

# ECOLOGÍA TRÓFICA DE LAS PALOMAS ENDÉMICAS DE LAS ISLAS CANARIAS (*COLUMBA BOLLII* Y *C. JUNONIAE*) Y DISPERSIÓN DE SEMILLAS EN LA LAURISILVA DEL PARQUE NACIONAL DE GARAJONAY (LA GOMERA)

PATRICIA MARRERO<sup>1</sup>, VICENTE M. CABRERA<sup>2</sup>, DAVID P. PADILLA<sup>1</sup> Y MANUEL NOGALES<sup>1</sup>

## RESUMEN

El presente proyecto comprende el estudio sistemático de la ecología trófica de las palomas turqué (*Columba bollii*) y rabiche (*C. junoniae*), especies endémicas de las Islas Canarias. Estas aves frugívoras habitan en simpatria en los relictos bosques de laurisilva. El estatus de amenaza de estas especies y su conducta evasiva, supone que el manejo de ejemplares y las observaciones de campo resulten muy complicados. Por tanto, en este estudio se aborda el desarrollo de técnicas moleculares usando muestras no invasivas, plumas y excrementos, procedentes de diferentes individuos de cada una de las dos especies. En primer lugar, se analizó la variabilidad inter e intraespecífica de las secuencias de la región control del ADN mitocondrial de las poblaciones de palomas presentes en el Parque Nacional de Garajonay en la isla de La Gomera. Posteriormente, los excrementos (similares morfológicamente), fueron identificados a nivel de especie usando la técnica molecular de RFLP. Además, debido a la baja concentración del ADN fecal y la presencia de inhibidores en las muestras, se diseñó un método de extracción del ADN que permitió el incremento de la tasa de amplificación. Este método fue utilizado por vez primera, para la extracción y amplificación del ADN de las palomas presente en la superficie de las semillas regurgitadas. Una vez identificadas las muestras fecales, se procedió al análisis microhistológico de sus contenidos. Para ello, fue necesaria la elaboración de una extensa colección de referencia de las epidermis de las hojas, flores, frutos y semillas de las principales especies de plantas presentes en el diverso bosque de laurisilva, y que pudieran ser potencialmente consumidas por las palomas. Se realizó una clave de identificación de las epidermis foliares y de frutos de las más de veinte especies arbóreas presentes en los bosques de laurisilva. Por último, aplicando esta metodología, se estudia la distribución de las palomas turqué y rabiche en el Parque Nacional de Garajonay, la descripción de la dieta y su variación espacio-temporal, la relación entre el consumo y la disponibilidad de frutos y el papel dispersor o depredador de las palomas sobre las semillas.

**Palabras clave:** colúmbidos, dieta, dispersión/depredación de semillas, extracción ADN, microhistología, muestras no invasivas, RFLP.

<sup>1</sup>Grupo de Ecología y Evolución en Islas (IPNA-CSIC), 38206 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

<sup>2</sup>Departamento de Genética (Facultad de Biología), Universidad de La Laguna, 38271 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias.

pmarrero@ipna.csic.es, vcabrera@ull.es, dpadilla@ipna.csic.es, mnogales@ipna.csic.es

## SUMMARY

This project involves the systematic study of the feeding ecology of the endemic Bolle's pigeon (*Columba bollii*) and white-tailed laurel pigeon (*C. junoniae*) of Canary Islands. These frugivorous birds live in sympatry in the relict laurel forests. The status of threatened species and their avoidance behaviour, assumes that the management of specimens and field observations to be difficult. Therefore, this study deals with the development of molecular techniques using noninvasive samples, feathers and faeces from different individuals of each species. First, we analyzed the inter- and intraspecific variation of the Control Region sequences of DNA mitochondrial from pigeon populations found in Garajonay National Park (La Gomera). Subsequently, faeces (similar morphologically) were identified to species level using the RFLP test. Moreover, due to the low concentration of faecal DNA and the presence of inhibitors in samples, we designed a DNA extraction method that allowed the increase in the amplification rate. This method was used by first time for the extraction and amplification of pigeons DNA, which is on surface of the regurgitated seeds. Once faecal samples were identified, microhistological analysis was applied. An extensive reference collection of the epidermis of leaves, flowers, fruits and seeds of major plant species, which could be potential food items by pigeons, was elaborated. We performed an identification key of the leaf and fruit epidermis of over twenty tree species present in the laurel forests. Finally, applying this methodology, we study the distribution of Bolle's pigeon and white-tailed laurel pigeon in the Garajonay National Park, the description of their diet and spatio-temporal variation, the relationship between consumption and availability of fruits and the role of pigeons as disperser or predator of seeds.

**Key words:** columbids, diet, dispersal / predation of seeds, DNA extraction, microhistological analysis, noninvasive samples, RFLP.

## INTRODUCCIÓN

El estatus de las palomas turquí (*Columba bollii*, GODMAN 1872) y rabiche (*C. junoniae*, HARTERT 1916) como endemismos íntimamente ligados a un hábitat relictos sugiere que deben tener un papel importante en la estructura, composición y dinámica de los bosques de laurisilva de las Islas Canarias (Tenerife, La Palma, La Gomera y El Hierro). Se han realizado diversas investigaciones sobre la distribución, estado de las poblaciones (EMMERSON *et al.* 1986; MARTÍN *et al.* 2000), y reproducción (MARTÍN *et al.* 1993; HERNÁNDEZ & MARTÍN 1994; HERNÁNDEZ *et al.* 1999), pero la dieta es uno de los aspectos más desconocidos de la biología de las palomas (ver MARTÍN *et al.* 2000).

La información obtenida por varios autores, mediante la observación de las aves en su medio natural y a través del análisis de algunos contenidos estomacales de ejemplares muertos o de excrementos, señala que estas palomas son especies básicamente frugívoras, aunque también consumen

hojas y flores, tanto de árboles, como de arbustos y herbáceas (MARTÍN *et al.* 2000 y referencias citadas). No obstante, y a pesar de estos valiosos datos de historia natural, se carece de un estudio estacional y cuantitativo sobre los hábitos alimentarios de las palomas endémicas de Canarias.

La conducta evasiva y reservada de estas aves, junto a la escarpada orografía donde se localizan los densos bosques de laurisilva, dificulta en gran medida el trabajo con estas especies, de modo que las denominadas muestras no invasivas (plumas, excrementos, cáscaras de huevo, etc.) colectadas sistemáticamente en el campo, resultan de gran utilidad para desarrollar estudios ecológicos (ver TABERLET *et al.* 1999). Los excrementos en particular, nos informan de la dieta, pero también de la distribución, área de campeo y selección del hábitat (KOHN & WAYNE 1997; EGGERT *et al.* 2005). Sin embargo, debido a la similitud morfológica de los excrementos de turquí y rabiche, es necesario primero aislar y amplificar el ADN fecal para identificarlos espe-

cíficamente, para posteriormente analizar el contenido de las heces a través del desarrollo de una metodología que permita evaluar la importancia espacio-temporal de los distintos recursos que constituyen la dieta. El carácter simpátrico de estas palomas aporta un valor añadido a los resultados, puesto que ayudarán a comprender cómo dos especies frugívoras coexisten en un mismo hábitat.

