvo bajo la prueba de tetrazolio, pero no tornó a la tinción pardo-rojiza que corresponde a una semilla viable siguiendo las directrices de la prueba mencionada (Fig. 6.25).

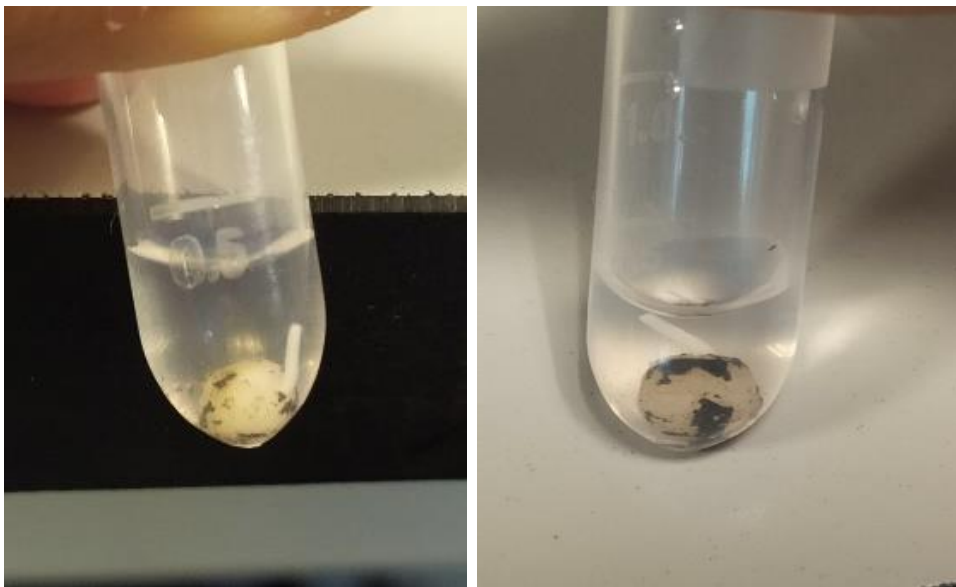


Figura 6.25. Semilla de *Asparagus sp.* ya germinada en disolución de tetrazolio, pero no virada.

La aparición de ambos casos dio lugar a una explicación relacionada con la fiabilidad y eficacia del método empleado, tratándose en este caso de la técnica de flotación y de la prueba de tetrazolio.

Respecto a la técnica de flotación, para el estudio de semillas del bosque mediterráneo no existen trabajos ni estudios previos concretos sobre estas especies. Hay estudios de especies de ámbito costero y semillas de ámbito forestal (Serrano & Guerrero, 2009) que concluyen que el método más idóneo es el método de flotación en una disolución de ácido sulfúrico al 20%. Esto se produce ya que se consigue una densidad adecuada, siendo mayor que la densidad del agua (concretamente 1.8 g/cm³). Con esto se consigue separar las semillas llenas de las vanas, consiguiendo así un menor error. En nuestro caso la técnica de flotación se realizó bajo agua destilada.

Por otro lado, la eficacia de la prueba de tetrazolio se ha podido comprobar en diversos estudios, llegando a la conclusión en la que la prueba de viabilidad con tetrazolio es efectiva a concentraciones de 0,5 % y 1,0 %, durante tiempos de exposición de 24 y 48 horas (Salazar et al., 2020). En nuestro caso se realizó al 1% y en un periodo de 24 horas, correspondiente al protocolo establecido y el más idóneo para el tipo de muestra. Sabiendo esto, la semilla se dejó durante 48 horas más y se comprobó que tampoco se realizó la tinción, por lo que el origen pudiera encontrarse en la flotación previa a la tinción. Por otra parte, hay estudios que comparan la prueba de tetrazolio con métodos que abarquen y sean adecuados para la totalidad de especies de flora (Moreno-Álvarez et al., 2001) aplicándolo en cuestiones de fiabilidad. El test de índigo-carmín y del tetrazolio son utilizados para predecir la capacidad germinativa de la semilla; donde la primera prueba tiene su fundamento en las células o tejidos sin vida de las semillas mientras que la segunda consiste en la tinción de células o tejidos vivos. Ambas pruebas presentan valores buenos y razonables de fiabilidad, destacando el mayor abanico de semillas posibles a evaluar en el test de índigo-carmín.

