

**ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN DE *PISTACIA*
LENTISCUS EN BOSQUES FRAGMENTADOS**
**DISPERSAL STUDY OF *PISTACIA LENTISCUS* IN
FRAGMENTED FORESTS**

Tesis Doctoral
Clara Parejo Farnés

**Directores: Dr. Abelardo Aparicio Martínez y Dr. Rafael
González Albaladejo**





**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA**

Memoria presentada por Clara Parejo Farnés, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla en Octubre de 2017.

Abelardo Aparicio, Catedrático y Rafael González Albaladejo Profesor titular, ambos del departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla certifican que esta memoria fue realizada bajo su dirección en el departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Farmacia. Ante lo cual consideran que tiene suficiente entidad para constituir un trabajo de Tesis Doctoral y autorizan su presentación ante el Consejo de Departamento y la Comisión del Programa de Doctorado.

Dr. Abelardo Aparicio Martínez

Dr. Rafael González Albaladejo

Esta tesis fue financiada por el proyecto: Conectando lluvia de semillas y lluvia de genes: efectos espacio-temporales de la fragmentación y la frugivoría (CGL2011-23721) que incluía la ayuda para la Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2012-055103) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Para las estancias se disfrutó de las ayudas para la movilidad del personal investigador en los años 2014 (EEBB-I-14-08553) que se realizó en el INIA-CIFOR (Madrid, España), 2015 (EEBB-I-15-09392) en IMBIV-CONICET (Córdoba, Argentina) y 2016 (EEBB-I-16-10765) en CIBIO-Universidad de Oporto (Oporto, Portugal).



A mis padres

A Avia

“Nada en la Biología tiene sentido excepto a la luz de la Evolución”

Theodosius Dobzhansky

“Nada tiene sentido en Evolución si no es a la luz de la Genética de Poblaciones”

Michael Lynch

“Las flores del campo no quieren macetas”

Kiko Veneno

Agradecimientos

Hubo momentos en los que dudé si conseguiría llegar a este día, y parece que al final he llegado, lo que tenía claro es que si lo conseguía sería gracias al apoyo de todas las personas que forman parte de mi vida y que me llenan de orgullo que formen parte de ella. Por orden cronológico, y para no olvidar a nadie, mi primera parada: Área de Ecología. A Ángel (Martín) por descubrirme este mundo y Juanma (Mancilla), por aquellos amaneceres gélidos rodeados de cabras!. Mis compañeros: María José, Sara, Leo, Javi, Raquel, Antonio, Dora, Inma, etc, muchísimos compañeros con los que compartí risas en el nicho trófico y en las fiestas de navidad!.

Mis compañeros del Master Biología Evolutiva, Álvaro, Luis, Eva, etc, por hacer divertidas aquellas eternas horas haciendo comida para ratones. A los profesores del master y por supuesto al director, Juan Arroyo, por la ilusión, el esfuerzo y el apoyo que nos dieron. Y por supuesto darnos la oportunidad de encontrar un grupo donde hacer la Tesis (nunca pensé que podría llegar a un grupo como este!).

A mis directores, Abelardo por haber confiado en mí en este proyecto tan increíble, creo que si hubiera podido elegir el tema de mi Tesis sería exactamente este, muchísimas gracias por haberme dado la oportunidad de hacer la Tesis en un sitio como este. A Rafa por esas ideas geniales, por enseñarme, por solucionarme todas las dudas posibles desde cuellos de botella hasta el nombre de una larva que encuentre en una maceta, gracias por crearme una frustración de que un farmacéutico sepa más de bichos que un biólogo. Gracias por ir redirigiendo mi Tesis, y por ser más que un jefe, un compañero y un amigo, esta Tesis no existiría sin ti. A mis compañeras, primero Sofía por compañera de fragmentación, las tardes se hacían más cortas contigo aquí. A Sara y la recién llegada, Macarena, por sus ánimos y su optimismo y por supuesto Encarni técnico de apoyo científico y moral, mi naranja favorita, mi

Tesis no hubiera sido lo mismo sin ti. La quinta planta es mucho mejor con vosotras.

Al grupo EVOCA por reuniones y discusiones tan interesantes. De nuevo Juan Arroyo por su apoyo, su cariño y sus consejos, mil gracias. A la sección latina y no latina que ha crecido estos años, por la alegría y el cariño que nos han traído, Dani, Pek, Erika, Estefania, Violeta, Marcial, Rorro y por supuesto Ale y Vania, más que compañeros amigos, con los que espero seguir contando y con los que nos encontraremos en alguna parte del mundo.

A José Manuel Herrera por enseñarme y ayudarme con los pájaros, parecía imposible poder reconocer los tui tui o el reloj de cuerda! por sus consejos, su apoyo, sus revisiones, sus ánimos y su sinceridad, la ciencia es maravillosa por gente como tú.

Al área de botánica de Farmacia Paco, Pablo, Francisco y Felipe y María y en especial a Arturo, Rocío y Julia por sus ánimos, sus consejos, su cariño y apoyo.

A mis directores temporales de las estancias, por aceptarme en sus grupos y permitirme conocer el funcionamiento de otros laboratorios, sin duda ha sido de lo mejor de la Tesis, ser aceptada por personas que admiro y que hacen la ciencia que espero poder hacer algún día. A Juanjo (Robledo-Arnuncio) por su paciencia y las reuniones magistrales en las que tantísimo aprendí y por permitirme incluso alargar la estancia!. A mis compañeros geniales, nunca había estado con tantos becarios!, Natalia, Kike, Rose, Paloma, Ruth, mi hermano científico Gregor y Javi, Dani y Laura! Por hacerme sentir una más, por tanto apoyo y noches de swing, y no me olvido de Yure y Javi por ser mis guías por Madrid (y mis teléfonos apuntados en el papel en el bolsillo!) y mi apoyo, y mis otras compis de piso Irene y Kina! Más que compañeros fuisteis y sois amigos.

A Ramiro (Aguilar) por aceptarme viniendo de la otra punta del mundo, por dedicarme tiempo e ilusión y por aceptarme de nuevo!. Ser aceptada por un grupo así te da la energía suficiente para acabar con esta fase y hace que estos meses interminables sean más llevaderos. A Lorena (Asworth), Anita (Calviño), Julia (Asteguiano), Fernando (Zamudio) y a los becarios y postdoc:

Lucas, Natalia, Ana Laura, Julia, Evangelina, Celeste (y demás personas que estaban por el lab), por ser tan cariñosos y darme tanto apoyo para que los 12000 km de mi familia no fueran tanto, por hacerme sentir como en casa, como una más, un grupo ejemplar al que me encantaría volver.

Y mi última estancia, Cris (García)! por esa ilusión en la ciencia, por recordarme porque me metí en esto, por tantas ideas y tanto que me has enseñado y de nuevo vuelvo contigo, por más sardinhas e vinho verde! Ojalá este sistema científico recuperara gente tan increíble como tú, eres todo un ejemplo para mí. Y mis compañeros del CIBIO Lucia, Carlos, Antonio, Jesús, Pili, etc. Gracias a todos por demostrarme que el mundo es más pequeñito de lo que pensamos.

A mi familia, mi hermana, mis enanos y mis padres, por ser mi campamento base de estos años de viajes, de idas y venidas, gracias por ser mi red de caída, por cuidar tantísimo de mí y de mis bichos, por enseñarme a luchar por lo que eres y por aquello que te hace feliz, por enseñarme a levantarme después de cada caída, por enseñarme a amar la naturaleza y crecer rodeada de plantas y animales, por ser como sois y por quererme tanto. A mi tío Jordi, Marilda y Miguel, por apoyarme, por quererme tanto y por estar SIEMPRE ahí, habéis sido un gran apoyo, Jordi no solo eres mi tío, sin duda alguna eres uno de mis pilares. A avia estés donde estés, pels teus somriures, per teva extrema sinceritat, vas ser una gran dona lluitadora, treballadora i ens vas donar tot el teu amor. Un gran exemple a seguir.

A mis niñas (más bien mis “mumjeres”) Cire, Isa e Irene, por estar ahí, por los mejores cafés de mi vida en los que podías reír y llorar a la vez, en los que aprendí de cosas raras y de ciencia. Sé que sin vosotras no lo hubiera conseguido, que en muchos momentos me fallaron las fuerzas y ahí estabais vosotras siempre, que en los primeros años no habría podido seguir si no hubiera tenido el apoyo en el zulito (después el terrario) o en la segunda planta, así que esta Tesis en parte también os pertenece.

A mis amigas Andrea, Ali, Patri, Lule, Isabel y Elena, sé que la dedicación total a la Tesis es difícil de entender, pero prometo estar más visible a partir de ahora (aunque sea por Skype!), gracias por vuestro apoyo, vuestros ánimos y

por vuestros consejos de vida y sobre todo por el gran apoyo de este último año. Al resto de mis amigos y a Carlos, por esta portada tan estupenda y por seguir ahí después de tantos años, por apoyarme en los peores momentos y también por estar en los divertidos.

Agradecer a todas las personas que a pesar de las condiciones en las que está la ciencia en este país siguen haciéndola, disfrutando y enseñándonos a los que estamos empezando. A todas estas personas y a las que han estado en este largo camino y que ya no están o que acaban de llegar, GRACIAS de corazón por acompañarme hasta aquí y hacer este camino tan empinado un poco más llano.

ÍNDICE

Introducción general	2
Objetivos y estructura de la tesis	17
Capítulo 1	
DNA barcoding from bird droppings for the study of seed dispersers of <i>Pistacia lentiscus</i> in fragmented forests	26
Capítulo 2	
Seasonal dynamics interactions between <i>Pistacia lentiscus</i> and avian frugivores in fragmented forests	52
Capítulo 3	
Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species	100
Capítulo 4	
Efectos genéticos de la fragmentación del paisaje en una especie anemófila dispersada por frugívoros	137
Discusión general	180
Conclusiones	196

Introducción general

Fragmentación del hábitat

La fragmentación del hábitat a menudo se define como un proceso por el cual "una gran extensión de hábitat se transforma en un número de pequeños fragmentos de menor área total y aislados entre sí por una matriz de hábitats diferente a la original" (Wilcove *et al.* 1986; Lindenmayer y Fischer 2006). Con esta definición, un paisaje puede estructuralmente clasificarse entre continuo y fragmentado en grado muy diverso y quedar rodeado por una matriz con diferente grado de permeabilidad al movimiento de las especies (McIntyre y Hobbs 1999) (Fig. 1). La fragmentación conlleva efectos sobre el paisaje como la reducción en la cantidad y calidad de hábitat, aumento del número de fragmentos, disminución del tamaño de los mismos y aumento en el aislamiento de las poblaciones (Fahrig 2003). No obstante, el término de fragmentación crea confusión ya que se puede tratar desde distintos puntos de vista, bien sea teniendo en cuenta la matriz, el tamaño de los fragmentos o la riqueza que contiene cada uno de ellos. En esta tesis se entenderá la fragmentación como un proceso antrópico que origina pérdida de hábitat y aislamiento de las poblaciones resultantes, al tiempo que se prestará especial atención a la propia conectividad física del paisaje como uno de los elementos esenciales para la entender la respuesta de las especies a la desaparición de su hábitat (Young *et al.* 1996; Fahrig 2003). En los últimos años ha crecido de manera exponencial los trabajos que estudian la fragmentación del hábitat y en menor medida la conectividad, aunque a este último aspecto cada vez se le da más importancia (Fig. 2).



Figura 1. Proceso de la fragmentación del hábitat donde la cobertura original va disminuyendo y los fragmentos remanentes van quedando físicamente aislados entre sí.

Desde el punto de vista biológico, la pérdida de hábitat es una amenaza importante para la biodiversidad, ya que causa la extinción de especies a corto y a largo plazo (Haila 2002; Fahrig 2003; Lindborg y Eriksson 2004). Así, se ha estimado una tasa de degradación y pérdida de hábitat total del 0,2% anual a nivel mundial (Achard *et al.* 2002). En términos generales se considera que los efectos de la fragmentación se hacen patentes a partir de niveles bajos de cantidad de hábitat, por debajo de aproximadamente el 20-30% de hábitat en el paisaje (Fahrig 1998, 2003; Flather y Bevers 2002). El aislamiento y el tamaño de los fragmentos pueden afectar de manera desigual a las especies (Steffan-Dewenter *et al.* 2002; Fahrig 2003), de forma que las más especialistas son menos resistentes a la fragmentación mientras que para especies generalistas el efecto puede ser insignificante. Uno de los tópicos actuales en la biología de la conservación se centra en determinar el rango de tamaño de los fragmentos para que las especies que viven en él no detecten los efectos de la fragmentación y evitar su extinción (Beier 1993; Marshall y Edwards-Jones 1998; Fahrig 2001, 2013). Sin embargo, la sensibilidad a la fragmentación puede variar a nivel regional por las características reproductivas y los atributos dispersivos de cada especie y así es necesario identificar las especies que son más vulnerables a la

perdida de hábitat (Fahrig 2001) y estimar el hábitat mínimo requerido para la persistencia de cada uno de estos grupos.

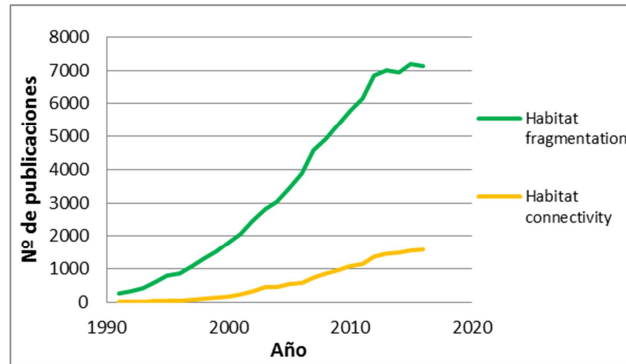


Figura 2. Número de artículos por año con las palabras “Habitat fragmentation” y “Habitat connectivity” con una búsqueda realizada en Google académico.

Entre los efectos más estudiados que provoca la fragmentación se encuentran las consecuencias genéticas: disminución de la variabilidad genética, aumento de la divergencia entre poblaciones debido al incremento de la deriva génica y la endogamia, y la reducción del flujo génico entre las poblaciones remanentes (Young *et al.* 1996; Kremer *et al.* 2012). Muchos bosques que están siendo reducidos en tamaño y conectividad por la actividad humana están mostrando un claro empobrecimiento en la riqueza genética de muchas de sus especies (Aguilar y Galetto 2004; Robledo-Arnuncio *et al.* 2014). Pero además, esta reducción del hábitat no solo afecta a la diversidad (de especies y de genes) sino que afecta a procesos tales como las interacciones planta-animal (Aguilar *et al.* 2006). Dependiendo de la resistencia de las especies a este proceso y la dependencia de las especies a estas interacciones se verán más o menos comprometidas y afectará en distinto grado al futuro de las poblaciones.

Flujo de genes y dispersión de semillas en paisajes fragmentados

El flujo génico se define como el “intercambio de genes entre poblaciones” y en plantas está mediado por el movimiento del polen y las semillas. Para las plantas, que son organismos sésiles, es un paso crucial ya que es la única manera que tienen de llegar y colonizar nuevos territorios (Jordano 2010). La dispersión ocurre dos veces en el ciclo de vida de una planta, en primer lugar, la dispersión del polen que implica la dispersión del gametofito masculino y es generalmente responsable de la mayoría de los movimientos génicos a larga distancia (Ennos 1994; Petit y Hampe 2006; Dick 2008). Y en segundo lugar, la dispersión de semillas que conlleva el doble de genes que el polen al ser confluencia de ambos gametos y que impone mayor impacto en los patrones de estructuración genética espacial (Crawford 1984; García y Grivet 2011; Sork *et al.* 2015). Para las plantas, el polen y las semillas representan los vectores de conectividad reproductiva, demográfica y genética, determinando la distribución de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones (Jordano 2017). Este flujo de ambos componentes determinará en parte la variación genética de las poblaciones e impedirá el empobrecimiento genético, la pérdida de alelos, el exceso de la endogamia y en última instancia fenómenos como cuellos de botella (Robledo-Arnuncio *et al.* 2014).

En la dispersión del polen por viento (anemofilia) hay un componente importante de aleatoriedad en el proceso de fertilización (Mulcahy 1979) ya que ésta puede depender de la cercanía a la flor hembra y por lo tanto de la densidad de la nube de polen (Jordano 1989) y de factores abióticos como la lluvia y el viento (Albaladejo *et al.* 2012). Por su parte, la distribución de las semillas en el paisaje (la lluvia de semillas), es en gran parte responsable de la estructura

genética espacial y del éxito de la supervivencia de las plántulas, y representa la variabilidad bruta de donde surgirá la estructuración genética de las futuras poblaciones reproductoras. La dispersión de semillas puede ser un proceso no aleatorio cuando intervienen los animales como vectores de dispersión, interacción mutualista clave para los ecosistemas (Schupp *et al.* 2017), donde éstos distribuyen las semillas de manera heterogénea y con preferencia hacia ciertos microhábitats (Schupp *et al.* 2002) dando lugar a fenómenos de nucleación (Verdú y García-Fayos 1996). La suma de estos procesos produce patrones significativos de estructuración genética espacial que resultan más complejos en las especies dispersadas por aves (Torimaru *et al.* 2007). En la dispersión por animales es fundamental el tiempo de retención de las semillas ya que dispersores de mayor tamaño tienen la capacidad de recorrer una mayor distancia antes de defecar o regurgitar las semillas y contribuir de manera desproporcionada a los eventos de dispersión a larga distancia (acrónimo inglés LDD; *long-distance dispersal*), mientras que animales de menor tamaño no tardaran en depositar las semillas y las distancias desde la planta madre hasta el destino final es menor (SDD; *short-distance dispersal*).

La configuración del paisaje en sí mismo como consecuencia de la fragmentación, también influye en la cantidad y el patrón espacial de dispersión efectiva de polen y semillas (Young *et al.* 1996; Cordeiro y Howe 2003; Aguilar *et al.* 2008). Aunque a priori debería tener un efecto relativamente pequeño sobre la polinización en especies anemófilas (Hamrick 2004), existen numerosos ejemplos de cómo el flujo de polen es limitado por la fragmentación del hábitat (Koenig y Ashley 2003; Broadhurst 2015). Por su parte, en especies endozoócoras la fragmentación también afecta a la dispersión de semillas ya que puede modificar el comportamiento de los dispersores (Herrera 1995; Uriarte *et al.* 2011). La

heterogeneidad del paisaje puede alterar la disponibilidad de los frutos (Jordano y Schupp 2000) así como la abundancia de dispersores (Bierregaard y Lovejoy 1989; Cordeiro y Howe 2001; Clark *et al.* 2005; Farwig *et al.* 2006; Moran *et al.* 2009; Lehouck *et al.* 2009).

Otro componente importante a tener en cuenta para flujo de genes es la variación temporal en la producción de semilla, que al afectar la dinámica de la población y la comunidad y el ensamblaje de la diversidad genética durante la regeneración (Robledo-Arnuncio *et al.* 2014) puede tener importantes repercusiones para el mantenimiento de las poblaciones de las plantas. A pesar del creciente interés por los procesos asociados a la fragmentación aún existen pocos trabajos que tengan en cuenta la variación temporal, por lo que en esta tesis doctoral hacemos hincapié en la importancia de la estacionalidad para comprender cómo las variables ambientales influyen en los patrones de dispersión de semillas mediada por frugívoros y cómo esto afecta en último término a la diversidad y estructura genética de las poblaciones. Esta estacionalidad la estudiamos a dos escalas diferentes: (i) a una escala de microhábitat para tener en cuenta la heterogeneidad de los fragmentos y (ii) a escala de paisaje para entender como la fragmentación afecta a los propios fragmentos.

Especie de estudio

Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) es un arbusto o pequeño árbol (puede alcanzar hasta 5 metros de altura) esclerófilo y dioico de origen Terciario, característico de altitudes medias y bajas en el Mediterráneo (Zohary 1952; Quézel 1981; Verdú y

García-Fayos 2002). La Historia Natural de esta especie es bien conocida (Jordano 1988, 1989; Verdú y García-Fayos 1996, 1998, 2000; Albaladejo *et al.* 2009, 2012) debido a la abundancia y el papel clave para los procesos y servicios ecosistémicos que desempeña por la fuerte dependencia que tienen pájaros frugívoros de pequeño y mediano tamaño con sus frutos de alto contenido lipídico.

La razón de sexos (*sex ratio*) de las poblaciones es muy variable como consecuencia de la perturbación del hábitat, lo que es bien conocido en especies dioicas en la cuenca mediterránea. Según la teoría de Fisher (Trivers y Willard 1973) la Selección Natural llevaría a un equilibrio entre hembras y machos (1:1), pero esto raramente se cumple en ambientes perturbados, de hecho, en las zonas más perturbadas la *sex ratio* de *P. lentiscus* suele estar muy sesgada existiendo de forma general en las poblaciones perturbadas una mayor proporción de hembras que en las no perturbadas (Verdú y García-Fayos 1998; Barradas y Correia 1999). Este fenómeno se puede achacar a la acción del hombre que selecciona a las hembras frente a los machos por el beneficio obtenido como los aceites esenciales o para atraer a los pájaros para la caza o el menor porte de estas (Verdú y García-Fayos 1998).

La floración se produce entre marzo y abril solapándose la de ambos sexos (Jordano 1988; Correia *et al.* 1992; Martínez-Palle y Aronne 2000). La polinización es anemófila y mediante el uso de marcadores genéticos se han medido unas distancias medias de dispersión de polen entre 200–400 m, aunque son frecuentes los eventos de dispersión de polen de hasta 1 km (Albaladejo *et al.* 2012). El cuajado de frutos se incrementa con la densidad de las poblaciones, lo cual sugiere una limitación del polen a bajas densidades que desaparecen a densidades por encima de 100 individuos por hectárea (Verdú y García-Fayos 1998). El número de flores que finalmente forman frutos oscila en las distintas

poblaciones entre el 9% y el 53% (Verdú y García-Fayos 1998). Los frutos son de tipo drupa que contienen una única semilla. La maduración y la viabilidad de las semillas es dependiente de los recursos hídricos disponibles para la madre (Jordano 1988, 1989; Verdú y García-Fayos 1998, 2002). Las tasas poblacionales de producción de semillas viables varían entre el 7% y 50% (Verdú y García-Fayos 2002) y esta viabilidad va asociada a un cambio del color del fruto que pasa de blanco a rojo y finalmente a negro, siendo estos últimos los que contienen la mayoría de las semillas viables (Fig. 3). Hay frutos que permanecen blancos o rojos en la planta que, o bien, son de origen partenocárpico o bien presentan semillas abortadas (Jordano 1988, 1989). La producción de frutos de un año a otro varía enormemente debido al carácter vecero del género en general y de la especie en particular (Herrera *et al.* 1998, Albaladejo *et al.* 2009).



Figura 3 Flores masculinas (izquierda) y femeninas (derecha) de *Pistacia lentiscus*. En la imagen superior frutos de en distintos estadios de maduración desde inmaduros, abortados o partenocárpicos (los blancos y rojos) a maduros que contienen la mayoría de las semillas que son viables (negros).

La pérdida de semillas por la acción de agentes predadores es variable. La avispa *Megastigmus pistaciae* (Chalcidoidea) puede ser responsable de una pérdida entre el 0,4% y el 2,9% de la producción total según las poblaciones (Verdú y García-Fayos 2002). En las poblaciones de estudio las tasas de predación

por *M. pistaciae* son anecdóticas (observación personal). Sin duda, las mermas más importantes en la producción son causadas por vertebrados (principalmente aves Passeriformes) que pueden llegar a consumir hasta el 31% de la producción de frutos (Marañón *et al.* 2004). Entre las especies de depredadores más abundantes se encuentran *Fringilla coelebs*, *Passer domesticus*, *Chloris chloris*, *Parus major* y *Cyanistes caeruleus* (Fig. 4). Se ha propuesto (Janzen 1971a, 1971b) que la presencia de frutos inviábiles (los de origen partenocárpico) pueden reducir las tasas de predación por aves en *P. lentiscus* bajo condiciones particulares ya que aumentan el costo de la manipulación de los frutos para estos depredadores.

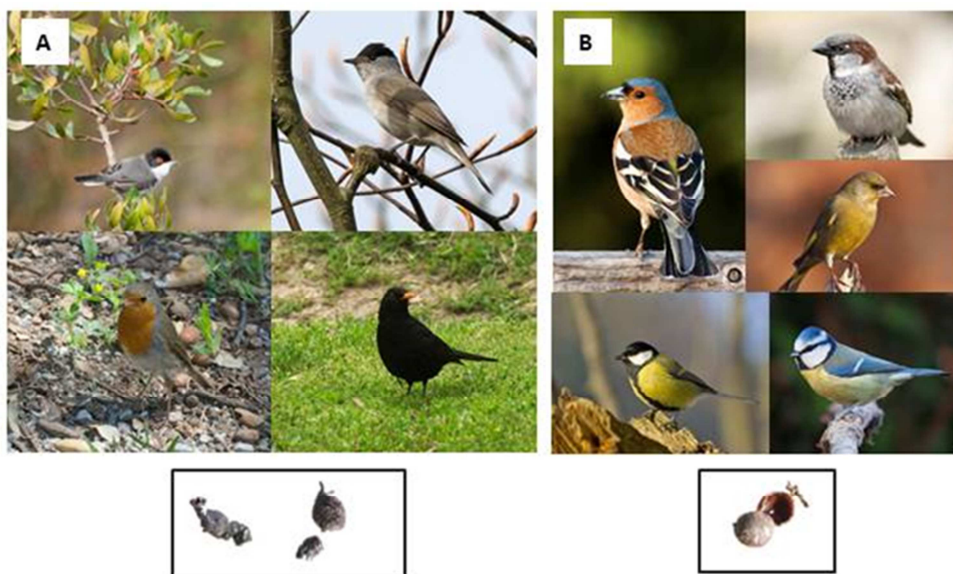


Figura 4 Principales dispersores (A) y predadores (B) presentes en los bosques de estudio. En el sentido de las agujas del reloj en A: *Sylvia atricapilla*, *S. melanocephala*, *Turdus merula* y *Erithacus rubecula*; en B: *Fringilla coelebs*, *Passer domesticus*, *Chloris chloris*, *Parus major* y *Cyanistes caeruleus*. En la imagen inferior frutos tras la manipulación de cada grupo: heces y semillas regurgitadas por dispersores en A y valvas de los frutos tras la ingesta de la semilla por parte de los predadores en B.

Los frutos carnosos del lentisco son una importante fuente de alimento para pájaros frugívoros durante el otoño-invierno en el área de estudio y los dispersan hasta un total de 19 especies (Jordano 1989; Capítulo 2). No obstante, solo cuatro de estas especies dispersan hasta un 82 % de las semillas (Jordano 1989; Verdú y García-Fayos 2002; Capítulos 1 y 2) que son *Sylvia atricapilla*, *S. melanocephala*, *Erithacus rubecula* y *Turdus merula* (Fig. 3A). La dispersión de las semillas por las aves frugívoras representa entre el 42% y el 91% del total de la producción de frutos durante el otoño-invierno (Izhaki y Safriel 1985; Jordano 1989; Verdú y García-Fayos 2000, 2002), variando el destino demográfico de esos propágulos en función del hábitat donde son depositados. La preferencia de las aves por los frutos de *P. lentiscus* con respecto a los frutos de otras especies se debe a su composición química caracterizada por la elevada concentración de lípidos de la pulpa (Herrera 1982a, 1982b, 1987; Debussche *et al.* 1987). Las semillas que no germinan son incapaces de formar un banco permanente de semillas debido a que la viabilidad de las mismas decrece drásticamente tras el primer año (García-Fayos y Verdú 1998) al ser una especie rebrotadora.

Todas estas características destacan la importancia de la especie en el área de estudio. Sus características vitales la hacen no solo mantenerse sino ser una especie dominante y colonizadora de nuevos hábitats especialmente importante en el sur de España donde muchos fragmentos remanentes de este paisaje eminentemente agrícola consisten principalmente en plantas de *P. lentiscus* que proporcionan alimento a muchas aves. Es pues una especie clave en estos fragmentos. Desde un punto de vista de investigación es también relevante destacar que la existencia de un fruto drupáceo en el que las valvas del endocarpo son de origen exclusivamente materno y el embrión es biparental permite metodológicamente diseñar estudios para analizar de manera independiente la

contribución tanto materna como paterna en semillas incluso después de haber sido dispersadas de forma natural.

Área de estudio

El trabajo de campo de esta tesis doctoral se realizó durante dos temporadas consecutivas (2012/13 y 2013/14) en la cuenca baja del río Guadalquivir (sur de España). Esta zona ha sido manejada de forma intensiva desde tiempos históricos y es actualmente un paisaje agrícola que retiene una cubierta forestal natural o semi-natural muy escasa (1% de la cobertura potencial), baja conectividad física entre los fragmentos de los fragmentos remanentes y un alto grado de impacto humano (Aparicio 2008).

En los fragmentos remanentes las especies leñosas más frecuentes son *Asparagus* spp., *Cistus* spp., *Daphne gnidium*, *Chamaerops humilis*, *Pistacia lentiscus*, *Halimium halimifolium*, *Lavandula stoechas*, *Olea europaea*, *Myrtus communis*, *Quercus coccifera*, *Phlomis purpurea* y *Retama sphaerocarpa* (Aparicio 2008). La región posee un clima típicamente mediterráneo, con veranos calurosos y secos e inviernos fríos y húmedos. Las temperaturas medias anuales oscilan entre los 15º y los 18,5º C y la precipitación anual es de entre 460 y 1020 mm. La orografía de la zona es plana variando en altitud entre el nivel del mar y los 200 m (Aparicio 2008) (Fig. 5).

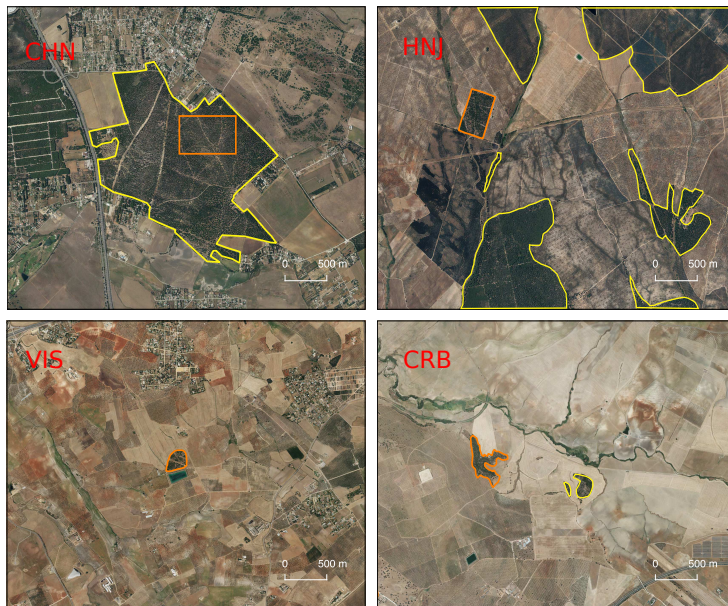
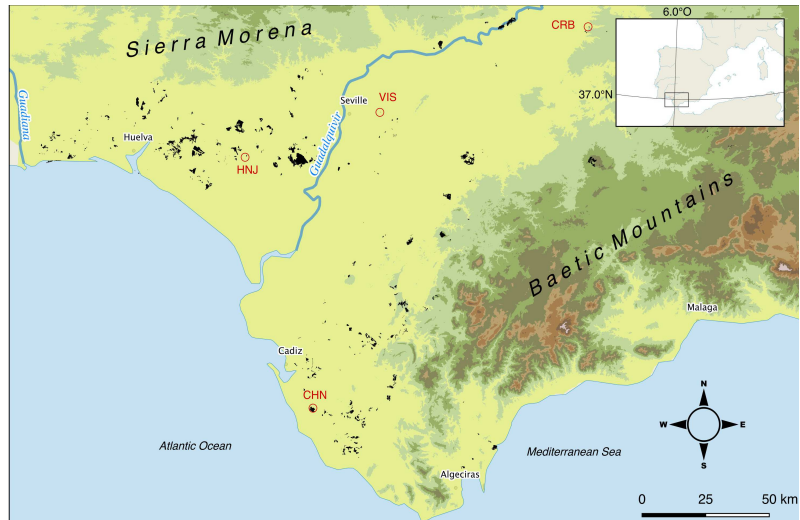


Figura 5. Localización de los fragmentos de estudio y detalle de los mismos. En el valle del Guadalquivir se muestran todos los fragmentos de bosque remanentes (en negro) y se marcan y etiquetan los estudiados: CHN y HNJ son los bosques ‘conectados’ mientras que CRB y VIS son los ‘aislados’. En color naranja se delimitan los fragmentos de estudio y en amarillo localizaciones cercanas donde abunda *Pistacia lentiscus*.

Fragmentos de estudio

Para los trabajos experimentales de esta Tesis Doctoral se seleccionaron cuatro fragmentos (Tabla 1, Fig. 5) categorizados como fragmentos ‘conectados’ y fragmentos ‘aislados’ según el índice integral de conectividad (IIC) implementado en Conefor 2.6 (Saura y Torné 2009). Este índice mide la conectividad física y el flujo de cada fragmento forestal en relación con otros fragmentos que contienen poblaciones de *P. lentiscus* en la región. Utilizamos el software QGIS (GIS Development Team 2012) para obtener el tamaño del fragmento y calcular el porcentaje de cobertura forestal adecuada para *P. lentiscus* dentro de un radio de 5 km (cobertura R5) alrededor del parche focal. Esta métrica (cobertura R5) suele considerarse como una estimación inversa de la fragmentación del bosque a una escala amplia del paisaje (Steffan-Dewenter *et al.* 2002; González-Varo 2010). El parámetro usado IIC se divide en tres fracciones distintas: $dIIC_{intra}$ es la contribución de un fragmento i en términos de conectividad intra-fragmento (basada en atributos tales como su tamaño y su forma) y no depende de la configuración de otros fragmentos del paisaje; $dIIC_{flux}$ es el flujo de dispersión ponderado en el área a través de las conexiones de un fragmento k hacia o desde todos los otros fragmentos en el paisaje donde k es el fragmento inicial o final de la conexión entre fragmentos; finalmente $dIIC_{connector}$ es la contribución del fragmento o enlace a la conectividad entre otros fragmentos y sólo depende de la ubicación espacial de un fragmento en la red (valores alrededor de cero no mostrados en la Tabla 1). Los análisis con Conefor 2.6 (Tabla 1) mostraron valores muy diferentes entre fragmentos conectados (CHN y HNJ) y aislados (CRB y VIS).

Tabla 1. Características físicas de los fragmentos de estudio: localización, conectividad, densidad y sex-ratio.

Fragmento	Coordenadas (N, W)	Área (ha)	Medidas de conectividad			Densidad (ind. ha ⁻¹)	Población más cercana (km)	Sex-ratio (♀/♂) ^{†c}
			dIIC	dIIC _{intra}	dIIC _{flux}			
<i>Conectados</i>								
CHN	36°23'10", 6°05'58"	200	5.674	3.780	1.894	287	-	1.33 ^{ns}
HNJ	37°14'58", 6°25'55"	14	12.821	0.011	12.81	160.8	0.2	1.39 ^{ns}
<i>Aislados</i>								
CRB	37°43'36", 4°55'25"	9.8	0.007	0.004	0.002	185.3	1	2.47*
VIS	37°26'20", 5°44'27"	5.1	0.002	0.001	0.001	102.2	10	0.63 ^{ns}

[†]Desviación estadística de la razón 1:1 siguiendo un test de χ^2 ; ^{ns}no significativo, * $P < 0.05$

El fragmento conectado CHN es un pinar relativamente grande (c. 200 ha) que alberga una gran población de *P. lentiscus* (para una descripción detallada ver Albaladejo *et al.* 2009). El fragmento conectado HNJ es un pinar de 14 ha que se encuentra rodeado de otros cuatro fragmentos que albergan grandes poblaciones de *P. lentiscus*. Los fragmentos aislados CRB y VIS son pequeños (<10 ha) y albergan pequeñas poblaciones de *P. lentiscus* donde, además, se han detectado cuellos botella genéticos acaecidos en el pasado (Nora *et al.* 2015). El fragmento CRB tiene dos pequeños fragmentos aproximadamente a 1 km de distancia. Por las prospecciones realizadas y por las imágenes aéreas la población de *P. lentiscus* más cercana al fragmento VIS se encuentra a unos 10 km de distancia. Estos dos fragmentos, CRB y VIS, tienen un fuerte manejo antrópico y están claramente defaunados debido a actividades cinegéticas.

Durante la primera temporada de estudio contábamos con un tercer fragmento conectado (BNZ) que al inicio de la segunda temporada fue deforestado. Por ello, no pudieron tomarse los datos necesarios para los estudios de los Capítulos 2-4, y únicamente está presente en el Capítulo 1.

Objetivos generales de la tesis

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es conocer el efecto de la fragmentación sobre la dispersión de semillas de una especie clave y ampliamente distribuida a una escala espacial (fragmentos en el valle del Guadalquivir) y temporal (durante dos temporadas de fructificación consecutivas: 2012/13 y 2013/14). Prevedemos que la fragmentación actuará sobre el flujo de genes del que es responsable el viento para el polen y pájaros de pequeño y mediano tamaño para las semillas.

Estructura de la tesis

En el **Capítulo 1** estudiamos los dispersores legítimos de *Pistacia lentiscus* en fragmentos de bosques remanentes en diferentes contextos de fragmentación de hábitat y evaluamos la diversidad genética de las poblaciones de los dispersores más frecuentes (*Sylvia* spp.). Hemos extraído el ADN de las células epiteliales que se encuentran en los excrementos que contienen semillas de *P. lentiscus* y para la identificación de las especies de aves hemos usado un método de *barcoding* que consiste en la amplificación de una porción del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) mitocondrial, mientras que para la evaluación de la diversidad genética usamos microsatélites nucleares disponibles para *S. atricapilla* y *S. melanocephala*.