### Objetivos

En el presente trabajo se aborda el estudio de la ecología trófica de las palomas endémicas de las Islas Canarias mediante el planteamiento de los siguientes objetivos:

- 1) Identificar los excrementos de turqué y rabi-che a nivel específico mediante técnicas moleculares. Este trabajo requiere (i) la obtención de secuencias de la Región Control del ADN mitocondrial, (ii) la identificación de las secuencias de ADN polimórficas a nivel inter- e intraespecífico, (iii) optimizar la extracción y amplificación del ADN procedente de las muestras fecales y (iv) la distinción de las secuencias del ADN fecal de ambas especies, según el patrón de corte de enzimas de restricción.
- 2) Elaborar una colección de referencia de la epidermis de las hojas, frutos y semillas de los árboles, arbustos y herbáceas presentes en las áreas de estudio.
- 3) Describir la dieta de las palomas endémicas canarias, cuantitativa y cualitativamente, y su variación espacio-temporal a lo largo de un año, mediante el análisis microhistológico de los excrementos ya identificados genéticamente a nivel específico.
- 4) Determinar la relación entre el consumo y la disponibilidad de frutos en el bosque de laurisilva del Parque Nacional de Garajonay.
- 5) Comprobar el estado de las semillas encontradas en los excrementos y definir la importancia de las palomas como dispersoras o depredadoras de semillas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

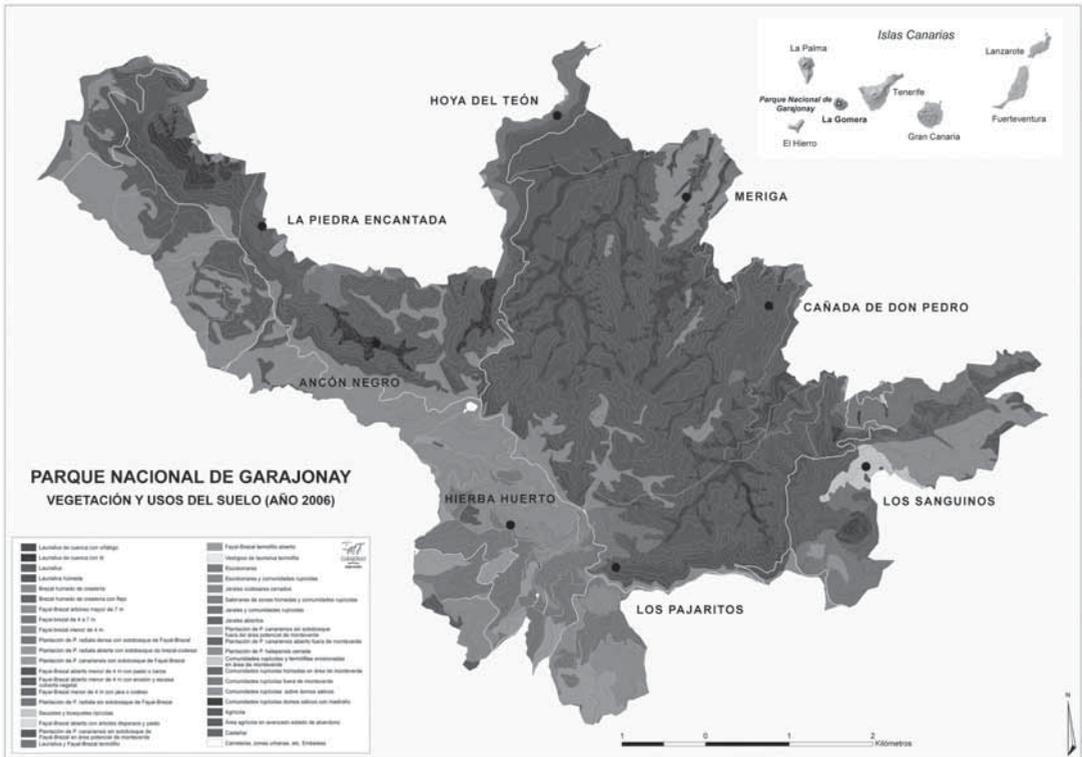
### Áreas de estudio

La Gomera se localiza a unos 30 km del suroeste de la isla de Tenerife y a unos 333 km de África (28°07' N, 17°14' O). Tiene un área de 369 km<sup>2</sup> y una altitud máxima de 1.487 m s.n.m. (Alto Garajonay). Después de La Palma, es en La Gomera donde se han registrado los valores más elevados de abundancia de ambas especies de palomas (2,87 aves/10' para turqué y 0,77 aves/10' para rabi-che, MARTÍN *et al.* 2000).

El trabajo de campo se realizó, entre mayo de 2007 y mayo de 2008, en ocho áreas localizadas en el interior del Parque Nacional de Garajonay: en el Norte (La Hoya del Teón y Meriga), al Sur (Los Pajaritos y Hierba Huerto), al Este (Los Sanguinos y Cañada de D. Pedro) y al Oeste (Ancón Negro y La Piedra Encantada) (Figura 1). Aunque todas las estaciones de muestreo presentan una vegetación de laurisilva, ésta varía en composición de especies según su orientación y topografía. En conjunto, las especies más abundantes y ampliamente distribuidas son el laurel *Laurus azorica*, el acebiño *Ilex canariensis* y la faya *Myrica faya*, mientras que el naranjero salvaje (*I. perado*) y el barbusano (*Apollonias barbujana*) son las más escasas y de distribución más restringida.

### Colecta de muestras

En cada una de las áreas de muestreo se colectaron plumas y excrementos de palomas dos veces en cada estación del año. Las plumas mudadas de diferentes individuos de las dos especies fueron utilizadas en el estudio genético de la diversidad inter- e intraespecífica de las poblaciones de palomas. Los excrementos, destinados al análisis de la dieta previa identificación molecular, fueron colectados cerca de bebederos o posaderos. Se recogieron únicamente los excrementos recientes para asegurar que correspondían a la estación del año en estudio, retirando los antiguos. La pseudo-replicación en el muestreo se evitó tomando un máximo de 10 muestras por posadero. Los excrementos fueron etiquetados individualmente y almacenados a -20°C. Por otra



**Figura 1.** Mapa de vegetación del Parque Nacional de Garajonay, mostrando la localización de las ocho áreas de estudio. Fuente bibliográfica: PN Garajonay.

**Figure 1.** Vegetation map of Garajonay National Park, showing the location of the eight study areas. Bibliographical source: Garajonay NP.

parte, semillas presumiblemente regurgitadas por las palomas fueron colectadas con la finalidad de identificar el ADN de estas aves que pudiera quedar adherido a la testa de las semillas. Finalmente, se tomaron muestras de hojas y frutos de la mayoría de las especies de plantas presentes en las áreas de estudio para la elaboración de la colección microhistológica de referencia.

**Identificación molecular de los excrementos**

Inicialmente, y con la finalidad de identificar molecularmente los excrementos de las dos especies de palomas, fue necesario obtener las secuencias del ADN mitocondrial y determinar su variación inter- e intraespecífica entre poblaciones. Para ello, se extrajo el ADN procedente del tejido muscular de un individuo de cada especie, mediante el pro-

cedo de la proteinasa K fenol-cloroformo (GILBERT *et al.* 2004). Los ejemplares fueron cedidos por el Museo de la Naturaleza y el Hombre de Santa Cruz de Tenerife. La amplificación de las secuencias completas de la Región Control (RC) y sus regiones flanqueantes (ARNt-Glu y ARNt-Phe) se realizó usando el sistema de PCR Long Expand (Boehringer Mannheim, Germany) y cebadores o “primers” muy conservados (ND6, 5'-CCCAAAAAAAGCACAAAATAAGTCAT-3'; CL4, 5'-CTTGGCATCTTCAGTGCCATGCT-3'), diseñados a partir del alineamiento, con el programa Clustal W (THOMPSON *et al.* 1994), de las secuencias de aves disponibles en el GenBank. Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 60°C y 2 min a 72°C. La longitud de las secuencias obtenidas fue de 1.902 pares de bases (pb) para *C. bollii* y 1.896 pb para *C. junoniae*. Estas

secuencias fueron depositadas en el GenBank con los números de Acceso: DQ229348 (*C. bollii*) y DQ229349 (*C. junoniae*).