Independientemente del origen del problema, ponemos de manifiesto a través de este caso, que la prueba de viabilidad por tetrazolio no es un método 100% efectivo, habiendo semillas realmente viables que, a priori, se tomarían como no viables al no teñirse durante el tiempo recomendado. Aun así, es un buen método para estimar la proporción de semillas con potencial de germinación, si bien, para semillas de frutos carnosos como las estudiadas que poseen endocarpios duros, se requiere de un mayor tiempo de procesamiento de la muestra para su preparación para la prueba que

en el caso de semillas de plantas anuales a las que típicamente se les realiza esta prueba.

7. CONCLUSIONES

- Dentro de la comunidad de frugívoros, concretamente aves, existen diferencias entre la capacidad de dispersión de semillas, siendo algunas especies notablemente más efectivas que otras.
- Dependiendo de la especie vegetal dispersada, el rango de tamaño de semilla diseminada varía en mayor o menor medida por el tamaño de abertura de pico del dispersor.
- Conviene aumentar el número de estudios relativos a la dispersión de semillas por aves, así como mejorar la metodología para conocer mejor los servicios ecosistémicos que puedan ofrecernos las comunidades de frugívoros en medios agrícolas.
- La viabilidad de la semilla tras el proceso de extracción de ADN (con el fin de conocer la identidad del dispersor) se ve afectada negativamente, quedando demostrado que provoca una considerable degradación sobre ella.
- Si se requiere estudiar la dispersión de semillas por aves, necesitando evaluar el potencial de germinación a la vez que la identidad del dispersor, es preferible combinar el uso de alternativas diferentes como la captura y anillamiento científico de aves, que nos proporciona una estima de viabilidad de las semillas dispersadas no sesgada por pérdida de integridad de la semilla (mayor fiabilidad de los datos de viabilidad), con la de identificación de dispersor de semillas de dispersión realizada (semillas a destino recogidas por ej. con bandeja de caídas de semilla) que requiere técnicas moleculares de secuenciación de regiones específicas de ADN (por ej. las denominadas técnicas de 'barcoding').

Financiación

Este trabajo ha sido financiado con fondos del proyecto RECOVECOS (PID2019-108332GB-I00,MICIN/AEI/10.13039/501100011033) y del proyecto LIFE Olivares Vivos + Increasing the impact of Olivares Vivos in the EU (LIFE20 NAT/ES/001487).

Agradecimientos

A los técnicos de campo de ambos proyectos y los tutores de este trabajo los cuales llevaron a cabo la recolección de semillas en campo, extracción de ADN, identificación de los dispersores. Especial agradecimiento a todos los propietarios de las fincas por facilitar el acceso a ellas para la toma de datos en campo y al Instituto Mixto en Investigación en Biodiversidad (IMIB) por la ayuda prestada en todo el proceso de identificación de los dispersores.

8. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht, J., Bohle, V., Berens, D. G., Jaroszewicz, B., Selva, N. & Farwig, N. (2015). Variation in neighbourhood context shapes frugivore-mediated facilitation and competition among co-dispersed plant species. *Journal of Ecology*, 103(2), 526-536. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12375>

Aparicio, A. (2008). Descriptive analysis of the 'relictual' Mediterranean landscape in the Guadalquivir River valley (southern Spain): a baseline for scientific research and the development of conservation action plans. *Biodiversity and Conservation*.

Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.

Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W. & Nielsen, A. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R. J.* 9, 378–400. doi: 10.32614/RJ-2017-066

Cardona Cardozo, A., y Vargas Ríos, O. (2004). El banco de semillas germinable de especies leñosas en dos bosques subandinos y su importancia para la restauración ecológica (reserva biológica Cachalú - Santander. Colombia). *Colombia forestal*, 8(17), 60–74. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2004.1.a04>

Carlo, T. A. (2005). Interspecific neighbors change seed dispersal pattern of an avian-dispersed plant. *Ecology*, 86(9), 2440-2449. <https://doi.org/10.1890/04-1479>

Castro Caro, J.C. (2015). Efectos del manejo agrícola sobre las aves passeriformes en el olivar mediterráneo. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Zoología.

Fernández García, B. & Pérez Castro, O. (2002). Medir como tarea básica. *Tecnociencia*, 4(2), 13-28.

Fleming, T. H. & Kress, W. J. (2011). A brief history of fruits and frugivores. *Acta Oecologica*, 37(6), 521-530.

García, F. P. & Villamil, J. M. P. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General de Estructuras.

González-Varo, J. P., Arroyo, J. M. & Jordano, P. (2014). Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(8), 806-814.

González-Varo, J.P. & Traveset, A. (2016). The Labile Limits of Forbidden Interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, September 2016, Vol. 31, No. 9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.06.009>

González-Varo, J. P., Carvalho, C. S., Arroyo, J. M., & Jordano, P. (2017). Unravelling seed dispersal through fragmented landscapes: Frugivore species operate unevenly as mobile links. *Mol. Ecol.* 26, 4309–4321. doi: 10.1111/mec.14181

González-Varo, J. P., Arroyo, J. M. & Jordano, P. (2019). The timing of frugivore-mediated seed dispersal effectiveness. *Molecular Ecology*, 28 (2), 219-231.

González-Varo, J. P., Rumeu, B., Albrecht, J., Arroyo, J. M., Bueno, R. S., Burgos, T. & Traveset, A. (2021). Limited potential for bird migration to disperse plants to cooler latitudes. *Nature*, 595(7865), 75-79.

González-Varo, J. P., Onrubia, A., Pérez-Méndez, N., Tarifa, R. & Illera, J. C. (2022). Fruit abundance and trait matching determine diet type and body condition across frugivorous bird populations. *Oikos*, 2022(2).

Google Earth (2023). Landsat/Copernicus Inst. Geográfico Nacional. Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NBA, GEBCO.

Herrera, C. M. (1984). A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological monographs*, 54(1), 1-23. doi: 10.2307/1942454

GBIF.ES (2023). Natusfera. iNaturalist en España. Version 1.4. GBIF-Spain. Metadata dataset. <https://doi.org/10.15470/g16vln>

ISTA. (2003). International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland. International Rules for Seed Testing. Rules ISTA. 984(1):7-22.

Martínez, D., García, D., & Herrera, J. M. (2014). Consistency and reciprocity of indirect interactions between tree species mediated by frugivorous birds. *Oikos*, 123(4), 414-422. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.00558.x>

Martínez Orea, Y., Castillo Argüero, S. & Guadarrama Chávez, P. (2009). La dispersión de frutos y semillas y la dinámica de comunidades. *Ciencias*, 96(096).

Miret, J. J., Espinosa, J., Caballero, M. T. & Pérez Rodríguez, J. (2010). Medidas de longitud: pie de rey, tornillo y microscopio. *Física*.

Nogales, M. & Valido, A. (2000). Endozoocoria. Interacción ecológica y evolutiva. *Investigación y ciencia*. <http://hdl.handle.net/10261/23698>

Moreno-Álvarez, M. T., Benito-Matías, L. F., Herrero-Sierra, N., Domínguez-Lerena, S. & Peñuelas-Rubira, J. L. (2001). Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. In *Actas del III Congreso Forestal Español. Granada., Mesa* (Vol. 3, pp. 653-658).

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rey, P. J., Manzaneda, A. J., Valera, F., Alcántara, J. M., Tarifa, R., Isla, J., ... & Ruiz, C. (2019). Landscape-moderated biodiversity effects of ground herb cover in olive groves: Implications for regional biodiversity conservation. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 277, 61-73.