En el **Capítulo 2** estudiamos la producción de frutos de *P. lentiscus* en dos años consecutivos, muy contrastados por el fenómeno de vecería, para evaluar cómo afecta la fragmentación a las interacciones mutualistas y antagonistas de dispersión y predación. Para ello contabilizamos la presencia y abundancia de frugívoros dispersores y predadores, estimamos las tasas de dispersión y

predación y analizamos el destino de la lluvia de semillas en cuatro microhábitats diferentes a escala de fragmento.

En el **Capítulo 3** cuantificamos la contribución relativa del polen y la dispersión de semillas a la estructura genética a escala fina de la lluvia de semillas. Evaluamos las diferencias en la variación genética de la lluvia de semillas entre dos años consecutivos en los fragmentos y cuantificamos las correlaciones maternas y paternas así como el correspondiente número efectivo de madres (N_{em}) y padres (N_{ep}) en las semillas dispersas.

En el **Capítulo 4** medimos a escala de paisaje la diversidad genética de las distintas poblaciones de los adultos establecidos y de las semillas dispersadas para evaluar cambios en los patrones de diversidad genética entre diferentes generaciones. Detectamos en cada paisaje los diferentes grupos genéticos existentes e inferimos su historia demográfica mediante simulaciones con técnicas de Aproximación Bayesiana Computacional (ABC).

Referencias

- Achard F, Eva HD, Stibig HJ, Mayaux P, Gallego J, Richards T, Malingreau JP (2002) Determination of deforestation rates of the World's Humid Tropical Forests. *Science*, 297, 999-1002.
- Aguilar R, Galetto L (2004) Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia*, 138, 513–520.
- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17, 5177–5188.
- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramins GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *PLoS One* 7:e49012.
- 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*, 17, 2219-2232.
- Barradas MC, Correia O (1999) Sexual dimorphism, sex ratio and spatial distribution of male and female shrubs in the dioecious species *Pistacia lentiscus* L. *Folia Geobotanica*, 34, 163–174.
- Beier (1993) Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. *Conservation Biology*, 7, 94-108.

- Bierregaard RO, Lovejoy TE (1989) Effects of forest fragmentation on Amazonian understory bird communities. *Acta Amazonica*, 19, 215-241.
- Broadhurst L (2015) Pollen dispersal in fragmented populations of the dioecious wind-pollinated tree, *Allocasuarina verticillata* (drooping sheoak, drooping she-oak; Allocasuarinaceae). *PLoS One* 10:e0119498.
- Clark CJ, Poulsen JR, Bolker BM, Connor EF, Parker VT (2005) Comparative seed shadows of bird-, monkey-, and wind-dispersed trees. *Ecology*, 86, 2684–2694.
- Cordeiro NJ, Howe HF (2001) Low Recruitment of Trees Dispersed by Animals in African Forest Fragments. *Conservation Biology*, 15, 1733–1741.
- Cordeiro NJ, Howe HF (2003) Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceeding Natural Academy of Science, USA* 100, 14052–14056.
- Correia O, Martins AC, Catarino FM (1992) Comparative phenology and seasonal foliar nitrogen variation in mediterranean species of Portugal. *Ecologia Mediterranea*, 18, 7–18.
- Crawford TJ (1984) The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity*, 52:273–283.
- Dick CW (2008) New interpretations of fine-scale spatial. *Molecular Ecology* 18:1873–1874.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72, 250–259.
- Fahrig L (1998) When does fragmentation of breeding habitat affect population survival? *Ecological Modeling*, 105, 273–92.
- Fahrig L (2001) How much habitat is enough?. *Biological Conservation*, 100, 65-74.
- Fahrig L (2003) Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487-515.

- Farwig N, Böhning-Gaese K, Bleher B (2006) Enhanced seed dispersal of *Prunus africana* in fragmented and disturbed forests? *Oecologia* 147:238–252.
- Flather CH, Bevers M (2002) Patchy reaction diffusion and population abundance: the relative importance of habitat amount and arrangement. *American Naturalist* 159, 40–56.
- García C, Grivet D (2011) Molecular insights into seed dispersal mutualisms driving plant population recruitment. *Acta Oecologica*, 37, 632–640.
- González-Varo JP (2010) Fragmentation, habitat composition and the dispersal/predation balance in interactions between the Mediterranean myrtle and avian frugivores. *Ecography*, 33,185–197.
- Haila Y (2002) A conceptual genealogy of fragmentation research: from island biogeography to landscape ecology. *Ecological applications*, 12, 321-334.
- Hamrick J. (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest ecology and management*, 197:323–335.
- Herrera CM (1982) Seasonal variation in the quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispersers. *Ecology*, 63, 773-85.
- Herrera CM (1982) Defense of ripe fruits from pests: its significance in relation to plant-disperser interactions. *American Naturalist*, 12, 218-41.
- Herrera CM (1987. Vertebrate dispersed plants of the Iberian Peninsula: a study of fruit characteristics. *Ecology Monograph*, 57, 305-331.
- Herrera CM (1995) Dispersal systems in the Mediterranean: Ecological, Evolutionary, and Historical Determinants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26,705–727.
- Herrera CM (1984) A study of avian Frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecology Monograph* 54, 1–23.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J, Traverset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept: reassessment of

- principles and relationship to pollination and seed dispersal. *American Naturalist*, 152, 576–594.
- Izhaki I, Safriel UN (1985) Why do fleshy-fruit plants of the mediterranean scrub intercept fall- but not spring-passage of seed-dispersing migratory birds? *Oecologia*, 67, 40-43.
- Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R, Bridle JR, Gomulkiewicz R, Klein EK, Ritland K, Kuparinen A, Gerber S, Schueler S (2012) Long distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters*, 15, 378–392.
- Lehouck V, Spanhove T, Vangestel C, Cordeiro NJ, Lens L (2009) Does landscape structure affect resource tracking by avian frugivores in a fragmented Afrotropical forest? *Ecography*, 32, 789–799.
- Lindborg R, Eriksson O (2004) Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology*, 85, 1840–1845.
- Lindenmayer D, Fischer J (2006) *Habitat fragmentation and landscape change: An ecology and conservation synthesis*. Island Press, Washington, USA.
- Janzen DH (1971a) Seed predation by animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2, 465–492.
- Janzen DH (1971b) Escape of *Cassia grandis* L. beans from predators in time and space. *Ecology*, 52, 964–979.
- Jordano P (2010) Pollen, seeds and genes: the movement ecology of plants. *Heredity*, 105, 329–330.
- Jordano P (2017) What is long-distance dispersal? And a taxonomy of dispersal events. *Journal of Ecology*, 105, 75–84.
- Jordano P (1989) Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos* 55, 357–386.

- Jordano P (1984) El ciclo anual de los passeriformes frugívoros en el matorral mediterráneo del sur de España: importancia de su invernada y variaciones interanuales. *Ardeola*, 32, 69-94.
- Jordano P (1988) Polinización y variabilidad de la producción de semillas en *Pistacia lentiscus* L. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 45, 213-231.
- Jordano P, Schupp EW (2000) Seed disperser effectiveness: the quantity component and patterns of seed rain for *Prunus mahaleb*. *Ecological monographs*, 70, 591–615.
- Koenig WD, Ashley M V. (2003) Is pollen limited? The answer is blowin' in the wind. *Trends Ecology and Evolution*, 18, 157–159.
- Marañón T, Camarero JJ, Castro J, Díaz M, Espelta JM, Hampe A, Jordano P, Valladares F, Verdú M, Zamora R (2004) Heterogeneidad ambiental y nicho de regeneración. En: Valladares, F EGRAF, S. A., Madrid. ISBN: 84-8014-552-8. Ministerio de Medio Ambiente, Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante 69-99.
- Marshall K, Edward-Jones G (1998) Reintroducing capercaillie (*Tetrao urogallus*) into southern Scotland: identification of minimum populations at potential release sites. *Biodiversity and Conservation*, 7, 275-296.
- Martínez-Palle E, Aronne G (2000) Reproductive cycle of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) in southern Italy. *Plant Biosystems*, 134, 365-371.
- McIntyre S, Hobbs R (1999). A framework for conceptualising human effects on landscapes and its relevance to management and research models. *Conservation Biology*, 13, 1282-1292.
- Moran CC, Catteral P, Kanowski J (2009) Reduced dispersal of native plant species as a consequence of the reduced abundance of frugivore species in fragmented rainforest. *Biological Conservation*, 142, 541–552.
- Mulcahy DL (1979) The rise of angiosperms: A genecological factor. *Science*, 206, 20–23.

- Petit RJ, Hampe A (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 187–214.
- Quézel P (1981) The study of plant groupings in the countries surrounding the Mediterranean: some methodological aspects.
- Robledo-Arnuncio JJ, Klein EK, Muller-Landau HC, Santamaría L (2014) Space, time and complexity in plant dispersal ecology. *Movement Ecology*, 2,16.
- Saura S, Torné J (2009) Conefor Sensinode 2.2: A software package for quantifying the importance of habitat patches for landscape connectivity. *Environmental modelling & software*, 24, 135–139.
- Schupp EW, Jordano P, Gomez JM (2017) Review: A general framework for effectiveness concepts in plant-animal mutualisms. *Ecology Letters*.
- Schupp EW, Milleron T, Russo SE (2002) Dissemination limitation and the origin and maintenance of species-rich tropical forests Seed dispersal and frugivory: *Ecology, evolution and conservation*, 19-33.
- Sork VL, Smouse PE, Grivet D, Scofield DG (2015) Impact of asymmetric male and female gamete dispersal on allelic diversity and spatial genetic structure in valley oak (*Quercus lobata* Née). *Evolutionary Ecology*, 29, 927–945.
- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, Thies C, Tscharrntke T (2002) Scale-Dependent Effects of Landscape Context on Three Pollinator Guilds. *Ecology*, 83, 1421-1432.
- Trivers R, Willard DE (1973) Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. *Science*, 179, 90-92.
- Torimaru T, Tani N, Tsumura Y, Nishimura N, Tomaru N (2007) Effects of kin-structured seed dispersal on the genetic structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoxyla*. *Evolution*, 61, 1289–1300.
- Uriarte M, Anciaes M, Da Silva MT, Rubim P, Johnson E, Bruna EM (2011) Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92 924–937.

- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation process in a mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology*, 10, 275–280.
- Verdú M, García-fayos P (1998) Female biased sex ratios in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Plant Ecology*, 135, 95–101.
- Verdú M, García-fayos P (2000) The effect of deceptive fruits on predispersal seed predation by birds in *Pistacia lentiscus*. *Plant Ecology*, 156, 245-248
- Verdú M, García-fayos P (2002) Ecología reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): un anacronismo evolutivo en el matorral mediterráneo. *Revista Chilena Historia Natural*, 57–65.
- Wilcove DS, CH McLellan CH, AP Dobson AP (1986) Habitat fragmentation in the temperate zone. In *Conservation Biology*, ed. ME Soulé. 237-256. Sunderland, MA: Sinauer.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 413-418.
- Zohary M (1952) A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series)*, 5, 187-228.

1 IDENTIFICATION OF SEED DISPERSERS OF *PISTACIA LENTISCUS* BY MEANS OF DNA BARCODING OF FAECAL DROPPINGS

Resumen

Por medio de secuencias código de barras de ADN estudiamos los dispersores de semillas legítimos del arbusto mediterráneo *Pistacia lentiscus*, una especie clave que representa la principal fuente de alimento en invierno de las aves frugívoras. Se recogieron las heces de pájaros que contenían semillas de *P. lentiscus* en fragmentos boscosos y después de la extracción de ADN amplificamos y secuenciamos un fragmento del gen COI mitocondrial. A través de búsquedas en la herramienta BLASTN revisamos los fragmentos secuenciados comparándolos con las secuencias registradas en GenBank e identificamos las especies de aves que actualmente están dispersando semillas de *P. lentiscus* en los fragmentos de estudio. Además, a través de la amplificación de microsatélites nucleares específicos, calculamos los parámetros básicos de diversidad genética de la población de aves del género *Sylvia* (currucas), los dispersores más importantes de *P. lentiscus*. En este estudio se muestra cómo el análisis genético de muestras fecales ambientales es una herramienta útil y conveniente para el estudio de las interacciones mutualistas a través de la determinación de la identidad de las especies involucradas y también a través de los análisis de la variabilidad genética de sus poblaciones.

Palabras clave: dispersores de semillas, *Pistacia lentiscus*, gen COI mitocondrial, *Sylvia*, microsatélites.

Abstract

By means of DNA barcoding we studied the legitimate seed dispersers of the Mediterranean shrub *Pistacia lentiscus*, a keystone species that represents the main source of food in winter for frugivorous birds. We collected dropping of birds containing seeds of *P. lentiscus* in forest fragments, and after DNA extraction

we amplified and sequenced a fragment of the mitochondrial COI gene. Through BLASTN queries of the sequenced fragments against registered sequences in the GenBank database we identified the bird species that are currently dispersing *P. lentiscus* seeds across the studied forest fragments. Further, through the amplification of specific nuclear microsatellite loci we calculate standard genetic diversity parameters of the population of birds from the genus *Sylvia* (the blackcap and Sardinian warbler), the most important dispersers of *P. lentiscus*. In this study we show how the genetic analyses of environmental faecal samples is an useful and convenient tool for the study of mutualistic interactions through the ascertain of the identity of the species involved and also through the analyses of genetic variability of their populations.

Keywords: seed dispersers, *Pistacia lentiscus*, mitochondrial COI gene, *Sylvia*, microsatellites.

Introduction

The role of animal dispersers is a key process in the reproductive cycle of many plant species. Dispersers eat fleshy fruits and then regurgitate or defecate the seeds. When dispersers move from the ingestion place seeds might reach different microhabitats, favouring seedling fitness and gene flow between populations (Jordano and Schupp 2000; Robledo-Arnuncio *et al.* 2014). Dispersal distance may increase the survivorship of seeds and seedlings since an efficient dispersal process enables them to escape from the disproportionate mortality occurring in the close vicinity of the mother plant predictions of the Janzen–Connell hypothesis (Howe and Smallwood 1982; Comita *et al.* 2014). Thus, frugivory along with seed dispersal plays a pivotal role in shaping the ecology, evolution and population genetics of plant species (Traveset 1998; García *et al.* 2017).

In the Mediterranean region, one of the important interactions between a fleshy fruit plant and disperser birds is the one concerning the woody plant *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae), an interaction that has been studied profusely (Jordano 1988, 1989; Verdú and García-Fayos 1996; 1998; Albaladejo *et al.* 2009, 2012; Parejo-Farnés *et al.* 2017). This shrub is a common sclerophyllous species up to 3-5 m in height. It is dioecious, wind-pollinated, and the fruits are one-seeded drupes that are dispersed by birds from September to March (Herrera 1984a; Jordano 1989; Verdú and García-Fayos 1996). *Pistacia lentiscus* is a keystone species in the Mediterranean region for birds to feed, due to its relative high abundance, great coverage and high lipid content of their fruits which represent the best reward at the end of autumn and winter (Herrera 1984) when disperser residents and migratory birds match in the region. The mutual

interaction between plant-frugivorous is key for both components, following previous studies (by capturing birds and obtaining faecal samples for diet analyses), the main dispersers of *P. lentiscus* in southern Spain, where the study region is located, are two different blackcap species (*Sylvia melanocephala* and *S. atricapilla*), the European robin (*Erithacus rubecula*) and the common blackbird (*Turdus merula*) which are responsible of up to the 82.2% of the fruits consumed (Jordano 1989). *Sylvia* species disperse seeds regularly through defecating or regurgitating, the latter behavior being less common (Jordano and Herrera 1980). This plant-bird interaction is especially strong (Herrera 1984) by the little size and migratory behavior of these birds needing of high lipid intake. On the other hand, robins usually defecate only the smallest ingested seeds while the bulk of *Pistacia* seeds are regurgitated (Herrera 1981). This strong dependence of birds by *P. lentiscus* fruits makes the abundance of bird dispersers to vary according to the abundance of available fruits which fluctuate in time by the masting nature of *P. lentiscus* (see Chapter 2).

Additionally, the interaction of *P. lentiscus* with disperser birds can be affected by the alteration of the habitat by man which can cause the collapse of the regeneration process, disturbing the components of the dispersion both quantitatively (i.e. the removal of seeds) and qualitatively (i.e. the arrival of seeds to safe sites) (Rey and Alcántara 2013; Chapter 2). Avian frugivorous may be lost or change their behavior when forests are fragmented into small fragments, and trees that depend on fruit-eating birds may fail to recruit seedlings (Cordeiro and Howe 2003). Further, habitat loss and fragmentation can also exert a negative effect into the evolutionary dynamic of birds, for example, by decreasing reproductive rates in small forest fragments compared to large ones (Donovan *et al.* 1995). Fragmentation also causes a decrease in resources such as space and

food, and thus may lead to an increase in the competition for those limited resources (Moran *et al.* 2004).

Until now, dispersal studies have mostly used indirect approaches including field observation (Yumoto 1999), radio-tracking (Westcott and Graham 2000; Westcott *et al.* 2005) or the use of camera traps (Otani 2002). These techniques are either time consuming, expensive or difficult to track many plants at once. Recent studies have used non-invasive sampling methods for accurate identification of bird species using droppings, feather or fruit leftovers as DNA sources coupled with DNA barcoding techniques (Segelbacher 2002; Joo and Park 2012; González-Varo *et al.* 2014). Further, this technique can potentially allow performing genetic variability analyses of the population of dispersers with the aid of specific markers, which to our knowledge have been rarely explored (e.g. Yannic *et al.* 2011). Thus, the isolation of DNA from droppings can lead dispersal studies to cover two important layers of information; (i) the identification of seed dispersers acting in a specific area, and (ii) the assessment of genetic variation of the dispersal agent population.

The aim of this study is to identify the natural guild of dispersers of the Mediterranean shrub *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) in remnant forest fragments under different contexts of habitat fragmentation and to assess the genetic diversity of the most frequent genus of *P. lentiscus* seed dispersers in the study fragments, *Sylvia* spp., which encompass the blackcap and the Sardinian warbler. We extracted DNA from remaining epithelial cells occurring in droppings containing seeds of *P. lentiscus*. For the identification of bird species we used a barcoding approach consisting in the amplification of a portion of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene (Kerr *et al.* 2009; Joo and Park 2012), while for the assessment of genetic diversity we rely on microsatellite

markers already available for *S. atricapilla* and *S. melanocephala* (Segelbacher *et al.* 2008).

Material y Methods

Sampling

During the dispersal season 2012-2013 and 2013-2014, we conducted the study in five forest fragments located in southern Spain (Table 1). These fragments showed different degrees of physical connectivity; while VIS and CRB are isolated fragments (their nearest populations are more than 1 km apart), HNJ, BNC and CHN can be considered as connected fragments (Table 1). A detailed description of the measurements for categorization of the forest fragments can be found in the General Introduction. During the second season the study was not conducted in BNC due to the complete deforestation of this fragment along 2013. In each fragment we placed 10 seed collectors (traps) of 31 x 20 cm under each of four different microhabitats; under female and male *P. lentiscus*, under other shrub species and in open ground under tree canopy (200 collectors in total). The collectors were revised every 3-4 weeks and bird faecal samples with *P. lentiscus* seeds attached were collected during the dispersal season from October to March. Samples were individually stored in 2 ml Eppendorf tubes and frozen in the lab (-20°C) until DNA extraction.

Table 1. Physical characterization of the studied forest fragments. Forest fragments were categorized as either connected or isolated (see text for details).

Fragment ID	Coordinates (N; W)	Area (ha)	Pop. Size*	Density (ind/ha)	Nearest pop. (km)
Connected fragments					
CHN	36°23'10"; 6°05'58"	200	57400	287	-
HNJ	37°14'58"; 6°25'55"	14	2251	160.8	0.2
BNC	37°17'37"; 6°12'29"	4.5	157	34.9	0.1
Isolated fragments					
CRB	37°43'36"; 4°55'25"	9.8	1816	185.3	1
VIS	37°26'20"; 5°44'27"	5.1	521	102.2	10

**Pistacia lentiscus* population size in each fragment was obtained by counting all adult plants within a 10-m sampling band on either side of each of 10 linear transects (500 m) randomly located within each fragment (the total area covered per fragment was 10 ha). In fragments BNC and VIS the whole population was directly count.

In order to verify the effectiveness of the identification of birds we placed three mists networks in one of the study forest fragment (HNJ) in January 2014. The first day the nets were placed from 6:00 pm to 8:00 pm, and second day the nets were placed from dawn at 7:00 am until 12:00 pm. Only one disperser species was captured (*Erithacus rubecula*). The birds caught in the net were kept in paper bags for weighting and tagging and then were released unharmed. The paper bags were taken to the laboratory for DNA isolation from droppings.

DNA isolation, amplification, sequencing and identification of dispersers

DNA was extracted from the collected droppings using the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories INC, Carlsbad, CA, US) according to manufacturer's protocols. COI sequences were amplified using the primer pair set *BirdF1* (5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') and *COIbirdR2* (5'-ACGTGGGAGATAATTCCAATCCTGG-3') from Kerr *et al.* (2009). When PCR amplification failed and degraded DNA was the suspected cause, we used the internal primer *AvMiR1* (5'-ACTGAAGCTCCGGCATGGGC-3') also from Kerr *et al.* (2009) in conjunction with *BirdF1* to amplify a smaller portion of the gene. A third pair of primers (Joo and Park 2012), which amplifies an alternative 226 bp region of the COI gene, was used for samples that did not amplify with the primer combinations above: *K_Bird_F* (5'-CCCCAGACATAGCATTYCC-3') and *K_Bird_R1* (5'-TTGTGATAGTGGTGGGGTTTTAT-3'). Amplification reactions were carried out in a final volume of 25 µl, with 4 µl of extracted DNA, 5 µl of 1x MyTaq polymerase

buffer containing MgCl₂ and dNTPs, 0.2 mM of each primer, 0.1 M of BSA and 1 U of MyTaq Red polymerase (Bioline, London, UK). PCR cycle conditions were as follows; one step of 94°C for 1 min, five cycles of 94°C for 1 min, 45°C for 40 s, and 72°C for 1 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 51°C for 40 s, and 72°C for 1 min, with a final extension step of 72°C for 5 min. PCR products were purified with Exonuclease I and Antarctic phosphatase (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) and then, directly sequenced in an ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) with the ABI Big Dye terminator kit (Applied Biosystems).

Obtained sequences were subjected to a BLASTN search, and for bird identification we choose the best match against the Genbank nucleotide database the sequence with the highest identity percentage (the highest identity for a set of aligned segments to the same subject sequence). Also we recorded the information of Query cover (the percent of the query length that is included in the aligned segments) and E-value (the number of alignments expected by chance with a particular score or better).

Amplification of microsatellite markers of Sylvia species

DNA identified to come from the blackcap species *Sylvia atricapilla* and *S. melanocephala* was the most frequent in our study (see Results). In these DNA samples we amplified eight pairs of microsatellite markers (*Syl1*, *Syl2*, *Syl3*, *Syl5*, *Syl7*, *Syl8*, *Syl9* and *Syl10*) specifically designed for *S. atricapilla* (Segelbacher *et al.* 2008). Amplification reactions were carried out in a final volume of 10 µl following the nested PCR protocol of Schuelke (2000), with 1 µl of extracted DNA, 2 µl of 1x MyTaq polymerase buffer, 1 U of MyTaq Red, 0.4 µM of the reverse and the M13 universal primer (the latter labelled with FAM, NED, VIC or PET to the 5'-end), and

0.14 μM of the modified forward primer with the M13 primer sequence added at its 5'-end. PCR cycle profiles used for the successful amplification of the microsatellite loci were as follows: one step of 94°C for 4min, followed by 10 touchdown cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s ($-1^\circ\text{C}/\text{cycle}$), 72°C for 1 min, followed by another 30 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 7 min. Labelled amplification products were analyzed with an ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, USA) at the "Unidad de Genómica" (UCM, Madrid, Spain), and further scoring was performed with GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Standard parameters describing genetic diversity in the analyzed samples were calculated with Genalex v.6 (Peakall and Smouse 2006); number of alleles (A), effective number of alleles (A_e), unbiased expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o).

Results

Identification of seed dispersers

Seven bird droppings were obtained from birds captured with the mist nets, and all of them successfully amplified some fragment of the COI gene. All BLASTN assignments corresponded to the bird identified in the capture, in this case the European robin (*Erithacus rubecula*) (see Supplementary Material Table S1). These results show that the amplification of DNA from droppings and further matching against the Genbank database accurately assigned all samples to the bird species.

Overall we collected 111 dropping during the two study seasons, which due to the unbalanced distribution across fragments and seasons (Table 2) is relatively low to obtain accurate information on the differences between type of fragments (connected and isolated) and, unfortunately limits the information that can be obtained in this study. During the winter season 2012-2013 we collected 86 bird droppings with *P. lentiscus* seeds attached (Table 2), and from those, 43 samples (50%) successfully amplified some fragment of the COI gene used as barcoding and matched to a frugivorous bird species sequence in Genbank (see Supplementary Material Table S2). Most droppings were found in the isolated forest fragments with a total of 38 successful identifications (12 in VIS and 26 in CRB). In the season 2013-2014 the number of collected samples was significantly lower (Wilcoxon's test $V = 26$; $P = 0.025$) and only 25 droppings could be recovered. We could successfully amplify some fragment of the COI gene in 12 of them (48%). Like in the previous season we found more samples in the isolated forest fragments (6 in VIS and 5 in CRB).

Table 2. Number of recovered faecal samples with *P. lentiscus* seeds attached. In brackets is the number of successfully processed samples for DNA analysis.

Fragment ID	Season 2012-2013	Season 2013-2014
Connected fragments		
CHN	5(2)	2(0)
HNJ	5(1)	3(1)
BNC	2(2)	*
Isolated fragments		
CRB	49(26)	9(5)
VIS	25(12)	11(6)
Total	86(43)	25(12)

*No sampling could be performed because of fragment deforestation.

Of all successfully amplified samples (55), most samples produced an amplified product with the primer pair *BirdF1-CO1birdR2* (46 samples) with a product size ranging from 374 to 778 bp, followed by the primer pair *BirdF1-AvMiR1* (7 samples) with a product size of 201-533 bp, and finally by the primer pair *K_Bird_F-K_Bird_R1* (2 samples) with a PCR product size of 188-200 bp (Table S2). The best match for each of the amplified product showed a similarity between 95-100% with the registered COI fragment sequences in GenBank after the BLASTN search.

The 43 amplified products during the first season matched with four different bird species; 37 samples corresponded to three blackcap species (21 samples to *Sylvia melanocephala*, 17 to *S. atricapilla*, and one to *S. borin*), and four were identified to belong to the common blackbird (*Turdus merula*). The 13 samples amplified in the second season yielded four bird species; six samples to *S. melanocephala*, five samples to *S. atricapilla*, one sample to *T. merula* and finally, one sample to *T. philomelos*.

Microsatellite analysis of Sylvia species

For the genetic diversity analyses of DNA recovered from *Sylvia* species from two seasons (*S. atricapilla* and *S. melanocephala*) we removed the microsatellite *Syl8* for inconsistent amplification products. Genetic diversity results are summarized in Table 3. In *S. atricapilla*, the percentage of missing data for each locus ranged from 6% for the loci *Syl7* to 62% for *Syl1* and *Syl3*, and in *S. melanocephala* they ranged from 0% in *Syl7* to 72% in *Syl2*. The number of alleles for *S. atricapilla* ranged from 6 in *Syl1* to 15 in *Syl7*, and for *S. melanocephala* from 5 in *Syl2* to 17 in *Syl7*. The averaged value of expected heterozygosity (H_e) for the population of *S. atricapilla* was 0.707 and that for *S. melanocephala* 0.645. In general, values of observed heterozygosity (H_o) were lower than expected, with averaged values for *S. atricapilla* of 0.229 and 0.075 for *S. melanocephala*.

Table 3. Standard genetic diversity parameters for seven nuclear microsatellite markers of DNA isolated from faecal samples from two *Sylvia* species (*S. atricapilla* and *S. melanocephala*).

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>MD</i>	<i>A</i>	A_e	H_e	H_o
<i>Sylvia atricapilla</i>						
<i>Syl1</i>	6	62%	6	5.538	0.819	0.167
<i>Syl2</i>	9	43%	6	4.909	0.796	0.111
<i>Syl3</i>	6	62%	3	2.571	0.611	0.000
<i>Syl5</i>	12	25%	12	9.931	0.899	0.583
<i>Syl7</i>	15	6%	5	1.324	0.244	0.267
<i>Syl9</i>	12	25%	10	7.784	0.872	0.333
<i>Syl10</i>	7	56%	5	3.379	0.704	0.143
Mean	9.6	40%	6.7	5.060	0.707	0.229
<i>Sylvia melanocephala</i>						
<i>Syl1</i>	12	33%	4	3.130	0.681	0.000
<i>Syl2</i>	5	72%	2	1.471	0.320	0.000
<i>Syl3</i>	9	50%	7	6.231	0.840	0.000
<i>Syl5</i>	12	33%	10	6.857	0.854	0.250
<i>Syl7</i>	17	0%	3	1.197	0.164	0.059
<i>Syl9</i>	14	22%	9	6.426	0.844	0.214
<i>Syl10</i>	8	55%	6	5.333	0.813	0.000
Mean	11	38%	5.9	4.378	0.645	0.075

N: samples size; *MD*: missing data; *A*: number of alleles; A_e : effective number of alleles; H_e : unbiased expected heterozygosity; H_o : observed heterozygosity.

Discussion

Seed dispersal is a crucial step in the plant regeneration process and the identification of the components involved in that interaction can help us to predict the future of the mutualisms on which ecosystems depend (Shupp *et al.* 2017). In fragmented and deteriorated habitats it is important to keep track of the ecosystem services occurring, since a collapse of populations could occur if these interactions cease to function. This is one of the few empirical studies identifying seed dispersal agents with a non-invasive barcode technique for a particular plant-animal interaction (e.g. Joo and Park 2012; González-Varo *et al.* 2014) and further explore the genetic diversity of some of the population of dispersers from the faecal droppings recovered. Although the DNA obtained from droppings or feather samples is inherently of low quality (Segelbacher 2002; Hajibabaei *et al.* 2006; Meusnier *et al.* 2008), which is inherently associated to relatively high proportion of missing data, it is still possible to assess standard genetic diversity parameters of the local population of dispersers involved in the process. This information can be valuable to assess the viability of disperser populations and can help predict the future of the plant-frugivorous interaction. Although limited by the unbalanced sampling, the method applied in this study improves our understanding on how habitat fragmentation may be disturbing the interaction between plant and dispersers by giving us information from both components, which might be useful in future planning decision.

In this two-season study, we recorded a significant difference in the number of collected bird droppings between years even after the same sampling effort. This natural variation is associated with the masting behavior of *P. lentiscus* (Herrera *et al.* 1998; Parejo-Farnés *et al.* 2017). Masting affects the year-to-year fruit production, and consequently influences the food available for dispersers.

The fleshy fruits of *P. lentiscus* provide an important food resource for most autumn-passage and wintering frugivorous birds in the lowlands of southwestern Spain (Jordano 1989). We have found seeds dispersed by six different bird species which have been previously described as major dispersers of *P. lentiscus* (Herrera 1984b; Jordano 1989) with the exception of the European robin. This absence must be due to the robin's behavior of regurgitating, rather than defecating, the larger seeds as described by Herrera (1981). In fact, we successfully assigned droppings to the European robin captured in the mist nets when checking the correct performance of the barcode technique.

Most droppings from *S. atricapilla* were found in December, and those of *S. melanocephala* in January. We know that the presence of dispersers is dependent on the connectivity of the fragments (Jordano 1984; Chapter 2). We found a higher number of dropping in isolated and small fragments than in connected and large ones, which at first seems counterintuitive. This difference may be attributed to a dilution effect since large forests harbor more resources and support more perches for birds. Resources in the small fragments are more restricted and places that act as perches are more limited and occurring at higher densities. The nucleation process occurs in fewer places in the forest, condensing the places that act as perch for birds (Verdú and García-Fayos 1996).

In southern Spain, Metler *et al.* (2013) found values of genetic diversity very similar to those reported here in a population of *S. atricapilla* ($H_e = 0.76$ vs. 0.71). However, these authors found levels of observed heterozygosity higher than we reported here ($H_o = 0.65$ vs. 0.23). These differences might be attributable to the physical isolation suffering by birds in the studied isolated fragments where most droppings were found. Physical isolation can promote birds' residence by avoiding the migratory behavior (Robinson *et al.* 1995) which

might increase the developing of a kinship structure in the population and consequently increase the genetic relatedness among birds. To our knowledge, no previous studies of *S. melanocephala* exist with which to compare our results. We found the population of *S. melanocephala* displays slightly lower genetic diversity than that of *S. atricapilla*. *Sylvia melanocephala* is a resident bird (Jordano 1985) that rarely travel long distances, and thus the genetic diversity of populations in small fragments is expected to be low (Pérez-Tris *et al.* 2004). We were unable to conduct a detailed study in each forest fragment due to limited sampling, however our data show a raw picture of the genetic diversity patterns of the disperser populations present in these fragments through a non-invasive technique of DNA sampling. Information gathered by this approach might help knowing the behavior of dispersers and how the deterioration and loss of habitats affects the population of dispersers.

Conclusions

In general, it is difficult to recover target sequences of DNA from faecal samples longer than 200 bp because degraded DNA disrupt amplification of full-length sequences (Hajibaei *et al.* 2006; Meusnier *et al.* 2008). Despite this, we have successfully determined the identity of the current dispersers of *P. lentiscus* in our set of forest fragments and illustrate basic parameters of genetic diversity for the two most important seed dispersers. This approach is relatively simple, fast and provides worthy information since it can help us understanding the frugivorous-plant interaction. However, sampling DNA from faecal samples may underrepresent the true guild of dispersers if regurgitation is the prominent behavior of some of them, such as the European robin in our case. We were not

able to obtain DNA from the endocarp of *P. lentiscus* fruits after the manipulation by frugivorous birds (although see González-Varo *et al.* 2014), even after whole genome amplification (WGA) techniques with the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase (not shown), which could have help revealing this “hidden” disperser.

References

- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramin GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *PLoS One*, 7, e49012.
- Comita LS, Queenborough SA, Murphy SJ, Eck JL, Xu K, Krishnadas M, Beckman N, Zhu Y (2014) Testing predictions of the Janzen–Connell hypothesis: a meta-analysis of experimental evidence for distance- and density-dependent seed and seedling survival. *Journal of Ecology*, 102, 845–856.
- Cordeiro NJ, Howe HF (2003) Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 14052–14056.
- Donovan TM, Thompson FR, Faaborg TJ, Probst JR (1995) Reproductive success of migratory birds in habitat sources and sink. *Conservation Biology*, 9, 1380–1395.
- García C, Etienne K, Klein EK, Jordano P (2017) Dispersal processes driving plant movement: challenges for understanding and predicting range shifts in a changing world. *Journal of Ecology*, 105, 1–5.
- González-Varo JP, Arroyo JM, Jordano P (2014) Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 806–814.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6, 959–964.
- Herrera CM (1981) Fruit food Robins wintering in southern Spanish Mediterranean scrubland. *Bird Study*, 28, 115–122.

- Herrera CM (1984a) A study of avian frugivores bird-dispersed plants and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological Monographs*, 54, 1–23.
- Herrera CM (1984b) Tipos morfológicos y funcionales en plantas del matorral mediterráneo del sur de España. *Studia Oecologica* V, 7-34.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept. *American Naturalist*, 152, 576–594.
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13, 201–228.
- Joo S, Park S (2012) Identification of bird species and their prey using DNA barcode on feces from Korean traditional village groves and forests (maeulsoop). *Animal Cells and Systems*, 16, 488–497.
- Jordano P (1984) El ciclo anual de los passeriformes frugívoros en el matorral mediterráneo del sur de España: importancia de su invernada y variaciones interanuales. *Ardeola*, 32, 69-94.
- Jordano P (1988) Polinización y variabilidad de la producción de semillas en *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Anales del jardín botánico de Madrid*, 45, 213-231.
- Jordano P (1989) Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos*, 55, 357–386.
- Jordano P, Herrera CM (1980) The frugivorous diet of blackcap populations *Sylvia atricapilla* wintering in southern Spain. *Ibis*, 123, 502-507.
- Jordano P, Schupp EW (2000) Seed disperser effectiveness: the quantity component and patterns of seed rain for *Prunus mahaleb*. *Ecological Monographs*, 70, 591–615.
- Kerr KCR, Lijtmaer D, Barreira AS, Hebert PDN, Tubaro PL (2009) Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. *PLoS One*, 4, e4379.

- Mettler R, Schaefer HM, Chernetsov N, Fiedler W, Hobson KA, Ilieva M, Imhof E, Johnsen A, Renner SC, Rolshausen G, Serrano D, Wesolowski T, Segelbacher G (2013) Contrasting patterns of genetic differentiation among Blackcaps (*Sylvia atricapilla*) with divergent migratory orientations in Europe. *PLoS One*, 8, e81365.
- Meusnier I, Singer GC, Landry J-F, Hickey DA, Hebert PDN and Hajibabaei M (2008) A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9, 214.
- Moran C, Catterall CP, Green RJ, Olsen MF (2004) Functional variation among frugivorous birds: Implications for rainforest seed dispersal in a fragmented subtropical landscape. *Oecologia*, 141, 584–595.
- Otani T (2002) Seed dispersal by Japanese marten *Martes melampus* in the subalpine shrubland of northern Japan. *Ecological Research*, 17, 29–38.
- Parejo-Farnés C, Robledo-Arnuncio JJ, Albaladejo RG, Rubio-Pérez E, Aparicio A (2017) Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. *Tree Genetics and Genomes*, 13, 17.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Pérez-Tris J, Bensch S, Carbonell R, Helbig AJ, Tellería JL (2004) Historical Diversification of Migration Patterns in a Passerine Bird. *Evolution*, 58, 1819–1832.
- Rey PJ, Alcántara JM (2013) Effects of habitat alteration on the effectiveness of plant-avian seed dispersal mutualisms: consequences for plant regeneration. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16, 21–31.
- Robinson SK, Thompson FR, Donovan TM, Whitehead DR, Faaborg J (1995) Regional forest fragmentation and the nesting success of migratory birds. *Science*, 267, 1987–90.
- Robledo-Arnuncio JJ, Klein EK, Muller-Landau HC, Santamaría L (2014) Space, time and complexity in plant dispersal ecology. *Movement Ecology*, 2, 16.