La diversidad genética de las poblaciones de palomas fue determinada a través del estudio de los dominios I y II de la RC, los cuales contienen las principales mutaciones que definen la diversidad haplotípica entre especies e individuos (BROWN *et al.* 1986). Se utilizó el ADN extraído de las plumas mudadas de la cola de diferentes individuos de cada especie (GILBERT *et al.* 2004), que habían sido colectadas durante los trabajos de campo. Estas plumas, son fácilmente identificadas a nivel específico: la paloma turquí tiene una cola de color gris oscuro con una banda subterminal gris pálida, mientras que la paloma rabiche tiene una cola gris con una banda terminal blanquecina. Los primers utilizados para este estudio fueron: CR3F, 5'-CCCCCTGCAC-TTGTGTCCTA-3'; CR2R, 5'-CGATCACGGACT-GAAATGGTG-3', con las siguientes condiciones de PCR: 35 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 58°C y 30 s a 72°C. El fragmento obtenido para *C. bollii* fue de 637 pb y para *C. junoniae* de 638 pb.

El ADN de las aves presentes en los excrementos aparece frecuentemente fragmentado y en baja concentración, siendo recomendable la amplificación de fragmentos cortos (100-300 pb) (EGGERT *et al.* 2005). Por tanto, una vez analizada la variación inter- e intraespecífica en las secuencias anteriores (637-8 pb), se diseñaron primers internos para la obtención de secuencias de 196 pb para *C. bollii* y 197 pb para *C. junoniae* (RA3, 5'-AAACCAGCAACTC-GACGCGAGA-3'; CR2R) con las condiciones de 35 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 58°C y 15 s a 72°C.

No obstante, el principal problema que detectamos en la amplificación del ADN fecal no fue la cantidad de ADN, sino la inhibición de la *Taq* polimerasa. Las palomas endémicas de la Macaronesia son especies frugívoras, que consumen frutos y hojas según variaciones temporales y espaciales en la disponibilidad de los recursos (MARTÍN *et al.* 2000; OLIVEIRA *et al.* 2002; MARRERO *et al.* 2004). Por tanto, sus excrementos podrían contener inhibidores vegetales en cantidades suficientes como para limitar las reacciones de PCR (KHANUJA *et al.* 1999). Para reducir

este efecto, se desarrolló una metodología para optimizar el proceso de extracción del ADN que se describe con detalle en el siguiente apartado, y que fue además empleado para extraer el ADN de las palomas depositado sobre la superficie externa de semillas regurgitadas.

Por otra parte, para abordar el estudio de la dieta de las dos especies de palomas se requiere la colección e identificación molecular de un número considerable de muestras fecales. Por ello, para ahorrar en tiempo y en costes de secuenciación, se utilizó la técnica de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") sobre los fragmentos cortos. La enzima de restricción *HaeIII* (5'-GG/CC-3'), proporcionó un modelo de corte adecuado para la identificación de las secuencias (Gene Runner 3.05, Hastings Software, Inc.). Además, como controles positivos en los experimentos, se utilizaron muestras de excrementos y plumas procedentes de tres individuos de turquí y cinco de rabiche mantenidos temporalmente en cautividad en centros de rehabilitación de la fauna silvestre de La Palma y Gran Canaria. La ausencia de contaminación se evaluó mediante controles negativos. Los productos digeridos con la enzima *HaeIII* se visualizaron en gel de acrilamida (10%) y tinción con bromuro de etidio.

#### Extracción de ADN a partir de semillas regurgitadas y excrementos

El procedimiento de extracción del ADN consistió en envolver cada semilla, presumiblemente regurgitada por las palomas, en un papel de filtro de grosor fino (de unos 2 x 2 cm), añadiendo 50-100 µl de tiocianato de guanidina (GuSCN) para que el papel se adhiriera a la testa. El GuSCN además, provoca la lisis celular al desnaturalizar las proteínas, lo que significa que las moléculas de ADN quedan libres. Después de 30 min-1 h, el papel se transfirió a un tubo eppendorf (0,6 ml) con 100-150 µl de GuSCN (BOOM *et al.* 1990). Este tubo previamente perforado por el fondo con una aguja estéril, se introdujo en otro eppendorf (1,5 ml) para ser centrifugado a 13.000 x g durante 10 min con el fin de recuperar la fase acuosa del papel, a la que se añadió 15 µl de sílica para limpiar y concentrar el extracto de ADN (BOOM *et al.* 1990; HÖSS & PÄÄBO 1993). La mezcla se man-

tuvo a temperatura ambiente con vórtex cada 15 min. Después de centrifugar durante 2 min a  $13.000 \times g$ , el sobrenadante fue desechado y el sedimento de sílica fue lavado con 200  $\mu$ l de solución tampón (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl y 50% etanol) y 1 ml de éter:cloroformo (v: v). Finalmente, el ADN fue extraído a 60°C durante 10 min en 50  $\mu$ l TE pH 8,0.

La eficiencia de este nuevo protocolo fue comparada con la del método usado comúnmente, en el cual se emplean trozos de excremento o bien el excremento completo durante la extracción del ADN (“extracción directa”). Para ello, cada muestra fecal se dividió en dos porciones iguales en peso. De una porción sólo se usó la superficie externa, envolviendo el trozo en papel de filtro con GuSCN y extrayendo luego el ADN del papel, tal como se hizo con anterioridad para las semillas. Por el contrario, la otra porción se usó directamente en la extracción: después de incubarla durante 30 min en GuSCN, se centrifugó durante 2 min para eliminar los residuos fecales. El sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf y se siguió el mismo protocolo anterior para los extractos procedentes de ambas porciones. Los instrumentos de laboratorio se esterilizaron entre muestras y todo el proceso se realizó en una habitación pre-PCR independiente para evitar la contaminación.

La cantidad y calidad del ADN obtenido fue medido mediante espectroscopía de absorción (Ultraspex 1100 *pro*, Amersham Pharmacia Biotech). La pureza de los ácidos nucleicos se determinó mediante las medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm de longitud de onda. Un ratio  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  indica bajas cantidades de contaminación proteica en las muestras. La concentración de ADN se expresó en  $\mu$ g/100 mm<sup>2</sup> de área para las semillas y como  $\mu$ g/100 mg de peso fresco para las muestras fecales. La eficiencia en la amplificación del ADN se testó sobre un pequeño fragmento de 196-7 pb de la Región Control del ADNmt de *C. bollii* y *C. junoniae*.

### Colección microhistológica de referencia

El número y morfología de los distintos tipos de células especializadas presentes en la epidermis

vegetal revelan un importante rango de funciones y adaptaciones a las condiciones ambientales (GLOVER 2000), además de ser características que ayudan a identificar a las especies de plantas. En todas las estaciones del año, se colectaron muestras de las diferentes partes vegetales de cada una de las especies de árboles, arbustos y herbáceas del bosque de laurisilva de las islas de Madeira y Canarias. Las muestras se almacenaron en seco o bien congeladas a -20°C. La preparación de la colección de referencia consistió en hidratar las muestras y bajo una lupa binocular, separar el tejido epidérmico del haz y envés de las hojas y de los frutos, mediante ligeros raspados con el borde afilado de un bisturí sobre la superficie de la muestra. Los fragmentos obtenidos se montaron en glicerina sobre un portaobjetos perfectamente etiquetado, sellando el cubreobjetos con barniz de uñas.

