



I+D+i **GIZC** GESTIÓ INTEGRADA DE LA ZONA COSTANERA

Investigació per a la Sostenibilitat de la Zona Costanera de les Illes Balears



Avaluar el valor de la biomassa i de la diversitat de macroalgues epífites de la *Posidonia oceanica*

Evaluación del valor de la biomasa y diversidad de macroalgas epífitas de la angiosperma marina *Posidonia oceanica* (L.) Delile como indicadores de eutrofización de las aguas costeras de Mallorca

Investigador Principal:

Jorge Terrados Muñoz, Científico Titular CSIC

Investigadores participantes:

Francisco Javier Medina Pons, Becario predoctoral Govern Illes Balears
Inés Castejón Silvo, Becaria predoctoral I3P CSIC

Fecha: 31 de diciembre de 2007

Informe Final

Resumen

Las praderas de angiospermas marinas son un componente importante de los ecosistemas costeros someros, especialmente en mares donde la transparencia del agua es alta como el Mediterráneo. Estas comunidades se caracterizan por poseer una alta productividad biológica, albergar una gran diversidad de especies, actuar como filtro de partículas en suspensión y nutrientes disueltos en la columna de agua, reducir la resuspensión y estabilizar el sedimento y contribuir a la protección de la línea de costa. *Posidonia oceanica* (L.) Delile es una angiosperma marina endémica del Mar Mediterráneo que forma comunidades de alto valor ecológico.

El aporte de nutrientes a las aguas costeras puede estimular el desarrollo de macroalgas que, a su vez, pueden afectar negativamente el crecimiento y la supervivencia de las praderas de angiospermas marinas. Aunque la eutrofización de los ecosistemas costeros es considerada uno de los principales agentes de pérdida de las praderas de angiospermas marinas, el conocimiento científico actual no permite hacer predicciones sobre los efectos de los aportes de nutrientes en la proliferación de macroalgas epífitas en praderas de angiospermas marinas ni identificar qué niveles de desarrollo de macroalgas epífitas pueden ser considerados como indicadores de eutrofización. Y ello es así por que se desconoce en qué medida la abundante población de meso-herbívoros que habita en las praderas de angiospermas marinas es capaz de controlar la biomasa de macroalgas y algas epifíticas y si la abundancia de los meso-herbívoros está controlada por los predadores, principalmente peces. En este sentido las praderas de *Posidonia oceanica* no son una excepción. Además se carece de información suficiente sobre la abundancia y la composición específica de las macroalgas epífitas de *P. oceanica* que permita describir su variación temporal interanual y establecer niveles de referencia. Los principales objetivos de este proyecto son establecer qué niveles de desarrollo de macroalgas epífitas pueden ser indicadores de eutrofización en las praderas de *P. oceanica* en Mallorca y evaluar el papel de las interacciones tróficas en la regulación del efecto de los aportes de nutrientes sobre la proliferación de macroalgas epífitas en estas praderas.

Las actividades realizadas incluyen (1) el mantenimiento de una serie temporal de datos de biomasa y diversidad de macroalgas epifíticas de *Posidonia oceanica* en dos localidades de Mallorca con distinto grado de urbanización del litoral (Magaluf, Ses Salines), (2) la comparación del desarrollo alcanzado por la comunidad epifítica en localidades con distintos aportes de nutrientes, (3) un análisis de las relaciones entre el tamaño de los haces foliares de *P. oceanica*, el contenido en nutrientes de las hojas y la masa de epífitos sobre las mismas, (4) el estudio de la comunidad de meso-herbívoros presente en la pradera de *P. oceanica*, (5) una evaluación experimental del papel de los peces en la respuesta de las macroalgas epifíticas al aporte de nutrientes y (6) la colaboración en el desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de la estructura de la comunidad de epífitos de *P. oceanica*.