- Segelbacher G (2002) Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*, 2, 367–369.
- Segelbacher G, Rolshausen G, Weis-Dootz T, Serrano D, Schaefer HM (2008) Isolation of 10 tetranucleotide microsatellite loci in the blackcap (*Sylvia atricapilla*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1108–1110.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233–234.
- Schupp EW, Jordano P, Gomez JM (2017) A general framework for effectiveness concepts in mutualisms. *Ecology Letters*, 20, 577–590.
- Traveset A (1998) Effect of seed passage through vertebrate frugivores' guts on germination: a review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1, 151–190.
- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation processes in a Mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology*, 10, 275–280.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Female biased sex ratios in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Plant Ecology*, 135, 95–101.
- Westcott D, Bentrupperbäumer J, Bradford MG, McKeown A (2005) Incorporating patterns of disperser behaviour into models of seed dispersal and its effects on estimated dispersal curves. *Oecologia*, 146, 57–67.
- Westcott D, Graham DL (2000) Patterns of movement and seed dispersal of a tropical frugivore. *Oecologia*, 122, 249–257.
- Yannic G, Sermier R, Aebischer A, Gavrilo MV, Gilg O, Miljeteig C, Sabard B, Strøm H, Pouive´ E, Broquet T (2011) Description of microsatellite markers and genotyping performances using feathers and buccal swabs for the ivory gull (*Pagophila eburnea*). *Molecular Ecology Resources*, 11, 877–889
- Yumoto T (1999) Seed dispersal by Salvin's curassow, *Mitu salvini* (Cracidae), in a tropical forest of Colombia: Direct measurements of dispersal distance. *Biotropica*, 31, 654–660.

Supplementary Material

Table S1. BLASTN results for the seven successfully sequenced COI gene fragment from faecal samples of *Erithacus rubecula* captured with the mist nets. Primer pair code A refers to the primer pair *BirdF1-CO1birdR2* (see text for details).

Sample ID	Primer pair code	Query cover	E-value	Bird species identity (%)	Genbank accession number
1	A	84%	0.0	<i>Erithacus rubecula</i> (91%)	KF946659.1
2	A	94%	0.0	<i>Erithacus rubecula</i> (99%)	GU571383.1
3	A	90%	0.0	<i>Erithacus rubecula</i> (100%)	GU571383.1
4	A	90%	0.0	<i>Erithacus rubecula</i> (99%)	GU571383.1
5	A	89%	0.0	<i>Erithacus rubecula</i> (99%)	GU571383.1
6	A	60%	5e-72	<i>Erithacus rubecula</i> (100%)	KT803634.1
7	A	45%	9e-92	<i>Erithacus rubecula</i> (97%)	KT803634.1

Table S2. BLASTN results for the 55 successfully sequenced COI gene fragment from faecal samples. Primer pair code A refers to the primer pair *BirdF1-COlbirdR2*, B for the pair *BirdF1-AvMiR1* and C for the pair *K_Bird_F-K_Bird_R1*.

Sample ID	Forest fragment	Primer pair code	Query cover	E-value	Bird species identity (%)	Genbank accession number
<i>Season 2012-2013</i>						
1	CHN	A	60%	1E-155	<i>Sylvia melanocephala</i> (97%)	KT803679.1
2	CHN	A	92%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (97%)	KT803679.1
3	HNJ	A	100%	0.0	<i>Turdus merula</i> (90%)	GQ482834.1
4	BNC	B	94%	0.0	<i>Sylvia borin</i> (100%)	KF946875.1
5	BNC	A	98%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (95%)	KT803679.1
6	CRB	A	99%	0.0	<i>Turdus merula</i> (98%)	GQ482834.1
7	CRB	A	99%	0.0	<i>Turdus merula</i> (99%)	GQ482834.1
8	CRB	A	97%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
9	CRB	A	91%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
10	CRB	A	100%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
11	CRB	A	93%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
12	CRB	A	100%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
13	CRB	A	86%	2E-145	<i>Sylvia melanocephala</i> (82%)	KT803679.1
14	CRB	A	100%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
15	CRB	A	77%	2.00E-148	<i>Sylvia melanocephala</i> (96%)	KT803679.1
16	CRB	A	97%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
17	CRB	A	71%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KT803684.1
18	CRB	A	94%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (97%)	KT803684.1
19	CRB	A	62%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KF946871.1
20	CRB	A	76%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (97%)	KT803684.1
21	CRB	A	78%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (100%)	GU571641.1
22	CRB	A	89%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (97%)	KT803684.1
23	CRB	A	100%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KT803684.1
24	CRB	A	49%	7E-124	<i>Sylvia atricapilla</i> (97%)	KT803684.1
25	CRB	A	68%	1E-98	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KT803684.1
26	CRB	A	57%	2E-90	<i>Sylvia atricapilla</i> (94%)	AM889140.1
27	CRB	B	100%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KF946871.1
28	CRB	B	60%	1E-133	<i>Sylvia atricapilla</i> (94%)	AM889140.1
29	CRB	A	63%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (98%)	AM889140.1

30	CRB	B	100%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	KF946871.1
31	CRB	A	100%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (90%)	KX283162.1
32	VIS	A	70%	0.0	<i>Turdus merula</i> (95%)	GU571670.1
33	VIS	A	91%	9E-161	<i>Sylvia melanocephala</i> (97%)	KT803679.1
34	VIS	A	87%	7E-164	<i>Sylvia melanocephala</i> (98%)	KT803679.1
35	VIS	A	72%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (98%)	KT803679.1
36	VIS	A	71%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
37	VIS	A	83%	9E-159	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
38	VIS	A	82%	7E-152	<i>Sylvia melanocephala</i> (98%)	KT803679.1
39	VIS	A	74%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (98%)	KT803679.1
40	VIS	B	70%	3E-116	<i>Sylvia melanocephala</i> (97%)	KT803679.1
41	VIS	B	83%	3E-155	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
42	VIS	A	87%	6E-168	<i>Sylvia atricapilla</i> (98%)	KT803684.1
43	VIS	B	97%	4E-77	<i>Sylvia atricapilla</i> (94%)	KT803684.1
<i>Season 2013-2014</i>						
44	HNJ	A	55%	2E-45	<i>Sylvia melanocephala</i> (97%)	KT803679.1
45	CRB	A	86%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (95%)	AM889140.1
46	CRB	A	85%	0.0	<i>Sylvia atricapilla</i> (99%)	AM889140.1
47	CRB	C	56%	9E-23	<i>Turdus philomelos</i> (87%)	KT803633.1
48	CRB	A	75%	0.0	<i>Sylvia melanocephala</i> (98%)	KT803679.1
49	CRB	A	0.0	1.00E-155	<i>Turdus merula</i> (99%)	GU571670.1
50	VIS	A	55%	5E-41	<i>Sylvia melanocephala</i> (96%)	KT803679.1
51	VIS	A	55%	1E-37	<i>Sylvia melanocephala</i> (94%)	KT803679.1
52	VIS	A	52%	7E-45	<i>Sylvia melanocephala</i> (99%)	KT803679.1
53	VIS	A	57%	1E-41	<i>Sylvia melanocephala</i> (96%)	KT803679.1
54	VIS	C	67%	2E-53	<i>Sylvia atricapilla</i> (96%)	KT803684.1
55	VIS	A	48%	24E-32	<i>Sylvia atricapilla</i> (94%)	KT803684.1

2 SEASONAL DYNAMICS INTERACTIONS BETWEEN *PISTACIA LENTISCUS* AND AVIAN FRUGIVORES IN FRAGMENTED FORESTS

Clara Parejo-Farnés, Ramiro Aguilar, José M. Herrera, Abelardo Aparicio, Rafael G. Albaladejo (Manuscrito en preparación)

Resumen

La dispersión de las semillas y su destino final resultan de la interacción entre el comportamiento frugívoro y la distribución de los recursos alimenticios, y ambos pueden variar en el espacio y el tiempo. Se evalúa la interacción entre los pájaros frugívoros con el arbusto vecero *Pistacia lentiscus* en situaciones contrastantes de fragmentación del hábitat a lo largo del valle del río Guadalquivir. Se comparó la abundancia y composición de los pájaros frugívoros dispersores y depredadores de semillas, se registraron las tasas de dispersión y predación de frutos, y finalmente se investigaron posibles cambios en el destino final de las semillas. Nuestros resultados mostraron una mayor abundancia de dispersores en fragmentos conectados que en fragmentos aislados en la temporada vecera (alta disponibilidad de fruto), pero el patrón opuesto en la siguiente temporada no vecera (baja disponibilidad de fruto). El efecto de la fragmentación del hábitat fue más visible para las aves de tamaño mediano que para las de tamaño pequeño ya que los medianos tuvieron mayor abundancia en fragmentos aislados y los pequeños aparentemente no se vieron afectados por la fragmentación. Las tasas de dispersión de las semillas fueron más altas en los fragmentos aislados en la temporada vecera, pero lo opuesto ocurrió en la no vecera, mientras que las tasas de depredación fueron insignificantes entre temporadas (0,4%). El destino final de la lluvia de semillas fue consistente a lo largo de las estaciones y la configuración del paisaje, con la mayor parte de las semillas dispersadas bajo el dosel de plantas *Pistacia* hembra. En este estudio se hace hincapié en la influencia de la interacción entre la estacionalidad y la configuración del paisaje en los patrones de dispersión de semillas mediada por frugívoros. Así, a pesar del vínculo directo de la interacción planta-frugívoro, los efectos de la fragmentación del hábitat en frugívoros y plantas se desacoplaron en nuestro sistema de estudio. Estas

respuestas desacopladas parecían principalmente debido a la alta dependencia alimentaria de los dispersores en los frutos de *P. lentiscus*.

Palabras clave: Frugivoría, especie vecera, microhábitat, dispersión de semillas, predación de semillas, lluvia de semillas.

Abstract

Seed dispersal and their final destination result from the interaction between frugivorous behavior and the distribution of food resources, and both can vary over space and time. We evaluate the interaction between avian frugivores with the masting shrub *Pistacia lentiscus* occurring in contrasting situations of habitat fragmentation along the Guadalquivir River valley. We compared the abundance and composition of avian dispersers and seed predators, recorded fruit removal rates by dispersers and predators, and finally investigated potential changes in the final destination of seeds. Our results showed a higher abundance of dispersers in connected than in isolated fragments in the mast season (high fruit availability) but the opposite pattern in the non-mast season (low fruit availability). The effect of habitat fragmentation was more visible for medium-sized birds than for small bird dispersers, the former showing a higher abundance in isolated forest fragments and the latter being apparently unaffected by fragmentation. Seed dispersal rates were higher in isolated fragments in the mast season but not in the non-mast season, while predation rates were negligible across seasons (c. 0.4%). Seed rain destination was consistent across seasons and landscape configurations with most seeds being dispersed under the canopy of female *Pistacia* plants. In this study we emphasize the influence of the interplay between seasonality and landscape configuration on patterns of frugivore-mediated seed dispersal. Thus, despite the direct link of the plant-frugivorous interaction, habitat fragmentation

effects on frugivores and plants were decoupled in our study system. These decoupled responses seemed mostly due to the high feeding dependence of dispersers on *P. lentiscus* fruits.

Keywords: Frugivory, mast species, microhabitat, seed dispersal, seed predation seed rain.

Introduction

Seed dispersal is the last step in the reproductive cycle of plants, and therefore it is crucial for the structure and dynamics of plant populations and communities (Janzen 1970). Plants are sessile organisms and thus, seed dispersal is essential to colonize new territories. The seed dispersal process has three basic components: (i) a source, the fruits by the maternal plant; (ii) a distance component between the source and destination locations; and (iii) a vector carrying the propagules from the origin to the destination (Jordano 2017). Frugivory and seed dispersal have a crucial role to play in the novel landscapes that are emerging all around the world and to maintain the diversity of forests that already exist connecting them.

In many tropical and temperate ecosystems, a large proportion of plant species rely on fleshy pulp-rich fruits to attract dispersal agents (i.e. frugivores) (Herrera 1988; Corrêa Cortês and Uriarte 2012). For these plants, both seed removal probabilities and seed dispersal patterns away from the parent plants are strongly related to spatial environmental factors such as the availability of suitable food, shelter, spatial heterogeneity and climatic conditions for frugivores (Corrêa Cortês and Uriarte 2012). Studies carried out exclusively within a population may neglect the possible spatial heterogeneity in the structure of the habitat that could possibly exist on a regional scale, as well as small-scale heterogeneity such as the microhabitat. The spatial heterogeneity will affect the distribution of frugivorous species, since there are species restricted to certain environments and others much more mobile capable of using the non-forested matrix that tend to be more abundant in moderately marginalized fragmented habitats (Farwig *et al.* 2006). Current Mediterranean forests display a high degree of habitat heterogeneity and variation that benefits generalists or omnipresent species

(Blondel and Aronson 1999) unlike forest birds that are now very scarce or extinct since they have historically been heavily affected by fragmentation, and thus the remaining species are well adapted to these heterogeneous landscapes (Tellería and Santos 1999).

In dispersal process, frugivores either regurgitate or defecate undamaged seeds away from the parent plants (Jordano 2000). Animal-seed dispersal can exhibit non-random patterns, and dispersal toward certain microhabitats within the landscape seems to be especially common (Schupp *et al.* 2002). At a local scale, fleshy-fruited plants depend on dispersal by frugivores to escape the high mortality near mother plants and to colonize suitable habitats for regeneration, a recruitment pattern known as the Janzen-Connell effect (Janzen 1970; Connell 1971; Howe and Smallwood 1982; Schupp and Jordano 2011; Farwing *et al.* 2017). Essentially frugivorous birds may promote uneven distribution by the use of certain perches favoring the nucleation process (Verdú and García-Fayos 1996) and creating spatially contagious distribution of the dispersed seeds (seed rain) (Schupp *et al.* 2002). Such process affects seed survival and seedling establishment and therefore plant population recruitment and community dynamics (Howe and Smallwood 1982; Wang and Smith 2002; Nathan 2006; Clark *et al.* 2007; González-Castro *et al.* 2015). On the other hand, not all frugivorous birds establish mutualistic interactions but antagonistic ones being granivorous birds. Some bird species eat the seeds and therefore kill the embryo reducing the plant fitness (Verdú and García-Fayos 2000). At the end of the fruiting period the plant will have interacted with both, seed dispersers and seed predators and the relative balance between them will determine the net effectively dispersed seeds.

Plant-animal interactions are affected by different fruit characteristics, such as size (Jordano 1987; Sallabanks 1993), color (Galetti *et al.* 2003) or

maternal plant fruit production (Davidar and Morton 1986; Jordano 1987; Laska and Stiles 1994). Further, seasonal variation in fruit production (for example due to masting effects) has been regarded as a key mechanism for increasing the adequacy of plants by reducing seed predation to satiate the predators with high number of available fruits and consequently improving the fitness of plants (Mezquida and Olano 2013). Despite the importance of seasonal variation, there are few studies spanning a temporal window larger than one single season (e.g. Jordano 1987; Alcantara *et al.* 1997; Herrera *et al.* 2011). The variation in fruit production from year to year can affect the presence and abundance of frugivorous birds in the forests (Jordano 1985). As in plants, frugivorous characteristics, such as body size, behavior or constancy throughout the fruiting season may also influence some components of the seed dispersal process like dispersal distances (Tellería *et al.* 2014). For frugivorous animals, movement decisions might simply reflect underlying fruit-resource distribution, rather than the influence of habitat cover itself (Lehouck *et al.* 2009; González-Varo 2010; Herrera and García 2010) and the strong seasonal variation (Herrera *et al.* 2011).

Changes in landscape configuration such as forest fragmentation and habitat destruction or changes in the land use (e.g. hunting) may alter both the abundance of fruiting plants and of frugivorous birds (Stiles 1980; Restrepo and Gomez 1998; Restrepo *et al.* 1999). Therefore, affecting seed dispersal by modifying the behavior of animal dispersers (Herrera 1995) can also imbalance mutualist and antagonist interactions, through increased antagonism (Jules and Rathcke 1999; Herrera *et al.* 2011), which may disrupt forest regeneration dynamics by reducing the number of seeds removed (Markl *et al.* 2012). Uriarte *et al.* (2011) have demonstrated how habitat fragmentation changes the composition of disperser birds, specifically fragmentation reduces the abundance

of the largest-bodied bird disperser also driving shifts to the population size of fruiting plants. In the long term, human activities may lead to changes in the regenerative potential of plant species by affecting the recruitment and regeneration of plant populations (García *et al.* 2012; Rey and Alcantara 2013).

Moreover, temporal changes can intensify or reduce the strength of this mutualistic interaction. To predict dispersal processes in fragmented forests, it is necessary to characterize the frugivorous guild since small-bodied frugivores display a substantial contribution to short dispersal distance (SDD) events, while large-bodied species make a disproportionate contribution to long dispersal distance (LDD) events (Jordano 2017). Generally larger frugivorous will have higher feeding and habitat requirements than smaller frugivorous that will be able to live in small and poor forest (Uriarte *et al.* 2011).

In the present study, we evaluate the interaction between avian frugivores and seed predators on the Mediterranean masting species *Pistacia lentiscus* L. occurring in contrasting situations of habitat fragmentation (connected and isolated fragments). More specifically, we (i) compared the abundance and composition of avian frugivores and seed predators, (ii) recorded fruit removal rates by fruit dispersers and predators, and finally (iii) investigated potential changes in the final destination of seeds. We expect to find higher frugivorous richness and abundance in connected than in physically isolated fragments for the easy physical connection (Uriarte *et al.* 2011). We also expect to find different patterns depending on the size of the dispersers due to differences in food and niche requirements (Uriarte *et al.* 2011). However, being *P. lentiscus* a masting species, we expect to find strong differences in dispersal and predation rates in different fragments across seasons. Finally, because frugivorous bird visits are longer in female plants and regurgitate or defecate the seeds in the same

place they ingested them, we expect higher levels of seeds dispersal under female *Pistacia* individual plants than in other microhabitats (Verdú and García-Fayos 2002).

Material and Methods

Study area

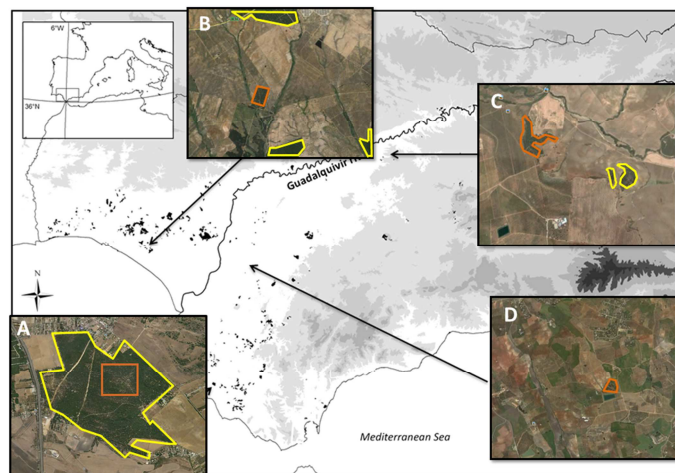
This study was conducted in Andalusia (southern Spain). More specifically, it was conducted along the Guadalquivir River valley, which has a long history of human management, expressed as an intensively cultivated area with strong deforestation (Aparicio 2008). To conduct this study we selected four forest fragments in the region (Fig. 1) categorized either as “connected” or “isolated” based on several landscape connectivity metrics. Forest fragments HNJ and CHN are large (> 10 ha) and potentially connected to other forest fragments bearing large populations of *P. lentiscus*. On the other hand, forest fragments VIS and CRB are small (< 10 ha) and more physically isolated displaying extremely low values of connectivity related to the presence of conspecific populations of *P. lentiscus* in a 5-km surrounding landscape (see the General Introduction). Although different fleshy-fruit species are available in the study fragments (e.g. *Myrtus communis* L., *Olea europaea* L., *Phyllirea angustifolia* L. or *Crataegus monogyna* Jacq.), frugivorous birds show a strong preference for *Pistacia lentiscus* fruits due to its relative higher abundance, greater coverage, extensive fruit production and the high lipid content of the fruit pulp, all these factor making *P. lentiscus* the best reward at the end of autumn and winter in the area (Herrera 1984).

Study species

Pistacia lentiscus (Anacardiaceae) is a common evergreen, sclerophyllous shrub of up to 3-5 m in height distributed throughout the Mediterranean region. The species is dioecious, wind-pollinated, and the fruits are one-seeded drupes that ripe from September to March (Verdú and García-Fayos 1998). Fruit ripening is

associated with the change of color from white to red and then black. Black fruits harbor the highest probability of bearing a viable seeds while red and white fruits are deceptive fruits of parthenocarpic origin or have aborted embryos (Jordano 1989; Albaladejo *et al.* 2009, 2012). The production of deceptive fruits has been associated to a reduction in seed predation by granivorous birds (Verdú and García-Fayos 2000). Seed predator birds break the hard endocarp of the fruit discarding the two valves and eating the seed inside. On the other hand, seed disperser birds eat only the fleshy pericarp of the fruit and defecate or regurgitate the seeds intact within the hard endocarp. Classical census studies and recent DNA barcoding techniques applied to bird droppings show that four bird species are the main seed dispersers (legitimate dispersers) of *P. lentiscus* in our study region; the blackcap species *Sylvia melanocephala* and *S. atricapilla*, the European robin (*Erithacus rubecula*) and the common blackbird (*Turdus merula*) (Jordano 1989; González-Varo *et al.* 2014; Chapter 1).

Figure 1. Aerial photographs of the studied fragments, the position of females is homogeneous along the entire fragment. A: CHN, B: HNJ, C. CRB and D: VIS.



Pistacia lentiscus is a masting plant, and thus fruit production ranges greatly from high to low fruit production across years (Herrera *et al.* 1998). Masting is a common trait in the genus *Pistacia* (Lyles *et al.* 2009) and is responsible of a high temporal variation in food availability to frugivorous birds. This study was conducted in two consecutive dispersal seasons (2012-13 and 2013-14) with contrasting scenarios of fruit offer within the forest fragments. During the first season (mast season), *P. lentiscus* yielded an extensive crop and was basically the only species with fleshy fruits in the study fragments because it was a dry year. The second season (non-mast season), *P. lentiscus* plants yielded much less fruits and the other shrub species increased their relative fruit production due to the rainy spring occurred that year.

Abundance of avian frugivores and seed predators

Censuses were done in the two study seasons from the beginning of fruit ripening (September) until fruit depletion (April). In each of the study fragments, we recorded bird abundance along 300-m long transects performed twice a day, between 9.00 and 12.00 AM, every 3-4 weeks. Frugivorous birds were identified by sound and sight (e.g. Seoane *et al.* 2006; González-Varo 2010). We classified each individual bird species according to their behavior as belonging to the seed disperser or seed predator guild (Herrera 1984, Jordano 1987; González-Varo 2010). We quantify the proportion of resident and migrant birds, and within the disperser guild we also differentiated between small-sized birds (e.g. *Sylvia*) or medium-sized birds (e.g. *Turdus*).

Seed dispersal and predation rates

To determine seed dispersal and predation rates of *P. lentiscus* fruits across the seasons, we selected 10 female shrubs in each forest fragment. We marked four branches in each individual to monitor the ripening of fruits and disappearance by either predation or dispersal. We monitored shrubs every 3-4 weeks completing a total of five monthly observations for each sampling season. In each survey, all the studied fragments were visited during the same week. We considered the disappeared fruits from the branch between two consecutive observations as being removed by legitimate dispersers. The fraction of fruits that remained on the branches was recorded as not dispersed (Alcantara *et al.* 1997; Jordano and Schupp 2000). To correct dispersal rates with fallen and predated fruits we placed seed collectors aboveground, below the canopy of the marked plants. Collectors consisted of aluminum trays of 31 x 20 cm covered with a wire mesh of 5 mm to avoid postdispersal seed predation by rodents. Every two valves in the collecting trays were recorded as one predated fruit.

In order to quantify the seed dispersal and predation rates we estimated the initial fruit density within the canopy (fruits m⁻²) at the beginning of the dispersal season (September) for each marked plant. We counted the number of total fruits within ten 15 x 15 cm quadrats randomly placed throughout the plant canopy (0.225 m² per sampled plant). We estimated the total proportion of fallen fruits for each plant *i* (Ft_i) by dividing the number of fallen and predated fruits (collected in the aboveground trays) by the density of fruits in the entire canopy of the plant (see González-Varo 2010 for a similar procedure). The dispersal rate (proportion of fruits consumed by dispersers) was indirectly calculated as $D'_i = D_i - (D_i \times Ft_i)$, where D_i is the number of missing fruits from the branches between two consecutive observations and Ft_i is the number of non-dispersed (fallen and

predated) fruits. The dispersal rate is calculated for each observation, correcting the number of fruits in the canopy by subtracting the number of fallen and dispersed fruits in the previous observation to the original number of fruits in the canopy. The predation rate was calculated directly from the number of endocarp valves found in the collectors below each marked plant.

Spatio-temporal patterns in the seed rain of P. lentiscus

To determine the spatial and temporal pattern of dispersed seeds within each of the four study fragments and the two study seasons, we established 10 plots comprising 4 seed collectors (traps) each as those explained above. Overall, we installed 40 plots totaling 160 collectors. Plots were distributed throughout the fragments homogeneously and the distance between traps within plot was 10.9 ± 2.5 m. The four traps in each plot were placed in four distinct microhabitats considered as suitable places for birds to perch and drop the seeds (e.g. Rey and Alcántara 2000; González-Varo *et al.* 2008; Parejo-Farnés *et al.* 2017): (i) under female *P. lentiscus* plant, (ii) under male *P. lentiscus* plant, (iii) under the canopy of other shrub species with endozoochorous fruits (mainly *Myrtus communis*, *Quercus coccifera* or *Crataegus monogyna*), and (iv) in open ground under tree canopy (*Pinus pinea*). We placed the collectors in October (at the beginning of fruit ripening) and recorded the seeds dispersed into them monthly, spanning until March-April when no more seeds were recorded.

Statistical analysis

We fitted general linear models (GLMs) to test for differences in abundance of seed dispersers and predators (response variables) between forest fragment types

(connected vs. isolated), and season (mast vs. non-mast year). We included fragment identity as a nested factor within forest fragment type, and the interaction term between the main factors to test for seasonal consistency of potential patterns. We used a Poisson distribution with a log-link function for model fitting, and significance of all categorical fixed-effects was assessed through likelihood ratio tests (LRTs) by comparing the full model with competing models dropping each term at a time. Further, we conducted the same GLM design to the response variable disperser abundance dissected into small-size disperser abundance and medium-size disperser abundance.

Dispersal and predation rates were analyzed by fitting general linear mixed models (GLMMs) with the explanatory variables fragment type (connected vs. isolated) and fragment identity nested within fragment type. Temporal variation was accounted for in the model in order to detect intraseasonal patterns with the factor month, and interseasonal differences through the factor season. Since we were also interested in the consistency of patterns of seed dispersal and predation among fragment types across time, both at a short temporal scale and larger temporal scales we included the second order interactions between fragment type \times month and fragment type \times season. We had several measurements for each focal plant along the experiment and thus plant identity was included as a random factor in the models. The proportion of dispersed seeds was fitted to a binomial distribution with a logit-link function and the number of valves to assess predation rates with a Poisson distribution with a log-link function. Significance of main term and interactions was assessed through LRTs by comparing the full model with competing models dropping each term at a time. GLM and GLMM models were run with the package *lme4* (Bates *et al.* 2013) in R 3.3.2 (R Core Team 2017).

Because of the large number of zeros in the seed rain dataset (in 63.8% of our visits we recorded no seeds in the collectors) and to avoid overdispersion, the number of seeds in the collectors was fitted with a zero-inflated Poisson (ZIP) (Lambert 1992) mixed model under a Bayesian framework (Zuur *et al.* 2012). The ZIP model was fitted as a two-part modelling approach; a binary model (i.e. a Bernoulli process with a logit-link function), and a count process modelled with a Poisson distribution (through a log-link function). We only included the intercept in the Bernoulli process because including covariates in this part leads to excessive model complexity and may suffer from estimation problems (see Zuur *et al.* 2012). In the count process we included fragment type, fragment identity (nested within fragment type), year and month as fixed covariates. As in previous analyses we also included the second-order interactions between fragment type and the temporal covariates in the analysis to test for differences in seed arrival patterns between fragment types across time. Microhabitat and its interaction with fragment type were also included to test for differences in the final destination of seeds in contrasting fragmentation scenarios. Plot identity was included in the analysis as a random factor to account for local scale spatial dependency structure. Priors for regression parameters and random intercepts were drawn from a diffuse normal distribution (mean = 0; precision = 0.0001). We ran three MCMC chains, with a burnin of 10000 iterations followed by 50000 iterations with a thinning rate of 10. Convergence of MCMC chains was checked with the Gelman–Rubin statistic and visualization of plots of the chains for each estimated parameter. For each parameter, we extracted the mean, standard errors and 95% credible intervals from the resulting posterior distributions. Bayesian analysis was carried out in JAGS (Plummer 2003) inside R through the package *R2JAGS* (Su and Yayima 2015). The R script with model specifications for JAGS can be found in supplementary material.

Results

Mean total fruit production of *Pistacia lentiscus* during the mast year was 2873 fruits m⁻² (3526 and 2220 fruits m⁻² in connected and isolated fragments, respectively). During the non-mast season fruit production dropped dramatically, averaging 795 fruits m⁻² (883 and 708 fruits m⁻² in connected and isolated fragments, respectively), the difference between season being strongly significant (Wilcoxon paired-test $V = 1237$; $P < 0.001$).

Abundance of avian frugivores and seed predators

Overall, we detected 958 individual birds (614 and 344 birds in the mast and non-mast years, respectively) belonging to 18 species (Table 1). We recorded eight bird disperser species and 10 predator species in both seasons (Fig. 2). The most abundant disperser species recorded were *Sylvia melanocephala*, *S. atricapilla*, *Turdus merula* and *Erithacus rubecula*, which comprised 50-63% of the total frugivorous bird abundance, and the most abundant predator species were *Parus major*, *Carduelis chloris*, *Fringilla coelebs* and *Serinus serinus*, which comprised 21-28% of the recorded birds.

Seed dispersers' abundance was different between fragment types (connected vs. isolated), seasons and also in the interaction between these two factors (Table 2). There was higher abundance of seed dispersers in connected than in isolated forest fragments in the first season and the opposite trend was observed in the second season, with higher abundance in isolated than in connected forest fragments (Fig. 2). Overall, the abundance of seed dispersers was higher in the first season. Fragment identity within fragment type was not significant showing that fragments of the same type displayed similar patterns.

Table 1. Mean values (\pm SD) and total abundance of frugivorous bird species (dispersers and predators) across two seasons (mast and non-mast year) in the study forest fragments. We indicate (S) small-size disperser and (M) medium-size disperser for legitimate dispersers, abundance residency behavior as R: residents and M: winter residents.

Bird species	Behav ior	Connected fragments				Isolated fragments			
		CHN		HNJ		CRB		VIS	
		Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year
Seed dispersers									
<i>Sylvia atricapilla</i> (S)	M	4.3 \pm 0.6	1.6 \pm 1.5	2.4 \pm 0.5	0.9 \pm 1.4	5.3 \pm 2.1	3.0 \pm 1.9	2.0 \pm 1.9	0.9 \pm 1.2
<i>Sylvia melanocephala</i> (S)	R	4.0 \pm 1.0	2.9 \pm 1.2	2.2 \pm 1.9	2.7 \pm 0.7	1.6 \pm 1.0	3.2 \pm 1.1	4.3 \pm 2.1	2.7 \pm 1.4
<i>Turdus merula</i> (M)	R	1.7 \pm 0.6	1.0 \pm 0.8	1.8 \pm 1.3	1.0 \pm 0.9	1.2 \pm 0.7	0.6 \pm 0.7	3.0 \pm 2.4	2.1 \pm 1.2
<i>Erithacus rubecula</i> (S)	M	2.7 \pm 2.1	2.7 \pm 1.8	3.2 \pm 1.9	1.9 \pm 1.4	0.9 \pm 1.1	1.6 \pm 1.3	2.6 \pm 2.6	1.5 \pm 1.0
<i>Phoenicurus ochruros</i> (S)	M	0.3 \pm 0.6	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4	0.8 \pm 1.0	0.3 \pm 0.5	-	0.3 \pm 0.5	0.1 \pm 0.3
<i>Turdus philomelos</i> (M)	M	0.7 \pm 1.2	0.3 \pm 0.8	3.6 \pm 3.9	0.4 \pm 0.9	1.7 \pm 2.7	1.7 \pm 2.2	-	1.2 \pm 1.6
<i>Columba palumbus</i>	R/M	-	0.1 \pm 0.4	-	0.3 \pm 0.5	1.9 \pm 3.8	-	-	0.6 \pm 1.0
<i>Sturnus vulgaris</i> (M)	R/M	-	1.1 \pm 1.1	0.6 \pm 1.3	-	-	0.3 \pm 0.7	-	0.1 \pm 0.3
Total number		41	65	70	80	76	104	70	108
Seed predators									
<i>Parus major</i>	R	2.0 \pm 1.7	0.9 \pm 0.9	3.8 \pm 1.8	0.2 \pm 0.4	2.0 \pm 1.3	1.9 \pm 1.4	3.0 \pm 1.2	0.6 \pm 0.8
<i>Carduelis chloris</i>	R	-	0.7 \pm 1.0	0.2 \pm 0.4	0.4 \pm 0.9	0.3 \pm 0.5	1.1 \pm 1.2	1.3 \pm 1.5	1.3 \pm 1.9
<i>Fringilla coelebs</i>	R	3.3 \pm 4.2	0.3 \pm 0.5	0.8 \pm 1.8	0.8 \pm 1.1	1.0 \pm 1.9	0.4 \pm 0.7	0.9 \pm 1.2	0.4 \pm 1.0
<i>Serinus serinus</i>	R	0.7 \pm 1.2	0.4 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.7	-	1.7 \pm 1.6	0.1 \pm 0.4	0.5 \pm 1.0
<i>Passer domesticus</i>	R	-	-	-	-	-	1.9 \pm 5.3	2.9 \pm 7.6	2.3 \pm 5.1
<i>Carduelis cannabina</i>	R	0.3 \pm 0.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cyanistes caeruleus</i>	R	-	0.7 \pm 0.8	-	0.1 \pm 0.3	-	-	-	0.1 \pm 0.3
<i>Cyanopica cyanus</i>	R	-	1.7 \pm 4.1	-	-	-	-	-	-
<i>Carduelis carduelis</i>	R	-	-	-	-	-	0.3 \pm 0.7	-	0.8 \pm 1.3
<i>Saxicola torquatus</i>	R	-	-	-	-	-	-	-	0.7 \pm 1.6
Total number		19	25	25	23	37	73	61	81

Seed predator abundance was significantly higher in isolated forest fragments, especially during the second season which made the interactions between these two factors also significant (Table 2, Fig. 2). A weaker, albeit significant, term was observed between fragments which was mostly due to the high abundance of predators in the VIS population in the first season compared to population CRB.

Table 2. Results of the Poisson GLMs testing the effect of fragment type, fragment (nested within type), and season on bird abundance (dispersers and predators). Significant highlighted terms in bold.

Source of variation	Seed dispersers			Seed predators		
	χ^2	df	<i>P</i> -value	χ^2	df	<i>P</i> -value
Type	5.086	1	0.024	32.215	1	< 0.001
Fragment (within Type)	0.836	2	0.658	7.580	2	0.023
Season	6.162	1	0.013	0.232	1	0.630
Type × Season	7.830	1	0.005	10.315	1	0.001

Within the dispersers, the most abundant small-sized birds were *Sylvia atricapilla* y *S. melanocephala*, *Erithacus rubecula* and *Phoenicurus ochruros*, while the medium-sized birds recorded more frequently were *Turdus merula*, *T. philomenos* and *Sturnus vulgaris*. Regarding bird size, small dispersers were more abundant in the first season, and seemed to be less sensitive to the fragmentation effects since no differences were found between fragment types. Medium-sized birds showed the same behavior as the dispersers in general (Table 3) being more abundant in isolated fragmented but depending on the availability of fruits as revealed by the significant season effect.

The relative abundance of migrant and resident birds in both study seasons is shown in Figure 3.

Figure 2. Model fitted average number of bird species, dispersers and predators, in the two study seasons (mast year and non-mast year) by forest fragment type.