Las características morfológicas de la epidermis se analizaron y dibujaron a escala, usando un microscopio óptico Leica DMLB con contraste interferencial Nomarski, y una cámara lúcida a 400X. Además, se usó el programa analySIS® (SOFT IMAGING SYSTEM GMBH 2002) para estimar el tamaño (media y desviación estándar) por unidad de área de las células, tricomas, pelos glandulares y estomas de especies pertenecientes al mismo género. A partir de toda la información obtenida, se elaboraron dos claves anatómicas de referencia, en base a las formas y dimensiones de las estructuras celulares de la epidermis foliar de los árboles y la de los frutos, respectivamente. Los nombres científicos de las plantas y autorías siguen la clasificación de HANSEN & SUNDING (1993) e IZQUIERDO *et al.* (2001).

### Análisis de la dieta

Después de determinar molecularmente la especie de procedencia, el contenido de los excrementos fue analizado para describir la dieta de las palomas turquí y rabiche. Los fragmentos epidérmicos de las plantas consumidas por las palomas fueron identificados mediante la comparación con la colección microhistológica de referencia. El análisis consistió en disgregar cada excremento en unos 500  $\mu$ l de agua. De esta mez-

cla, se tomaban 2 gotas para ser examinadas con un microscopio óptico bajo el objetivo de 10x. Este proceso se repitió 5 veces para cada muestra, analizándose 10 campos ópticos seleccionados al azar para cada preparación y por tanto, haciendo un total de 50 campos ópticos/muestra. El material que podía ser identificado a nivel macroscópico, principalmente semillas intactas y hojas enteras, era inicialmente determinado mediante la comparación con los especímenes depositados en un herbario de referencia. Dicha identificación era posteriormente verificada microscópicamente cuando fue necesario. Su cuantificación se realizó mediante una estima del porcentaje de volumen ocupado en el excremento, y transformado a campos ópticos mediante una simple regla de tres, considerando que el volumen total corresponde a 50 campos ópticos. Esto permitió obtener una unidad común para comparar los datos.

### Disponibilidad de frutos

Para determinar la relación entre el consumo de frutos por las palomas y la disponibilidad de frutos en el bosque, se realizó un estudio sobre la composición, fenología y abundancia relativa estacional de las especies arbóreas más comunes en cada una de las áreas de estudio. El método consistió en recorrer a pie, dos veces en cada estación del año, un transecto de unos 500 m de largo, en cada una de las áreas de estudio. Se registró la presencia/ausencia de flores y frutos en los árboles situados hasta los 2 m desde uno de los lados del transecto. Además, se estimó la proporción de frutos verdes, maduros o pasados, en la copa de los árboles mediante el uso de prismáticos. Es obvio que los resultados obtenidos en este tipo de muestreo no reflejan la producción real de frutos en toda la extensión del hábitat (BLAKE *et al.* 1990). Sin embargo, proporcionan una estimación aproximada de la cantidad de frutos disponibles para las palomas turquí y rabiche en el hábitat de estudio.

### Análisis de datos

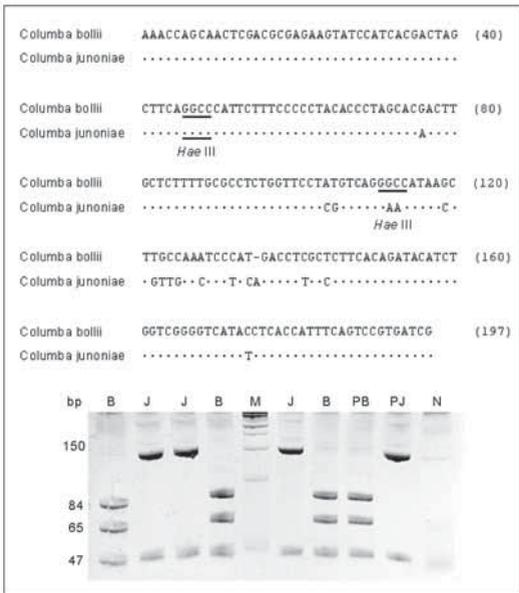
Los datos de la dieta se presentan de dos formas: 1) como el porcentaje de campos ópticos que contenían una determinada especie vegetal res-

pecto al total de campos ópticos estudiados (porcentaje total), y 2) como el número medio y desviación estándar de dichos campos ópticos respecto a las muestras que contenían esa especie (porcentaje medio). La primera medida indica la incidencia de una especie en la dieta de las palomas, mientras que la segunda señala la prevalencia de esa especie en las dietas de cada individuo. La relación entre el porcentaje total de campos ópticos y el porcentaje de presencia en las muestras fecales fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La composición de la dieta (porcentajes transformados a arcoseno) se examinó mediante un análisis de varianza multivariante (MANOVA), considerando como fuentes de variación las épocas del año (primavera, verano, otoño e invierno), las ocho áreas de estudio y la interacción entre ambas. La similitud o superposición de las dietas se calculó mediante el índice de Morisita usando el porcentaje total de campos ópticos (KREBS 1989). Los valores de este índice oscilan entre 0 (solapamiento nulo) y 1 (solapamiento completo). La amplitud de nicho trófico se evaluó, usando el porcentaje total de campos ópticos, con el índice estandarizado de Levin, donde los valores cercanos a 0 indican especialización de la dieta, y los valores próximos a 1 indican una dieta de composición diversa (KREBS 1989). Todos los análisis estadísticos se desarrollaron usando los programas SPSS 15.0 (SPSS INC. 2006) y Canoco 4.5 (TER BRAAK & ŠMILAUER 2002).

## RESULTADOS

### Identificación molecular de los excrementos

La diversidad nucleotídica interespecífica obtenida a partir de las secuencias de 637-638 pb fue de  $0,16 \pm 0,07$ , mientras que la diversidad intraespecífica fue similar en ambas especies ( $0,002 \pm 0,001$ ). El análisis RFLP en el que los productos de PCR de 196-7 pb fueron cortados con la enzima *HaeIII*, mostró dos patrones de corte diferentes para las dos especies de palomas (Figura 2). La secuencia de *C. bollii*, con dos dianas para la enzima de restricción, dio lugar a tres fragmentos de 47, 65 y 84 pb respectivamente, y la secuencia de *C. junoniae*, con una sola diana



**Figura 2.** Fragmentos de 196-7 pb de la RC del ADNmt de la paloma turqué *Columba bollii* y la paloma rabiche *C. junoniae*. Los lugares de corte de la enzima HaeIII (5'-GG/CC-3') se muestran con un subrayado. Los puntos indican la misma base que la línea superior y un guión indica una inserción-delección ("indel"). Tres fragmentos de restricción (47, 65 y 84 pb) fueron obtenidos para la turqué (B) y dos (47 y 150 pb) para la rabiche (J). M, marcador de ADN de 50 pb; PB y PJ, controles positivos de muestras conocidas de ADN fecal de turqué y rabiche, respectivamente; N, control negativo.

**Figure 2.** Fragments of 196–197 bp of mtDNA control region (CR) sequences of Bolle’s laurel pigeon *Columba bollii* and white-tailed pigeon *C. junoniae* from the Canary Islands. HaeIII enzyme-restriction sites (5 -GG/CC-3 ) are underlined and identified. A dot indicates the same base as on the upper line; a dash indicates an alignment gap. Three restriction products (47, 65 and 84 bp) were obtained for Bolle’s laurel pigeon (B) and two (47 and 150 bp) for white-tailed pigeon (J). M, 50-bp DNA marker; PB and PJ, positive controls of known faecal sample DNA from individuals in captivity (Bolle’s and white-tailed pigeons, respectively); N, negative control.