Introducción

El análisis de la importancia relativa e influencia mutua que tienen la disponibilidad de recursos (nutrientes, alimento) y las interacciones tróficas (herbivoría, predación) en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas es uno de los principales objetivos de la Ecología. Hairston et al. (1960) propusieron que la abundancia o biomasa de los organismos puede estar determinada por la disponibilidad de recursos o por las interacciones tróficas según su posición en la red trófica. Este modelo ha estimulado una parte importante de la investigación ecológica durante los últimos 40 años y el concepto de cascada trófica (Paine, 1980; Carpenter et al., 1985) constituye un desarrollo del mismo. La manifestación de una cascada trófica requiere de la existencia de interacciones tróficas fuertes o de especies clave (Paine, 1980) y puede ser considerada un caso particular de la dinámica de las redes tróficas en comunidades poco diversas, aisladas donde las interacciones tróficas actúan de forma unificada (Strong, 1992). Comunidades ricas en especies, con abundancia de omnívoros y/o especies generalistas, espacial y temporalmente heterogéneas no constituirían un entorno adecuado para el desarrollo de cascadas tróficas (Strong, 1992). A pesar de que se han descrito cascadas tróficas en algunos ecosistemas marinos (Paine, 1980; Shurin et al., 2002), lo que implica que su estructura estaba controlada por las interacciones tróficas, la estructura de otros depende tanto de éstas como de la disponibilidad de recursos (Menge, 1992; Menge, 2000).

Las praderas de angiospermas marinas son un componente importante de los ecosistemas costeros someros, especialmente en mares donde la transparencia del agua es alta como el Mediterráneo. Estas comunidades se caracterizan por poseer una alta productividad biológica, albergar una gran diversidad de especies, actuar como filtro de partículas en suspensión y nutrientes disueltos en la columna de agua, reducir la resuspensión y estabilizar el sedimento y contribuir a la protección de la línea de costa (Hemminga y Duarte, 2000). La disponibilidad de nutrientes es un factor determinante para el desarrollo vegetativo y la productividad de las praderas de angiospermas marinas y en muchos lugares el aporte de nutrientes ha favorecido el desarrollo vegetativo de las angiospermas marinas (Romero et al., 2006). Sin embargo, el aumento de los aportes de nutrientes puede también estimular la proliferación de algas y la reducción del desarrollo vegetativo de las angiospermas marinas (Short y Burdick, 1996; Short et al., 1996; Tomasko et al., 1996; Tomasko y Lapointe, 1991; Hauxwell et al., 2001; Hauxwell et al., 2003; Lapointe et al., 2004). La eutrofización de los ecosistemas costeros es considerada uno de los principales agentes de pérdida de las praderas de angiospermas marinas (Duarte, 1995; Ralph et al., 2006).

Las praderas de angiospermas marinas proporcionan refugio y alimento a un gran número de organismos y por ello la fauna asociada a las mismas constituye una comunidad diversa y rica en especies. Tradicionalmente se ha asumido que la herbivoría directa sobre las angiospermas marinas es pequeña, especialmente en ambientes templados, pero esta percepción ha cambiado tras la acumulación de estudios que muestran que los herbívoros pueden consumir de forma directa una gran parte de la biomasa producida por las angiospermas marinas (Heck y Valentine, 2006; Valentine y Duffy, 2006). Por otro lado, la abundancia de especies herbívoras, particularmente de pequeños crustáceos y moluscos gasterópodos, en las praderas de angiospermas marinas y la alta productividad de la comunidad epifítica determinan que sea considerada como muy importante la herbivoría por invertebrados en la red trófica de las praderas de angiospermas marinas (Heck y Valentine, 2006; Borowitzka et al., 2006). De hecho, los mesoherbívoros pueden controlar la biomasa alcanzada por los epífitos de las angiospermas marinas (Tomasko and Lapointe, 1991; Neckles et al., 1993; Williams y Ruckelshaus, 1993; Short et al., 1995) de tal modo que su efecto puede ser equivalente o superior al que tienen los nutrientes (Heck et al., 2000; Hughes et al., 2004). Así se ha propuesto que los mesoherbívoros pueden jugar un papel fundamental en la red trófica de las praderas de angiospermas marinas facilitando el crecimiento de las angiospermas al reducir la biomasa de epífitos y que una reducción de la abundancia de mesoherbívoros podría causar de forma indirecta la de las angiospermas marinas (Heck y Valentine, 2006; Valentine y Duffy, 2006). Los experimentos realizados in situ por Gacia et al. (1999) y Heck et al. (2000) sugieren que la estructura de la red trófica de las praderas de angiospermas marinas puede estar determinada por las interacciones tróficas pero, también, que el omnivorismo y las preferencias

alimentarias concretas de los mesoherbívoros y sus predadores pueden evitar la manifestación de cascadas tróficas en las mismas.