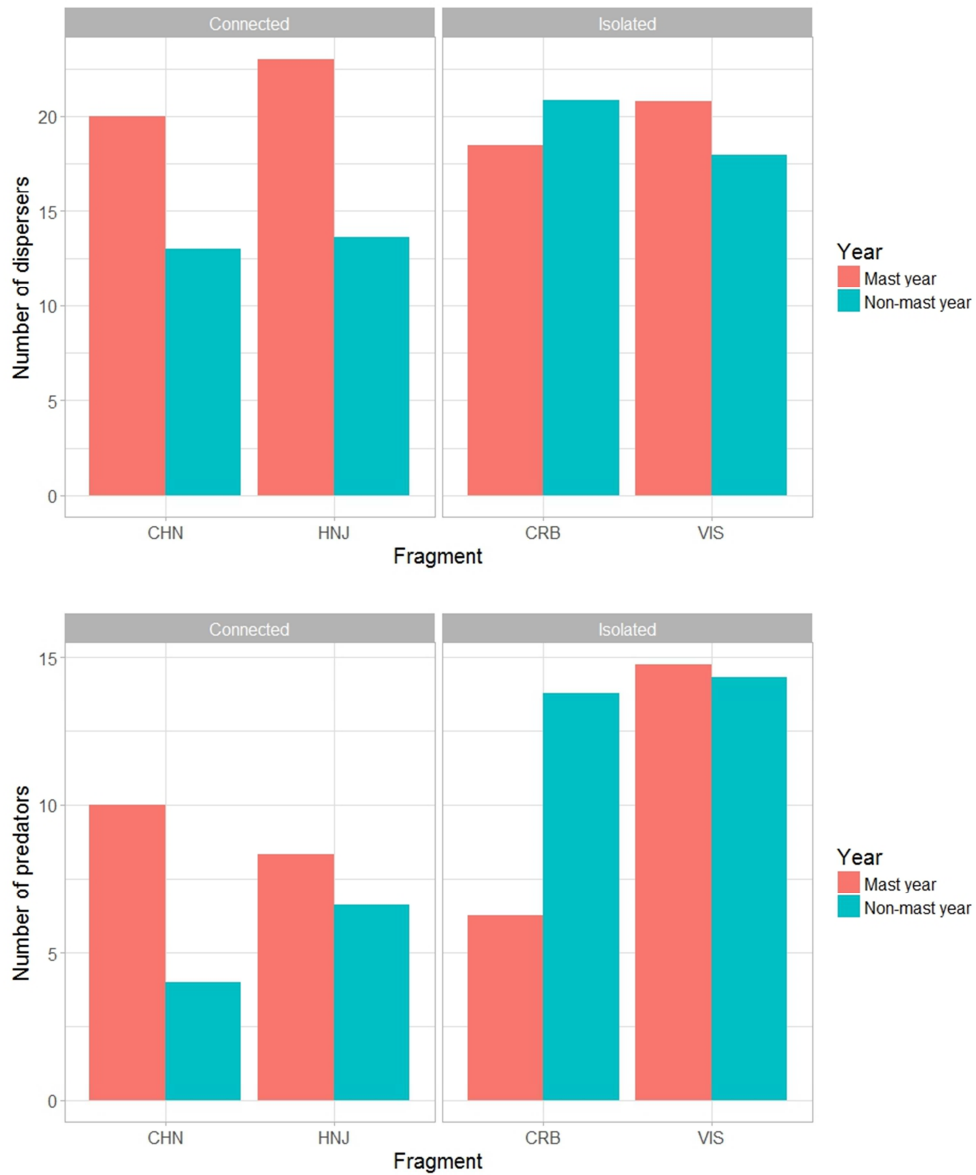
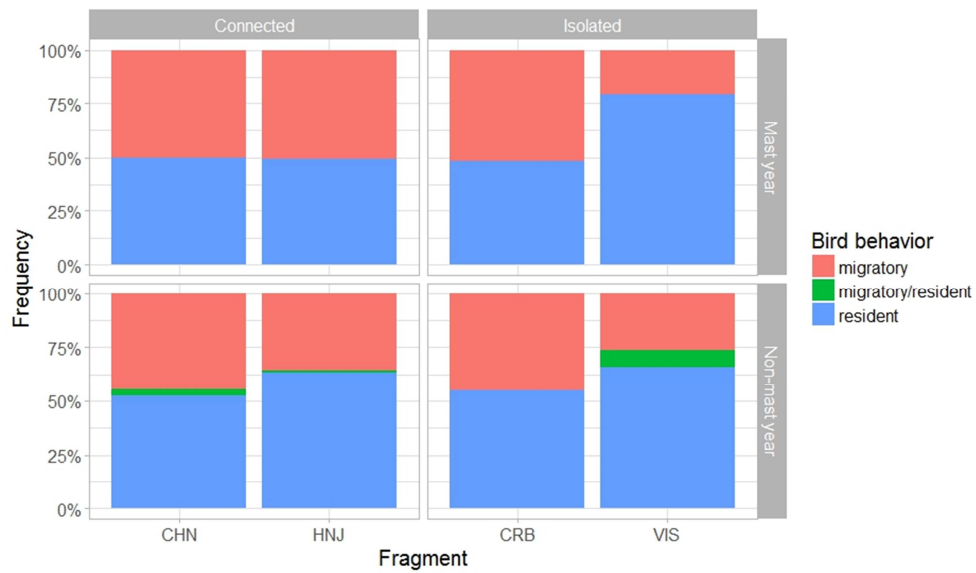


Table 3. Results of the Poisson GLMs testing the effect of fragment type, fragment identity (nested within type) and season on bird abundance by body size (small and medium). Significant terms highlighted in bold.

Source of variation	Small size dispersers			Medium size dispersers		
	χ^2	df	<i>P</i> -value	χ^2	df	<i>P</i> -value
Type	1.631	1	0.201	6.876	1	0.008
Fragment (within Type)	2.073	2	0.354	3.335	2	0.188
Season	4.377	1	0.036	10.324	1	0.001
Type × Season	0.661	1	0.416	10.001	1	0.001

Figure 3. Relative abundance of migratory and/or residents birds in the two study seasons (mast and non-mast years) in connected fragments (CHN and HNJ) and isolated fragments (CRB and VIS).



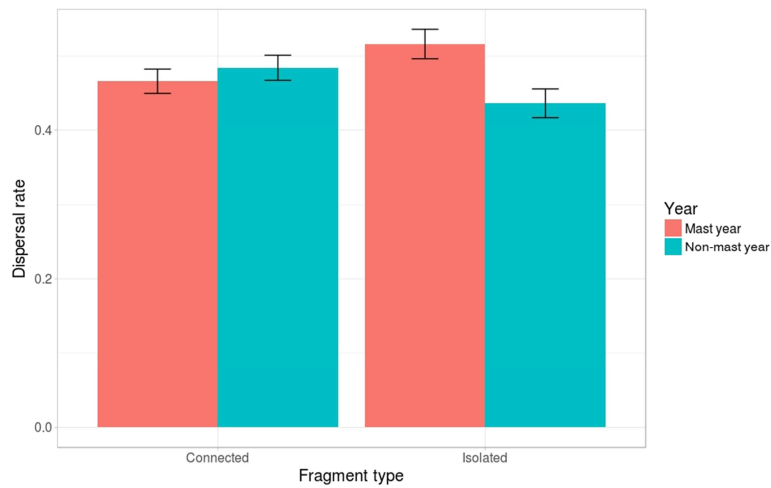
Seed dispersal and predation rates

Seed dispersal rates were significantly higher in the first season. Although we detected no differences between fragment types we found a significant interaction between the temporal factors (month and season) and fragment type (Table 4) indicating that seed dispersal was slightly higher in isolated fragments during the first season; however when the availability of fruits was reduced in the non-mast year dispersal rates significantly decreased in isolated fragments compared to connected ones (Fig. 4). Within seasons, there was a marked monthly variability in the dispersal patterns, with most dispersal events occurring in January-February but with non-overlapping peaks between fragment types (connected and isolated) (Fig. 5).

Table 4. Results of the binomial GLMM testing the effect of fragment type, fragment identity (nested within type), season, month and interaction effects on seed dispersal rates. Significant terms highlighted in bold.

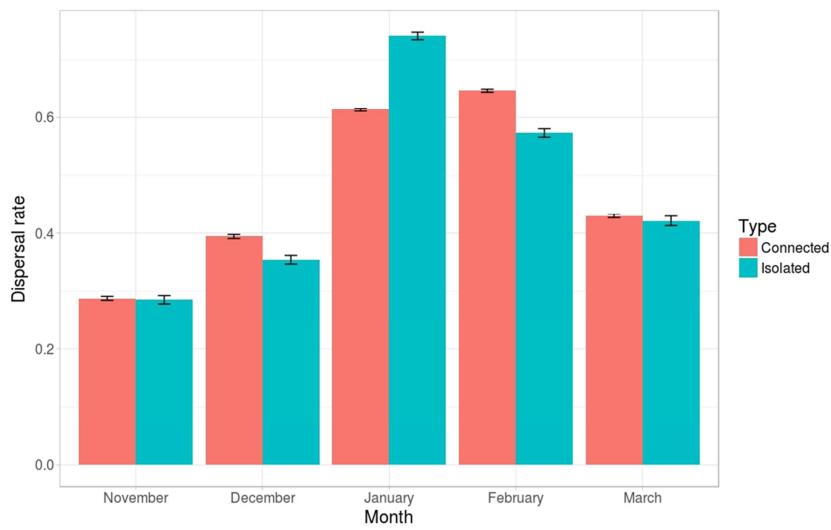
Source of variation	χ^2	df	P-value
Type	0.452	1	0.501
Fragment (within Type)	0.491	2	0.782
Month	3147	4	< 0.001
Season	28.499	1	< 0.001
Type × Month	200.203	4	< 0.001
Type × Season	99.286	1	< 0.001

Figure 4. Model fitted means (\pm 95%CI) of seed dispersal rates by season and forest fragment type.



Predation rate in *P. lentiscus* averaged 0.4% of the fruit crop (in the four studied fragments) which means a negligible effect in the fitness of the plant and thus it will not receive considerable focus in the discussion (results of the GLM on predation rates can be found in supplementary material, Table S1).

Figure 5. Model fitted means (\pm 95%CI) of seed dispersal rates by month and forest fragment type.



Spatio-temporal patterns in the seed rain of P. lentiscus

Mixing of chains for all regression parameters in the ZIP mixed model was good (see Fig. S1), which was also supported by the Gelman-Rubin statistic (all estimated parameters < 1.01). Posterior mean values (and SE) from the model are summarized in Table 5. The random term for the plot effect was significant meaning that a positive spatial local structure existed. A semivariogram conducted on the residual of the ZIP model did not show the existence of remaining spatial patterns (see Fig. S2). As expected due to the masting behavior of *P. lentiscus*, the number of seeds collected in the two study seasons was strong and significantly different (Tables 5 & 6); 1084 seeds were recorded in the collectors during the first season across all fragments while only 249 were recorded in the second. However, no significant differences were detected in the number collected of seeds either between fragment types or between fragments. Overall, there were significant differences between the *Pistacia* female microhabitat with the other microhabitats (Tables 5 & 6), since more than one half of the dispersed seeds were located under the maternal plant (60% in the first season and 55% the second). We found no differences between months (Table 5, Fig. 6) indicating that a similar number of seeds were recovered in the collectors in each visit within the dispersal season. Unexpectedly, patterns of seed deposition across microhabitats and months were not different according to the fragment type, showing the same trend with overlapping 95% confidence intervals for the estimated parameters (Fig. 6).

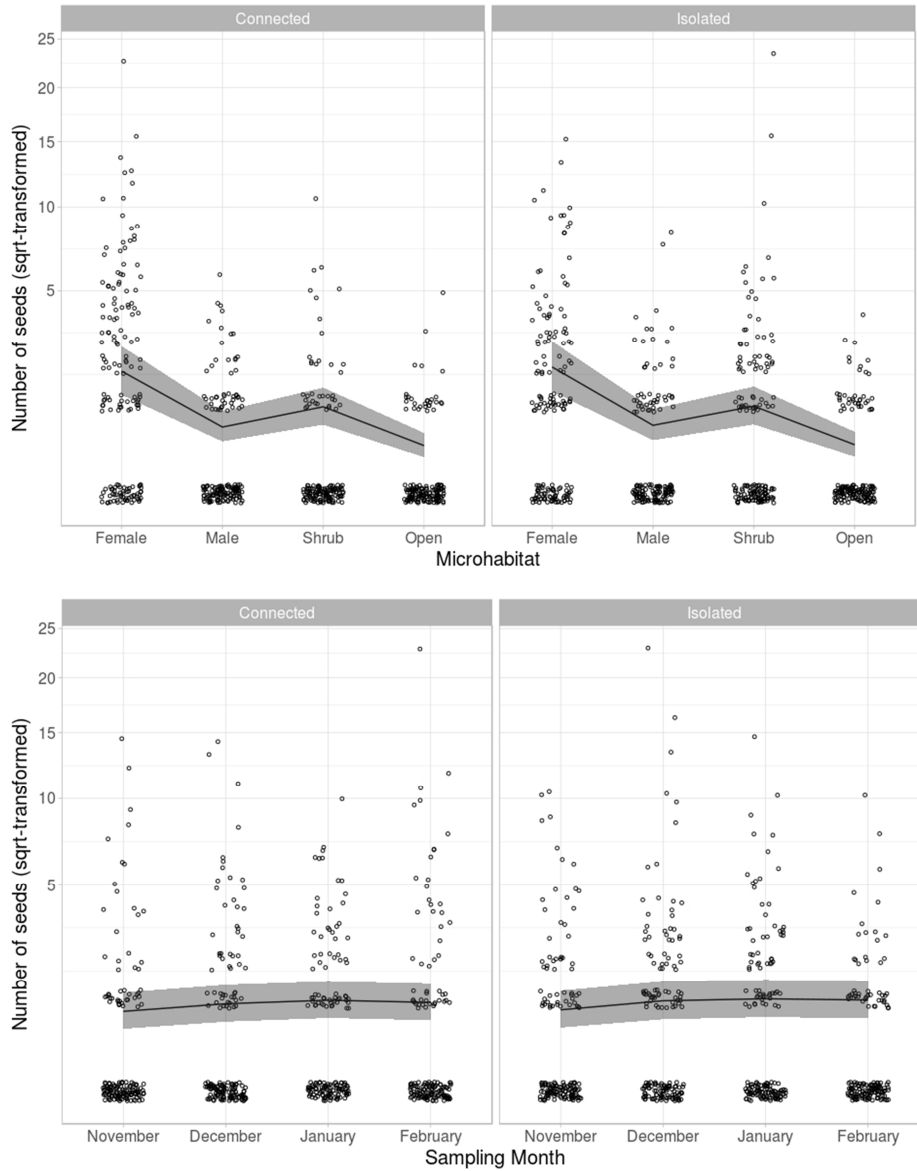
Table 5. Posterior mean values, standard errors (SE) and 95% credible intervals (95% CI) of the main factors from the Bayesian zero-inflated Poisson (ZIP) mixed model of the seed rain of *P. lentiscus*. Values for regression parameters of the interaction terms are omitted (see Figure 7). Important terms (those whose 95% credible intervals do not overlap zero) highlighted in bold.

Parameter s	Covariate	Mean	SE	95% CI
<i>Count process (Poisson distribution with log-link function)</i>				
β_0	Intercept	1.470	0.174	(1.112, 1.805)
β_1	Type (isolated vs. connected fragments)	-0.329	0.246	(-0.808, 0.159)
β_2	Season (non-mast vs. mast year)	-1.116	0.117	(-1.342, -0.885)
β_3	Microhabitat (male vs. female)	-1.345	0.142	(-1.625, -1.069)
β_4	Microhabitat (shrub vs. female)	-1.258	0.156	(-1.564, -0.957)
β_5	Microhabitat (tree vs. female)	-2.148	0.189	(-2.528, -1.785)
β_6	Month (December vs. November)	0.194	0.125	(-0.051, 0.441)
β_7	Month (January vs. November)	0.099	0.128	(-0.149, 0.349)
β_8	Month (February vs. November)	0.239	0.125	(-0.007, 0.482)
β_9	Fragment HNJ vs. CHN (nested within fragment type connected)	-0.255	0.216	(-0.670, 0.166)
β_{10}	Fragment VIS vs. CRB (nested within fragment type isolated)	0.084	0.214	(-0.334, 0.505)
σ_{plot}	Random term for plot effect	0.427	0.068	(0.309, 0.575)
<i>Binary process (Bernoulli distribution with logit-link function)</i>				
Υ_0	Intercept	-0.675	0.130	(-0.945, -0.435)

Table 6. Destination of the seed rain of *P. lentiscus* in the study forest fragments during the two study seasons.

	Connected fragments				Isolated fragments				Total	
	CHN		HNJ		CRB		VIS		Mast year	Non-mast year
	Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year	Mast year	Non-mast year		
Under <i>P. lentiscus</i> female	210	46	143	23	204	32	98	36	655	137
Under <i>P. lentiscus</i> male	29	14	26	13	31	8	44	7	130	42
Under other shrub species	24	6	41	10	56	8	101	25	222	49
Open under tree canopy	22	3	17	5	12	5	12	8	77	21
Total	285	69	227	51	303	53	255	76	1084	249

Figure 6. Posterior mean values (black lines) and 95% credible intervals (shade areas) per microhabitat (upper panels) and month (lower panels) for each forest fragment type (connected and isolated) from the Bayesian ZIP mixed model superimposed to the observed values (points). Slight jittering was added to the points to avoid overplotting and Y-axis was square root-transformed to improve visualization.



Discussion

Habitat quality of human-managed forest fragments may be insufficient to support stable populations of bird species specialized to living in continuous old-growth forest (Henle *et al.* 2004). Assessing the consequences of seed dispersers' loss is important because it can affect long-distance dispersal, spatial patterns of seed deposition, seed germination and plant regeneration. Thus, an impoverished set of frugivores may decrease the chances for rare long-distance dispersal events, which are crucial for meta-population dynamics, the persistence in a fragmented landscape and even for range shifts at large spatial scales (Trakhtenbrot *et al.* 2005; Schupp *et al.* 2010; Corlett and Westcott 2013).

Abundance of avian frugivores and seed predators

The most abundant frugivorous bird species were the legitimate dispersers *Sylvia melanocephala*, *S. atricapilla*, *T. merula* and *E. rubecula*. This result agrees with both traditional studies conducted on the seed dispersal process in *P. lentiscus* (Jordano 1989; Verdú and García-Fayos 1996) and with recent studies using DNA barcoding techniques to assess the identity of the dispersal agents of *P. lentiscus* (González-Varo *et al.* 2014; Chapter 1). We found differences in the presence of dispersers between years, which can be associated with the difference in fruit production observed in *P. lentiscus*, a pattern found in other masting species. For example, in *Olea*, changes in disperser abundance are also observed with variation in the fruit supply (Jordano 1987). The abundance of seed dispersers was higher in the mast season (i.e. high fruit production of *P. lentiscus*) which was the season with a higher record of seed dispersal rate suggesting a strong association between fruit production and the abundance of dispersers. Legitimate bird

dispersers are specialists at the time of fructification of *P. lentiscus* as they feed nearly exclusively on these fruits that are lipid rich (Jordano 1985). On the other hand, the abundance of predators was similar between years, since these are generalist that do not depend so much on the availability of fruits (Blondel and Aronson 1999). During the non-mast season there was a greater abundance of dispersers and predators in isolated than in connected fragments. We attributed this result to a lower number of migrant birds (Fig. 3) which are more frequent in connected fragments because these birds prefer large and well connected forests with a higher variety of food available (Robinson *et al.* 1987).

Habitat fragmentation changes the composition of the disperser guild and this effect is more visible for medium birds than for small bird dispersers (Uriarte *et al.* 2011; Farwing *et al.* 2017). In our study area, medium-sized birds are represented by a few resident species throughout the year (mainly *Turdus* species). The size of dispersers is important because medium-size birds are responsible for LDD since maximum dispersal distances depend not only on the distance that dispersers can travel, but also on the size of seeds relative to frugivorous body mass and the time of retention of the seeds within the body of the disperser (Jordano 2017). In our area, we have found that small dispersers (mostly *Sylvia* species) were less sensitive to fragmentation than medium dispersers because they need fewer resources and are mostly temporary residents. They are responsible of most SDD events where the seeds are expected not to travel large distances. This result is in agreement with a previous genetic study (Parejo-Farnés *et al.* 2017) where we found a very low effective number of mothers (N_{em}) which must be related to the SDD by small-sized birds. In an empirical study in southern Spain, Jordano *et al.* (2007) found that small birds dispersed seeds less than 51 m from the origin while birds of medium size reached

up to 495 m. We believe that in our study site, having more medium-body bird dispersers in isolated fragments than in connected ones will not ensure that the final destination of seeds is adequate due to the small size of the fragments, their isolation and the inhospitable matrix that surrounds them (intensive crop fields).

Seed dispersal and predation rates

Overall, the dispersal rates found in this study were high (51 and 57% in masting season and no masting season respectively) given the intensive defaunation of the forest fragments. Previous studies in others population no fragmented have reported dispersal rates between 42-91% (Jordano 1989; Verdú & García-Fayos 1995, 2002). Although there were not differences in seed dispersal rates between fragment types, there was a temporality in the seed dispersal pattern since we found higher removal rates in isolated fragments in the mast season and the opposite pattern in the non-mast season. These results indicate that seed removal may be relatively robust regardless the differences in connectivity of the fragmented forests and that the differences should be mainly related to the difference in fruit availability between seasons. There were differences between the two types of fragments on a monthly scale, seed dispersal differ among them because of the differences in food resources that the birds have in them.

The difference in the number of dispersers between fragment types seemed not to affect seed dispersal rates which were far from full depletion. This result is indicative of the absence of a satiation process in which the fruit crop will be not completely depleted, and therefore dispersed (e.g. Jordano 1987). In a fragmented landscape, Herrera *et al.* (2010) did not find differences in seed dispersal rates between fragment types (connected and isolated) but between

years, which the authors attributed to the high mobility of birds. Further, Farwing *et al.* (2017), in temperate forest, also found that the loss of vulnerable species did not result in reduced seed removal rates in fragmented forests compared to continuous ones. However, Alcantara *et al.* (1997) found that fragment isolation affected seed dispersal rates recording lower dispersal rates in fragmented forests.

Predation rates were negligible in *P. lentiscus* compared to that reported in other studies in the same species, between 3-31% (see Jordano 1989, Verdú and García-Fayos 1995, 2001). We found isolated individuals with rates of up to 7% of fruit predation but the average was extremely low (0.4% in the four fragments).

Spatio-temporal patterns in the seed rain of P. lentiscus

Despite the effects of habitat fragmentation on frugivorous birds and seed dispersal rates, we did not find a translation in the amount of seeds recovered across fragment types. The distribution of dispersed seeds was strongly skewed with most seeds deposited under the maternal plant (Fig. 6). Dispersal under the maternal plant decreases the potential viability of seedlings via competition with the mother plant and higher levels of post-dispersal seed predation (Janzen-Connell effect). This result agrees with a previous work (Parejo-Farnés *et al.* 2017) where low N_{em} were associated to the high seed dispersal under the mother plant microhabitat. Moreover, the effective short-distance frugivorous-mediated seed dispersal suspected here, may be related to the higher abundance of small bird dispersers in both fragment types contributing to SDD, which reduces gene flow among populations. Although we found higher number of medium-sized birds in

isolated forests this was not reflected in the seed rain. The small size of isolated fragmented forests and the strong territorial behavior of birds such as *E. rubecula* may limit the dispersal movements within the fragments and have no effect on the seed rain deposition pattern. In spite of the intensively managed condition of some of our studied fragments seed rain was similar across fragments and independent of fragment type. This was not an unexpected outcome since small-sized birds were equally abundant across fragments.

Conclusions

We found a higher abundance of seed dispersers in connected than in isolated forest fragments during the mast season and the contrary in the second. However, small seed dispersers, which are responsible of most dispersal events in our fragments showed no differences in abundance. We detected a higher abundance of seed predators in isolated fragments and thus we would have expected to find reduced rates of seed removal by legitimate seed dispersers in isolated fragmented forests compared to connected forest fragments. However, we did not find any fragmentation effect on seed removal rates due to the decoupling of the plant-frugivorous interaction in our study system. These decoupled responses seem mostly due to the high feeding dependence of disperser birds on *P. lentiscus* fruits. In the three components of the seed dispersal process in our study system we found: (i) source; high variability in fruit availability between years by masting, (ii) distance component; unaffected by isolation imposed by fragmentation, and (iii) the dispersal vector; disperser birds were affected by the degree of connectivity of fragments, lowering their abundance in isolated forest fragments at maximum fruiting season (mast season). In this study we emphasize the importance of seasonality for

understanding how environmental variables influence patterns of frugivore-mediated seed dispersal.

Acknowledgements

We would like to thank the local landowners for permission to work at the study sites, Lorena Ashworth, Ana Calviño and Pedro Jordano for valuable comments, and Encarnación Rubio-Perez for field and laboratory assistance. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CGL2011- 23721). CPF is supported by a predoctoral fellowship from Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2012-055103) and research mobility for short stays (EEBB-I-15-09392).

References

- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramin GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *Plos One*, 7, e49012.
- Alcántara JM, Rey PJ, Valera F, Sanchez-Lafuente AM, Gutierrez JE (1997) Habitat alteration and plant intra-specific competition for seed dispersers. An example with *Olea europaea* var. *sylvestris*. *Oikos*, 79, 291–300.
- 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*, 17, 2219–2232.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1-48.
- Blondel J, Aronson J (1999) *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. University Press, Oxford, UK.
- Clark JS, Dietze M, Chakraborty S, Agarwal PK, Ibanez I, LaDeau S, Wolosin M (2007) Resolving the biodiversity paradox. *Ecology Letters*, 10, 647–659.
- Connell JH (1971) On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. *Dynamics of Populations*, ed. P. J. Den Boer, G. Gradwell, pp. 298-312. Wageningen: PUDOC
- Corlett RT, Westcott DA (2013) Will plant movements keep up with climate change? *Trends in Ecology and Evolution*, 28, 482–488.
- Corrêa Côrtes MC, Uriarte M (2012) Integrating frugivory and animal movement: A review of the evidence and implications for scaling seed dispersal. *Biological Reviews*, 88, 255–272.

- Davidar P, Morton ES (1986) The relationship between fruit crop sizes and fruit removal rates by birds. *Ecology*, 67, 262-65.
- Farwig N, Böhning-Gaese K, Bleher B (2006) Enhanced seed dispersal of *Prunus africana* in fragmented and disturbed forests? *Oecologia*, 147, 238–252.
- Farwig N, Schabo DG, Albrecht J (2017) Trait-associated loss of frugivores in fragmented forest does not affect seed removal rates. *Journal of Ecology*, 105, 20–28.
- Galetti M, Alves-costa CP, Cazetta E (2003) Effects of forest fragmenting anthropogenic edges and fruit colour on the consumption of orinthocoric fruits. *Biological Conservation*, 111, 269–273.
- García C, Grivet D (2011) Molecular insights into seed dispersal mutualisms driving plant population recruitment. *Acta Oecologica*, 37, 632–640.
- García D, Martínez D, Herrera JM, Morales JM (2012) Functional heterogeneity in a plant–frugivore assemblage enhances seed dispersal resilience to habitat loss. *Ecography*, 35, 197-208.
- González-Castro A, Calviño-Cancela M, Nogales M (2015) Comparing seed dispersal effectiveness by frugivores at the community level. *Ecology*, 96, 808-818.
- González-Varo JP, Albaladejo RG, Aparicio A (2008) Mating patterns and spatial distribution of conspecific neighbours in the Mediterranean shrub *Myrtus communis* (Myrtaceae). *Plant Ecology*, 203, 207–215.
- González-Varo JP (2010) Fragmentation, habitat composition and the dispersal/predation balance in interactions between the Mediterranean myrtle and avian frugivores. *Ecography*, 33, 185–197.
- González-Varo JP, Arroyo JM, Jordano P (2014) Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 806–814.

- Henle K, Davies KF, Kleyer M, Margules C, Settele J (2004) Predictors of species sensitivity to fragmentation. *Biodiversity and Conservation*, 13, 207–251.
- Herrera CM (1984) A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological Monographs*, 54, 1–23.
- Herrera CM (1988) Variaciones anuales en las poblaciones de pájaros frugívoros y su relación con la abundancia de frutos. *Ardeola*, 35, 135-142.
- Herrera CM (1995) Plant-vertebrate seed dispersal systems in the Mediterranean: ecological, evolutionary, and historical determinants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 705–727.
- Herrera CM, Jordano P, Lopez-Soria L, Amat JA (1994) Recruitment of a mast-fruiting, bird-dispersed tree: Bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs*, 64, 315–344.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept. *The American Naturalist*, 152, 576–594.
- Herrera JM, García D (2010) Effects of forest fragmentation on seed dispersal and seedling establishment in ornithochorous trees. *Conservation Biology*, 24, 1089–1098.
- Herrera JM, Morales JM, García D (2011) Differential effects of fruit availability and habitat cover for frugivore-mediated seed dispersal in a heterogeneous landscape. *Journal of Ecology*, 99, 1100–1107.
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 201–228.
- Janzen D (1970) Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *The American Naturalist*, 130, 526–543.
- Jordano P (1985) El ciclo anual de los passeriformes frugívoros en el matorral mediterráneo del sur de España: importancia de su invernada y variaciones interanuales. *Ardeola*, 32, 69-94.

- Jordano P (1987) Avian Fruit removal: effects of fruit variation, crop size and insect damage. *Ecology*, 68, 1711-1723.
- Jordano P (1988) Polinización y variabilidad de la producción de semillas en *Pistacia lentiscus* L. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 45, 213-231.
- Jordano P (1989) Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos*, 55, 357–386.
- Jordano P (2000) Fruits and frugivory. In *Seeds: The Ecology of Regeneration in Natural Plant Communities*, ed. M Fenner, 125-66. Wallingford, UK.
- Jordano P, García C, Godoy JA, García-Castaño JL (2007) Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 3278-3282.
- Jordano P, Schupp EW (2000) Seed disperser effectiveness: the quantity component and patterns of seed rain for *Prunus mahaleb*. *Ecological Monographs*, 70, 591–615.
- Jordano P (2017) What is long-distance dispersal? And a taxonomy of dispersal events. *Journal of Ecology*, 105, 75–84.
- Jules ES, Rathcke BJ (1999) Mechanisms of reduced Trillium recruitment along edges of old-growth forest fragments. *Conservation Biology* 13, 784–793.
- Lambert D (1992) Zero-inflated Poisson regression, with an application to defects in manufacturing *Technometrics*, 34, 1-14.
- Laska MS, Stiles EW (1994) Effects of fruit crop size on the intensity of fruit removal in *Viburnum prunifolium* (Caprifoliaceae). *Oikos*, 69, 199-202.
- Lehouck V, Spanhove T, Demeter S, Groot NE, Lens L (2009) Complementary seed dispersal by three avian frugivores in a fragmented Afromontane forest. *Journal of Vegetation Science*, 20, 1110–1120.

- Lyles D, Rosenstock TS, Hastings A, Brown PH (2009) The role of large environmental noise in masting: general model and example from pistachio trees. *Journal of Theoretical Biology*, 259, 701–713.
- Markl JS, Schleuning M, Forget PM, Jordano P, Lambert JE, Traveset A, Wright SJ, Böhning-Gaese K (2012) Meta-Analysis of the Effects of Human Disturbance on Seed Dispersal by Animals. *Conservation Biology*, 26, 1072-1081.
- Mezquida ET, Olano JM (2013) What makes a good neighborhood? Interaction of spatial scale and fruit density in the predator satiation dynamics of a masting juniper tree. *Oecologia*, 173, 483–492.
- Nathan R (2006) Long-distance dispersal of plants. *Science*, 313, 786–788.
- Parejo-Farnés C, Robledo-Arnuncio JJ, Albaladejo RG, Rubio-Pérez E, Aparicio A (2017) Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. *Tree, Genetics & Genomes*, 13, 17.
- Plummer M (2003) JAGS: A Program for Analysis of Bayesian Graphical Models Using Gibbs Sampling. In K Hornik, F Leisch, A Zeileis (eds.), *Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing*.
- Restrepo C, Gomez N (1998) Responses of understory birds to anthropogenic edges in a Neotropical montane forest. *Ecological Applications*, 8, 170-183.
- Restrepo C, Gomez N, Heredia S (1999) Anthropogenic edges, treefall gaps, and fruit-frugivore interactions in a Neotropical montane forest. *Ecology*, 80, 668-685.
- Rey PJ, Alcántara JM (2000) Recruitment dynamics of a fleshy-fruited plant (*Olea europaea*): Connecting patterns of seed dispersal to seedling establishment. *Journal of Ecology*, 88, 622–633.
- Rey PJ, Alcántara JM (2013) Effects of habitat alteration on the effectiveness of plant-avian seed dispersal mutualisms: consequences for plant regeneration. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16, 21–31.

- Robinson SK, Thompson FR, Donovan TM, Whitehead DR, Faaborg J (1995) Regional forest fragmentation and the nesting success of migratory birds. *Science*, 267, 1987-90.
- Sallabanks R (1993) Fruiting plant attractiveness to avian seed dispersers: native vs. invasive *Crataegus* in western Oregon. *Madroño*, 40, 108-116.
- Schupp EW, Milleron T, Russo SE (2002) Dissemination limitation and the origin and maintenance of species-rich tropical forests. 19-33.
- Schupp EW, Jordano P, Gómez JM (2010) Seed dispersal effectiveness revisited: A conceptual review. *New Phytologist*, 188, 333–353.
- Schupp EW, Jordano P (2011) The full path of Janzen–Connell effects: genetic tracking of seeds to adult plant recruitment. *Molecular Ecology*, 20, 3953-3955.
- Seoane J, Justribó JH, García F, Retamar J, Rabadán C, Atienza JC (2006) Habitat-suitability modelling to assess the effects of land-use changes on Dupont's lark *Chersophilus duponti*: A case study in the Layna Important Bird Area. *Biological Conservation*, 128, 241–252.
- Su Y, Yajima M (2015) R2jags: Using R to Run 'JAGS'. R package version 0.5-7.
- Stiles EW (1980) Patterns of fruit presentation and seed dispersal in bird-disseminated woody plants in the eastern deciduous forest. *American Naturalist*, 116, 670-688.
- Tellería JL, Santos T (1999) Distribution of birds in fragments of Mediterranean forests: the role of ecological densities. *Ecography*, 22, 13-19.
- Tellería JL, Carrascal LM, Santos T (2014) Large-scale features affect spatial variation in seed dispersal by birds in juniper woodlands *Ecological Research*, 29, 13-20.
- Trakhtenbrot A, Nathan R, Perry G, Richardson D (2005) The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation. *Diversity and Distributions*, 11, 173–181.

- Uriarte M, Anciães M, Da Silva MT, Rubim P, Johnson R, Bruna EM (2011) Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92, 924–937.
- Verdú M, García-Fayos P (1995) Dispersión y predación predispersiva de semillas en *Pistacia lentiscus*. *Studia Oecologica*, 12, 169-178.
- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation process in a mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology*, 10, 275–280.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Female biased sex ratios in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Plant Ecology*, 135, 95–101.
- Verdú M, García-Fayos P (2000) The effect of deceptive fruits on predispersal seed predation by birds in *Pistacia lentiscus*. *Plant Ecology*, 156, 245-248.
- Verdú M, García-Fayos P (2002) Ecología reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): un anacronismo evolutivo en el matorral mediterráneo. *Revista Chilena de Historia Natural*, 57–65.
- Wang BC, Smith TB (2002) Closing the seed dispersal loop. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 379-385.
- Zuur AF, Saveliev AA, Ieno EN (2012) *Zero Inflated Models and Generalized Linear Mixed Models with R*. Newburgh, NY: Highland Statistics Limited.

Supplementary material

R script for running the zero-inflated Poisson mixed model in R2JAGS.

```
#####  
GENERAL LINEAR MIXED MODEL (GLMM) WITH ZERO-INFLATED POISSON  
DISTRIBUTION (ZIP-GLMM).  
R CODE IS BASED ON ZUUR & IENO (2016)-BEGINNER'S GUIDE TO ZERO-  
INFLATED MODELS WITH R. HIGHLAND STATISTICS LTD.  
YOU NEED TO HAVE JAGS INSTALLED IN THE COMPUTER AND TO LOAD THE  
PACKAGE R2JAGS.  
#####  
  
#MODEL VARIABLES.  
#Type      -> Categorical. Forest fragment type (Isolated, Connected)  
#Fragment  -> Categorical. ID of each forest fragment (CHN, HNJ, CRB,  
VIS)  
#Year      -> Categorical. Year of sampling (Year1, Year2)  
#Month     -> Categorical. Month of sampling (Month1, Month2, Month3,  
Month4)  
#Microhab  -> Categorical. Sampled microhabitats (Female, Male,  
Shrub, Open)  
#Plot      -> Categorical. Random factor. Sampling plots (1-40)  
#SEED      -> Response count variable. Seeds recovered for collector  
(trap) in each sampling date  
  
#PARAMETERS NEEDED FOR JAGS.  
>Xc <- model.matrix(~1 + Type/Fragment + Year + Microhab + Month +  
Type:Year + Type:Month + Type:Microhab, data = seed_rain) #Matrix  
for the count (Poisson) process  
  
>Xb <- model.matrix(~1, data = seed_rain) #Matrix for the  
Bernouilli process  
  
>Kc <- ncol(Xc)  
>Kb <- ncol(Xb)  
>IO <- as.numeric(seed_rain$SEED > 0)  
>re <- as.numeric(as.factor(seed_rain$Plot))  
>NumRE <- length(unique(seed_rain$Plot))  
  
#JAGS input  
>JAGS.data <- list(Y = seed_rain$SEED,  
                  Xc = Xc,  
                  Kc = Kc,  
                  Xb = Xb,  
                  Kb = Kb,  
                  N = nrow(seed_rain),  
                  re = re,  
                  NumRE = NumRE,
```

```

        IO = IO,
        Zeros = rep(0, nrow(seed_rain))

#ZIP-GLMM MODEL SYNTAX
>sink("ZIPGLMM_seed_rain.txt")
>cat("
    model{
        #1. Priors for regressions parameters
        for (i in 1:Kc) {beta[i] ~ dnorm(0, 0.0001)}
        for (i in 1:Kb) {gamma[i] ~ dnorm(0, 0.0001)}

        #1B. Priors for random intercepts
        for (i in 1:NumRE) {a1[i] ~ dnorm(0, tau)}

        #1C. Priors for variances for random intercepts
        sigma ~ dunif(0.001, 5)
        tau <- 1 / (sigma * sigma)

        #2. Likelihood with zero trick. Needed to fit a ZIP
distribution
        C <- 1000
        for (i in 1:N) {
            Zeros[i] ~ dpois(-Li[i] + C)
            l1[i] <- log(Pi[i] + (1 - Pi[i]) * exp(-mu[i]))
            l2[i] <- log(1-Pi[i]) + Y[i] * log(mu[i]) - mu[i]
- loggam(Y[i] + 1)
            Li[i] <- (1 - IO[i]) * l1[i] + IO[i] * l2[i]
            log(mu[i]) <- inprod(beta[], Xc[i,]) + a1[re[i]]
            logit(Pi[i]) <- inprod(gamma[], Xb[i,])
            }

        #3. Pearson residuals. For validation purposes
        for (i in 1:N) {
            ExpY[i] <- (1 - Pi[i]) * mu[i]
            VarY[i] <- (1 - Pi[i]) * (mu[i] + Pi[i] * mu[i] *
mu[i])
            E[i] <- (Y[i] - ExpY[i]) / sqrt(VarY[i])
            }
        }
    ", fill = TRUE)
>sink()

#INITIAL VALUES
>inits <- function () {list(beta = rnorm(Kc, 0, 0.1),
        gamma = rnorm(Kb, 0, 0.1),
        a1 = rnorm(NumRE, 0, 0.1),
        sigma = runif(1, 0.001, 5))}

#LIST OF PARAMETERS TO SAVE
>params <- c("beta", "gamma", "a1", "ExpY", "E", "sigma")

```

```
#RUNNING JAGS
>ZIP1 <- jags(data = JAGS.data,
             inits = inits,
             parameters = params,
             model = "ZIPGLMM_seed_rain.txt",
             n.thin = 10,
             n.chains = 3,
             n.burnin = 10000,
             n.iter = 50000)
```

```
#####
```

Table S1. Results of the binomial GLMM testing the effect of fragment type, fragment identity (nested within type), season, month and interaction effects on seed predation rates. Significant terms highlighted in bold.