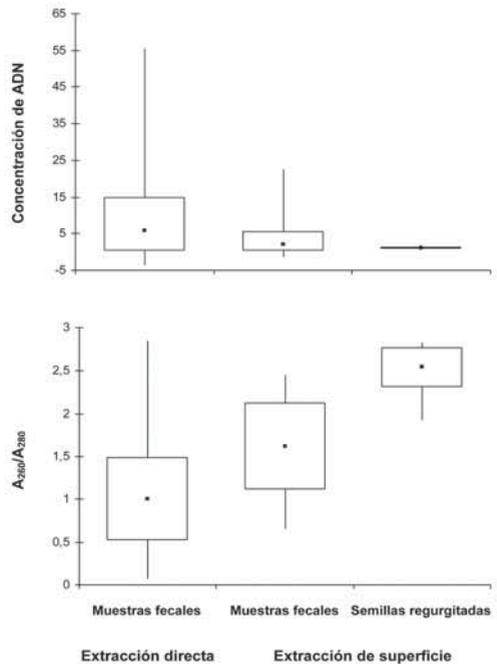
proporcionó dos fragmentos de 47 y 150 pb (MARRERO *et al.* 2008).

Se logró genotipar un total de 505 excrementos (53,2% de los 949 excrementos analizados), de los que 449 (89%) fueron identificados como pertenecientes a la paloma turqué y 56 (11%) a la paloma rabiche. La paloma turqué fue detectada en todas las áreas de estudio, mientras que la rabiche se localizó en cinco de las ocho fuentes (Los

Sanguinos, La Piedra Encantada, Hoya del Teón, Los Pajaritos y Hierba Huerto).

**Extracción de ADN a partir de semillas regurgitadas y excrementos**

Los resultados indicaron que la concentración de ADN fue significativamente mayor usando el método directo de extracción con muestras fecales en comparación al método propuesto (test Kruskal-Wallis;  $\chi^2_2 = 16,46; p < 0,001$ ; Figura 3). Entre los dos tipos de muestras extraídas con papel de filtro (su-



**Figura 3.** Concentración de ADN para muestras fecales ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ ) y semillas regurgitadas ( $\mu\text{g}/100 \text{ mm}^2$ ) procedentes de las palomas endémicas turqué (*Columba bollii*) y rabiche (*C. junoniae*), y ratio A260/A280 de los productos de PCR usando dos métodos diferentes para la extracción del ADN ("directo" y de superficie externa). Los rectángulos representan los valores de la media  $\pm$  desviación estándar, incluyendo los valores máximos y mínimos.

**Figure 3.** DNA concentration ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  and  $\mu\text{g}/100 \text{ mm}^2$ ) for fecal samples and regurgitated seeds, respectively and A260/A280 ratio for PCR products of endemic Bolle’s laurel pigeon *Columba bollii* and white-tailed pigeon *C. junoniae*, using two different DNA sources in the extraction procedure ("direct" and external surfaces). The boxes represent the average  $\pm$  standard deviation values; maximum and minimum values are also included.

perficie externa de heces y semillas regurgitadas) no hubo diferencias significativas (test Mann-Whitney;  $Z_1 = -0,73$ ;  $p = 0,46$ ). En cambio, cuando el grado de pureza del ADN fue estimado por el ratio  $A_{260}/A_{280}$ , se registraron diferencias significativas entre métodos y muestras empleadas: el extracto de ADN procedente de las semillas regurgitadas fue más puro que el de la superficie externa de los excrementos y éste a su vez más puro que el obtenido con el método de extracción directo (test Kruskal-Wallis;  $\chi^2_2 = 67,24$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 3). Este resultado permitió que la tasa de amplificación fuera mayor en muestras extraídas con papel de filtro (80% de las heces,  $n = 45$  y 87,5% de las semillas regurgitadas,  $n = 24$ ) que en muestras extraídas con el método directo (53,3% de los excrementos) ( $G_2 = 11,87$ ;  $p = 0,003$ ).

### Colección microhistológica de referencia

Las características diagnósticas para identificar la epidermis de las hojas, se basaron en la morfología de los estomas, pelos glandulares y tricomas (Figura 4), mientras que las epidermis de los frutos son estructuralmente más simples, y por tanto, más difíciles de determinar. Las características diagnósticas se basaron principalmente en la morfología de las células epidérmicas (Figura 5).

### Ecología trófica de las palomas turqué y rabiche

Se empleó una media de 50 excrementos, previamente genotipados, por estación del año ( $\approx 6$  por área de estudio), lo cual significó el análisis microhistológico de un total de 198 excrementos de turqué (9.900 campos ópticos analizados) y de 56 excrementos de rabiche (2.800 campos ópticos).

La dieta de la paloma turqué consistió en al menos 13 especies de plantas (Tabla 1). Los frutos (pulpa y semillas) representaron el 75,6% del total de campos ópticos, las hojas un 22,4% y las flores tan solo el 0,3%. Los frutos de laurel (*L. azorica*) fueron el recurso más importante, seguido por el viñático (*Persea indica*), y los frutos y hojas del acebiño (*I. canariensis*), sanguino (*Rhamnus glandulosa*) y tедера (*Bituminaria bituminosa*). La composición de la dieta mostró una significativa variación espacio-temporal (Lambda de Wilks = 3,56;  $p < 0,001$ ). En prima-

1. Tricomas ausentes
2. Pelos glandulares ausentes
3. Complejos estomáticos paracíticos
4. Células lobuladas ..... <i>Ilex canariensis</i>
4. Células irregulares ..... <i>Apollonias barbujana</i>
3. Complejos estomáticos anomocíticos y grupos de dos células redondeadas en el haz de las hojas ..... <i>Ilex perado</i>
3. Complejos estomáticos actinocíticos y ausencia de grupos de dos células redondeadas ..... <i>Prunus lusitanica</i>
2. Pelos glandulares presentes
5. Pelos glandulares sésiles en forma globular con una sola célula en la base
6. Células poligonales alargadas y pelos glandulares en forma de vesicular ovalada con pie segmentado ..... <i>Heberdenia excelsa</i>
6. Células irregulares más pequeñas con cristales de sílica en forma de aguja ... <i>Picconia excelsa</i>
5. Pelos glandulares sésiles en forma globular con dos células en la base
7. <i>Myrica faya</i>
7. <i>Myrica rivis-martinezii</i>
1. Tricomas presentes
8. Tricomas constituidos por una sola célula
9. Tricomas pequeños en forma de cono
10. Complejos estomáticos ausentes, células poligonales
11. <i>Erica arborea</i>
11. <i>Erica scoparia</i>
11. <i>Erica maderensis</i>
10. Complejos estomáticos presentes, células pequeñas redondeadas ..... <i>Rhamnus glandulosa</i>
9. Tricomas rectos
12. Células irregulares en el envés de las hojas ..... <i>Persea indica</i>
12. Células poligonales en el haz y el envés de las hojas, y tricomas largos y flexibles con amplia base en las glándulas foliares. <i>Ocotea foetens</i>
9. Tricomas largos y anchos con amplia base
13. Pelos glandulares ausentes
14. Complejos estomáticos anomocíticos y células poligonales ..... <i>Visnea mocanera</i>
14. Complejos estomáticos anisocíticos y células pequeñas irregulares ..... <i>Clethra arborea</i>
13. Pelos glandulares presentes
15. Complejos estomáticos paracíticos y células con paredes sinuosas ..... <i>Viburnum rigidum</i>
9. Tricomas largos, ondulados y delgados
16. Células pequeñas lobuladas y complejos estomáticos anomocíticos ..... <i>Laurus azorica</i>
16. Células irregulares con estomas redondos de tipo paracítico ..... <i>Salix canariensis</i>
16. Células poligonales con paredes gruesas concéntricas de fibras de esclerénquima en el envés de las hojas ..... <i>Euphorbia melifera</i>
9. Tricomas largos en forma de cono
17. Pelos glandulares con pie segmentado y una sola célula en la cabeza ..... <i>Sambucus palmensis</i>
17. Pelos glandulares con pie segmentado y cuatro células en la cabeza ..... <i>Sambucus lanceolada</i>
8. Tricomas constituidos por más de una célula ..... <i>Arbutus canariensis</i>

Figura 4. Clave microhistológica de la epidermis de las hojas de las especies arbóreas presentes en los bosques de laurisilva de las islas macaronésicas.