La eutrofización y la sobrepesca son dos de los principales agentes de alteración de los ecosistemas costeros como consecuencia de las actividades humanas y ambos pueden tener su influencia en el mantenimiento de las praderas de angiospermas marinas. La eutrofización favorece la proliferación de algas de crecimiento rápido que, a su vez, pueden reducir el desarrollo vegetativo de las angiospermas marinas. La sobrepesca, dependiendo del nivel trófico de las especies de peces cuya abundancia se vea reducida por la misma, puede promover o reducir de forma indirecta la proliferación de algas epífitas (Heck y Valentine, 2006; Valentine y Duffy, 2006). Puesto que ambos procesos (eutrofización y sobrepesca) suelen coincidir en el espacio es difícil predecir el efecto que pueden tener los aportes de nutrientes en las praderas de angiospermas marinas sin conocer cómo la actividad pesquera modifica las interacciones tróficas en las mismas (Hughes et al., 2004; Heck y Valentine, 2006; Valentine y Duffy, 2006).

Posidonia oceanica (L.) Delile es una angiosperma marina endémica del Mar Mediterráneo que forma comunidades de alto valor ecológico. Aunque se dispone de un amplio conocimiento sobre múltiples aspectos de la ecofisiología, desarrollo vegetativo y productividad primaria de esta especie, su participación en los ciclos del carbono y nutrientes de los ecosistemas costeros, su papel como promotor de la diversidad de los mismos, y su respuesta a perturbaciones antropogénicas muy poco se sabe del funcionamiento y la dinámica de la red trófica de las praderas que forma. El análisis de isótopos estables indica que la mayor parte del carbono de la fauna asociada a la pradera no procede directamente de *P. oceanica* sino de material detrítico o de las algas y epífitos presentes en la pradera (Jennings et al., 1997; Lepoint et al., 2000; Vizzini et al., 2002). Este resultado es consistente con las estimas del porcentaje de la producción primaria de la planta consumida directamente por herbívoros (principalmente peces y erizos) que es variable pero pequeño (Cebrián et al., 1996), aunque estudios recientes indican que puede ser muy superior a lo estimado hasta ahora (Tomás et al., 2005 a; Prado et al., 2007 a). La biomasa alcanzada por las macroalgas epífitas parece depender de la presión de herbivoría que las plantas soportan aunque los herbívoros considerados fueron sólo aquellos que son capaces de alimentarse directamente de la propia *P. oceanica*, el erizo *Paracentrotus lividus* y el pez *Sarpa salpa* (Alcoverro et al., 1997, Prado et al., 2007 b). *P. lividus* es también capaz de consumir hasta el 80 % de la biomasa de epífitos sobre las hojas de *P. oceanica* (Tomás et al., 2005 b). No se han realizado estudios, sin embargo, que permitan evaluar en qué medida la abundante población de mesoherbívoros que habita en la pradera de *P. oceanica* es capaz de controlar la biomasa de macroalgas y algas epífitas. Tampoco se conoce en qué medida los mesoherbívoros pueden estar controlados por la predación de peces. Por ello es cuestionable interpretar las proliferaciones de algas y epífitos en las praderas de *P. oceanica* como indicadoras de un aumento de los aportes de nutrientes ya que un descenso de la presión ejercida por los mesoherbívoros podría también causarlas. El aporte de nutrientes a la columna de agua promueve un aumento de la biomasa y una modificación de la composición específica de la comunidad de algas epífitas de *P. oceanica* durante el verano (Leoni et al., 2006; Prado, 2006) pero no se ha evaluado en qué medida esta respuesta depende del aumento de la disponibilidad de nutrientes o de las interacciones tróficas que se establecen en la pradera.

En resumen, el conocimiento científico actual no permite hacer predicciones sobre el estado final del sistema *Posidonia oceanica*-macroalgas epífitas tras un aumento del aporte de nutrientes ni identificar qué niveles de desarrollo de macroalgas epífitas pueden ser considerados como indicadores de eutrofización de las aguas costeras. Además se carece de información suficiente sobre la abundancia y la composición específica de las macroalgas epífitas de *P. oceanica* que permita describir su variación temporal interanual y establecer niveles de referencia.

Los objetivos de este proyecto son:

1. Mantener la serie de datos iniciada en el año 2003 sobre biomasa y diversidad de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica* realizando los muestreos y análisis correspondientes a los años 2006 y 2007.

2. Evaluar el papel de las interacciones tróficas en la regulación del efecto de los aportes de nutrientes sobre la proliferación de macroalgas epífitas en praderas de *Posidonia oceanica*.
3. Identificar niveles de desarrollo de macroalgas epífitas en praderas de *Posidonia oceanica* que puedan ser considerados como indicadores de eutrofización de las aguas costeras.