Source of variation	χ^2	Df	<i>P</i> -value
Type	0.545	1	0.460
Fragment (within Type)	367.780	2	< 0.001
Month	2312.171	1	< 0.001
Season	64.945	1	< 0.001
Type × Month	245.462	3	< 0.001
Type × Season	73.211	3	< 0.001

Figure S1. Mixing of chains for all estimated regression parameters in the ZIP mixed model.

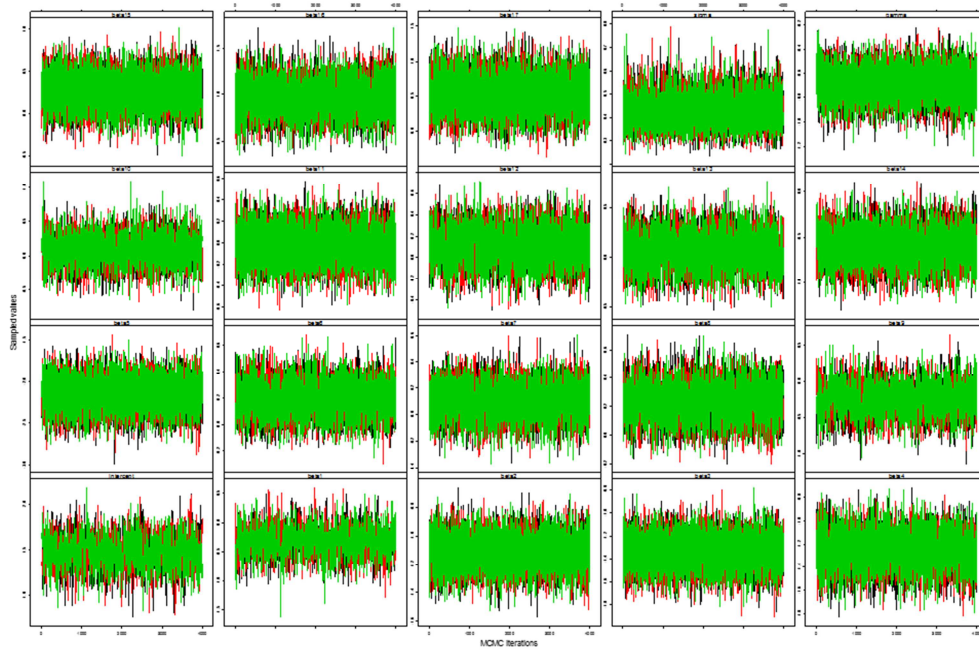
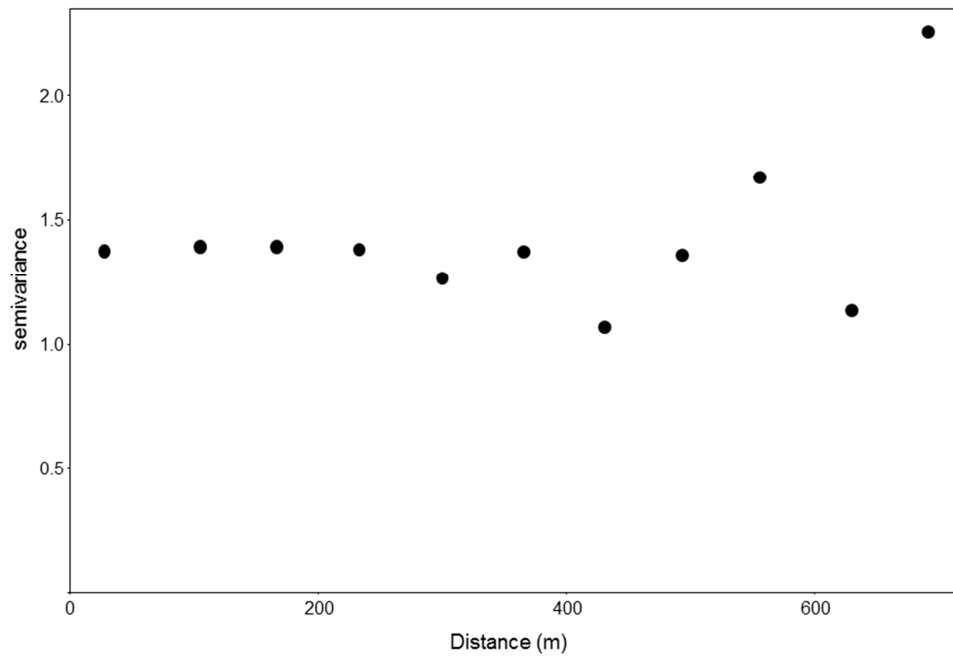


Figure S2. Semivariogram conducted on the residuals of the ZIP mixed model.



3 EFFECTS OF HABITAT FRAGMENTATION ON PARENTAL CORRELATIONS IN THE SEED RAIN OF A BIRD-DISPersed SPECIES

Clara Parejo-Farnés, Juan J. Robledo-Arnuncio, Rafael G. Albaladejo, Encarnación Rubio-Pérez, Abelardo Aparicio. (2017) Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. *Tree, genetics & Genomes* 13: 17. DOI 10.1007/s11295-017-1100-9

Resumen

La dispersión de las semillas desempeña un papel crucial en la regeneración de los bosques naturales. Los cambios en la lluvia de semillas debido a la alteración antrópica del hábitat pueden influir en los patrones de reclutamiento de las plántulas y afectar la dinámica evolutiva de las poblaciones. Utilizando un ensayo combinado de microsatélites de endocarpo-embrión de semillas dispersadas de forma natural, se cuantifica simultáneamente la contribución de la dispersión de polen y semillas a la estructura genética de la lluvia de semillas de la especie arbustiva *Pistacia lentiscus* L. El estudio se llevó a cabo en dos temporadas consecutivas en cuatro bosques fragmentados con paisajes contrastantes (conectados vs. aislados). La variación interseasonal en la estructura genética parental de la lluvia de semillas se evaluó a través del análisis de la varianza molecular y se calcularon correlaciones paternas y maternas y números parentales efectivos para diferentes fragmentos y microhábitats utilizando el análisis de parentesco genético. La variación temporal en la estructura genética de las semillas dispersadas fue mayor para los gametos maternos, lo que refleja una contribución más variable temporalmente de las plantas madre individuales a la lluvia de semillas, como una consecuencia potencial de la vecería y / o la heterogeneidad natural. Se observó un mayor número efectivo de padres que de madres en todos los fragmentos de bosque estudiados y microhábitats, siendo la diferencia más pronunciada para los fragmentos conectados que para los aislados. El número efectivo de madres, influido directamente por el comportamiento de las aves dispersoras, era aparentemente insensible a la fragmentación. A pesar de la movilidad potencialmente alta del polen por el viento y las semillas por las aves, la fragmentación del hábitat podría influir en la estructura de los padres de las

semillas dispersas, con posibles consecuencias para la estructura genética de la generación adulta.

Palabras clave: Flujo genético, *Pistacia lentiscus*, dispersión de polen y semillas, parentesco, análisis de la estructura parental.

Abstract

Seed dispersal plays a crucial role in natural forest regeneration. Changes in the seed rain due to anthropogenic habitat alteration can influence seedling recruitment patterns and affect the evolutionary dynamics of populations. Using a combined endocarp-embryo microsatellite assay of naturally dispersed seeds, we concomitantly quantify the contribution of contemporary pollen and seed dispersal to the genetic structure of the seed rain of the shrub species *Pistacia lentiscus* L. The study was conducted in two consecutive seasons at four forest fragments embedded in contrasting (connected vs. isolated) landscapes. Interseasonal variation in the parental genetic structure of the seed rain was assessed through analysis of molecular variance, and paternal and maternal correlations and effective parental numbers were computed for different fragments and microhabitats (within fragments) using genetic kinship analysis. Temporal variation in the genetic structure of the dispersed seeds was higher for maternal gametes, reflecting a more temporally variable contribution of individual mother plants to the seed rain, as a potential consequence of masting and/or natural heterogeneity. Higher effective numbers of fathers than mothers were consistently observed in all studied forest fragments and microhabitats, the difference being more pronounced for connected than for isolated fragments. The effective number of mothers, directly influenced by disperser birds behaviour,

was apparently insensitive to fragmentation. Despite potentially high mobility of pollen by wind and seeds by birds, habitat fragmentation could influence the parental structure of dispersed seeds, with potential consequences for the genetic structure of the adult generation.

Keywords: gene flow, *Pistacia lentiscus*, pollen and seed dispersal, kinship, parental structure analysis.

Introduction

For plant populations, pollen and seed dispersal represent the vectors of reproductive, demographic and genetic connectivity, determining the distribution of genetic diversity within and among populations, and thus the template on which evolutionary forces operate (Jordano 2010). The synergy between pollen and seed movement, which ultimately structure seedling populations, primarily determines the genetic variation of the populations.

Pollen dispersal represents the initial vector of male gametic dispersal and is generally responsible for most long-distance gene movement (Ennos 1994; Petit and Hampe 2006; Dick 2008). Seed dispersal subsequently transports both male and female gametes and, because it carries twice the number of genes than pollen, it is expected to have comparatively larger impact on patterns of genetic structure (Crawford 1984; Hamilton 1999; García and Grivet 2011; Sork *et al.* 2015). Effective seed dispersal typically exhibits distance-dependent patterns, as a result of the decreasing probability of seed movement with distances and potential density-dependent seedling establishment (e.g. Janzen-Connell effects). Seed dispersal, however, can be simultaneously influenced by distance-independent non-random processes, and directed dispersal toward certain microhabitats within the landscape seems to be specially common for animal-dispersed seeds (Schupp *et al.* 2002). For instance, disperser birds frequently display a marked preference for perching in specific trees or shrubs where they regurgitate or defecate the seeds (Caves *et al.* 2013), and thus, foraging behavior might promote a heterogeneous seed rain and enhance fine-scale genetic structure in subsequent steps of the regeneration process (Jordano 2007). This produces significant spatial genetic structure patterns that are more complex in bird-dispersed species (Torimaru *et al.* 2007). If both pollen and seed dispersal are

non-random, plant populations may develop substantial genetic structure (Aguilar and Galetto 2004). By contrast, if pollen flow is limited but seed dispersal is widespread, seed dispersal is expected to dilute the potential genetic structure that restricted pollen flow would produce (Chung *et al.* 2000). Conversely, extensive pollen flow will mitigate the spatial genetic structure produced by restricted seed dispersal (Lowe *et al.* 2005).

Landscape configuration, particularly fragmentation, also influences the amount and spatial pattern of both pollen and seed effective dispersal (Young *et al.* 1996; Cordeiro and Howe 2003; Aguilar *et al.* 2008). Although it should in principle have comparatively little effect on pollination by wind (Hamrick 2004), there are numerous examples of how pollen flow may be limited by habitat fragmentation (Koenig and Ashley 2003; Broadhurst 2015). In addition, fragmentation not only might affect pollen dispersal, but also seed dispersal by modifying the behaviour of animal dispersers (Herrera 1995; Uriarte *et al.* 2011). Seed dispersers behaviour determines quantitative (seed removal) and qualitative (seed arrival to safe sites) components of seed dispersal, thereby affecting the recruitment and regeneration of plant populations (García *et al.* 2012; Rey and Alcantara 2013). Changes in either the number or the spatial distribution of dispersed seeds may influence seedling competition and predation, or mortality through dispersal to unsuitable sites (Uriarte *et al.* 2011).

Even if the relative contributions of pollen and seed dispersal to spatial genetic structure influence the evolutionary dynamics of local populations, studies concomitantly assessing them are recent and still scarce. Grivet *et al.* (2009) have proposed an analytical method to infer how contemporary pollen and seed dispersal processes contribute to create fine-scale spatial genetic structure. Unlike parentage analyses, their approach does not require parental genotypic samples,

and it can be applied to data sets in which it is possible to discriminate between the male and female contribution to diploid offspring genotypes (Robledo-Arnuncio *et al.* 2012). The method estimates paternal and maternal correlations (i.e. probabilities of paternal and maternal identities between offspring pairs) within fragments of dispersed seeds or established seedlings. Paternal and maternal correlations can be translated into effective parental numbers (N_e), which provide a measure of the potential for genetic drift, inbreeding and kin competition on a local scale. In addition, the decay in among-patch parental correlations with distance reflects the degree of isolation among offspring fragments as determined by the spatial range of pollen and seed dispersal.

In this study, we quantify the relative contribution of contemporary pollen and seed dispersal to the fine-scale genetic structure of the seed rain in fragments of the wind-pollinated animal-dispersed shrub species *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) located in contrasting landscapes. Our interest and focus in this species is twofold; on the one hand the species is widespread in Mediterranean forest remnants, it bears fleshy fruits that support populations of migrant and resident bird species, and thus can be considered a keystone species with important effects on ecosystem processes and services (de Bello *et al.* 2010). On the other hand, the species is an ideal study case since dispersed seeds retain diploid maternal tissue in the endocarp, which allows an exact determination of the maternal genotype, while biparental genetic contribution can be assessed from the combined assay of endocarp and embryo genotypes. Our specific objectives were (i) to assess differences in genetic variation of seed rain between two seasons in fragments with different degree of connectivity (connected vs. isolated), (ii) to quantify the maternal and paternal correlations and the corresponding effective number of mothers (N_{em}) and fathers (N_{ep}) in naturally

dispersed seeds within connected vs. isolated fragments, and (iii) to measure the maternal and paternal correlations in the seed rain in different microhabitats (defined by the species identity of the closest adult individual) within fragments. We expected larger N_{ep} and N_{em} in connected than in physically isolated fragments, as a consequence of higher mate availability. Further, we expected N_{em} to be generally lower than N_{ep} , because seed dispersal seems to be more spatially restricted than pollen flow in this species (Albaladejo *et al.* 2012). Finally, we hypothesize higher levels of correlated paternity and maternity in seeds dispersed under female *Pistacia* individual plants than in other microhabitats, because of longer stays of disperser birds in this microhabitat (Verdú and García-Fayos 1996).

Material and Methods

Study species, study site and sampling strategy

Pistacia lentiscus L. is a sclerophyllous shrub typical in the Mediterranean maquis vegetation. The species is dioecious and wind-pollinated and the fruits are one-seeded drupes. In the study region the drupes mature from September to December and are dispersed during winter and early spring by small and medium-sized birds such as blackcaps, thrushes and robins, among others (Herrera 1984, C. Parejo-Farnés, unpublished results). Mammal dispersal is not expected to play a significant role in the study fragments, as mammals are substantially more affected than small birds by the strong defaunation in the area. The species exhibits a masting behavior, a strategy that might increase female fitness by imposing satiation-starvation cycles on seed predators (Mezquida and Olano 2013), represented mostly by rodents and granivorous birds (Verdú and García-Fayos 1996). Fruit color is associated to seed viability and normally only black

mature fruits contain viable seeds (Verdú and García-Fayos 1998; Albaladejo *et al.* 2009). Red and white fruits contain parthenocarpic or aborted embryos, which limit female fecundity (Verdú and García-Fayos 1998). Overall, the proportion of viable seeds is low, but highly variable between years (Albaladejo *et al.* 2009). Water availability during fruit maturation has been suggested as a main factor of viable seed set (Jordano 1988; Verdú and García-Fayos 1998).

This study was conducted in southwestern Spain, in the lower catchment of the Guadalquivir River (Fig. 1). This area has been intensively managed and is currently an agricultural landscape characterized by very low natural or semi-natural woodland cover (ca. 1%), low physical connectivity between remnant forest fragments and a high degree of human impact (Aparicio 2008). The climate is typically Mediterranean, with warm dry summers and cool humid winters.

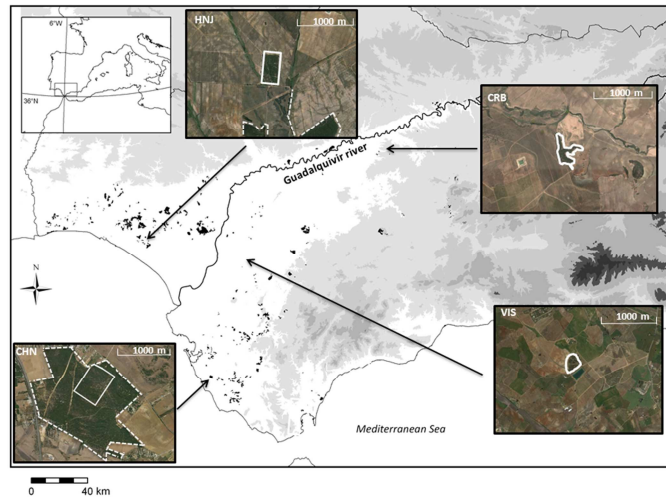


Figure 1. Aerial photographs of the four studied forest fragments comprising *Pistacia lentiscus*, located in southwestern Spain. White lines delineate study fragments, and dotted line show areas with *P. lentiscus* stands connected to the study fragments. Sampling plots were evenly distributed within each fragment.

Table 1. Physical features of the studied forest fragments including location, fragment size and density, metrics of connectivity and sex-ratio.

Fragment	Coordinates (N,W)	Area (ha)	Connectivity metrics ^a			Density (ind. ha ⁻¹) ^b	Nearest population (km)	Sex-ratio (♀/♂) ^c
			dIIC	dIIC _{intra}	dIIC _{flux}			
<i>Connected</i>								
CHN	36°23'10", 6°05'58"	200	5.674	3.78	1.894	287	-	1.33 ^{ns}
HNJ	37°14'58", 6°25'55"	14	12.821	0.011	12.81	160.8	0.2	1.39 ^{ns}
<i>Isolated</i>								
CRB	37°43'36", 4°55'25"	9.8	0.007	0.004	0.002	185.3	1	2.47*
VIS	37°26'20", 5°44'27"	5.1	0.002	0.001	0.001	102.2	10	0.63 ^{ns}

^aConnectivity metrics derived with Conefor 2.6 (Saura and Torné 2009), see Supplementary Material for a detailed description of metrics.

^b*Pistacia lentiscus* density in each fragment was obtained by counting all adult plants within a 10-m sampling band on either side of each of 10 linear transects (500 m) randomly located within each fragment (the total area covered per fragment was 10 ha, in isolated fragment we counted the whole population).

^cDifferences from 1:1 in the sex-ratio done with a χ^2 -test; ^{ns}not significant, * $P < 0.05$.

In this area we studied four forest fragments containing *P. lentiscus* populations (Table 1). Our study fragments were categorized either as 'connected' or 'isolated' following the integral index of connectivity (IIC) of Conefor 2.6 (Saura and Torné 2009), this index measuring the physical connectivity and flow of each forest fragment relative to other fragments containing *P. lentiscus* populations in the region (a detailed explanation of the index can be found in Supplementary Material). The connected forest fragment CHN is relatively large (ca. 200 ha) and harbors a large population of *P. lentiscus* (see Albaladejo *et al.* 2009 for a detailed description) (Fig. 1). The connected fragment HNJ is smaller (14 ha) but is surrounded by other fragments which harbor large populations of *P. lentiscus*. The isolated fragments CRB and VIS are small (< 10 ha) and harbor small stands of *P. lentiscus*, showing detectable signs of past genetic bottlenecks (Nora *et al.* 2015). Little or no suitable habitat for the species was available within a 5 km radius from these two isolated fragments (Supplementary Material).

Within each of the four study fragments, we established 10 plots comprising four seed collectors (traps) each, totaling 40 plots and 160 traps. Traps consisted of trays of 31 x 20 cm covered with a wire mesh of 5 mm to avoid postdispersal seed predation by rodents. We recorded and collected the seeds found in the traps every 3-4 weeks. Strictly speaking, collected items were not seeds but fruits devoid of the fleshy mesocarp and epicarp after their passage through the bird. The material was brought to the laboratory for subsequent DNA extraction. We collected and counted seeds dispersed into the traps in two different dispersal seasons, starting respectively in September (before fruit ripening) of 2012 and 2013, and spanning until April (when no more fruits were available) of the following year, totaling 313 seeds in the first season and 50 in the second (see Table 2). Plots were distributed throughout the fragments

homogenously, the distance between neighboring traps within plots being 10.9 ± 2.5 m (see Supplementary Material). The four traps were placed in four distinct microhabitats considered suitable places for birds to perch and drop the seeds (e.g. Rey and Alcántara 2000; González-Varo *et al.* 2008): (i) under a female *P. lentiscus* plant, (ii) under a male *P. lentiscus* plant, (iii) under the canopy of other shrub species (mainly *Myrtus communis*, *Quercus coccifera* or *Crataegus monogyna*), and (iv) in open ground under tree canopy.

DNA isolation and microsatellite genotyping

Recovered seeds were soaked for 24 h, then the hard endocarp could be carefully split to extract the embryo. For every seed, we isolated DNA from the endocarp to obtain the diploid multilocus maternal genotype, and from the embryo to obtain the biparentally-inherited diploid multilocus offspring genotype. DNA was isolated with the Invisorb DNA Plant HTS 96 Kit (Invitex, Berlin, Germany) according to the manufacturer's protocol with some slight modifications: we homogenized the material (endocarps or embryos) in a Retsch MM200 shaker mill for two minutes, then we continued with the protocol except that we extended the period of incubation at 65° for at least 90 min, everything else followed the manufacturer's protocol.

We amplified seven polymorphic nuclear microsatellite loci developed for *P. lentiscus* (Albaladejo *et al.* 2008). Details about amplification conditions and PCR cycle profiles can be found in Albaladejo *et al.* (2008) and Nora *et al.* (2015). Amplified products were labeled with fluorescent dyes (6-FAM, NED, VIC or PET) and analyzed on an ABI 3730 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, US) at the 'Unidad de Genómica' (Universidad Complutense, Madrid, Spain).

Microsatellite scoring was automatically done with the software GeneMapper v.3.7 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, US) and manually corrected when necessary.

Data analysis

Unfortunately, the number of seeds recovered during the second study season (2013-14) was quite low (see Results) hence parental correlation analyses were restricted to the first season (2012-13). Nevertheless, we assessed interannual variation in the genetic composition of the seed rain through analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) with Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010), which does not require as many samples as parental correlation analysis. In particular, we computed among-year maternal genotypic variation (maternal- F_{ST}) from the endocarp multilocus genotypes, among-year biparental genotypic variation (biparental- F_{ST}) from the embryo multilocus genotypes (i.e. F_{ST} among offspring samples), and among-year paternal haplotypic variation (paternal- F_{ST}) from the paternal gametic phases of the seeds. The latter were inferred from the corresponding maternal and embryonic diploid genotypes following the maximum-likelihood approach by Irwin *et al.* (2003). 95% confidence intervals (95%CI) were assessed through bootstrap (20000 replicates). We used locus-by-locus AMOVA, as recommended when there are unequal rates of missing data across loci (Excoffier and Lischer 2010).

For the larger dataset obtained in the season 2012-13 we calculated simultaneously the presence of null alleles and unbiased inbreeding coefficients (F_{IS}) in the microsatellite loci for the maternal endocarp and biparental embryo datasets separately with the software INest 2.0 (Chibicky and Burczyk 2009). Since

estimated null allele frequencies were not very large (Table S2), we retained all loci for further analyses.

We analyzed the parental structure in the seed rain of the first season of study using PSA software (Robledo-Arnuncio *et al.* 2012). Based on the combination of maternally endocarp genotypes and biparentally inherited embryo genotypes, PSA provides joint estimates of maternal and paternal correlations within and among a set of predefined spatial groups of seeds (or seedlings), as well as derivative estimates of effective parental numbers for each offspring group (see Grivet *et al.* 2009 and Robledo-Arnuncio *et al.* 2012 for a detailed description of the method). The estimated parameters in our study were: Q_w^p (within-group paternal correlation), the probability that two seeds drawn at random from a group have been sired by the same father; Q_w^m (within-group maternal correlation), the probability that two seeds drawn at random from a group have been dispersed from the same mother; Q_b^p (among-group paternal correlation), the probability that two seeds drawn at random from two different groups have been sired by the same father; and Q_b^m (among-group maternal correlation), the probability that two seeds drawn at random from two different groups have been dispersed from the same mother. Note that the probability that two randomly drawn seeds share their father (or mother) corresponds to the proportion of paternal (or maternal) half-sibs within or among the corresponding groups from which they were sampled. We also calculated the effective number of fathers ($N_{ep} = 1/Q_w^p$), mothers ($N_{em} = 1/Q_w^m$), and parents ($N_e = 4/(Q_w^p + Q_w^m)$) for each seed group. We constructed seed groups as appropriate to test for differences in parental correlations (i) among forest fragments (irrespective of microhabitat), for which we considered the plot as the reference spatial group for dispersed seeds, averaging parental correlation estimates across the 10 plots

within each fragment, and (ii) among microhabitats (irrespective of forest fragment), for which we considered the trap as the reference spatial group and averaged parental correlation estimates across the 40 traps located in the same microhabitat over all fragments. In the latter case, note that averaged among-group parental correlations were based on within-fragment group pairs only, as determined by the used threshold pairwise distance (see below). Interacting effects of fragment and microhabitat were not tested because of insufficient sample size. We approximated the standard deviation of estimates by jackknifing over loci, rather than by bootstrapping over seeds within groups, because the number of seeds per trap and per plot was frequently very small. Among-groups differences in parental correlations were assessed with general linear models (GLM) to test for differences (i) between fragment types (connected vs. isolated) including fragment as a nested factor within fragment type, and (ii) between microhabitat types.

The accuracy of parental correlation estimates can be improved by using spatial information to define threshold distances beyond which gene pools can be considered unrelated, allowing the calibration of genetic kinship coefficients among offspring pairs (Robledo-Arnuncio *et al.* 2012). We found low non-significant values of among-group (seed traps or plots) parental correlations, which were not significantly associated with spatial distance, suggesting that even nearby pairs of seed groups had originated from unrelated sets of parents. We thus chose as threshold distance the 70th percentile of the distribution of inter-group distances, approximating the maximum distance between groups while leaving a sufficient number of reference pairs to conduct the calibration. In analyses conducted at the forest fragment level, the threshold distance ranged from 93 m in VIS to 310 m in CHN. For analyses including all four fragments, the

overall threshold distance was set at the greatest threshold distance calculated at the individual fragment level (i.e. 310 m). In any case the choice of threshold distance did only slightly affect parental correlation estimates, without altering the observed differences among fragments and microhabitats.

We used a direct genetic exclusion approach to check whether the closest female plant could have sired the seeds collected within the corresponding plot.

Results

The seed rain recovered in the 2012-13 mast season consisted of 1155 seeds, the number of viable seeds being 313 (27%). By contrast, the number of seeds produced in the 2013-14 non-mast season was significantly lower, resulting in only 273 collected seeds, out of which only 50 (18%) were viable (Table 2).

Table 2. Viable seeds recovered in each forest fragment and microhabitat in the two study winter-spring seasons 2012-2013/2013-2014.

Microhabitat	Connected fragments		Isolated fragments	
	CHN	HNJ	CRB	VIS
Female <i>Pistacia</i>	67/6	46/4	47/6	16/3
Male <i>Pistacia</i>	14/6	7/3	13/1	10/2
Other shrub species	18/5	1/3	25/3	29/4
Tree canopy	6/0	4/1	4/3	6/0

Interannual genetic variation in the seed rain

Overall, variation in the genetic composition of the seed rain (F_{ST}) between the two seasons was larger for the maternal than for the paternal contribution (maternal- F_{ST} = 0.019 vs. paternal- F_{ST} = 0.007; Table 3), indicating a less coinciding

set of maternal contributions to seeds sampled in the two seasons, relative to male contributions, which tended to be more homogeneous. This same pattern was also observed for individual fragments except for VIS, which showed the opposite trend. As expected, interannual F_{ST} values for biparentally inherited embryo genotypes were intermediate between the corresponding maternal and paternal values (Table 3).

Table 3. Interannual genetic variation of the seed rain ($F_{ST} \pm 95\%$ confidence interval) for embryos (biparental- F_{ST}) and maternal (maternal- F_{ST}) and paternal (paternal- F_{ST}) gametic contributions to seeds. F_{ST} values significantly different from zero (95%CI does not overlap with zero) in bold.

Fragment	biparental- F_{ST}	maternal- F_{ST}	paternal- F_{ST}
Connected fragments			
CHN	0.007 (-0.004 – 0.020)	0.033 (0.012– 0.057)	0.002 (-0.015 – 0.027)
HNJ	0.031 (-0.001 – 0.067)	0.055 (0.005 – 0.099)	0.015 (-0.027 – 0.056)
Isolated fragments			
CRB	0.029 (-0.004 – 0.068)	0.046 (0.015 – 0.085)	0.014 (-0.030 – 0.068)
VIS	0.015 (-0.010 – 0.042)	0.011 (-0.008 – 0.027)	0.049 (0.004 – 0.084)
All fragments	0.015 (0.002 – 0.035)	0.019 (0.002 – 0.042)	0.007 (-0.006 – 0.025)

Parental correlations in the seed rain

Parental correlation analyses at the plot level (irrespective of microhabitat) showed that the average proportion (over all forest fragments) of maternal half sibs was substantially larger than the average proportion of paternal half sibs within plots ($Q_w^m = 0.156$ vs. $Q_w^p = 0.038$; Table 4). This result translated into an average effective number of fathers per plot (overall $N_{ep} = 22.25$) about four-fold larger than the average effective number of mothers per plot (overall $N_{em} = 5.94$), with an intermediate value for the two-sex effective parental number ($N_e =$

14.01). The inequality $N_{ep} > N_{em}$ was consistently observed within all studied forest fragments, but the difference was more pronounced in the connected fragments (CHN and HJN) than in the isolated fragments (CRB and VIS), largely because the latter showed substantially lower N_{ep} values (but rather similar N_{em} values) than the former (Table 4). There was not any apparent relationship between N_{ep} and N_{em} values with either the density or sex-ratio of each fragment, although our study was limited to a few number of fragments. However, the observed differences in Q_w^m and Q_w^p were neither significant between fragment type (connected vs. isolated) nor between fragments within type (Table 5). The probability that two seeds originating from the same mother or father disperse into different plots (Q_b^m and Q_b^p , respectively) was generally low but significant for Q_b^m reflecting higher values in connected than in isolated fragments (Table 5). Inbreeding coefficients were relatively low and similar between maternal plants and dispersed seeds (overall $F_{IS} = 0.110$ and 0.121 , respectively) (see Table S1) with no apparent pattern of higher inbreeding in isolated fragments.

Table 4. Mean (\pm SE) values of paternal and maternal correlations (Q^p and Q^m , respectively) within and among sampling plots (Q_w and Q_b , respectively) and effective number of parents (N_e), mothers (N_{em}) and fathers (N_{ep}) of *Pistacia lentiscus* seed rain in the 2012-2103 season at the fragment level.

	Connected fragments		Isolated fragments		All fragments
	CHN	HNJ	CRB	VIS	
Q_w^p	0.020 (\pm 0.039)	0.008 (\pm 0.031)	0.035 (\pm 0.024)	0.082 (\pm 0.080)	0.038 (\pm 0.025)
Q_w^m	0.232 (\pm 0.046)	0.103 (\pm 0.046)	0.132 (\pm 0.061)	0.147 (\pm 0.092)	0.156 (\pm 0.032)
Q_b^p	0.006 (\pm 0.010)	-0.003 (\pm 0.015)	0.003 (\pm 0.007)	-0.016 (\pm 0.017)	-0.003 (\pm 0.006)
Q_b^m	0.050 (\pm 0.014)	0.012 (\pm 0.012)	0.001 (\pm 0.009)	-0.001 (\pm 0.010)	0.015 (\pm 0.006)
N_{ep}	50.47	122.28	28.79	12.20	22.25
N_{em}	4.32	9.68	7.57	6.80	5.94
N_e	15.91	35.88	23.99	17.46	14.01

The analysis at the micro-habitat level (pooling forest fragments) showed that the probability of correlated maternity for two seeds dispersed into the same trap was significantly higher under the tree canopy and under the female *Pistacia* plant microhabitats. The probability of correlated paternity was higher for seed pairs dispersed under other shrub species (Table 6), but the differences among microhabitats were not statistically significant, as a likely consequence of the low number of samples available.

The direct exclusion approach conducted on the seeds collected in each plot revealed that only 52 seeds out of the total 313 seeds collected across all microhabitats (16.6%) bore a multilocus genotype compatible with the closest *Pistacia* plant, while in the second season only 3 seeds out of 50 (6%) showed a compatible genotype with the closest candidate maternal plant.

Table 5. Results from general linear models (GLMs) testing the influence of forest fragment type (connected vs. isolated) and fragment identity (nested within type) on maternal and paternal correlations (Q^m and Q^p , respectively) within and among sampling plots (Q_w and Q_b , respectively).

Significant effects are highlighted in bold.

Source of variation	Q^p_w			Q^m_w			Q^p_b			Q^m_b		
	F	F	F	F	df	P-value	F	df	P-value	F	df	P-value
Type	0.750	0.750	0.750	0.283	1	0.598	0.425	1	0.516	7.326	1	0.007
Fragment within type	0.244	0.244	0.244	0.905	2	0.414	0.663	2	0.517	2.657	2	0.073

Table 6. Mean (\pm SE) values of paternal and maternal correlations (Q^p and Q^m , respectively) within and among sampling plots (Q_w and Q_b , respectively) and effective number of parents (N_e), mothers (N_{em}) and fathers (N_{ep}) of *Pistacia lentiscus* seed rain in the 2012-2103 season at the microhabitat level. Results from GLM analyses to test for differences on paternal and maternal correlations among microhabitat types are shown in the last column with significant effects highlighted in bold.

	Female <i>Pistacia</i>	Male <i>Pistacia</i>	Other shrub species	Tree canopy	GLM
Q^p_w	0.016 (\pm 0.040)	0.018 (\pm 0.175)	0.102 (\pm 0.122)	-0.084 (\pm 0.211)	$F = 1.156$; $df = 3$; $P = 0.335$
Q^m_w	0.291 (\pm 0.066)	0.207 (\pm 0.120)	0.176 (\pm 0.072)	0.451 (\pm 0.411)	$F = 4.039$; $df = 3$; $P = \mathbf{0.011}$
Q^p_b	0.001 (\pm 0.007)	-0.009 (\pm 0.019)	-0.001 (\pm 0.016)	-0.014 (\pm 0.041)	$F = 0.205$; $df = 3$; $P = 0.892$
Q^m_b	0.023 (\pm 0.007)	0.005 (\pm 0.012)	0.016 (\pm 0.009)	0.018 (\pm 0.020)	$F = 0.495$; $df = 3$; $P = 0.685$
N_{ep}	60.452	54.206	9.771	NA	
N_{em}	3.432	4.838	5.677	2.217	
N_e	12.991	17.765	14.362	10.892	

NA; not available

Discussion

The effects of habitat fragmentation and the subsequent increase in physical isolation modify seed dispersal by animals. This is a key step in the dynamic of plant populations, affecting both demographic and genetic processes (Cordeiro and Howe 2003; Fahrig 2003; Aguilar *et al.* 2006). By decomposing the genetic inheritance of naturally dispersed seeds into male and female gametic contributions, our results showed that spatially restricted seed dispersal can be expected to have a strong impact on the genetic structure of the seed rain, even though pollen flow might be occurring at long distances. Our results showed that this effect was more pronounced in small and isolated fragments than in physically well-connected forest fragments, although our limited sample size and replication (four forest fragments analyzed) may have resulted in low statistical power. Further, although logistically challenging, a higher number of forest fragments would be necessary to disentangle the relative effects of physical isolation, fragment size and demography (population size and sex ratio) on parental correlations.

Interannual genetic variation in the seed rain

The observed strong difference in seed production (and the amount of recovered seeds) between the two studied seasons is consistent with the masting behavior of the species (Herrera 1998). Temporal variation in seed production may have important implications for plant populations, affecting population and community dynamics and the assemblage of genetic diversity during regeneration (Robledo-Annuncio *et al.* 2014). Interestingly, we have found that temporal variation in seed production was associated with significantly stronger female than male

interannual gametic variation (Albaladejo *et al.* 2009). This result suggests that the contributions of individual mother plants to the seed rain were more variable from year to year than the contributions of individual father plants, as has been found in other studies (Iwaizumi *et al.* 2013). At present, we cannot state whether this is a general pattern in this species or it is due to masting, as mother plants that were well breeding one year might notably reduce their contribution of seeds the following year (Lyles *et al.* 2009). It is known that masting is especially relevant for long-lived species, because the contribution of individuals to population demography and genetics spans over multiple reproductive and dispersal episodes (Petit and Hampe 2006; Robledo-Arnuncio *et al.* 2014).