Figure 4. Leaf epidermis microhistological key from the tree species present in the laurel forest of the Macaronesian islands.

1. Tricomas ausentes
2. Células con paredes gruesas
3. Complejos estomáticos ausentes y células irregulares ..... <i>Apollonias barbujana</i>
3. Grandes estomas de tipo actinocítico ..... <i>Ilex canariensis</i>
3. Grandes estomas de tipo anomocítico y células pequeñas ..... <i>Prunus lusitanica</i>
3. Grupos de tres y cuatro células ..... <i>Heberdenia excelsa</i>
2. Grupo de células pequeñas separadas por gruesas paredes y complejos estomáticos ausentes ..... <i>Picconia excelsa</i>
2. Células sin paredes gruesas
4. Complejos estomáticos ausentes y células poligonales de diferentes tamaños y densamente dispuestas ..... <i>Persea indica</i>
4. Complejos estomáticos anomocíticos
5. Células pequeñas en grupos de dos ..... <i>Ilex perado</i>
5. Células pequeñas sin constituir grupos ..... <i>Myrica faya</i>
4. Complejos estomáticos anomocíticos
6. Grandes estomas y células anexas más estrechas que el resto ..... <i>Rhamnus glandulosa</i>
6. Estomas pequeños y células anexas similares al resto ..... <i>Arbutus canariensis</i>
6. Estomas muy pequeños y escasos, fibras de esclerénquima en las paredes celulares fácilmente visibles al microscopio y no reflejadas en la figura ..... <i>Ocotea foetens</i>
6. Células anexas similares en tamaño al resto y células cercanas dispuestas concéntricamente ..... <i>Laurus azorica</i>
4. Complejos estomáticos paracíticos y células poligonales grandes ..... <i>Viburnum rigidum</i>
1. Tricomas presentes ..... <i>Visnea mocanera</i>

Figura 5. Clave microhistológica de la epidermis de los frutos de las especies arbóreas presentes en los bosques de laurisilva de las islas macaronésicas.

Figure 5. Fruit epidermis microhistological key from the tree species present in the laurel forest of the Macaronesian islands.

vera e invierno, la dieta se centró en el consumo de frutos de *L. azorica*, encontrados en el 67,3% del total de campos ópticos analizados en estas estaciones. En verano y otoño, la dieta fue proporcionalmente más diversa, y aunque *L. azorica* siguió siendo importante (22%), se registró un alto consumo de *I. canariensis* y *B. bituminosa*, comprendiendo en conjunto el 41,5% en verano, y de *P. indica* y *R. glandulosa* en otoño (52,8%). La presencia en la dieta de las especies de plantas más importantes para la paloma turqué varió significativamente entre las ocho áreas de estudio. *Laurus azorica* fue la única especie presente en la dieta en todas las áreas mientras que *O. foetens* y *C. proliferus* tuvieron una distribución más restringida. Por tanto, la composición botánica de la dieta de la paloma turqué dependió de la estación del año y el área de estudio.

La dieta de la paloma rabiche estuvo constituida por al menos 10 especies de plantas (Tabla 2). Los frutos representaron el 93,5% del total de campos ópticos y las hojas el 6,3%. Los frutos y hojas de *R. glandulosa* y *B. bituminosa*, y los frutos de *O. foetens* y *L. azorica* fueron los alimentos principales en la dieta de la paloma rabiche. *Persea indica*, *A. barbujana* e *I. canariensis* también fueron consumidos, aunque en menor proporción. La correlación entre el porcentaje total de campos ópticos y la frecuencia de aparición en las muestras fecales ( $rp = 0,97$ ;  $p < 0,001$ ), confirma que los resultados no representan preferencias individuales. El estudio espacio-temporal de la dieta mostró diferencias significativas (Lambda de Wilks = 3,16;  $p = 0,001$ ). En primavera y verano destacaron en la dieta los frutos de *B. bituminosa* y *R. glandulosa*, respectivamente, mientras que en los meses de otoño e invierno predominaron los frutos de las lauráceas. En el estudio de la variación espacial, realizado entre las dos áreas con mayor número de muestras de rabiche identificadas (Los Sanguinos y La Piedra Encantada), se observaron diferencias significativas en algunas de las especies más representativas de cada zona. Esto indica que la estructura vegetal de las áreas determinó en gran medida la composición de la dieta.

Las dietas de las palomas turqué y rabiche fueron significativamente diferentes respecto a la mayoría de las especies de plantas más consumidas. No

obstante, al comparar la dieta de las dos palomas en Los Sanguinos y La Piedra Encantada, áreas donde se obtuvo un mayor tamaño muestral para la rabiche, se observó que las diferencias no eran tan evidentes. El índice de Morisita produjo un valor "medio" de similitud entre dietas, mientras que el índice de Levin señaló la tendencia hacia la especialización, en la que pocas especies son centrales en la alimentación de las palomas, al menos durante el año 2007/2008 en las áreas de estudio del Parque Nacional.

En verano y otoño se registró el pico de producción de frutos en el total de las áreas de estudio. Se observó una tendencia general en las dos palomas, de aumentar el consumo de frutos cuando éstos estaban maduros en la mayoría de las especies arbóreas.

En los excrementos de las dos palomas se encontraron semillas dañadas de todas las especies de frutos presentes en la dieta. Sin embargo, algunas soportaron mejor el tratamiento digestivo, como las semillas de *I. canariensis* y *R. glandulosa*. En general, y a excepción de *B. bituminosa*, las semillas pequeñas fueron afectadas en menor medida que las de mayor tamaño durante la digestión.

## DISCUSIÓN

### Identificación molecular de los excrementos

El análisis molecular de los excrementos permitió conocer la distribución de las palomas en las ocho áreas de estudio establecidas en el Parque Nacional de Garajonay, además de poner de manifiesto la abundancia relativa de sus poblaciones. A partir del número de excrementos identificados, se sugiere que la paloma turqué es abundante tanto en áreas localizadas en el interior del bosque como en zonas de transición, mientras que la paloma rabiche, mucho más escasa, se detectó principalmente en áreas de borde. De hecho, se considera que ésta última especie actualmente ocupa un ambiente subóptimo, y que su hábitat original fuese el bosque termófilo, hoy prácticamente desaparecido (MARTÍN *et al.* 2000; NOGALES *et al.* 2009).