Las actividades realizadas en el marco de este proyecto son:

1. Muestreos en Magaluf y el cabo de Ses Salines correspondientes a los años 2006 y 2007 de la serie temporal de biomasa y diversidad de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica* iniciada en 2003 y análisis de las muestras obtenidas.
2. Comparación de la estructura de la comunidad epífita de *P. oceanica* en localidades con distintos niveles de aportes de nutrientes (La Victoria y torrent de Sant Jordi, ambos en la bahía de Pollença) durante los veranos de 2006 y 2007.
3. Análisis de las relaciones entre el tamaño de los haces foliares y el contenido en nutrientes de las hojas de *Posidonia oceanica*, la masa de epífitos sobre las hojas de *P. oceanica*, la estructura de la comunidad íctica asociada a la pradera de *P. oceanica* y la presión pesquera sobre dicha comunidad íctica en el ámbito geográfico de la bahía de Palma.
4. Diseño y ensayo de una trampa destinada a obtener información sobre la composición específica y abundancia de la comunidad de mesoherbívoros que viven en la pradera de *P. oceanica* y que potencialmente pueden tener un papel importante para determinar la masa de epífitos sobre las hojas de esta angiosperma marina.
5. Evaluación experimental del efecto de un aumento de la disponibilidad de nutrientes en la biomasa de macroalgas epífitas de *P. oceanica* y de la influencia que la comunidad íctica ejerce en dicho proceso (Cap Enderrocat, bahía de Palma, verano de 2007).

Además de las actividades citadas se ha contribuido al desarrollo de una nueva metodología para la descripción y análisis de la biodiversidad de organismos eucariotas que integran la comunidad epífita de *Posidonia oceanica* (Actividad 6) en colaboración con el Dr. Ramón Rosselló-Mora del IMEDEA y con financiación adicional del Ministerio de Educación y Ciencia (Acción Complementaria CTM2005-23775-E) y del Govern de les Illes Balears (Acció Especial de Recerca, año 2006).

Metodología

Actividad 1. Serie temporal de biomasa y diversidad de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica*.

El estudio se desarrolla en dos localidades con distinto grado de urbanización del litoral: Magaluf, en la bahía de Palma, y el cabo de Ses Salines. El muestreo en cada localidad consistió en la recolección de 10 haces foliares de *Posidonia oceanica* a lo largo de un transecto con una distancia de separación de 1 m entre cada uno, y otros 10 haces a lo largo de un segundo transecto situado a 30 m del primer transecto. Cinco haces de cada transecto se utilizaron para estimar el tamaño de los haces y la biomasa de epífitos por haz mientras que los haces restantes se utilizaron para describir la composición específica de las macroalgas de la comunidad epífita. La biomasa (peso seco) total de epífitos se estimó raspando con una cuchilla de afeitar la superficie de todas las hojas de cada haz y recolectando el material así obtenido en un filtro de fibra de vidrio previamente quemado a 450 °C durante 6 horas y pesado. El contenido en cenizas de la comunidad epífita se estimó quemando el material correspondiente a tres de los cinco haces recolectados en cada transecto a 450 °C durante 6 horas. La superficie foliar de cada haz se estimó midiendo la longitud y anchura de cada hoja del mismo. La biomasa (peso seco) de cada haz se estimó después de secar los haces a 60 °C durante 48 horas. Los haces destinados al estudio de la comunidad epífita (identificación y cuantificación de especies mediante lupa y microscopio óptico) fueron fijados en formol al 4% en agua de mar. La densidad de haces de la pradera *P. oceanica* se estimó a partir del número de haces presentes en el interior de 20 quadrats de 20x20 cm. Además, se estimó la abundancia de erizos en cada localidad a partir del número de erizos encontrados en 40 quadrats de 50x50 cm dispuestos consecutivamente a un lado y otro del primero de los transectos realizados y se han secado y triturado muestras de las hojas de *P. oceanica* para

determinar su contenido en nutrientes (nitrógeno y fósforo) en las dos localidades para cada año de estudio.

Actividad 2. Comparación de la estructura de la comunidad epifítica de *Posidonia oceanica* en condiciones contrastantes de aportes de nutrientes.