However, we have detected the opposite trend in the isolated fragments VIS, where temporal genetic differentiation was stronger for male than for female gametes. This result could be explained by the physical characteristics and the conservation status of this fragment, which is very small, intensively managed, deteriorated and isolated. Indeed, a previous study showed that this population of *P. lentiscus* has a low effective population size and that probably suffered a recent genetic bottleneck (Nora *et al.* 2015). Additionally, this fragment showed a significantly male-biased sex ratio, which could result in strong competition for female flowers leading to strong variation in male fecundity, as has been shown for the species in other extremely fragmented landscape (Albaladejo *et al.* 2012).

Correlated paternity and maternity analyses

Our results showed that the physical isolation of forest fragments might have comparatively greater influence on pollen than on seed flow, as we found higher N_{ep} values in (both large and small) connected fragments than in small isolated

ones. Physical connectivity probably enlarged the population of males available for mating. On the other hand, N_{em} values seemed to be more homogeneous among fragments regardless of physical isolation and fragment size. This might be due to seed dispersal by birds predominantly occurring within fragments (at local scales) irrespective of the large-scale landscape configuration (Grivet *et al.* 2009), unlike pollen dispersal.

The probability of parental sharing among different plots within each fragment was very low, which could be explained by a foraging behaviour of frugivores concentrated at very short distances. In fact, in the study forest fragments, *P. lentiscus* fruits are consumed mostly by small-sized birds such as warblers and robins (C. Parejo-Farnés, unpublished results) which are territorial and whose foraging flight distances are known to be short (e.g. Godoy and Jordano 2001). The fact that we found significant differences in the Q^m_b parameter between connected and isolated forest fragments might be explained by the behaviour of dispersers, so that in small isolated fragments foraging territories may overlap increasing territoriality and thus reducing the scale of seed dispersal (Karubian and Durães 2009).

Spatially restricted seed dispersal may have a strong impact on the genetic structure and effective population size of future populations (Jordano 2007). Seed dispersal has a direct effect on female gametic composition, but seed dispersal in itself also has an impact on pollen flow since reduced N_{em} will tend to reduce N_{ep} , because maternal half-sibs are generally more likely to have been sired by the same father than seed pairs from different mothers. On the other hand, even if the number of fathers is high, lower effective numbers of mothers will result in lower effective parental numbers (N_e), increasing local genetic structure in the next generation. Apparently, parental correlations were not

associated with population density or sex ratio, although the number of sampled fragments was too low, precluding clear inferences on these associations. There are few previous studies in which gene flow via pollen and seeds has been simultaneously assessed (see Iwaizumi *et al.* 2013), and to our knowledge this is the first one in which this has been conducted in contrasting landscape connectivity scenarios. The seminal study by Grivet *et al.* (2009) showed to some extent similar results to ours, with a higher effective number of fathers than mother plants in naturally dispersed *Quercus lobata* seedlings. These authors also found lower values of N_{ep} under tree canopy than in open patches, reflecting the fact that the former recruits were primarily those from the tree just above, which were pollinated predominantly by the pool of neighboring adults. Also, their study showed that seedlings in open ground came from multiple maternal plants, each one pollinated by a relatively distinct (and spatially restricted) set of neighboring individuals. The net result in *Quercus lobata* was a more heterogeneous pollen cloud contribution to open patch recruits than to canopy patches (N_{ep} values 15.4 vs. 8.1 respectively). In our study in *Pistacia*, maternal correlations were also lower overall than paternal correlations, while fragment connectivity tended to influence paternal (but not maternal) correlations in the seed rain (Table 4).

We found a relatively high number of dispersed seeds, despite N_{em} values being low, suggesting effective short-distance frugivore-mediated seed dispersal, which should contribute to the formation of fine-scale genetic structure within fragments. Overall, N_{ep} values were much higher than N_{em} values in all microhabitats, especially under *Pistacia* (both male and female), however N_e values showed no major differences between microhabitat types. These results reflect a strong spatial limitation in seed dispersal distances, occurring mostly at local scales (i.e. within plots) within forest fragments. The values of N_{em} for seeds

dispersed under female *Pistacia* plants and under the canopy of other tree species were the lowest among the four types of microhabitat. Many of the seeds found under a female *Pistacia* individual were probably dispersed from this same female (15.3% in the 2012-13 season), which would explain the corresponding low N_{em} value and suggests that fruits were ingested and regurgitated or defecated by the bird in the same place, without dispersing away. In the case of seeds collected under the tree canopy, disperser territorial behaviour might explain the low value of N_{em} , with birds repeatedly feeding on the same *Pistacia* female individuals and then perching on the same trees where they defecate or regurgitate the seeds.

Conclusions

Habitat loss and fragmentation determine pollen flow and the assembly and behaviour of avian seed dispersers, and therefore the outcome of dispersal. Even if the potentially high mobility of pollen and seeds dispersed by birds may maintain connectivity in highly fragmented and degraded landscapes (Lowe *et al.* 2015), we found that habitat fragmentation seemed to influence the parental structure (mostly the paternal one) of dispersed seeds, with potential consequences for the genetic structure of the adult generation. In addition, we found that (i) the maternal contributions to dispersed seeds tended to be genetically more heterogeneous between seasons than the paternal ones; (ii) the effective number of mothers (N_{em}) was overall smaller than the effective number of fathers (N_{ep}), as expected; (iii) N_{em} was found to be similar in the four studied fragments, and was thus apparently insensitive to the degree of fragmentation; and, finally, (iv) to the extent that our small seed sample size allows to infer, it seems more likely for seed pairs to share maternal parents when they are found

under female *Pistacia* plants or under the canopy of other tree species, probably due to the preference of birds for repeatedly eating from and perching in particular individual plants.

From a conservation and landscape genetics perspective, analyzing patterns of contemporary pollen and seed dispersal in disparate landscapes may allow an early detection of shifts in gene dispersal patterns that could eventually lead to local inbreeding, genetic erosion and among-fragment divergence. Of special importance is the monitoring and preservation of pollen-mediated gene flow across fragmented landscapes, as it may contribute disproportionately to the maintenance of genetic diversity during forest regeneration (Lowe *et al.* 2015). Our study plant species is long-lived, and it might take decades or even centuries before changes in seed and pollen dispersal patterns translate into changes in the genetic structure of adults (Young *et al.* 1996; Aguilar *et al.* 2008). Assessing early indicators of changes in gene dispersal patterns may help the design of conservation management plans to prevent genetic erosion, as could be for instance enhancing connectivity among fragment, which should achieve higher values of N_{ep} and thus increased seed genetic diversity.

Acknowledgements

The authors thank to the local landowners for permission to work at the study sites, S. Nora for field and laboratory assistance, E. Villalobo, three anonymous reviewers and the editor for helpful comments on the manuscript. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CGL2011-23721). JJRA was partly supported by CGL2015-64164-R project from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. CPF is supported by a

predoctoral fellowship from Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2012-055103).

Data Archiving Statement

Microsatellite data will be submitted to the public repository Dryad.

References

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Aguilar R, Galetto L (2004) Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia*, 138, 513–520.
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17, 5177–5188.
- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramin GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *PLoS One* 7:e49012.
- Albaladejo RG, Sebastiani F, Aparicio A, Buinamici A, González-Martínez GC, Vendramin GG (2008) Development and characterization of eight polymorphic microsatellite loci from *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*

Resources, 8, 904–906.

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*, 17, 2219–2232.

Broadhurst L (2015) Pollen dispersal in fragmented populations of the dioecious wind-pollinated tree, *Allocasuarina verticillata* (drooping sheoak, drooping she-oak; Allocasuarinaceae). *PLoS One* 10:e0119498.

Caves EM, Jennings SB, Hillerislambers J, Tewsbury JJ, Rogers HS (2013) Natural experiment demonstrates that bird loss leads to cessation of dispersal of native seeds from intact to degraded forests. *PLoS One* 8:e65618.

Chibicky IJ, Burczyk J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *The Journal of heredity*, 100, 106-113.

Chung MG, Chung MY, Oh GS, Epperson BK (2000) Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity*, 85, 490–497.

Cordeiro NJ, Howe HF (2003) Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 14052–14056.

Crawford TJ (1984) The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity*, 52, 273–283.

de Bello F, Lavorel S, Díaz S, Harrington R, Cornelissen JHC, Bardgett RD, Berg MP, Cipriotti P, Feld CK, Hering D, Martins da Silva P, Potts SG, Sandin L, Sousa JP, Storkey J, Wardle DA, Harrison PA (2010) Towards an assessment of multiple ecosystem processes and services via functional traits. *Biodiversity and Conservation*, 19, 2873-2893.

Dick CW (2008) New interpretations of fine-scale spatial. *Molecular Ecology*, 17, 1873–1874.

Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among

- plant populations. *Heredity*, 72, 250–259.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application. *Genetics*, 131, 479–491.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 487–515.
- García C, Grivet D (2011) Molecular insights into seed dispersal mutualisms driving plant population recruitment. *Acta Oecologica*, 37, 632–640.
- García D, Martínez D (2012) Species richness matters for the quality of ecosystem services: a test using seed dispersal by frugivorous birds. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 3106–3113.
- Godoy JA, Jordano P (2001) Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2275–2283.
- González-Varo JP, Albaladejo RG, Aparicio A (2008) Mating patterns and spatial distribution of conspecific neighbours in the Mediterranean shrub *Myrtus communis* (Myrtaceae). *Plant Ecology*, 203, 207–215.
- Grivet D, Robledo-Arnuncio JJ, Smouse PE, Sork VL (2009) Relative contribution of contemporary pollen and seed dispersal to the effective parental size of seedling population of California valley oak (*Quercus lobata*, Née). *Molecular Ecology*, 18, 3967–3979.
- Hamilton MB (1999) Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature*, 401, 8–9.
- Hamrick J (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323–335.

- Herrera CM (1984) A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological monographs*, 54, 1–23.
- Herrera CM (1995) Plant-vertebrate seed dispersal systems in the Mediterranean: ecological, evolutionary, and historical determinants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 705–727.
- Herrera CM (1998) Population-level estimates of interannual variability in seed production : what do they actually tell us? *Oikos*, 82, 612–616.
- Irwin A, Hamrick JL, Godt MJW, Smouse PE (2003) A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. *Heredity*, 90, 187–194.
- Iwaizumi MG, Takahashi M, Isoda K, Austerlitz F (2013) Consecutive five-year analysis of paternal and maternal gene flow and contributions of gametic heterogeneities to overall genetic composition of dispersed seeds of *Pinus densiflora* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 100, 1896–1904.
- Jordano P (1988) Polinizacion y variabilidad de la produccion de semillas en *Pistacia lentiscus* L. *Anales Jardin Botánico Madrid*, 45, 213-231.
- Jordano P (2007) Frugivores, seeds and genes: analysing the key elements of seed shadows. In Dennis AJ, Green RJ, Schupp EW(eds.) *Seed Dispersal: Theory and its Application in a Chagings World* 229-251.CABI.
- Jordano P (2010) Pollen, seeds and genes: the movement ecology of plants. *Heredity*, 105, 329–330.
- Karubian J, Durães R (2009) Effects of seed disperser social behavior on patterns of seed movement and deposition. *Oecologia Australis*, 13, 45–57.
- Koenig WD, Ashley MV (2003) Is pollen limited? The answer is blowin' in the wind. *Trends Ecology and Evolution*, 18, 157–159.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95, 255–273.

- Lowe AJ, Cavers S, Boshier D, Breed MF, Hollingsworth PM (2015) The resilience of forest fragmentation genetics -no longer a paradox- we were just looking in the wrong place. *Heredity*, 115, 97-99.
- Lyles D, Rosenstock TS, Hastings A, Brown PH (2009) The role of large environmental noise in masting: general model and example from pistachio trees. *Journal of Theoretical Biology*, 259, 701–713.
- Mezquida ET, Olano JM (2013) What makes a good neighborhood? Interaction of spatial scale and fruit density in the predator satiation dynamics of a masting juniper tree. *Oecologia*, 173, 483–492.
- Nora S, Albaladejo RG, Aparicio A (2015) Genetic variation and structure in the Mediterranean shrubs *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* in different landscape contexts. *Plant Biology*, 17, 311–319.
- Petit RJ, Hampe A (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 187–214.
- Rey PJ, Alcantara JM (2000) Recruitment dynamics of a fleshy-fruited plant (*Olea europaea*): Connecting patterns of seed dispersal to seedling establishment. *Journal of Ecology*, 88, 622–633.
- Rey PJ, Alcantara JM (2013) Effects of habitat alteration on the effectiveness of plant-avian seed dispersal mutualisms: consequences for plant regeneration. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16, 21–31.
- Robledo-Arnuncio JJ, Grivet D, Smouse PE, Sork VL (2012) PSA: software for parental structure analysis of seed or seedling patches. *Molecular Ecology Resources*, 12, 1180–1189.
- Robledo-Arnuncio JJ, Klein EK, Muller-Landau HC, Santamaría L (2014) Space, time and complexity in plant dispersal ecology. *Movement Ecology*, 2, 16.
- Saura S, Torné J (2009) Conefor Sensinode 2.2: A software package for quantifying the importance of habitat patches for landscape connectivity. *Environmental modelling & software*, 24, 135–139.

- Schupp EW, Milleron T, Russo SE (2002) Dissemination limitation and the origin and maintenance of species-rich tropical forest. In Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation (eds. Levey DJ, Silva WR, Galetti M), pp. 19–23, CAB International, Wallingford.
- Sork VL, Smouse PE, Grivet D, Scofield DG (2015) Impact of asymmetric male and female gamete dispersal on allelic diversity and spatial genetic structure in valley oak (*Quercus lobata* Née). *Evolutionary Ecology*, 29, 927–945.
- Torimaru T, Tani N, Tsumura Y, Nishimura N, Tomaru N (2007) Effects of kin-structured seed dispersal on the genetics structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoxyla*. *Evolution*, 61, 1289–1300.
- Uriarte M, Anciães M, Da Silva MT, Rubim P, Johnson E, Bruna EM (2011) Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92, 924–937.
- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation process in a mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology*, 10, 275–280.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 76, 134–141.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Female biased sex ratios in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Plant Ecology*, 135, 95–101.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecology and Evolution*, 11, 413–418.

Supplementary material

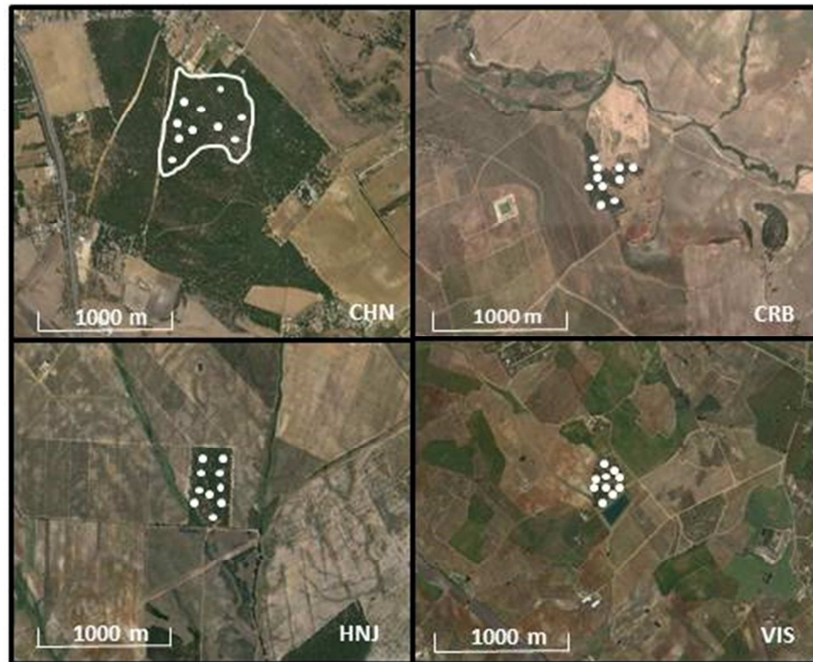
STRUCTURAL CONNECTIVITY METRICS WITH CONEFOR

We used QGIS (GIS Development Team 2012) for obtaining patch size and calculating the percentage of woodland cover suitable for *P. lentiscus* within a 5-km radius (R5 cover) around the focal patch. This metric (R5 cover) is usually considered as an inverse estimate of forest fragmentation at a broad landscape scale (e.g. Steffan-Dewenter *et al.* 2002; González-Varo 2010). We calculated structural connectivity metrics with Conefor 2.6 (Saura and Torné 2009; Saura and Rubio 2010) to analyze the connectivity and flow of each forest fragment with its environment. We used the integral index of connectivity (IIC) to measure fragment connectivity. The parameter dIIC can be partitioned into three distinct fractions; dIIC_{intra} which is the contribution of a given fragment *i* in terms of intra-fragment connectivity (based on attributes, such as fragment size and shape) and does not depend on other fragments configuration. dIIC_{flux} is the area-weighted dispersal flux through the connections of a fragment *k* to or from all of the other fragments in the landscape where *k* is either the starting or ending fragment of the connection among fragments. Finally, dIIC_{connector} is the contribution of the fragment or link to the connectivity among other fragments and depends only on the spatial location of a fragment in the network (values around zero not shown in table 1). The analyses with Conefor 2.6 (Table 1) showed strongly different values for our studied fragments supporting our categorization of connected (CHN and HN) and isolated (CRB and VIS) fragments.

Table S1. Summary results of the simultaneous estimation of null allele frequencies and inbreeding coefficients (F_{IS}) with INest (Chibicky and Burczyk 2009) for the nuclear microsatellite markers used in the two study seasons. Results for the endocarp and embryo data sets are provided separately.

	<i>Locus</i>							Mean
	<i>P114</i>	<i>P21</i>	<i>P333</i>	<i>P501</i>	<i>P526</i>	<i>P510</i>	<i>Ro5</i>	
Season 2012-13 (N = 313)								
Endocarp								
Null alleles	0.035	0.027	0.078	0.046	0.012	0.050	0.058	0.043
F_{IS}	0.066	0.046	0.193	0.055	0.029	0.128	0.253	0.110
Missing data	0.139	0.095	0.089	0.222	0.019	0.025	0.041	0.090
Embryo								
Null alleles	0.031	0.036	0.136	0.039	0.021	0.089	0.022	0.053
F_{IS}	0.090	0.114	0.251	0.084	0.061	0.079	0.170	0.121
Missing data	0.057	0.095	0.222	0.047	0.136	0.095	0.247	0.128
Season 2013-14 (N = 50)								
Endocarp								
Null alleles	0.123	0.196	0.099	0.014	0.027	0.077	0.090	0.089
F_{IS}	0.250	0.426	0.248	0.111	0.019	0.219	0.483	0.251
Missing data	0.120	0.280	0.120	0.200	0.360	0.020	0.420	0.217
Embryo								
Null alleles	0.093	0.016	0.061	0.022	0.000	0.057	0.080	0.047
F_{IS}	0.135	0.118	0.077	0.155	0.255	0.114	0.190	0.149
Missing data	0.080	0.080	0.160	0.140	0.060	0.060	0.100	0.097

Fig S1 Locations of the female Pistacia plants, the females are located at the center of each plot, the distance between neighboring traps within plots being 10.9 ± 2.5 m.



References

- Chybicki IJ, Burczyk J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity*, 100, 106-113.
- González-Varo JP (2010) Fragmentation, habitat composition and the dispersal/predation balance in interactions between the Mediterranean myrtle and avian frugivores. *Ecography*, 33,185–197.
- Saura S, Rubio L (2010) A common currency for the different ways in which patches and links can contribute to habitat availability and connectivity in the landscape. *Ecography*, 33, 523–537.
- Saura S, Torné J (2009) Conefor Sensinode 2.2: A software package for quantifying the importance of habitat patches for landscape connectivity. *Environmental modelling & software*, 24, 135–139.
- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, et al (2002) Scale-dependant effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology*, 83, 1421–1432.

4 EFECTOS GENÉTICOS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL PAISAJE EN UNA ESPECIE

ANEMÓFILA DISPERSADA POR FRUGÍVOROS

Clara Parejo-Farnés, Cristina García, Abelardo Aparicio, Rafael G. Albaladejo
(Manuscrito en preparación).

Resumen

La estructuración genética y las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones son consecuencia de la acción de las fuerzas evolutivas que van formando la historia genética de las poblaciones. El flujo de dispersión de polen y semillas pueden responder de diferente manera al aislamiento resultante de la fragmentación del hábitat, con consecuencias impredecibles para el flujo de genes y la estructuración de la población. Hemos estudiado poblaciones en cuatro paisajes fragmentados con distinta conectividad de *Pistacia lentiscus*. Esta es una especie anemófila y endozoocora, hemos medido el número de grupos genéticos a nivel de paisaje, hemos probado diferentes escenarios con posibles cuellos de botella ocurridos en el pasado y presente para entender las condiciones actuales de las poblaciones y medido la diversidad genética entre diferentes cohortes (adultos establecidos y semillas dispersadas). La cuenca del Guadalquivir es un paisaje muy alterado, con un 1% de cobertura original, y a pesar de estudiar una especie con características adecuadas para diluir los efectos de la fragmentación, hemos encontrado estructuración genética cuando los paisajes están divididos en fragmentos, provocando cuellos de botella genético reciente a pesar de la conectividad de estos y los posibles procesos de inmigración que sufren. Paisajes con un único fragmento sufrieron cuello de botella históricos hace unos 5000 años antes de la acción del Hombre, a pesar del aislamiento, no hemos encontrado diferenciación genética entre las cohortes. A pesar de la alta movilidad del polen por el viento y las semillas por las aves, la fragmentación del hábitat está afectando a la estructura genética de las poblaciones, con consecuencias para la diversidad genética de las siguientes generaciones al promover una estructuración y un empobrecimiento genético.

Palabras clave: dispersión por viento, endozoocoria, cohortes, cuello de botella, estructura genética, *P. lentiscus*, aislamiento genético.

Introducción

El flujo genético influye fuertemente en la estructuración genética regional de las poblaciones de plantas. La distribución espacial de la diversidad genética es un indicador de la dinámica reciente e histórica de las poblaciones por lo que su conocimiento es esencial para la conservación de las poblaciones (Escudero *et al.* 2003; Lowe *et al.* 2005; Storfer *et al.* 2007). El flujo genético entre las poblaciones es necesario para la regeneración de los bosques y de él dependerá en parte el tamaño efectivo de la población, la distribución espacial de los genotipos y la estructura genética espacial a escala fina (Jordano 2010). Este flujo está fuertemente influenciado por la genética regional de las poblaciones de plantas y es dependiente del movimiento del polen y de las semillas (Hamilton 1999). Los patrones de dispersión de semillas y polen pueden responder de manera diferente al aislamiento físico que fomenta la fragmentación del hábitat. Cambios en la estructura genética espacial pueden ser generados por cambios en los patrones de dispersión de semillas tras un proceso de fragmentación del paisaje, independiente del flujo de polen, debido a que la dispersión de semillas conlleva la movilización del doble de información genética que el polen (Bittencourt y Sebbenn 2007; Wang *et al.* 2011). A pesar de esto, la cantidad de flujo genético (vía semillas o polen) puede ser insuficiente para prevenir los efectos negativos de la depresión por endogamia tras el aislamiento.

La fragmentación antrópica modifica la configuración natural de los hábitats alterando el paisaje, reduciendo su extensión y calidad, y comprometiendo la persistencia no sólo de especies raras o endémicas sino incluso de las especies comunes y abundantes (Fahrig 2003; Honnay y Jacquemyn 2007). Además, la fragmentación puede tener efectos negativos sobre la diversidad genética y los patrones de apareamiento de las poblaciones de plantas

(Aguilar *et al.* 2008; Eckert *et al.* 2010) por lo que es una de las causas principales de pérdida de biodiversidad en el planeta (Sala *et al.* 2000). En el “paradigma de las pequeñas poblaciones genéticas” (Bacles y Jump 2011) se predice que el tamaño de la población puede hacer disminuir la diversidad genética aumentando el entrecruzamiento y la homocigosidad llevando en instancias posteriores a una reducción del fitness (Ellstrand y Elam 1993; Young *et al.* 1996; González-Varó *et al.* 2012). En este sentido, diversos estudios han corroborado estas asunciones teóricas demostrando que plantas en fragmentos aislados pueden presentar una reducción en las tasas de producción y germinación de sus semillas (Nason y Hamrick 1997), las plántulas generadas pueden presentar una menor diversidad genética que las que se producen en bosques continuos (Farwig *et al.* 2008) o presentar una disminución en el vigor (fitness) (Rocha y Aguilar 2001). Si el número efectivo de progenitores se reduce en el tiempo, los procesos de depresión endogámica ligados al progresivo aumento de la estructura genética espacial y de los cruzamientos consanguíneos desembocarán en pérdida de riqueza genética e incluso en la extinción (e.g. Saccheri *et al.* 1998). En este sentido, un estudio reciente por Parejo-Farnés *et al.* (2017) detectó un menor número efectivo de padres (N_{ep}) en bosques aislados que en bosques conectados estimando una menor riqueza genética vía semillas comparado con vía polen al constatar que los valores de diferenciación genética (F_{ST}) interanuales fueron más bajos para las hembras reproductoras que para los machos. La acción de todos estos fenómenos mantenidos en el tiempo van configurando la estructura genética de las poblaciones.

Estos cambios en las poblaciones pueden ocurrir a corto o a largo plazo, así plantas de vida larga con tiempos de generación más elevados tardarán más en reflejar los efectos del empobrecimiento genético por efecto de la

fragmentación (Robledo-Arnuncio *et al.* 2014). En plantas anemófilas la dependencia del viento incorpora un componente importante de aleatoriedad en el proceso de fertilización (Mulcahy 1979) que determinará el mezclado de genes en cada generación. Además, el flujo de genes debido a la lluvia de semillas proveniente de otras poblaciones favorecerá la riqueza genética de las futuras generaciones. Es por esto que conocer la capacidad de movimiento de estas dos vías es fundamental para poder predecir la respuesta de las poblaciones a la fragmentación (Robledo-Arnuncio *et al.* 2014) y entender las diferencias genéticas que se produzcan entre las plantas reproductoras y sus progenies. En el caso en el que el flujo de genes no sea aleatorio, tanto por polen como semillas, las poblaciones de plantas tenderán a desarrollar una estructuración genética espacial (Aguilar y Galetto 2004).

Pistacia lentiscus L. es uno de los arbustos más característicos del bosque Mediterráneo al ser de los más abundantes en la cuenca de Guadalquivir. En un inventario llevado a cabo en 535 fragmentos boscosos de esta cuenca *P. lentiscus* estuvo presente en 287 (54%) de ellos (Aparicio 2008; Aparicio *et al.* 2012). La biología reproductiva de esta planta es bien conocida (ver Introducción general); su polen es dispersado por el viento, aparentemente la limitación de polen desaparece a densidades por encima de 100 individuos por hectárea (Verdú y García-Fayos 1998) y sus frutos son dispersados por aves (Herrera 1984; Capítulos 1 y 2). Esta especie puede considerarse un relicto ya que se han descrito fósiles muy parecidos a los ejemplares actuales de *P. lentiscus* datados en el Terciario (Pons 1981; Palamarev 1989; Verdú y García-Fayos 1998). Por el registro de polen se sabe que esta especie tuvo una mayor abundancia en el sur de la Península ibérica entre 6500-5000 años BP, y después de nuevo aumentó su abundancia hace unos 4000 años BP (Carrión 2002) coincidiendo con cambios de temperatura

durante el Holoceno en la Península ibérica. Posteriormente esta región ha sido muy manejada por el Hombre a lo largo de la Historia y aunque gran parte de la deforestación ya tuvo lugar en periodos especialmente intensos como la ocupación Romana o la Edad Media (Valbuena-Carabaña *et al.* 2010), la destrucción del hábitat ha sido especialmente intensa durante los últimos 50 años (González-Varo *et al.* 2015) (ver Fig. 1). Concretamente en el valle del Guadalquivir apenas queda un 1% de la cobertura boscosa original debido principalmente a la extensión de la agricultura y otros usos que han dado como resultado boques fragmentados con poca conexión física entre ellos (Aparicio 2008).

Pistacia lentiscus es una especie con diferentes estrategias de dispersión para el polen y las semillas que se traducen en diferentes respuestas al aislamiento sufrido tras la fragmentación (Parejo-Farnés *et al.* 2017). El polen es transportado a grandes distancias por el viento (distancia media entre 200-400 m, Albaladejo *et al.* 2012) y sus frutos son la primera elección por los pájaros para su ingesta y dispersión, aunque estos recorren distancias pequeñas debido a que los principales dispersores son pájaros de mediano y pequeño tamaño (Cap. 1). Estas características, unidas al hecho de ser una planta de vida larga y dioica, donde la fecundación cruzada obligada favorece una mayor diversidad genética (Aparicio *et al.* 2012), configuran a esta especie, a priori, como poco vulnerable a los efectos de la fragmentación (Hamrick 2004). Por esto, consideramos que *Pistacia lentiscus* es una especie clave para entender los efectos del manejo del paisaje a corto y largo plazo, por lo que en este trabajo nos proponemos como objetivos: (i) caracterizar la estructura genética espacial de poblaciones adultas de *P. lentiscus*, (ii) detectar la existencia de procesos demográficos (cuellos de botella y procesos de divergencia) achacables en el tiempo a la acción humana, y (iii) comparar la

diversidad genética en la población adulta y en las semillas dispersadas en paisajes fragmentados con diferente grado de conectividad para determinar si el aislamiento puede contribuir al empobrecimiento genético entre generaciones. Esperamos encontrar un efecto sobre la estructuración genética en relación a la conectividad de los fragmentos así como una relación entre el manejo reciente del paisaje y la presencia de cuellos de botella o procesos de divergencia. Por otro lado, prevemos un empobrecimiento genético y un patrón de estructuración genética espacial mayor en la cohorte de semillas dispersadas que en la cohorte de plantas adultas, siendo esta diferencia más acusada en fragmentos aislados que en los conectados.

Material y Métodos

Especie y área de estudio

Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) es una especie dioica, común en el Mediterráneo. Es un arbusto esclerófilo, anemófilo y en el área de estudio es dispersado por pájaros frugívoros, la mayoría de ellos migratorios (residentes en invierno durante la época de fructificación). Generalmente la proporción de semillas viables es muy baja y muy variable entre años debido al carácter vecero de la especie (Herrera *et al.* 1998; Albaladejo *et al.* 2009; Parejo-Farnés *et al.* 2017). Los frutos de *P. lentiscus* son la primera elección para los frugívoros tanto por diseño como por su composición química teniendo un altísimo índice de aprovechamiento (Herrera 1982, 1988). La especie tiene una tasa de reclutamiento muy baja, entre un 2-7 % en el primer año, ya que la supervivencia de las plántulas frente a las altas temperaturas del verano es muy baja (Verdú y García-Fayos 2002; Nora *et al.* 2016).

Para la realización de este estudio se muestrearon un total de 369 plantas adultas y 313 semillas durante la temporada 2012-2013. Las plantas adultas se localizaron en cuatro zonas de estudio en el valle del Guadalquivir (SO de España) categorizadas como paisajes “conectados” y “aislados” (Tabla 1 y Fig. 1). Una completa descripción de las características físicas de cada paisaje puede encontrarse en la Introducción general. Cada uno de estos paisajes estuvo formado por un fragmento focal (situado en el centro del paisaje de estudio) y un número variable de fragmentos en el vecindario delimitado por un radio de 5 km alrededor del fragmento focal. Esta distancia suele considerarse como una estimación inversa de la fragmentación del bosque a una escala amplia del paisaje (p.e. Steffan-Dewenter *et al.* 2002; González-Varo 2010). El paisaje aislado VIS

consistió en un único fragmento focal de menos de 10 ha que no alberga ningún otro fragmento en un radio de 5 km que contenga poblaciones de *P. lentiscus*. Para la recolección de las semillas dispersadas de forma natural se dispusieron 40 colectores de semillas en cada uno de los cuatro fragmentos focales. Por cuestiones logísticas los colectores de semillas solo se dispusieron en los fragmentos focales y no en los periféricos. Para aumentar la probabilidad de recolectar semillas dispersadas en los colectores, éstos se dispusieron de manera homogénea por toda la superficie del fragmento focal bajo diferentes microhábitats que actúan como reclamo por sus frutos carnosos o por ser usados como percha por los agentes dispersores (p.e. Verdú y García-Fayos 1996; Rey y Alcantara 2000; Parejo-Farnés *et al.* 2017).

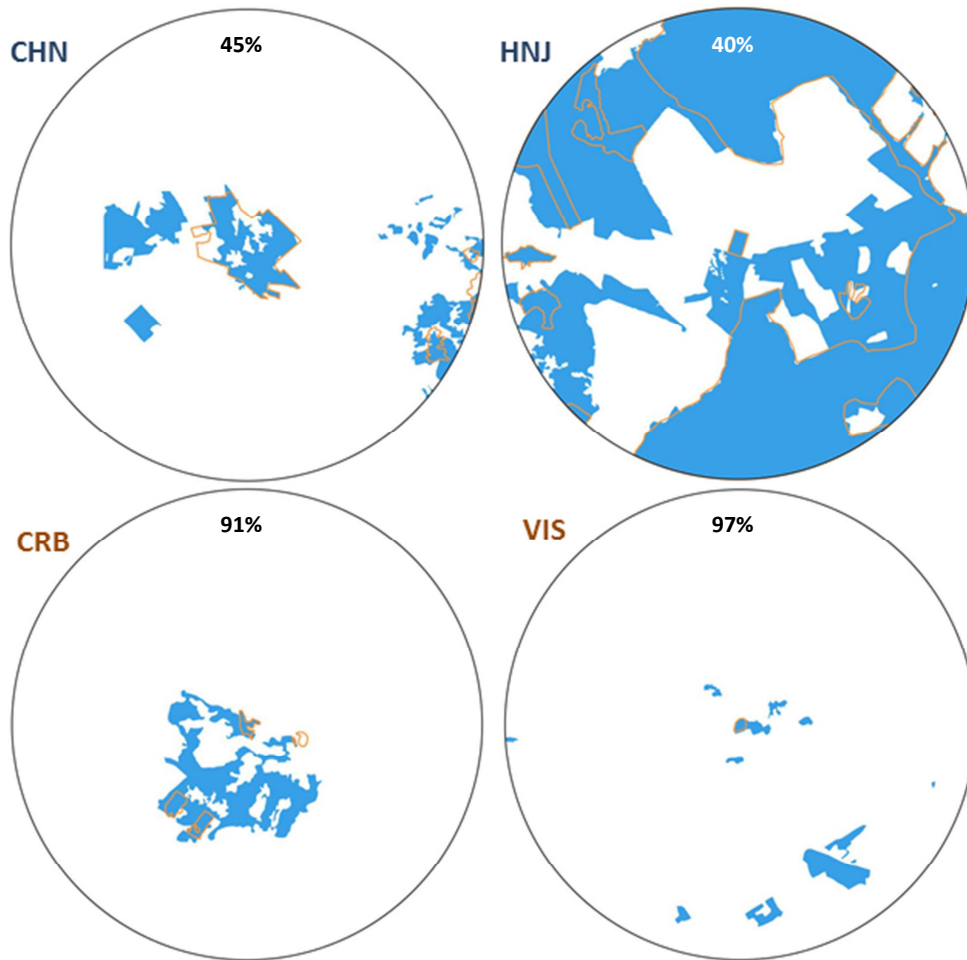
Tabla 1. Descripción física de los fragmentos de estudio (focales y de vecindario), agrupados en dos paisajes conectados (CHN y HNJ) y dos paisajes aislados (CRB y VIS).

	Coordenadas (N, W)	Area (ha)	Tamaño Poblacional ^a	Densidad (ind/ha)	Sex ratio (H/M) ^b
Paisajes conectados					
CHN_ <i>focal</i>	36°23'10", 6°05'58"	25	7175	287	1.33 ^{ns}
CHN_ <i>neighb1</i>	36°23'10", 6°05'58"	175	50225	287	1.36 ^{ns}
HNJ_ <i>focal</i>	37°14'58", 6°25'55"	14	2251	160.8	1.39 ^{ns}
HNJ_ <i>neighb1</i>	37°15'57", 6°25'45"	1974	263200	133	4*
HNJ_ <i>neighb2</i>	37°14'15", 6°24'00"	22	5236	238	1.5 ^{ns}
HNJ_ <i>neighb3</i>	37°14'31", 6°25'39"	0.9	75	83.3	2*
HNJ_ <i>neighb4</i>	37°14'10", 6°25'36"	4250	850000	200	3*
Paisajes aislados					
CRB_ <i>focal</i>	37°43'36", 4°55'25"	10	1853	185.3	2.47*
CRB_ <i>neighb1</i>	37°43'27", 4°54'34"	4.6	163	35.4	2.88*
CRB_ <i>neighb2</i>	37°43'27", 4°54'42"	0.7	34	48.6	2.40*
VIS_ <i>focal</i>	37°26'20", 5°44'27"	3	521	173.7	0.63 ^{ns}

^aEl tamaño poblacional se calculó por conteo directo o por transectos de 50 x 5 m según el tamaño del fragmento (entre 5-10 transectos según tamaño).

^bDiferencias significativas de una sex ratio 1:1 tras aplicar un test de χ^2 . ^{ns}No significativo, * $P < 0.05$

Figura 1. Imágenes de los paisajes de estudio conectados (CHN y HNJ) y aislados (CRB y VIS). En líneas amarillas se destaca la superficie del año 2002 (coincidente con la actualidad, y en azul se ilustra la cobertura boscosa en el año 1956. Dentro de cada paisaje se indica el porcentaje de cobertura boscosa perdida en los últimos 50 años.