Familia Especies	Frecuencia de aparición			Media % ± DE (por muestra fecal)				Total		
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total	Primavera	Verano		Otoño	Invierno
Lauraceae										
<i>Apollonia barbujana</i> (f)	-	-	15,06	-	4,03	-	-	56,50±50,39	-	56,50±50,39
<i>Laurus azorica</i> (f, h)	12,50	-	15,86	30,28	9,82	100,00±0,00	-	79,33±29,14	53,00±53,279	68,75±42,29
<i>Ocotea foelens</i> (f)	0,75	-	30,40	28,57	11,82	3,00±1,41	-	91,20±13,31	50,00±33,78	60,18±39,87
<i>Persea indica</i> (f)	16,50	0,07	1,06	26,28	5,96	66,00±48,08	2,00±0,00	4,00±1,63	61,33±45,35	33,40±41,29
Aquifoliaceae										
<i>Ilex canariensis</i> (f, h, fl)	-	0,61	0,66	13,42	2,14	-	16,00±0,00	10,00±0,00	94,00±0,00	40,00±46,86
Rhamnaceae										
<i>Rhamnus glandulosa</i> (f, h)	-	68,46	13,2	-	35,32	-	98,88±0,00	99,00±1,41	-	98,90±3,64
Fabaceae										
<i>Bituminaria bituminosa</i> (f, h)	72,5	30,69	8,53	-	26,89	82,85±36,58	99,75±0,70	42,66±50,64	-	83,66±34,54
<i>Chamaecytisus proliferus</i> (h)	-	0,23	-	-	0,10	-	6,00±0,00	-	-	6,00±0,00
Bryophyta	0,25	-	-	-	0,03	2,00±0,00	-	-	-	2,00±0,00
Invertebrados	0,25	-	0,26	0,28	0,14	2,00±0,00	-	4,00±0,00	2,00±0,00	2,66±1,15
Gen. spp. indeterminadas (h)	-	-	0,26	0,28	0,10	-	-	4,00±0,00	2,00±0,00	3,00±0,00

**Tabla 2.** Dieta y variación estacional de la paloma rabiche (*Columba junoninae*) en el Parque Nacional de Garajonay, La Gomera. Los valores se expresan como porcentajes del total de campos ópticos observados por muestra, y como media y desviación estándar de la especie respecto al total de muestras que contenía dicha especie. f = frutos y h = hojas.

**Table 2.** Diet and seasonal variation of white-tailed pigeon (*Columba junoninae*) in Garajonay National Park, La Gomera. Values are expressed as total percentage of optical fields in each sample, and as mean and standard deviation of the species in the total samples. f = fruit and h = leaves. Boldface indicates the type of resource significantly consumed.

### **Extracción de ADN a partir de semillas regurgitadas y excrementos**

La metodología propuesta en el presente trabajo para la optimización de la extracción del ADN utilizando muestras no invasivas aporta cuatro ventajas principales: (i) la eficiencia y pureza de los extractos de ADN obtenidos de la superficie externa de las muestras fueron significativamente mayores con respecto al método directo, en el que la muestra es empleada en su totalidad. Por consiguiente, se redujo el efecto de la inhibición en las reacciones de PCR. (ii) Se evitó la pérdida de los elementos contenidos en las muestras, por lo que éstas quedan intactas para posteriores análisis. Esto es especialmente útil cuando se trabaja con especies de aves pequeñas o de distribución restringida. (iii) El ADN de las palomas extraído de las semillas regurgitadas fue de alta calidad, y aunque la concentración fue lógicamente baja, pudo ser amplificado e identificado a nivel de especie. (iv) Las bases de este método podrían ser aplicadas utilizando muestras procedentes de otros vertebrados, como mamíferos y reptiles (ver MARRERO *et al.* 2009).

### **Colección microhistológica de referencia**

En general, la identificación de los tejidos epidérmicos de las diferentes especies arbóreas presentes en los bosques de laurisilva de las islas macaronésicas, fue posible gracias a las características microhistológicas del haz y envés de las hojas y de los frutos. Esta información resulta ser básica porque permitirá la descripción y cuantificación de la dieta en futuros estudios sobre los herbívoros (vertebrados y grandes invertebrados) que habitan en este ecosistema (MARRERO & NOGALES 2005).

### **Ecología trófica de las palomas turqué y rabiche**

Las palomas endémicas turqué y rabiche son especies básicamente frugívoras, si bien las hojas son un aporte alimentario importante en determinadas épocas del año. Aunque las dietas de estas aves no se diferenciaron respecto a la composición de las principales especies de plantas, sí se distinguieron en la proporción en las que éstas fueron

ingeridas. En cualquier caso, la fisiología digestiva de estas especies debe ser analizada. Las palomas son las aves frugívoras del bosque de laurisilva con un mayor tamaño corporal (una media de 37 cm y 430 g de peso), por lo que las consecuencias de su interacción con los frutos debe ser diferente a las de otras especies más pequeñas como el Mirlo (*Turdus merula*), el Petirrojo (*Erithacus rubecula*) o las currucas (*Sylvia* spp.); éstas últimas, más frecuentes en los bordes de la laurisilva.

Desde el punto de vista nutricional, los estudios de palomas frugívoras en áreas tropicales han señalado la importancia de los frutos de lauráceas en la dieta (CROME 1975; INNIS 1989). Son frutos muy nutritivos y ricos en carbohidratos. Sin embargo, la escasa concentración en proteínas determina que la mayoría de las aves frugívoras no puedan mantener su masa corporal con una dieta exclusiva de frutos (LEVEY & MARTÍNEZ DEL RIO 2001), y que requieran de las hojas como un importante suplemento de proteínas (SUN *et al.* 1997). En las palomas canarias, el consumo de hojas correspondió a los árboles de *R. glandulosa* e *I. canariensis*, así como a dos arbustos de la Familia Fabaceae, *B. bituminosa* y *C. proliferus*. Es bien conocido que las hojas de las leguminosas son ricas en proteínas. De hecho, estas dos especies han sido utilizadas por los pastores canarios desde época prehistórica, como forraje para el ganado (MORALES MATEOS 2003). Son plantas que crecen en áreas abiertas, bordes de caminos y zonas rocosas, lo cual implica que las palomas se desplazan hacia zonas generalmente situadas en áreas de borde para ingerirlas. El aporte de proteínas animales no fue importante, aunque restos de invertebrados, en general muy pequeños, fueron encontrados en los excrementos de las dos especies de palomas. El alto nivel de digestión de las presas no permitió su identificación a nivel de especie, y sean resultados de una insectivoría activa o más probablemente tomados accidentalmente junto con los alimentos vegetales, podrían ser recursos proteicos alternativos. Otra fuente significativa de proteínas serían las semillas. No obstante, se requiere el análisis químico de los distintos componentes de la dieta para determinar su importancia nutricional.

La dieta de las dos especies dependió de la variabilidad temporal y espacial de los recursos. Esto supone que la composición de sus dietas está asociada a los patrones estacionales en la disponibilidad de los alimentos, pero además, y dado que la topografía y orientación del terreno determina que la estructura de la Laurisilva no sea uniforme en toda su extensión, que las palomas se muevan a través del monte en base a sus preferencias por determinados recursos.

En áreas compartidas por la turquí y rabiche, la composición de la dieta fue muy similar y en relativa concordancia a la composición vegetal del hábitat. A pesar de estos resultados, se apreció una tendencia al uso diferencial de determinados recursos. Por tanto, si existe algún grado de competencia entre las dos especies por un recurso poco abundante, parece que ciertos mecanismos temporales o espaciales podrían estar actuando para permitir su coexistencia.