Rey, P.J., Camacho, F.M., Tarifa, R., Martínez-Núñez, C., Salido, T., Pérez, A.J. & García, D. (2021). Persistence of Seed Dispersal in Agroecosystems: Effects of Landscape Modification and Intensive Soil Management Practices in Avian Frugivores, Frugivory and Seed Deposition in Olive Croplands. *Front. Ecol. Evol.* 9:782462. doi: 10.3389/fevo.2021.782462.

Rey, P.J. (1993). The role of olive orchards in the wintering of frugivorous birds in Spain. *Ardea*, 81, 151–160.

Rey, P.J. (2011). Preserving frugivorous birds in agro-ecosystems: lessons from Spanish olive orchards. *Journal of Applied Ecology* 2011, 48, 228–237.

Rodríguez Quilón, I., Adam, G. & Durán, JM. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 78 (912).

Romero-Saritama, J. M. & Pérez-Ruíz, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*, 25(2), 59-65.

Rumeu, B., Álvarez-Villanueva, M., Arroyo, J. M. & González-Varo, J. P. (2019). Interspecific competition for frugivores: population-level seed dispersal in contrasting fruiting communities. *Oecologia*, 190, 605-617. <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04434-9>

Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D. & Bustos Urbano, V. J. (2020). Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(2), 7–15. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>

Senar, J.C. & Borrás, A. (2004). Sobrevivir al invierno: estrategias de las aves invernantes en la península ibérica. *Ardeola* 51(1), 2004, 133-168.

Serrano Antolín, A. & Guerrero, C. (2009, June). Ensayos de germinación por flotación y colorimetría al tetrazolio de *Juniperus Thurifera* L. y *Juniperus Oxycedrus* L. In *Congresos Forestales*.

Sodhi, N.S. & Ehrlich, P.R. (2010). *Conservation Biology for All*. Oxford University Press. UK.

Svensson, L., Møller, K. & Zetterström, D. (2009). Guía de aves. *España, Europa y región mediterránea*. Ediciones Omega. Barcelona.

Tscharntke T., Tylianakis J.M., Rand T.A., Didham R.K., Fahrig L., Batary P., Bengtsson J., Clough Y., Crist T.O., Dormann C.F., Ewers R.M., et al., (2012). Landscape moderation of biodiversity patterns and processes - eight hypotheses. *Biological Reviews*, 87, 661–685.

Wheelwright, N. T. (1985). Fruit-size, gape width, and the diets of fruit-eating birds. *Ecology*, 66(3), 808-818.

Villarán, A. (2002). El anillamiento: un método de plena vigencia para el estudio científico de las aves. *Ecología*, 16, 433-449.

ANEXO I. Tabla de semillas recolectadas por especie y finca sometidas a proceso de extracción de ADN.

Nombre de finca-> Nombre de especie-v	Be	CA	CG	DL	FT	Mo	Mon	Olu	PC	PG	RH	TA	To	Toq	Total general
<i>Asparagus sp.</i>			9	2	6	1	2	3	1	5	1	18	7	3	58
<i>Olea europaea</i>	25	4	4	9	9	3	4	13	31	9	16	12	14	11	164
<i>Phillyrea angustifolia</i>								5				30	14	1	50
<i>Pistacia lentiscus</i>	3	1		96	91		4	101		2	110	112	65	4	589
<i>Rhamnus sp.</i>		17		1	1		2	7		11	2		1	7	49
Total general	28	21	13	110	107	4	12	129	32	27	129	172	101	26	910

ANEXO II. Tabla de semillas recolectadas por especie y finca no sometidas a proceso de extracción de ADN y cuya viabilidad se comparó con sus semejantes pero sometidas a extracción (Anexo I).

Nombre de finca-> Nombre de especie-v	Be	CA	CG	DL	FT	Mo	Mon	Olu	PC	PG	RH	TA	To	Toq	Total general
<i>Asparagus sp.</i>					5					15		6	13		39
<i>Olea europaea</i>	6	8		13	28	2			38	14	2	1	10		122
<i>Phillyrea angustifolia</i>												18	13		31
Total general	6	8	0	13	33	2	0	0	38	29	2	25	36	0	192