Extracción de ADN y genotipado de microsatélites

Para obtener ADN genómico de plantas adultas se muestrearon hojas jóvenes que se secaron en gel de sílice. Para la extracción de ADN se utilizó el kit Invisorb DNA Plant HTS 96 Kit (Invitex, Berlin, Alemania) siguiendo el protocolo establecido por

el fabricante. Para extraer ADN de las semillas recuperadas en los colectores, éstas se dispusieron en placas de Petri con papel sobresaturado de agua destilada durante 24 h. Pasado este tiempo se abrió el endocarpo y cuidadosamente se aisló el embrión del cual se extrajo ADN genómico con el mismo protocolo que para las hojas. Tanto para hojas como para semillas se amplificó una batería de siete marcadores de microsatélites polimórficos nucleares desarrollados para *P. lentiscus* con las condiciones de amplificación y los ciclos de PCR previamente publicados (Albaladejo *et al.* 2008; Nora *et al.* 2015). Los productos amplificados fueron marcados con los fluoróforos FAM, NED, VIC o PET y analizados en un secuenciador ABI 3730 DNA Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en la 'Unidad de Genómica' (Universidad Complutense, Madrid, España). Los microsatélites se puntuaron de manera automática con el software GeneMapper v.3.7 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con ligeras correcciones manuales cuando fue necesario.

Estructura genética espacial de los paisajes conectados y aislados

Para detectar la existencia de patrones de estructuración genética espacial en los diferentes paisajes muestreados se realizó un análisis de asignación de cada individuo a grupos o clusters genéticos (K) usando el algoritmo Bayesiano de agrupamiento implementado en Geneland 3.2.4 (Guillot *et al.* 2005). El algoritmo de Geneland es muy parecido al de Structure (Pritchard *et al.* 2000) pero el primero considera el número de clusters como una variable más estimada mediante cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Guillot *et al.* 2005; Coulon *et al.* 2006) para inferir la probabilidad posterior de que los datos observados se ajusten a la hipótesis del número de grupos (K). Además, este programa puede

utilizar la localización geográfica de cada individuo como información a priori para asignar los individuos asumiendo que los individuos cercanos en el espacio tienen mayor probabilidad de pertenecer al mismo cluster genético (ver Guillot y Santos 2009). Esta cualidad es especialmente adecuada para detectar patrones de estructuración genética muy débiles tal y como podemos esperar en base a las características vitales de la especie y refrendado por estudios previos (Albaladejo *et al.* 2009, 2012; Aparicio *et al.* 2012; Nora *et al.* 2015). Para corroborar los resultados de Geneland se realizaron cinco carreras independientes para cada paisaje, se usó un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas teniendo en cuenta la presencia de alelos nulos, con 10^7 repeticiones y con una tasa de *thinin* cada 10^3 iteraciones. El post proceso incluyó una agrupación espacial de 50×50 píxeles y un *burnin* del 10% (1000 iteraciones).

Demografía poblacional mediante Aproximación Bayesiana Computacional (ABC)

Para constatar la presencia de cuellos de botella demográficos y datar los procesos de divergencia que han afectado a la estructura genética actual en cada uno de los paisajes muestreados usamos el software DIYABC 2 (Cornuet *et al.* 2008; Cornuet *et al.* 2014) que se basa en Aproximación Bayesiana Computacional (ABC). A diferencia de otros métodos que se centran en maximizar la estima de la probabilidad (*likelihood*), los métodos ABC no necesitan de una solución analítica de una función de probabilidad, por lo que estos métodos son especialmente útiles cuando una aproximación máximo-probabilística es difícil de implementar debido al diseño de modelos complejos con muchos parámetros, elevado número de datos, etc. (Beaumont *et al.* 2002). Brevemente, esta técnica consiste en (i) generar millones de datos simulados bajo una serie de parámetros elegidos a

partir de unas distribuciones a priori, (ii) seleccionar los datos simulados más cercanos al conjunto de datos reales, y (iii) estimar la distribución posterior de los parámetros mediante procedimientos de regresión lineal local. Para definir el número de poblaciones en cada paisaje usamos la solución óptima (K) proporcionada por Geneland. DIYABC usa la información genética proporcionada por los loci de microsatélites para seleccionar entre diferentes escenarios demográficos propuestos y posteriormente estima los parámetros demográficos del escenario seleccionado (Lopes y Boessenkool 2010). En cada uno de los paisajes comparamos cuatro posibles escenarios demográficos diferentes, aunque estos variaron según el número de clusters definidos a priori ($K = 1$ y $K = 2$, ver Fig. 2). Los diferentes escenarios propuestos se caracterizaron por la existencia de uno o dos puntos temporales (t_1 y t_2 , medidos en generaciones) en los cuales las poblaciones pudieron divergir o sus respectivos tamaños poblacionales efectivos (N_e) contraerse (cuellos de botella). Para $K = 1$ (paisajes CHN y VIS) los escenarios demográficos específicos establecidos fueron:

- *Escenario 1.1, escenario nulo.* El tamaño efectivo (N_{1a}) se mantiene constante a lo largo del tiempo.
- *Escenario 1.2, cuello de botella reciente.* Este escenario representa la posibilidad de una disminución en el tamaño efectivo de la población ($N_{1a} > N_{1b}$) en un tiempo reciente t_1 debido a causas antrópicas.
- *Escenario 1.3, cuello de botella antiguo.* Este escenario representa la posibilidad de una disminución en el tamaño efectivo de la población ($N_{1a} > N_{1b}$) en un tiempo t_2 achacable a causas históricas (anterior a la acción del Hombre)
- *Escenario 1.4, doble cuello de botella.* Este escenario sugiere la existencia de dos cuellos de botella en la población original ($N_{1a} > N_{1b} > N_{1c}$), uno en

tiempo reciente debido a causas antrópicas (t_1) y otro por causas históricas (t_2).

Para $K = 2$ (paisajes HNJ y CRB) los escenarios demográficos específicos propuestos fueron:

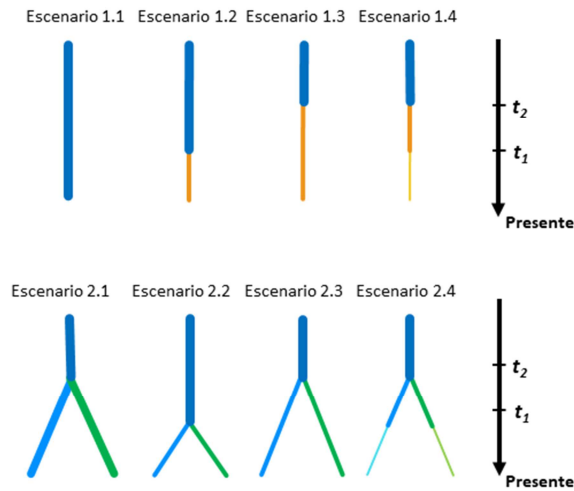
- *Escenario 2.1, escenario nulo.* La población original (N_{1a}) diverge en dos poblaciones (N_{2a} , N_{2b}) en un tiempo pasado antiguo (t_2) sin cuellos de botella asociados.
- *Escenario 2.2, divergencia reciente.* La población original (N_{1a}) diverge en dos poblaciones (N_{1b} y N_{2b}) en tiempo t_1 asociada a la acción humana. En el proceso de divergencia se permite la variación en el tamaño efectivo poblacional.
- *Escenario 2.3, divergencia histórica.* Una población original (N_{1a}) diverge en dos poblaciones (N_{1b} y N_{2b}) en tiempo t_2 asociada a causas históricas. En el proceso de divergencia se permite la variación en el tamaño efectivo poblacional.
- *Escenario 2.4, divergencia histórica seguida de cuellos de botella recientes.* La población (N_{1a}) diverge en dos poblaciones (N_{1b} y N_{2b}) en tiempo t_2 . Posteriormente, en tiempo t_1 , cada una de las dos poblaciones sufre una reducción en el tamaño poblacional ($N_{1b} > N_{1c}$ y $N_{2b} > N_{2c}$).

Los valores a priori para los tiempos se establecieron en 1-20 generaciones para t_1 y 10-1000 generaciones para t_2 . Al ser una especie de vida larga no se sabe con precisión el tiempo de generación de *P. lentiscus*. Se sabe que la floración no se produce hasta al menos los 5 años de vida (Verdú y García-Fayos 1998) por lo que si consideramos un tiempo de generación de unos 10-20 años el tiempo t_1 haría referencia a sucesos acontecidos entre 10-200 años (achacables a la acción humana reciente), mientras que el tiempo t_2 estaría

relacionado con sucesos históricos acontecidos entre unos 100-10000 años BP (abarcando hasta finales del cuaternario). Los valores a priori para los tamaños poblacionales efectivos considerados fueron muy amplios, variando entre 10-20000 individuos para las poblaciones originales (N_{1a}) hasta los 10-1000 individuos en las poblaciones que hayan sufrido cuellos de botella (N_{1b} , N_{2b} , N_{1c} , N_{2c}). Con respecto a los parámetros genéticos no se permitieron las inserciones/delecciones en las simulaciones y se asumió un modelo GSM (Generalized Stepwise Model) de mutación para el conjunto de microsatélites (con los valores por defecto del software). Como estadísticos resumen usados para seleccionar los conjuntos de datos simulados más parecidos a los datos observados se usaron la media de la diversidad génica y el valor M de Garza-Williamson (estadístico frecuentemente utilizado para detectar reducciones en el tamaño efectivo de la población, Garza y Williamson 2001).

Para cada escenario se realizaron 10^6 simulaciones. Los escenarios se compararon estimando su probabilidad posterior usando el método de la regresión logística (Cornuet *et al.* 2010). Para analizar la capacidad de este método para seleccionar el escenario “correcto” realizamos un análisis de sensibilidad mediante el módulo *confidence in scenario choice* (Cornuet *et al.* 2008). Para ello se corrieron análisis en DIYABC para los cuatro escenarios en cada paisaje obteniéndose estimas del error *tipo I* (frecuencia de eventos en los que el escenario real no es el escenario seleccionado). Cada escenario se utilizó como base para el conjunto de 1000 simulaciones de datos de prueba para calcular los errores (Lander *et al.* 2011).

Figura 2. Escenarios demográficos propuestos para los cuatro paisajes estudiados. Los escenarios 1.1-4 y 2.1-4 se corresponden con escenarios donde $K = 1$ y $K = 2$, respectivamente. El grosor de la línea y el cambio de color indican una reducción del tamaño poblacional efectivo.



Diversidad y estructura genética entre cohortes

Para caracterizar la diversidad genética de las cohortes de adultos y semillas se calcularon los siguientes parámetros básicos; riqueza alélica (A_R), diversidad génica (H_E), heterocigosidad observada (H_O) e índice de fijación (F_{IS}). Para determinar si los índices de fijación fueron significativamente diferentes de cero se construyeron intervalos de confianza al 95% mediante la realización de permutaciones (1000 réplicas). Para testar diferencias en los parámetros de diversidad genética entre las cohortes de adultos y semillas se realizaron tests de Wilcoxon para muestras pareadas. Dado que esperamos encontrar una mayor diversidad genética en las poblaciones de plantas adultas que en las semillas los tests se restringieron a una cola. Estos análisis fueron llevados a cabo con el

paquete *diveRsity* (Keenan *et al.* 2013) y el software R 3.4.0 (R Developmental Core Team 2017).

Para obtener una estima de la diferenciación genética entre adultos y semillas en cada fragmento focal se calcularon diversos índices de diferenciación entre las cohortes (F_{ST} , Weir & Cockerham 1984; G'_{ST} , Hedrick 2005; D , Jost 2008) y sus respectivos intervalos de confianza al 95% mediante permutaciones (1000 réplicas). Asimismo, para tener una estima del número efectivo de población actual en cada fragmento focal (N_e) usamos el método de coancestría molecular de Nomura (2008) mediante el software N_e ESTIMATOR 2.01 (Do *et al.* 2014).

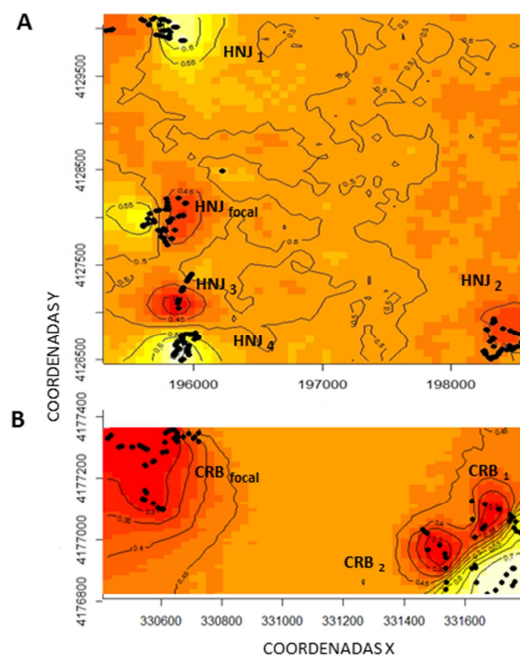
Para detectar diferencias en los patrones de estructuración espacial de la diversidad genética entre cohortes se realizaron correlogramas en cada uno de los fragmentos focales con la población adulta y las semillas dispersadas en cada uno de ellos. Para la construcción de los correlogramas se establecieron 6 clases de distancias iguales en cada uno de los cuatro fragmentos construidas de forma que permiten diseccionar la estructura genética espacial a escala fina pero que aglutinan un tamaño de muestra suficiente en cada clase. Para examinar la significación estadística de los coeficientes de similitud genética (r) en cada clase de distancia se construyeron intervalos de confianza del 95% mediante bootstrap (1000 réplicas), y para determinar la significación global del correlograma se calculó el estadístico ω (Smouse *et al.* 2008) y su significación se obtuvo mediante 1000 permutaciones. Siguiendo a Banks y Peakall (2012) un correlograma se consideró significativo cuando el valor de $P < 0.01$. Estos análisis se llevaron a cabo con GenALEX 6.3 (Peakall y Smouse 2006).

Resultados

Estructura genética espacial de los paisajes conectados y aislados

El análisis con Geneland reveló que los paisajes aislados no están de forma inherente más estructurados genéticamente que los conectados. El análisis de agrupamiento sugirió la existencia de dos grupos genéticos ($K = 2$) en el paisaje conectado HNJ y en el aislado CRB, así como la existencia de un único grupo genético ($K = 1$) en los paisajes CHN y VIS, el primero conectado y el segundo aislado. En el paisaje conectado HNJ encontramos que cada uno de los grupos detectados estuvieron formados por 54 y 113 individuos, mientras que en CRB los grupos estuvieron formados por 21 y 61 individuos, respectivamente (Fig. 3).

Figura 3. Gráfico de contorno de superficie de Geneland mostrando la probabilidad de asignación a dos grupos genéticos en el paisaje conectado HNJ (A) y el paisaje aislado CRB (B).



Demografía poblacional mediante Aproximación Bayesiana Computacional (ABC)

Un análisis de pre-evaluación reveló que la combinación de escenarios y valores a priori otorgados a los parámetros a estimar fueron compatibles con los datos observados (Fig. S1). El análisis de DIYABC sugirió un mejor ajuste del escenario 1.3 (cuello de botella antiguo) para los datos genéticos en los paisajes con $K = 1$ (CHN y VIS), así como del escenario 2.2 (divergencia reciente) en los paisajes con $K = 2$ (HNJ y CRB). Los escenarios más apoyados recibieron una probabilidad posterior relativamente fuerte; 0.590, 0.689, 0.707 y 0.569 para los paisajes CHN, HNJ, CRB y VIS, respectivamente (Tabla 2). Los otros escenarios propuestos recibieron un apoyo mucho más débil. Las simulaciones realizadas y basadas en cada uno de los escenarios propuestos destacaron que los escenarios seleccionados en los paisajes con $K = 1$ presentaron el error *tipo I* más bajo (Tabla 2), mientras que en los paisajes con $K = 2$ el escenario 2.3 presentó valores más bajos de error *tipo I*, aunque la probabilidad posterior en estos paisajes fue mucho más baja para este escenario lo que proporciona una mayor confianza en la selección del escenario 2.2 como el más probable entre los escenarios propuestos.

Tabla 2. Probabilidad posterior e intervalo de confianza al 95%(entre paréntesis) para cada uno de los escenarios demográficos propuestos en el software DIYABC, basado en la estimación logística, y el error tipo I para cada uno de los escenarios. Los escenarios seleccionados en cada paisaje se destacan en negrita.

Escenario	Probabilidad posterior	Error tipo I
Paisajes conectados		
CHN		
1.1	0.052 (0.050 – 0.055)	0.339
1.2	0.150 (0.147 – 0.154)	0.621
1.3	0.594 (0.589 – 0.598)	0.013
1.4	0.204 (0.200 – 0.208)	0.814
HNJ		
2.1	0.176 (0.130 – 0.222)	0.371
2.2	0.689 (0.632 – 0.746)	0.088
2.3	0.009 (0.000 – 0.022)	0.000
2.4	0.125 (0.090 – 0.161)	0.341
Paisajes aislados		
VIS		
1.1	0.048 (0.046 – 0.050)	0.422
1.2	0.105 (0.102 – 0.109)	0.717
1.3	0.707 (0.703 – 0.712)	0.159
1.4	0.139 (0.136 – 0.143)	0.757
CRB		
2.1	0.233 (0.225 – 0.240)	0.578
2.2	0.569 (0.561 – 0.578)	0.342
2.3	0.017 (0.014 – 0.020)	0.119
2.4	0.181 (0.175 – 0.188)	0.472

Las distribuciones posteriores para los parámetros de N_e arrojaron tamaños poblacionales efectivos pequeños en la actualidad (con una moda en la distribución entre 937 de CHN y 221 una de las poblaciones de CRB) (Tabla 3). En los paisajes $K = 1$ (CHN y VIS) la estima del tamaño de la población ancestral previo al cuello de botella mostró tamaños poblacionales efectivos mucho mayores, del orden de 10 veces el tamaño estimado actual ($N_{10} \approx 7900-9300$). Los tiempos estimados para esta reducción tan drástica de los tamaños poblacionales

sugieren unas 289 generaciones para CHN y alrededor de 566 generaciones para VIS. Para los paisajes con $K=2$ se detectó que los procesos de divergencia han sido muy recientes, con una moda en 5 generaciones para HNJ y 8 generaciones para CRB. Este proceso de divergencia estuvo acompañado de una reducción significativa en los tamaños poblacionales efectivos claramente detectable en CRB, donde se pasó de un tamaño poblacional estimado de 1750 individuos a dos poblaciones con unos 700 individuos en total. Sin embargo, en el paisaje HNJ los valores proporcionados por la moda de la distribución no sugieren una reducción drástica en los tamaños poblacionales ya que se estimaron unos valores previos a la divergencia de 1850 individuos y unos valores posteriores alrededor de 1243 individuos.

Tabla 3. Valores de la distribución posterior de los tamaños poblacionales efectivos (N) y tiempos (t) estimados en el mejor escenario evolutivo seleccionado por DIYABC en cada paisaje (entre paréntesis). $Q_{2.5}$ y $Q_{97.5}$ representan los límites del intervalo de credibilidad del 95%.

	Parámetros estimados	Media	Mediana	Moda	$Q_{2.5}$	$Q_{97.5}$
Paisajes conectados						
CHN (escenario 1.3)	N_{1b}	703	732	937	241	987
	N_{1a}	10600	10300	7920	2550	19300
	t_2	470	443	289	59.4	967
HNJ (escenario 2.2)	N_{1b}	601	613	824	130	980
	N_{2b}	525	514	419	94.1	966
	N_c	5550	4330	1850	1030	16200
	t_1	8.5	7.85	5.1	1	19.1
Paisajes aislados						
CRB (escenario 2.2)	N_{1b}	469	438	221	73	962
	N_{2b}	561	561	467	109	976
	N_c	6260	5020	1750	1150	17300
	t_1	10.4	10.3	8.3	1.1	19.8
VIS (escenario 1.3)	N_{1b}	646	657	708	214	979
	N_{1a}	10300	9890	9330	2220	19300
	t_2	542	546	566	84.8	973

Diversidad y estructura genética entre cohortes

Contrario a nuestra hipótesis previa, la riqueza alélica fue similar entre la población adulta y las semillas dispersadas independientemente del grado de fragmentación del paisaje (Tabla 4). En algunos parámetros de diversidad calculados los valores fueron ligeramente más bajos en las semillas aunque sin mostrar diferencias significativas entre ambas cohortes. Por lo general los valores de H_O fueron menores que los de H_E en las poblaciones por lo que hay un déficit de heterocigosidad reflejado en valores positivos del índice de fijación (F_{IS}). Los valores de F_{IS} fueron más elevados en la cohorte de semillas y significativamente diferentes de cero en los paisajes conectados.

Tabla 4. Valores promedio de los descriptores básicos de diversidad genética para las cohortes de adultos y semillas dispersadas de *P. lentiscus* en paisajes conectados y aislados. Entre paréntesis los SE excepto para los valores de F_{IS} donde se muestra el intervalo de confianza al 95%. Valores de F_{IS} significativamente diferentes de cero se ilustran en negrita.

	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
Paisajes conectados				
CHN_focal_adults	5.36 (± 2.51)	0.64 (± 0.25)	0.68 (± 0.22)	0.053 (-0.024 – 0.131)
CHN_focal_seeds	5.01 (± 2.46)	0.58 (± 0.22)	0.65 (± 0.25)	0.111 (0.070 – 0.159)
Wilcoxon test(P-value)	0.078	0.953	0.135	0.148
HNJ_focal_adults	5.18 (± 2.71)	0.63 (± 0.25)	0.66 (± 0.28)	0.035 (-0.038 – 0.105)
HNJ_focal_seeds	4.69 (± 2.87)	0.57 (± 0.25)	0.64 (± 0.28)	0.106 (0.021 – 0.190)
Wilcoxon test(P-value)	0.147	0.922	0.147	0.109
Paisajes aislados				
CRB_focal_adults	5.22 (± 2.44)	0.67 (± 0.28)	0.66 (± 0.24)	-0.020 (-0.082 – 0.043)
CRB_focal_seeds	5.11 (± 2.56)	0.61 (± 0.28)	0.65 (± 0.26)	0.062 (-0.0002 – 0.123)
Wilcoxon test(P-value)	0.223	0.846	0.500	0.078
VIS_focal_adults	4.84 (± 2.49)	0.68 (± 0.29)	0.62 (± 0.25)	-0.049 (-0.136 – 0.040)
VIS_focal_seeds	4.96 (± 2.55)	0.63 (± 0.27)	0.63 (± 0.27)	-0.007 (-0.063 – 0.052)
Wilcoxon test(P-value)	0.922	0.777	0.882	0.469

Los valores de diferenciación genética entre cohortes variaron según el parámetro, siendo G'_{ST} el parámetro que ofreció los valores más elevados (desde 0.032 hasta 0.052) (Tabla 5). Independientemente del parámetro los resultados fueron consistentes en revelar una diferenciación genética significativa entre cohortes con la excepción del paisaje conectado HNJ. Los tamaños poblacionales efectivos actuales estimados con N_E ESTIMATOR fueron bastante variables con un rango entre 62-312 para el paisaje VIS hasta 70-354 para HNJ. El rango de valores obtenido fue comparable en magnitud con el intervalo de credibilidad obtenido con DIYABC para los tamaños efectivos actuales (Tablas 3 y 5). No obstante, no pudieron obtenerse valores de N_e con este método en el paisaje de CHN por falta de convergencia del algoritmo.

Tabla 5. Valores de diferenciación genética (F_{ST} , G'_{ST} y D) entre las cohortes de adultos y semillas de *P. lentiscus* de cada fragmento focal. Entre paréntesis se muestran el intervalo de confianza del 95%. Los valores significativamente diferentes de cero se ilustran en negrita.

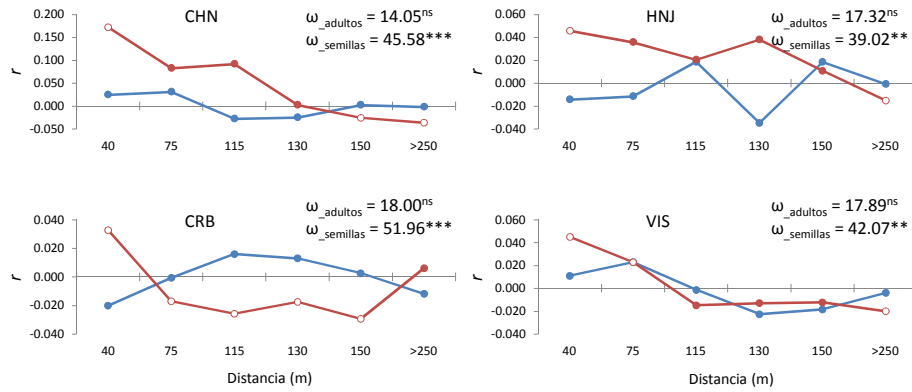
	F_{ST} (95%IC)	G'_{ST} (95%IC)	D (95%IC)	N_e
Paisajes conectados				
CHN	0.015 (0.003-0.029)	0.039 (0.01-0.075)	0.024 (<0.001-0.054)	-*
HNJ	0.012 (-0.002- 0.028)	0.032 (-0.002-0.068)	0.014 (-0.014- 0.051)	70-354
Paisajes aislados				
CRB	0.013 (0.002-0.027)	0.034 (0.008-0.069)	0.014 (-0.006-0.4)	371-1861
VIS	0.024 (0.01-0.039)	0.052 (0.023-0.086)	0.017 (<0.001-0.042)	62-312

*No disponible por falta de convergencia del algoritmo.

Los correlogramas mostraron una ausencia de estructuración genética espacial en la cohorte de plantas adultas, y la ausencia de significación en el test de heterogeneidad sugiere una distribución de los genotipos no diferente de una distribución aleatoria. Sin embargo, los correlogramas de la cohorte de semillas dispersadas en los cuatro fragmentos fueron significativos e indicativos de una

clina con estructuración genética espacial positiva en la primera clase de distancia (40 m) y negativa en las últimas. En el fragmento aislado VIS la estructuración espacial positiva se extendió hasta la segunda clase de distancia (75 m).

Figura 4. Correlogramas espaciales mostrando la estructuración genética de las cohortes de adultos (línea azul) y de las semillas dispersadas (línea roja). Los símbolos en blanco representan coeficientes de similitud genética (r) significativos para la clase de distancia correspondiente. Se muestran en cada correlograma los valores del test de heterogeneidad (ω) y su significación; ^{ns}No significativo, ****** $P < 0.01$, ******* $P < 0.001$.



Discusión

La fragmentación del hábitat es una importante amenaza para la biodiversidad en la mayoría de los ecosistemas ya que la pérdida de diversidad genética y disminución de la heterocigosidad pueden reducir la viabilidad y la supervivencia de los individuos (Young *et al.* 1996; Saccheri *et al.* 1998). Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones son consecuencia de la acción de las fuerzas evolutivas a lo largo del tiempo y por eso sirven como archivo de la historia evolutiva de las poblaciones. Tras un periodo largo de aislamiento y en ausencia de inmigración poblaciones pequeñas sufren una pérdida de alelos por la acción de la deriva génica. Las poblaciones de plantas tienen la capacidad demográfica y genética para proporcionar respuestas evolutivas adecuadas y asegurar así su persistencia en ambientes cambiantes (Eckert *et al.* 2010). Algunos estudios teóricos sugieren que los efectos de la fragmentación *per se* sólo se harán evidentes en niveles muy bajos de cantidad de hábitat (< 20-30% de hábitat en el paisaje) (Fahrig 1998, 2003; Flather y Bevers 2002). En este estudio, desarrollado en un paisaje muy alterado, hemos detectado como la fragmentación antrópica reciente pueden propiciar el desarrollo de estructuración genética y provocar cuellos de botella genéticos. No obstante, estos patrones no son generalizables ya que en algunas poblaciones los cambios climáticos ocurridos durante el Holoceno parecen haber dejado una mayor impronta en los patrones actuales de variación genética que la acción antrópica reciente. Además, a pesar del desarrollo de estructuración de la diversidad genética y la existencia de cuellos de botella no detectamos signos de empobrecimiento genético en las semillas generadas por las plantas adultas, lo que es achacable a los caracteres vitales de *P. lentiscus*, favorables para tamponar los efectos de la fragmentación (Albaladejo *et al.* 2012; Nora *et al.* 2015).

Estructura genética espacial de los paisajes conectados y aislados

Hemos detectado un fuerte impacto de la fragmentación a escala del paisaje. La dispersión limitada de semillas dentro de los fragmentos y la escasez de donantes de polen exitosos pueden estar contribuyendo a generar grupos locales y aumentar la estructuración a nivel de paisaje (Wang *et al.* 2011). En los paisajes divididos en fragmentos (HNJ y CRB) hemos la existencia de estructuración en dos grupos genéticos, mientras que en el caso de los paisajes con un único fragmento (CHN y VIS) solo se detectó un único grupo genético. La viabilidad a largo plazo de las poblaciones se basa en el mantenimiento de los niveles adecuados de variación genética y el flujo de genes (Young *et al.* 1996, Orrock 2005, Haddad *et al.* 2015). En las especies polinizadas por el viento, los granos de polen liberados en el borde de la vegetación tienen menos impedimentos aerodinámicos que los liberados en el interior de los fragmentos (Okubo y Levin 1989). Estos granos de polen pueden llegar a otros fragmentos homogeneizando las poblaciones aunque frecuentemente los apareamientos son más frecuentes con individuos vecinos para las especies polinizadas por el viento (Dow y Ashley 1998), además si el flujo de semillas es limitado y esta dispersión solo ocurre a nivel de fragmento contribuirá a la estructuración genética que es lo que hemos encontrado en los fragmentos de estudio. Además, las plantas dispersadas por pequeñas aves frugívoras presentarán una probabilidad más reducida de dispersión a larga distancia que en fragmentos aislados puede traducirse en un incremento de la estructuración espacial de las poblaciones.

Demografía poblacional mediante Aproximación Bayesiana Computacional (ABC)

Un ciclo de vida largo, un sistema de reproducción que obliga a la xenogamia completa, la dispersión del polen por viento parecen hacer que *Pistacia lentiscus* sea más resistente a la fragmentación y al aislamiento (Albaladejo *et al.* 2012). La extrema presión antropogénica puede llegar a aislar los fragmentos y restringir los microhábitats seguros dentro de los bosques para el reclutamiento, fomentando la formación de grupos genéticos (Schupp y Jordano 2011). Al aislarse los fragmentos no sólo la nube de polen percibida por las hembras es menos diversa, sino también, debido probablemente a la escasez de lugares adecuados para el reclutamiento, hay una distribución heterogénea de semillas aumentando la competencia entre ellas que promueve el empobrecimiento genético. Los paisajes de estudio tienen diferente historia de manejo, poblaciones con un único fragmento sufrieron un cuello de botella histórico por causas climáticas, en la era del Holoceno con un clima cambiante con bajadas y subidas de temperatura en la Península Ibérica (Gil-Romera *et al.* 2010) en el que la especie sufrió un descenso en el número de individuos por causas históricas y no por acción antrópica. En el paisaje CHN, el número efectivo de individuos anterior y posterior al cuello de botella es mayor que el medido en el fragmento VIS, este último es un fragmento muy pequeño y muy deteriorado (ver arriba).

Los paisajes que han sufrido un cuello de botella reciente son los que están divididos en distintos fragmentos, en el caso del paisaje conectado HNJ está formado por múltiples fragmentos conectados entre sí, que, a pesar de esta conexión, están estructurados en dos grupos genéticos que pueden ser consecuencia de este cuello de botella reciente. El paisaje CRB el cuello de botella sufrido fue antes que el de HNJ, hace unos 150 años, este es un paisaje muy alterado por el cultivo, donde la matriz que lo rodea son tierras aradas, los fragmentos remanentes son considerados aislados entre sí por la distancia que la

separan, ya que son distancias demasiado grandes para que sean recorridas por los pájaros dispersantes de manera habitual.

Diversidad y estructura genética entre cohortes

Hemos encontrado valores muy similares en los adultos establecidos pero valores más bajos en las semillas dispersadas, aunque no son diferencias significativas. Este empobrecimiento sería esperable como resultado del empobrecimiento genético al reducir el número de adultos tras la fragmentación, a pesar de que el flujo polínico puede mitigar la estructuración genética espacial que puede producir una limitación en la dispersión de semillas (Lowe *et al.* 2005). En estudios anteriores, Albaladejo *et al.* (2012) midieron altas tasas de flujo de polen provenientes del exterior del área de estudio (hasta 73-93%), aunque encontraron muy pocos donantes de polen por lo que esto se estaría reflejando en las semillas, que, a pesar de recibir polen de otros fragmentos, el número de padres donadores será reducido y poco variable por lo que habrá una menor riqueza genética en las siguientes generaciones después de la fragmentación.

En las plantas polinizadas por el viento, las variaciones anuales en los factores bióticos así como en los factores ecológicos abióticos pueden contribuir a crear heterogeneidad temporal en la nube polínica que estará disponible para las hembras (Irwin *et al.* 2003), además la vecería (como es el caso de la especie de estudio) con años muy variables en la producción puede además promover aún más las diferencias entre las cohortes de diferentes años. En el caso de las semillas encontramos valores altos de endogamia (F_{IS}) lo achacamos por la distribución desigual de las semillas y los subgrupos espaciales que forman disminuyendo la frecuencia de heterocigotos, este fenómeno es el efecto

Wahlund (Duminil *et al.* 2009), lo vemos apoyado por los resultados obtenidos en los correlogramas.

En el caso del fragmento VIS, los mecanismos de dispersión están completamente alterados, es un fragmento que no tiene conexión cercana a otros fragmentos. Nosotros hemos encontrado valores de riqueza genética más altos en las semillas que en los adultos establecidos y la mayor diferenciación genética entre estas cohortes a pesar de que estas semillas no pueden provenir de otro fragmento. Estudios previos detectaron cuellos de botella en esta población (Nora *et al.* 2015), grandes diferencias en la nube polínica y poca variación de las hembras reproductoras de un año a otro (Cap. 3), que es lo inverso a lo que ocurrió en otros fragmentos. Además, este fragmento es el único que tiene el balance de sex-ratio desviado hacia los machos.

Por el sistema de apareamiento, *Pistacia lentiscus* tiene altos niveles de diversidad genética previamente medidos (Albaladejo *et al.* 2009) típicos de las especies de plantas leñosas polinizadas por el viento (Nybom 2004). No esperábamos encontrar estructuración a escala de fragmento en los adultos, pero si era esperable en semillas, al ser dispersadas por animales, hay una dispersión dirigida y heterogénea hacia ciertos microhábitats dentro del paisaje (Schupp *et al.* 2002). Esto produce patrones significativos de estructura genética espacial que son más marcados y complejos en especies dispersas por aves (Torimaru *et al.* 2007). En las poblaciones más pequeñas hay una estructuración positiva a menos de 60 metros en los cuatro fragmentos, lo que puede asociarse con el carácter territorial de los pájaros dispersantes. Para las plantas que dependen de los vertebrados para la dispersión, la extinción o reducción de la abundancia en los parches aislados puede reducir las posibilidades de dispersión (Cordeiro y Howe 2003; Uriarte *et al.* 2011; Capítulo 2) por lo que la alteración en la abundancia o el

comportamiento de los dispersores afectará a la conexión efectiva entre fragmentos. Además, los frutos de *Pistacia lentiscus* son dispersados por aves de mediano y pequeño tamaño que no suelen recorrer largas distancias, la distancia media de distribución de semillas por lo general suele ser menos de 50 m de distancia (Jordano *et al.* 2007) que es la distancia medida de la estructuración genética detectada en los bosques pequeños característico de estos dispersantes.

Conclusiones

El impacto de la fragmentación sobre poblaciones de plantas naturales sigue siendo controvertido. La mayoría de los estudios de fragmentación que se realizan son a escala de fragmento, pero nuestro trabajo es a nivel de paisaje y nos proporciona información directa de cómo la historia biológica y el manejo del Hombre afecta a la historia genética de poblaciones de *Pistacia lentiscus*. El área de estudio es una zona muy manejada y alterada, y mostramos la evidencia de un efecto directo al aislamiento de los fragmentos,(i) detectamos un efecto directo de la separación en diferentes fragmentos y la formación de diferentes grupos genéticos y cuellos de botella recientes asociados a la fragmentación del paisaje, en cambio, los paisajes que no han sufrido este tipo de aislamiento solo han sufrido cuellos de botellas por razones históricas, (ii) a escala espacial, hay estructuración espacial de las semillas y no en los adultos como era esperable,(iii) aunque a pesar de la fragmentación no detectamos pérdida de riqueza genética entre cohortes. En este estudio demostramos la importancia de mantener las poblaciones continuas y sin aislar para evitar un empobrecimiento genético a largo plazo, la estructuración genética en las futuras generaciones que crecen en

fragmentos de menor tamaño y el empobrecimiento de las futuras generaciones tras el aislamiento, lo que hace patente el efecto directo del aislamiento y calidad de los bosques sobre la historia genética de las poblaciones.

Referencias

- Aguilar R, Galetto L (2004) Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia*, 138, 513–520.
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17, 5177–5188.
- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramin GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *PLoS One*, 7, e49012.
- Albaladejo RG, Sebastiani F, Aparicio A, Buonamici A, González-Martínez SC, Vendramin GG (2008) Development and characterization of eight polymorphic microsatellite loci from *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 904–906.
- 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 & Conservation*, 17, 2219–2232.
- Aparicio A, Albaladejo RG, Olalla-Tárraga MA, Carrillo LF, Miguel A Rodríguez MA (2008) Dispersal potentials determine responses of woody plant species

- richness to environmental factors in fragmented Mediterranean landscapes. *Forest Ecology and Management*, 255, 2894–2906.
- Aparicio A, Hampe A, Fernandez-Carrillo L, Albaladejo RG (2012) Fragmentation and comparative genetic structure of four Mediterranean woody species: complex interactions between life history traits and the landscape context. *Diversity and Distributions*, 18, 226–235.
- Bacles CFE, Jump AS (2011) Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics. *Trends in Plant Science*, 16, 13–18.
- Banks SC, Peakall R (2012) Genetic spatial autocorrelation can readily detect sex-biased dispersal. *Molecular Ecology*, 21, 2092–2105.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162, 2025–2035
- Bittencourt JVM, Sebbenn AM (2007) Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity*, 99, 580–591.
- Carrión J (2002) Patterns and processes of Late Quaternary environmental change in a montane region of southwestern Europe. *Quaternary Science Reviews*, 21, 2047–2066.
- Cordeiro NJ, Howe HF (2003) Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100, 14052–14056.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, 24, 2713–2719.
- Cornuet JM, Ravigné V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0) *BMC Bioinformatics* 11, 401.

- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data, *Bioinformatics*, 30, 1187–1189.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M, Hewison AJ (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*, 15, 1669–1679.
- Dow BD, Ashley MV (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity*, 89, 62–70.
- Duminil J, Hardy OJ, Petit RJ (2009) Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 177.
- Eckert CG, Kalisz S, Geber MA, Sargent R, Elle E, Cheptou PO, Goodwillie C, Johnston MO, Kelly JK, Moeller DA, Porcher E, Ree RH, Vallejo-Marín M, Winn AA (2009) Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 35–43.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217–242.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003) Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113, 351–365.
- Fahrig L (1998) When does fragmentation of breeding habitat affect population survival?. *Ecological Modelling*, 105, 273–292.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 487–515.
- Farwig N, Braun C, Böhning-Gaese K (2008) Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conservation Genetics*, 9, 317–326.

- Flather CH, Bevers M (2002) Patchy reaction-diffusion and population abundance: the relative importance of habitat amount and arrangement. *American Naturalist*, 159, 40–56.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10, 305–318.
- Gil-Romera G, Carrión JS, Pausas JG, Sevilla-Callejo M, Lamb HF, Fernández S, F. Burjachs F (2010) Holocene fire activity and vegetation response in south-eastern Iberia. *Quaternary Science Reviews*, 29, 1082-1092.
- González-Varo JP (2010) Fragmentation, habitat composition and the dispersal/predation balance in interactions between the Mediterranean myrtle and avian frugivores. *Ecography*, 33, 185–197.
- González-Varo JP, Nora S, Aparicio A (2012) Bottlenecks for plant recruitment in woodland remnants: An ornithochorous shrub in a Mediterranean “relictual” landscape. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*, 14, 111–122.
- González-Varo JP, Albaladejo RG, Aizen MA, Arroyo J, Aparicio A (2015) Extinction debt of a common shrub in a fragmented landscape. *Journal of Applied Ecology*, 52, 580–589.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 712–715.
- Guillot G, Santos F (2009) A computer program to simulate multilocus genotype data with spatially auto-correlated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1112–1120.
- Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD, Lovejoy TE, Sexton JO, Austin MP, Collins CD, Cook WM, Damschen EI, Ewers RM, Foster BL, Jenkins CN, King AJ, Laurance WF, Levey DL, Margules CR, Melbourne BA, Nicholls AO, Orrock JL, Song DX, Townshend JR (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, 1, e1500052.
- Hamilton MB (1999) Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature*, 401, 8–9.

- Hamrick J (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197, 323–335.
- Hedrick P (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59, 1633–1638.
- Herrera CM (1984) A study of avian Frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecology Monographs*, 54, 1–23.
- Herrera CM (1988) Variaciones anuales en las poblaciones de pájaros frugívoros y su relación con la abundancia de frutos. *Ardeola*, 35, 135–142.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept. *American Naturalist*, 152, 576–594.
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 21, 823–831.
- Irwin A, Hamrick JL, Godt MJW, Smouse PE (2003) A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. *Heredity*, 90, 187–194.
- Jordano P (2010) Pollen, seeds and genes: the movement ecology of plants. *Heredity*, 105, 329–330.
- Jost L (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015–4026.
- Keenan K, McGinnity P, Cross TF, Crozier WW, Prodöhl PA (2013) DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782–788.
- Lander TA, Oddou-Muratorio S, Prouillet-Leplat H, Klein EK (2011) Reconstruction of a beech population bottleneck using archival demographic information and Bayesian analysis of genetic data. *Molecular Ecology*, 20, 5182–5196.

- Lopes S, Boessenkool S (2010) The use of approximate Bayesian computation in conservation genetics and its application in a case study on yellow-eyed penguins. *Conservation Genetics*, 11 421-433.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95, 255–273.
- Mulcahy DL (1979) The Rise of the Angiosperms: A Genecological Factor. *Science*, 206, 20-23.
- Nason JD, Hamrick JL (1997) Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. *Journal of Heredity*, 88, 264–276.
- Nomura T (2008) Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications*, 1, 462–474.
- Nora S, Albaladejo RG, Aparicio A (2015) Genetic variation and structure in the Mediterranean shrubs *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* in different landscape contexts. *Plant Biology*, 17, 311–319.
- Nora S, Aparicio A, Albaladejo RG (2016) High correlated paternity leads to negative effects on progeny performance in two Mediterranean shrub species. *PLoS One*, 11, e0166023.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143–1155.
- Okubo A, Levin SA (1989) A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seeds and pollen. *Ecology*, 70, 329–338.
- Orrock JL (2005) Conservation corridors affect the fixation of novel alleles. *Conserv. Genet.* 6, 623–630.
- Palamarev E (1989) Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics and Evolution*, 162, 93-107.

- Parejo-Farnés C, Robledo-Arnuncio JJ, Albaladejo RG, Pérez-Rubio E, Aparicio A (2017) Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. *Tree Genetics & Genomes* 13:17.
- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 288–295.
- Pons A (1981) The history of the mediterranean shrublands. En Di Castri F, DW Goodall & RL Spetch (eds) *Mediterranean-type shrublands*, 131-138. Elseviere, Amsterdam, The Netherlands.
- Rey PJ, Alcántara JM (2000) Recruitment dynamics of a fleshy-fruited plant (*Olea europaea*): Connecting patterns of seed dispersal to seedling establishment. *Journal Ecology*, 88, 622–633.
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rocha OJ, Aguilar G (2001) Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. *American Journal of Botany*, 88, 1600-1606.
- Robledo-Arnuncio JJ, Klein EK, Muller-Landau HC, Santamaría L (2014) Space, time and complexity in plant dispersal ecology. *Movement Ecology*, 2, 16.
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392, 491–494.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow, Bloomfield A, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BR, Walker M, Wall DH (2000) Biodiversity-global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770–1774

- Schupp EW, Jordano P (2011) The full path of Janzen–Connell effects: genetic tracking of seeds to adult plant recruitment. *Molecular Ecology*, 20, 3953–3955.
- Sinnock P (1975) The Wahlund Effect for the Two-Locus Model. *The American Naturalist*, 109, 969, 565-570.
- Smouse PE, Peakall R, Gonzales E (2008) A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology*, 17, 3389–3400.
- Steffan-Dewenter I, Münzenberg U, Bürger C, Thies C, Tscharntke T (2002) Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology*, 83, 1421–1432.
- Storfer A, Murphy MA, Evans JS, Goldberg CS, Robinson S, Spear SF, Dezzani R, Delmelle E, Vierling L, Waits LP (2007) Putting the ‘landscape’ in landscape genetics. *Heredity*, 98, 128–142.
- Torimaru T, Tani N, Tsumura Y, Nishimura N, Tomaru N (2007) Effects of kin-structured seed dispersal on the genetic structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoxyla*. *Evolution*, 61, 1289–1300.
- Uriarte M, Anciaes M, Da Silva MT, Rubim P, Johnson E, Bruna EM (2011) Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92, 924–937.
- Valbuena-Carabaña M, López de Heredia U, Fuentes-Utrilla P, González-Doncel I, Gil L (2010) Historical and recent changes in the Spanish forests: A socio-economic process. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 162, 492-506.
- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation process in a mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology* 10, 275–280.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Female biased sex ratios in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Plant Ecology*, 135, 95–101.

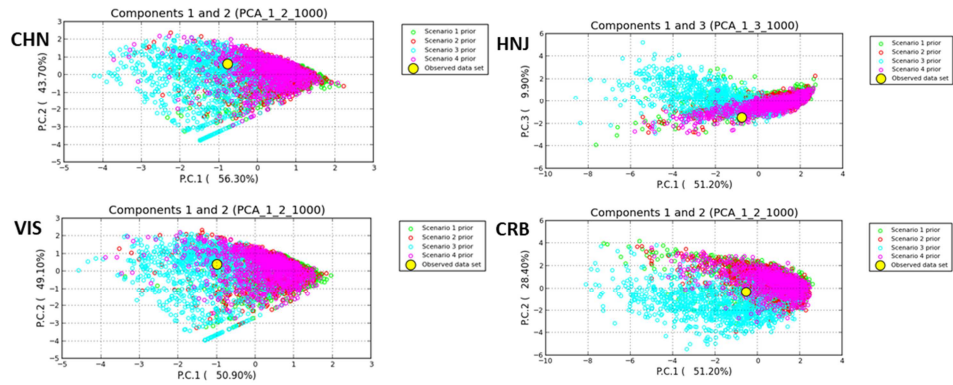
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 76, 134–141.
- Verdú M, García-Fayos P (2002) Ecología reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): un anacronismo evolutivo en el matorral mediterráneo. *Revista Chilena Historia Natural*, 57–65.
- Wang R, Compton SG, Chen XY (2011) Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. *Molecular Ecology*, 20, 4421–4432.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecology & Evolution*, 11, 413–418.

Material suplementario

Tabla S1. Descriptores básicos de diversidad genética para las plantas adultas de los fragmentos no focales en paisajes conectados y aislados de *P. lentiscus*. Se muestran los valores promedio y entre paréntesis los SE excepto para los valores de F_{IS} donde se muestra el intervalo de confianza al 95%. Valores de F_{IS} significativamente diferentes de cero se ilustran en negrita.

	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
Paisajes conectados				
CHN_ <i>neighb1</i>	5.23 (± 2.45)	0.64 (± 0.24)	0.68 (± 0.21)	0.060 (-0.012 – 0.134)
HNJ_ <i>neighb1</i>	4.98 (± 2.38)	0.61 (± 0.28)	0.66 (± 0.22)	0.084 (-0.006 – 0.169)
HNJ_ <i>neighb2</i>	5.24 (± 2.45)	0.62 (± 0.26)	0.65 (± 0.27)	0.050 (-0.025 – 0.120)
HNJ_ <i>neighb3</i>	4.41 (± 1.88)	0.53 (± 0.22)	0.61 (± 0.20)	0.123 (-0.037 – 0.268)
HNJ_ <i>neighb4</i>	5.06 (± 2.48)	0.58 (± 0.23)	0.67 (± 0.26)	0.126 (0.046 – 0.208)
Paisajes aislados				
CRB_ <i>neighb1</i>	5.00 (± 2.09)	0.61 (± 0.21)	0.66 (± 0.23)	0.080 (-0.017 – 0.174)
CRB_ <i>neighb2</i>	4.58 (± 2.15)	0.64 (± 0.31)	0.64 (± 0.25)	-0.004 (-0.183 – 0.133)

Figura S1. Análisis de pre-evaluación de escenarios y valores a priori respecto a los datos observados. Se muestran los dos primeros ejes de un análisis de componentes principales para probar la compatibilidad entre el conjunto de datos observados (punto grande amarillo) y una representación de 1000 datos simulados (puntos pequeños). Nótese que los datos observados se sitúan dentro de la nube de datos simulados.



Discusión general

Entre un 22% y un 56% de las especies de plantas de matorral Mediterráneo dependen de frugívoros para su dispersión (Howe y Smallwood 1982; Jordano 2000). La deforestación, la fragmentación y la defaunación modifican la interacción planta-animal con implicaciones directas para la conservación y regeneración de los bosques (Da Silva y Tabarelli 2000; Galetti *et al.* 2006; Cordeiro *et al.* 2009). En hábitats fragmentados y deteriorados es importante hacer un seguimiento de los servicios ecosistémicos que se producen, ya que las poblaciones podrían llegar a colapsar si estas interacciones dejaran de funcionar cesando el flujo genético. Este impacto humano sobre la pérdida de hábitat y la defaunación es tan fuerte y generalizado en todo el planeta que han marcado una nueva era terrestre denominada Antropoceno (Chapin *et al.* 2000; Duffy 2003; Dirzo *et al.* 2014).

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la dispersión de la especie *Pistacia lentiscus* en condiciones de fragmentación y aislamiento, y se han medido los efectos de la estacionalidad para comprender cómo las variables ambientales influyen en los patrones de dispersión. La dispersión de semillas es un paso crucial en el proceso de regeneración de plantas por lo que en este trabajo se ha comprobado si los dispersores legítimos ingieren semillas de *P. lentiscus* con una técnica no invasiva y se han obtenido datos básicos de diversidad genética de las poblaciones dispersoras del género *Sylvia* (*Sylvia atricapilla* y *S. melanocephala*) encontrándose una menor riqueza genética que la medida en trabajos anteriores en *S. atricapilla* (Segelbacher *et al.* 2008) (Cap. 1).

Si la comunidad de dispersores disminuyera (o en extremo se extinguiera) se podría bloquear el flujo de genes vía semillas y por esto se evaluó la presencia y abundancia de frugívoros dispersores y predadores, sus tasas de dispersión y predación así como el destino final de las semillas dispersadas (lluvia de semillas)

en dos años consecutivos (Cap. 2). Nuestros resultados mostraron una relación positiva entre el año de gran producción de frutos (año vecero) y la abundancia de dispersores. Sorprendentemente las tasas de dispersión de semillas, fueron mayores en fragmentos aislados en la primera temporada, pero no en la segunda temporada. El destino de las semillas dispersadas fue consistente a través de las temporadas sin mostrar diferencias entre fragmentos de distinto tipo, encontrándose la mayoría de las semillas dispersadas bajo el microhábitat lentisco hembra.

La dispersión de semillas es un paso clave en la dinámica de las poblaciones de plantas, que afecta tanto a los procesos demográficos como genéticos (Cordeiro y Howe 2003; Fahrig 2003; Aguilar *et al.* 2006), por lo que el siguiente paso de esta Tesis Doctoral fue descomponer la herencia genética de las semillas dispersadas en sus contribuciones de herencia materna y paterna (Cap. 3). Nuestros resultados mostraron que la dispersión de semillas estuvo espacialmente restringida lo que puede tener un fuerte impacto en la estructura genética, a pesar de que el flujo de polen pueda estar ocurriendo a largas distancias. Este efecto fue más pronunciado en fragmentos pequeños y aislados que en fragmentos conectados.

El aislamiento mantenido en el tiempo con los procesos asociados a él, pueden promover cambios en la estructura genética espacial de las poblaciones (Cornuet *et al.* 2010), no solo la historia reciente ha modelado las poblaciones actuales sino la historia pasada asociada a cambios climáticos históricos. El último trabajo de esta Tesis Doctoral se realizó a escala de paisaje y se evaluó como la fragmentación mantenida en el tiempo ha modelado las poblaciones de estudio (Cap. 4). Se detectó la existencia de estructuración genética asociada a la

fragmentación del paisaje lo que ha provocado cuellos de botella genéticos recientes a pesar de la aparente conectividad entre los fragmentos remanentes.

En los procesos abordados en esta Tesis Doctoral que dependen de la interacción planta-animal hemos detectado efectos de la fragmentación del hábitat en la mayoría de ellos (Fig. 1), determinando finalmente la estructura de las poblaciones a escala del paisaje.

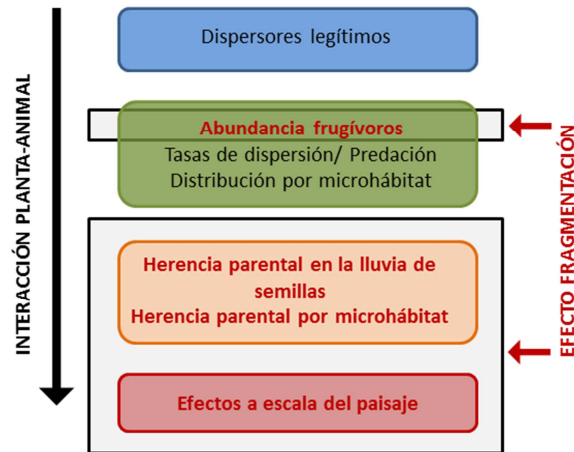


Figura 1. Procesos dependientes de la interacción planta animal, agrupados en los cuatro capítulos de la Tesis y marcados en rojo los procesos afectados por la fragmentación.

Efecto de la fragmentación sobre la interacción planta-animal

Pistacia lentiscus es una de las especies clave de los bosques remanentes de la cuenca del Guadalquivir, de él dependen muchas especies de frugívoros y por esta razón ha sido ampliamente estudiado (Jordano 1987, 1989; Verdú y García-Fayos 1996, 1998, 2000, 2002). En esta Tesis Doctoral nos planteamos el uso de una

técnica novedosa para detectar no solo la identidad de los agentes dispersores de *P. lentiscus* sino demostrar su actividad como dispersores legítimos debido al consumo de semillas. Hemos determinado, además de por los censos realizados (Cap. 2), que las heces que contenían las semillas eran de las especies más importantes de dispersores (Cap. 1), siendo la única excepción *Erithacus rubecula* que por el tamaño de las semillas de *P. lentiscus* normalmente las regurgita (Herrera 1981). Las especies de aves frugívoras más abundantes, detectados por censo, fueron *Sylvia melanocephala*, *S. atricapilla*, *Turdus. merula* y *E. rubecula*. Este resultado concuerda con los estudios tradicionales sobre el proceso de dispersión de semillas en *P. lentiscus* (Jordano 1989, Verdú y García-Fayos 1996). No encontramos un proceso de saciedad ya que las tasas de dispersión entre años son iguales a pesar de que se encontró una abundancia de frugívoros diferente entre temporadas. Tampoco detectamos una limitación de la dispersión de semillas en fragmentos de bosque aislados debido a la fuerte dependencia que las aves dispersoras establecen con los frutos de *P. lentiscus*.

Para las poblaciones de frugívoros, la fragmentación puede estar provocando un empobrecimiento genético en las poblaciones. Nuestros fragmentos de estudio, fundamentalmente los de los paisajes aislados, tienen una matriz bastante impermeable para el flujo de pájaros frugívoros de pequeño y mediano tamaño, así que las diferencias genéticas de los dispersores encontradas podrían atribuirse al aislamiento físico que sufren las aves en los fragmentos aislados de estudio donde se encontraron la mayoría de los excrementos. El aislamiento físico puede promover la residencia de las aves evitando el comportamiento migratorio (Robinson *et al.* 1995), lo que podría aumentar el desarrollo de una estructura de parentesco en la población y en consecuencia aumentar la relación genética entre las aves. Además sabemos que dentro de los

fragmentos el movimiento es limitado debido a que la estructuración genética espacial de las semillas ocurre a menor distancia en los fragmentos aislados que en los conectados (Cap. 4). Además se calcularon valores muy bajos en el número efectivo de las hembras de *P. lentiscus* que también asociamos a este comportamiento territorial que limita el movimiento de los pájaros (Cap. 3). Por lo tanto la fragmentación no solo está aislando a los frugívoros, sino que los está recluyendo en pequeños territorios que favorecerán los grupos familiares, y por tanto determinaran la estructuración genética espacial de las semillas que están dispersando.

Planta de estudio y vecería

La vecería afecta a la producción de frutos de un año a otro siendo los años veceros inusualmente elevados con respecto a la producción de frutos. La fuerte diferencia observada en la producción de frutos (y la cantidad de semillas recuperadas) entre los dos años estudiados es consistente con el comportamiento de la especie (Herrera *et al.* 1998) y reveló un patrón regional ya que la alta producción ocurrió la misma temporada en los cuatro fragmentos de estudio. Esta variación en la disponibilidad de recursos afecta a la alimentación de los frugívoros en la época de otoño e invierno. En esta Tesis, con datos de dos años consecutivos, registramos una diferencia significativa en el número de excrementos de pájaros recogidos con el mismo esfuerzo de muestreo (Cap. 1). También detectamos diferencias en la abundancia de dispersantes entre años (Cap. 2), siendo más elevada en la primera temporada que fue el año de alta producción de *P. lentiscus*. Los dispersores legítimos son especialistas en el momento de la fructificación de *P. lentiscus*, ya que se alimentan principalmente

de sus frutos ricos en lípidos (Jordano 1989). Encontramos diferencias entre los dos tipos de fragmentos (conectados y aislados) en los patrones temporales intra- anuales en las tasas de dispersión que asociamos a diferencias en los recursos alimenticios que las aves tienen disponibles en los bosques (otros frutos y pequeños insectos) y a la llegada de pájaros migratorios, factores por lo cual el agotamiento de los frutos de *P. lentiscus* no ocurre de forma sincrónica en los diferentes fragmentos. La existencia de patrones de variación temporal puede implicar importantes repercusiones para las poblaciones de las plantas, afectando la dinámica de la población y el ensamblaje de la diversidad genética durante la regeneración (Robledo-Arnuncio *et al.* 2014).

Curiosamente, hemos detectado una mayor variación temporal en la herencia materna de las semillas. Este resultado sugiere que las contribuciones de las plantas madre a la lluvia de semillas fueron más variables entre años que las contribuciones de las plantas paternas (Cap. 3), un patrón que se ha detectado en otros estudios (p.e. Iwaizumi *et al.* 2013). Las plantas madres invierten muchos recursos en la producción de frutos en un año vecero y en el siguiente destinarán más recursos al crecimiento vegetativo, en cambio, la producción de polen es menos costosa por lo que los machos pueden no variar la producción de un año a otro siendo la nube polínica más homogénea en el tiempo. Este fenómeno a largo plazo puede promover cambios en la diversidad genética entre los adultos y las semillas (Cap. 4), dependiendo del año de generación de los propágulos, su diversidad genética variará en función de las hembras más productoras de cada año.

Flujo de genes y lluvia de semillas

Nuestros resultados mostraron como el aislamiento físico de los fragmentos podría tener una influencia comparativamente mayor en el flujo de polen que en el flujo de semillas, ya que detectamos valores de N_{ep} más altos en fragmentos conectados que en aislados (Cap. 3). La conectividad física probablemente aumenta el número de machos disponibles para el apareamiento, incrementando el número efectivo de padres favoreciendo la diversidad genética de las siguientes generaciones. En estudios anteriores, Albaladejo *et al.* (2012) reportaron altas tasas de flujo de polen provenientes del exterior del área de estudio aunque los apareamientos más frecuentes de las madres se debieron a sus machos más cercanos, respectivamente. En base a estos resultados el aislamiento físico de los fragmentos parece promover el empobrecimiento genético incluso si las tasas de polen inmigrante no son desdeñables. No esperábamos encontrar estructuración a escala de fragmento por este flujo vía polen en los adultos, pero si era esperable en semillas, ya que al ser una dispersión mediada por animales es heterogénea hacia ciertos microhábitats dentro del paisaje (Schupp *et al.* 2002). A pesar de que el flujo polínico puede ocurrir a larga distancia, la dispersión de semillas es determinante en la estructuración genética debido a la doble carga de material genético que porta.

El destino final de las semillas dispersadas es muy heterogéneo debido a la preferencia de los dispersores de posarse en determinadas perchas (Verdú y García-Fayos 1996). En este trabajo hemos cuantificado una distribución en las semillas dispersadas fuertemente sesgada con la mayoría de las semillas depositadas bajo la planta materna (Fig. 2). La dispersión bajo la planta materna disminuye la viabilidad potencial de las plántulas a través de la competencia con la

madre a través del efecto Janzen-Connell, aunque pueda promover un microhábitat favorable para su establecimiento por amortiguar las altas temperaturas del verano. Esta distribución sesgada la vemos reflejada en la herencia materna de las semillas dispersadas (Cap. 3) donde el parámetro N_{em} se caracterizó por valores bajos que se asocian a la dispersión de semillas bajo el microhábitat de la planta madre. Esta dispersión de semillas mediada por frugívoros a corta distancia estará relacionada con la mayor abundancia de dispersores de pequeño tamaño y por el fuerte comportamiento territorial que pueden limitar los movimientos de dispersión dentro de los fragmentos (Cap. 2). El tamaño de los dispersores es importante para el tiempo de retención de las semillas dentro del cuerpo del dispersor (Jordano 2017). La probabilidad de que dos semillas compartan madre entre las diferentes parcelas dentro de cada fragmento fue muy baja, lo que podría explicarse por el comportamiento de los frugívoros concentrados a distancias muy cortas. Además, a escala de paisaje la conectividad de fragmentos influyó significativamente la paternidad correlacionada (pero no la maternidad correlacionada) en la lluvia de semillas.

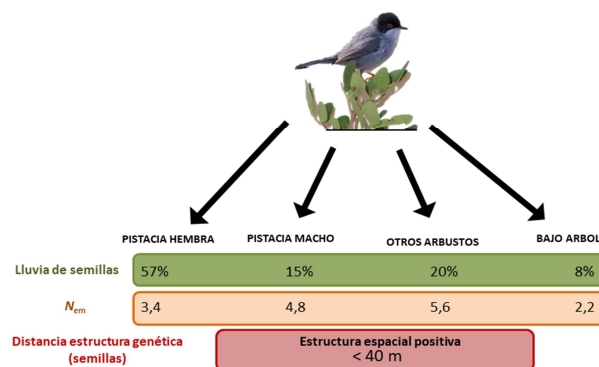


Fig. 2. Resultados obtenidos en los capítulos 2, 3 y 4 de la consecuencia de la lluvia de semillas. En verde el porcentaje medio de número de semillas por microhábitat (Cap. 2), en naranja el número efectivo de madres por microhábitat (Cap.3) y en granate la distancia de estructuración de las semillas (Cap. 4).

Efecto de la fragmentación y ejemplo del fragmento VIS

En resumen, podemos decir que tras el estudio de la dispersión de semillas la interacción planta-animal que establece *Pistacia lentiscus* con los pájaros dispersores no se ve alterada por la fragmentación del hábitat pero si esta alterada en ultima instancia el flujo de genes en los fragmentos remanentes. Si hemos detectado patrones diferentes en el flujo de polen entre tipos de fragmentos. Para las plantas que dependen de los vertebrados para la dispersión, la extinción o reducción de la abundancia en los fragmentos aislados puede reducir las posibilidades de dispersión (Cordeiro y Howe 2003; Uriarte *et al.* 2011). La extrema presión antropogénica puede llegar a aislar los fragmentos y restringir los microhábitats seguros dentro de los bosques, fomentando la formación de grupos genéticos. Al aislarse los fragmentos no sólo la nube de polen percibida por las hembras es menos diversa, sino también, debido probablemente a la escasez de lugares adecuados para el reclutamiento, hay una distribución heterogénea de semillas aumentado la competencia entre ellas que promueve el empobrecimiento genético.

En esta Tesis Doctoral hemos encontrado un claro ejemplo de aislamiento y alteración del hábitat en uno de los fragmentos de estudio, el fragmento VIS (pág. 15), en el que por sus características físicas de aislamiento y estado de conservación se promueve cada vez más el deterioro y el empobrecimiento. Este fragmento no tiene barreras físicas por desniveles cercanos ni árboles que bloquen o disminuyan el viento que pueda llevarse el polen sin ser efectivo para las hembras, además, carece casi en su totalidad de cobertura arbórea que proteja del lavado de polen durante la lluvia. En este fragmento detectamos una diferenciación genética temporal más fuerte para los padres reproductores que

para las madres, que es la tendencia opuesta en el resto de los fragmentos. Además, tiene razón de sexos diferente al resto de fragmentos estudiados, con una mayor proporción de machos, lo que conduce a una fuerte variación en la fecundidad masculina por la fuerte competencia por las flores femeninas, como se ha demostrado para las especies en otros paisajes extremadamente fragmentados (Albaladejo *et al.* 2012). Es un fragmento que no tiene conexión cercana a otros fragmentos y de manera inesperada presenta valores de riqueza genética más altos en las semillas que en los adultos establecidos (aunque sin diferencias significativas) y la estructuración genética espacial positiva es hasta los 70 m, mayor que en el resto de los fragmentos que la estructuración espacial de las semillas es a 40 m.

Otro hándicap para *Pistacia lentiscus* es la supervivencia de las plántulas en los fragmentos de estudio. Hemos encontrado un número sorprendentemente bajo de plántulas en los bosques, por lo que la regeneración se puede estar bloqueando por las condiciones extremas que sufren estos bosques. Hay muy baja tasa de supervivencia en las plántulas (Verdú y García-Fayos 2002), y se han detectado efectos negativos de la paternidad correlacionada en el tiempo de emergencia de las plántulas y la supervivencia de estas (Nora *et al.* 2016), y al no existir banco de semillas de un año a otro complica la germinación en condiciones más idóneas.

Futuras líneas de investigación

Esta Tesis doctoral estudia la lluvia de semillas a escala de paisaje y a escala de microhábitat, aunque esta última aproximación haya quedado menos

desarrollada en el trabajo debido al escaso número de semillas disponible uno de los años de estudio entre años imposibilitando el estudio interanual a escala de microhábitat. El siguiente trabajo que desarrollaremos será un estudio de los parámetros de diversidades α , β y γ con las semillas del primer año de estudio (año vecero) para medir el efecto de la fragmentación a distintas escalas de microhábitat y en distintos fragmentos, es importante conocer las diferencias a nivel de microhábitat para saber cómo afecta la posición de los parentales para la estructuración genética de las futuras progenies. Para este trabajo me han concedido la ayuda “Becas Iberoamérica. Santander investigación”, convocatoria 2017-2018 para realizarlo con la ayuda de la Dra. García en el CIBIO-Universidad de Oporto.

Otra línea de investigación que contemplaba la Tesis y para la que se obtuvieron datos y se realizaron parte de los análisis fue medir como varía la carga epigenética de las plantas adultas que crecen en fragmentos con diferente grado de aislamiento. Trabajos previos realizados en el grupo de investigación indican que los factores epigenéticos son importantes en el desempeño de los organismos (Albaladejo *et al.*, datos sin publicar). A través de un experimento en invernadero y la aplicación de la técnica de polimorfismo amplificado susceptible a la metilación (MSAP), hemos comparado la variación genética y hereditaria epigenética de plantas madre seleccionadas y su descendencia producida naturalmente en una población silvestre de *Pistacia lentiscus*. Los resultados obtenidos revelaron niveles similares de variación genética y epigenética hereditaria en la descendencia. La distancia espacial entre las plantas madre estudiadas se correlacionó significativamente con la distancia epigenética de su descendencia. Los niveles de metilación del ADN de la descendencia estuvieron negativa y significativamente relacionados con las mediciones de la biomasa de

forma que plántulas relativamente hipermetiladas presentaron un menor desarrollo. Este estudio proporciona un ejemplo de herencia epigenética transgeneracional en una especie de planta de vida larga, en la que los patrones de metilación del ADN en la descendencia podrían estar influenciado por las condiciones naturales de estrés materno. Estos resultados tan interesantes nos hicieron comenzar otros trabajos relacionados en campo para comprobar como la carga epigenética variaba según la localización del individuo, la cercanía de otras especies, las condiciones del suelo o el sexo. Por falta de tiempo aún no ha sido concluido y no se ha podido incluir en esta Tesis Doctoral.

Referencias

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Albaladejo RG, González-Martínez SC, Heuertz M, Vendramin GG, Aparicio A (2009) Spatiotemporal mating pattern variation in a wind-pollinated Mediterranean shrub. *Molecular Ecology*, 18, 5195–5206.
- Albaladejo RG, Guzmán B, González-Martínez SC, Aparicio A (2012) Extensive pollen flow but few pollen donors and high reproductive variance in an extremely fragmented landscape. *Plos One*, 7:e49012.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, Mack M, Díaz S (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405, 234-242.
- Cordeiro NJ, Howe HF (2003) Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *Proceeding and National Academy of Science of USA*, 100, 14052–14056.
- Cordeiro NJ, Ndangalasi HJ, McEntee JP, Howe HF (2009) Disperser limitation and recruitment of an endemic African tree in a fragmented landscape. *Ecology*, 90, 1030–1041.
- Cornuet JM, Ravigné V, Estou A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite. *BMC Bioinformatic*, 11, 401.
- Da Silva MT, Tabarelli M (2000) Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. *Nature*, 404, 72-74.
- Dirzo R, Young HS, Galletti M, Ceballos MG, Nick JB, Collen B (2014) Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345, 401–406.
- Duffy JM (2003) Biodiversity loss, trophic skew and ecosystem functioning. *Ecology Letters*, 6, 680–687.

- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 487–515.
- Galetti M, Donatti CI, Pires AS, Guimarães JAR, Jordano P (2006) Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: The combined effects of defaunation and forest fragmentation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151, 141–149.
- Herrera CM (1981) Fruit food Robins wintering in southern Spanish Mediterranean scrubland. *Bird Study*, 28, 115–122.
- Herrera CM, Jordano P, Guitián J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept. *American Naturalist*, 152, 576–594.
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13, 201–228.
- Iwaizumi MG, Takahashi M, Isoda K, Austerlitz F (2013) Consecutive five-year analysis of paternal and maternal gene flow and contributions of gametic heterogeneities to overall genetic composition of dispersed seeds of *Pinus densiflora* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 100, 1896–1904.
- Jordano P (1987) Avian fruit removal: effects of fruit variation, crop size, and insect damage. *Ecology*, 68, 1711–1723.
- Jordano P (1989) Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos*, 55, 375–386.
- Jordano P (2000) Chapter 6: Fruits and frugivory. In: Fenner, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in natural plant communities*. 2nd Edition. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK. Pages 125–166.
- Jordano P (2017) What is long-distance dispersal? And a taxonomy of dispersal events. *Journal Ecology*, 105, 75–84.

- Nora S, Aparicio A, Albaladejo RG (2016) High Correlated Paternity Leads to Negative Effects on Progeny Performance in Two Mediterranean Shrub Species. *PLoS ONE*, 11, e0166023.
- Parejo-Farnés C, Robledo-Arnuncio JJ, Albaladejo RG, Pérez-Rubio E, Aparicio A (2017) Effects of habitat fragmentation on parental correlations in the seed rain of a bird-dispersed species. *Tree Genetics Genomes* 13:17.
- Robledo-Arnuncio JJ, Klein EK, Muller-Landau HC, Santamaría L (2014) Space, time and complexity in plant dispersal ecology. *Movement Ecology*, 2, 16.
- Schupp EW, Milleron T, Russo S (2002) In *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation*, eds Levey DJ, Silva WR, Galetti M (CAB International, Wallingford, UK), 19–33.
- Segelbacher G, Rolshausen G, Weis-Dootz T, Serrano D, Schaefer HM (2008) Isolation of 10 tetranucleotide microsatellite loci in the blackcap (*Sylvia atricapilla*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1108–1110.
- Uriarte M, Anciaes M, Da Silva MT, Rubim P, Johnson E, Bruna EM (2011) Disentangling the drivers of reduced long-distance seed dispersal by birds in an experimentally fragmented landscape. *Ecology*, 92, 924–937.
- Verdú M, García-Fayos P (1996) Nucleation process in a Mediterranean bird-dispersed plant. *Functional Ecology*, 10, 275–280.
- Verdú M, García-Fayos P (1998) Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 76, 134-141.
- Verdú M, García-Fayos P (2000) The effect of deceptive fruits on predispersal seed predation by birds in *Pistacia lentiscus*. *Plant Ecology*, 156, 245-248.
- Verdú M, García-Fayos P (2002) Ecología reproductiva de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae): un anacronismo evolutivo en el matorral mediterráneo. *Revista Chilena Historia Natural*, 57–65.

Conclusiones

1. A pesar de la dificultad de recuperar secuencias diana de ADN de muestras fecales de más de 200 pb debido a la degradación del ADN, se ha determinado con éxito la identidad de los actuales dispersores de *P. lentiscus* en el conjunto de fragmentos estudiados y se obtuvieron parámetros básicos de la diversidad genética para poblaciones de dos dispersores de semillas más importantes (*Sylvia atricapilla* y *S. melanocephala*) encontrándose valores más bajos que los medidos en otros estudios.
2. Se encontró una mayor abundancia de dispersores de semillas en los fragmentos de bosques conectados que en los aislados en el año vecero. Sin embargo, los pequeños dispersores de semillas, que son responsables de la mayoría de los eventos de dispersión, no mostraron diferencias en la abundancia entre años. Se detectó una mayor abundancia de predadores de semillas en fragmentos aislados.
3. No se detectó ningún efecto de fragmentación en las tasas de dispersión de semillas entre diferentes tipos de fragmentos pero si a escala temporal. A pesar del vínculo directo a través de las interacciones planta-frugívoro, los efectos de la fragmentación en frugívoros y plantas estuvieron aparentemente desacoplados en el sistema de estudio. Estas respuestas disociadas parecen principalmente debido a la alta dependencia de las aves con los frutos de *P. lentiscus*.
4. El destino de la lluvia de semillas fue constante entre tipos de fragmentos, siendo el microhábitat bajo lentisco hembra el destino final de casi el 60% de las semillas dispersadas.
5. Las contribuciones maternas de las semillas dispersadas tienden a ser genéticamente más heterogéneas en el tiempo que las contribuciones paternas que son más constantes.
6. El número efectivo de madres (N_{em}) fue en general menor que el número efectivo de padres (N_{ep}). Además el número efectivo de madres es aparentemente insensible al grado de fragmentación.

7. Es más probable que dos semillas compartan madres cuando éstas se encuentran bajo plantas de *Pistacia* hembra o bajo el dosel de árboles, probablemente debido a la preferencia de las aves para comer repetidamente en las mismas perchas.
8. Entre diferentes cohortes no hay diferencias en la riqueza genética en la lluvia de semillas respecto a los adultos establecidos. La estructuración genética en los fragmentos de las semillas dispersadas ocurre a distancias espaciales de 40 m.
9. Existe un efecto directo de la fragmentación y separación en diferentes fragmentos con la formación de diferentes grupos genéticos y cuellos de botella recientes asociados a esta fragmentación del paisaje.