Importantes aspectos del ciclo anual de las palomas, como la reproducción, muda o crecimiento están probablemente asociados con los picos estacionales de producción de frutos, aunque por el momento se desconoce el grado de influencia de dicha relación.

Las palomas turquí y rabiche quizá actúen como dispersantes de ciertas especies de semillas, y como depredadoras frente a otras. En cualquier caso, el papel global de estas aves en el sistema de dispersión de las distintas especies de frutos carnosos depende de muchos factores, desde las adaptaciones conductuales y fisiológicas de estas aves hasta los componentes ambientales del hábitat (ver WHELAN *et al.* 1998).

Finalmente, los resultados de este estudio pretenden contribuir a comprender la relación ecológica existente entre dos especies endémicas y su hábitat relicto. La conservación de las palomas de la Laurisilva radica en la protección de los distintos ambientes que estas especies requieren para encontrar sus recursos alimentarios a lo largo del año.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del área de investigación del Organismo Autónomo de Parques Nacionales, institución que financió este trabajo (ref. 80/2005), al Parque Nacional de Garajonay, al Departamento de Genética de la Universidad de La Laguna, y al Grupo de Ecología y Evolución en Islas del IPNA-CSIC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAKE, J.G., LOISELLE, B.A., MOERMOND, T.C., LEVEY, D.J. & DENSLOW, J.S. 1990. Quantifying abundance of fruits for birds in tropical habitats. *Studies in Avian Biology* 13: 73-79.
- BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M. & VAN DER NOORDAA, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.
- BROWN, G.G., GADALETA, G., PEPE, G., SACCONI, C. & SBISÁ, E. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192: 503-511.
- CROME, F.H.J. 1975. The ecology of fruit pigeons in tropical northern Queensland. *Australian Wildlife Research* 2: 155-185.
- EGGERT, L.S., MALDONADO, J.E. & FLEISCHER, R.C. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples – animal scat and other associated materials. *Methods in Enzymology* 395: 73-87.
- EMMERSON, K.W., MARTÍN, A., DELGADO, G. & QUILIS, V. 1986. Distribution and some aspects of the breeding biology of Bolle's Pigeon (*Columba bollii*) on Tenerife. *Vogelwelt* 107: 52-65.
- GILBERT, M.T.P., WILSON, A.S., BUNCE, M., HANSEN, A.J., WILLERSLEV, E., SHAPIRO, B., HIGHAM, T.F.G., RICHARDS, M.P., O'CONNELL, T.C., TOBIN, D.J., JANAWAY, R.C. & COOPER, A. 2004. Ancient mitochondrial DNA from hair. *Current Biology* 14: R463-464. Supplemental data R1-R7 <http://www.currentbiology.com/cgi/content/full/14/12/r463/DC1/> (4 Marzo 2008).

- GLOVER, B.J. 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* 51: 497-505.
- GODMAN, F. 1872. Notes on resident and migratory birds of Madeira and the Canaries. *Ibis* 2: 209-224.
- HANSEN, A. & SUNDING, P. 1993. Flora of the Macaronesia. Checklist of vascular plants. 4. revised edition. *Sommerfeltia* 17: 1-295.
- HARTERT, E. 1916. Notes on pigeons. *Novitates Zoologicae* 23: 78-88.
- HERNÁNDEZ, M.A. & MARTÍN, A. 1994. First breeding record of the White-tailed Laurel Pigeon *Columba junoniae* on Tenerife (Canary Islands). *Alauda* 62: 253-256.
- HERNÁNDEZ, M.A., MARTÍN, A. & NOGALES, M. 1999. Breeding success and predation on artificial nests of the endemic pigeons Bolle's Laurel Pigeon *Columba bollii* and White-tailed Laurel Pigeon *Columba junoniae* in the laurel forest of Tenerife (Canary Islands). *Ibis* 141: 52-59.
- HÖSS, M. & PÄÄBO, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* 21: 3913-3914.
- INNIS, G.J. 1989. Feeding ecology of fruit pigeons in subtropical rainforests of southeastern Queensland. *Australian Wildlife Research* 16: 365-394.
- IZQUIERDO, I., MARTÍN ESQUIVEL, J.L., ZURITA, N. & ARECHAVALETA, M. 2001. Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres) 2001. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife.
- KHANUJA, S.P.S., SHASANY, A.K., DAROKAR, M.P. & KUMAR, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.
- KOHN, M.H. & WAYNE, R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Tree* 12: 223-227.
- KREBS, C.J. 1989. *Ecological methodology*. Harper Collins Publisher. New York.
- LEVEY, D.J. & MARTÍNEZ DEL RIO, C. 2001. It takes guts (and more) to eat fruit: lessons from avian nutritional ecology. *The Auk* 118: 819-831.
- MARRERO, P., OLIVEIRA, P. & NOGALES, M. 2004. Diet of the endemic Madeira Laurel Pigeon *Columba trocaz* in agricultural and forest areas: implications for conservation. *Bird Conservation International* 14: 165-172.
- MARRERO, P. & NOGALES, M. 2005. A microhistological survey on the trees of a relict subtropical laurel forest from the Macaronesian Islands as a base for assessing vertebrate plant diet. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 409-426.
- MARRERO, P., CABRERA, V.M., PADILLA, D.P. & NOGALES, M. 2008. Molecular identification of two threatened pigeon species (Columbidae) using faecal samples. *Ibis* 150: 820-823.
- MARRERO, P., FREGEL, R., CABRERA, V.M. & NOGALES, M. 2009. Extraction of high quality host DNA from feces and regurgitated seeds: a useful tool for vertebrate ecological studies. *Biological Research* 42: 147-151.
- MARTÍN, A., HERNÁNDEZ, M.A. & RODRÍGUEZ, F. 1993. Première nidification du Pigeon Trocaz *Columba bollii* à L'Île de Hierro (Iles Canaries). *Alauda* 61: 148.
- MARTÍN, A., HERNÁNDEZ, M.A., LORENZO, J.A., NOGALES, M. & GONZÁLEZ, C. 2000. Las palomas endémicas de Canarias. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias & SEO/BirdLife. Santa Cruz de Tenerife.
- MORALES MATEOS, J. 2003. De textos y semillas. Una aproximación etnobotánica a la prehistoria de Canarias. *El Museo Canario*. Las Palmas de Gran Canaria.
- NOGALES, M., MARRERO, P., PADILLA, D.P. & MEDINA, F.M. 2009. The study of habitat use by censuses and molecular methods in birds: the case of two sympatric pigeons. *Bird Study* 56: 414-418.
- OLIVEIRA, P., MARRERO, P. & NOGALES, M. 2002. Diet of the endemic Madeira Laurel Pigeon and fruit resource availability: a study using microhistological analyses. *The Condor* 104: 811-822.
- SOFT IMAGING SYSTEM GMBH. 2002. *AnalYSIS®* ([www.softimaging.net](http://www.softimaging.net)).
- SPSS INC. 2006. *SPSS for Windows*, Rel. 11.0.1; Release 15.0.0. SPSS Inc. USA.
- SUN, C., MOERMOND, T.C. & GIVNISH, T.J. 1997. Nutritional determinants of diet in three turacos in a tropical montane forest. *The Auk* 114: 200-211.

- TABERLET, P., WAITS, L.P. & LUIKART, G. 1999. Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 323-327.
- TER BRAAK, C.J.F. & ŠMILAUER, P. 2002. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power. Ithaca NY.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- WHELAN, C.J., SCHMIDT, K.A., STEELE, B.B., QUINN, W.J. & DILGER, S. 1998. Are bird-consumed fruits complementary resources?. *Oikos* 83: 195-205.