Las praderas de *Posidonia oceanica* estudiadas estaban situadas en la Victoria (39° 52' 18,4" N, 3° 9' 14,4" E; 7 m de profundidad) y en las inmediaciones del Torrent de Sant Jordi (39° 52' 56,1" N, 3° 5' 3" E; 5 m de profundidad), ambas en la Bahía de Pollença (Mallorca). La pradera de la Victoria se caracteriza por estar situada en una zona con un escaso aporte de nutrientes mientras que la de las inmediaciones del Torrent de Sant Jordi presenta una mayor carga de nutrientes. El muestreo se realizó durante los meses de agosto de 2006 y 2007 recolectándose haces de *P. oceanica* siguiendo la metodología de la Actividad 1. Por otro lado, se recogieron 3 grupos de 7 haces cada uno (separación entre grupos de al menos una veintena de metros) para describir la estructura de la comunidad epífita de verano en cada una de las localidades utilizando herramientas moleculares (ver Actividad 6). En el muestreo del año 2007 se recogieron muestras de sedimento para analizar su granulometría y contenido en materia orgánica y las concentraciones de amonio, nitratos y nitritos, y fosfatos en el agua intersticial. También se recogieron muestras para determinar las concentraciones de estos nutrientes en la columna de agua. Además, se han secado y triturado muestras de las hojas de *P. oceanica* para determinar su contenido en nutrientes (nitrógeno y fósforo).

Actividad 3. Análisis de las relaciones entre el tamaño de los haces foliares de *Posidonia oceanica*, el contenido en nutrientes de las hojas y la masa de epífitos sobre las mismas.

Para la realización de esta actividad se ha establecido una colaboración científica con el proyecto de investigación "Efectos indirectos emergentes en los sistemas depredador/presa: El caso de la dinámica de población de peces litorales explotados por la pesca recreativa" (MEC-Plan Nacional, CTM2005-00283) que lidera el Dr. Miquel Palmer del IMEDEA, y que es responsable de la generación de los datos correspondientes a la estructura de la comunidad íctica y presión pesquera. En el mes de noviembre de 2006 se seleccionaron dos localidades en la bahía de Palma que sufren niveles contrastantes de presión pesquera sobre la comunidad íctica asociada a la pradera de *Posidonia oceanica* y en cada una de ellas se seleccionaron al azar tres estaciones separadas varios centenares de metros y en las que se estimó el tamaño y biomasa de los haces foliares y la masa de epífitos sobre las hojas de *P. oceanica* a partir de tres muestras de 10 haces recolectados con una separación de varios metros entre sí. La metodología utilizada para la determinación del tamaño de los haces y la biomasa de epífitos es similar a la descrita en la Actividad 1. Además, se han secado y triturado muestras de las hojas de *P. oceanica* para determinar su contenido en nutrientes (nitrógeno y fósforo).

Actividad 4. Diseño y ensayo de una trampa para el muestreo la comunidad de mesoherbívoros que viven en la pradera de *Posidonia oceanica*.

Se ha construido una trampa para la captura de mesoherbívoros en la pradera de *Posidonia oceanica* (Figura 1) modificando la descrita por Hobson y Chess (1979) para la captura de crustáceos en fondos arenosos. Para ello se ha dotado a la trampa de un faldón que permita incluir todo el dosel foliar correspondiente a 1 m² de pradera. La trampa se coloca al atardecer y se recoge al día siguiente y se utiliza una fuente de luz química como estímulo de atracción de los mesoherbívoros.



Figura 1. Trampa para la captura de mesoherbívoros en la pradera de *Posidonia oceanica*.

Actividad 5. Evaluación experimental del efecto de un aumento de la disponibilidad de nutrientes en la biomasa de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica* y de la influencia que la comunidad íctica ejerce en dicho proceso

Utilizando un diseño factorial se he realizado un experimento *in situ* en el que se aumentó la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua y/o se impidió el acceso de los peces a parcelas experimentales de 1 m² establecidas en una pradera de *Posidonia oceanica* situada dentro de la reserva marina de la bahía de Palma (Cap Enderrocat, 8-11 m de profundidad). El aumento de la disponibilidad de nutrientes se efectuó colocando cuatro recipientes de plástico de 250 ml de capacidad llenos de fertilizante NPK Osmocote en el interior de cada parcela y a unos 30 cm de altura sobre el fondo y que se sustituían por otros nuevos con una periodicidad mensual. La pérdida de masa de fertilizante durante el periodo de exposición era inferior al 29 %. Para impedir el acceso de los peces a las parcelas experimentales se construyeron unas jaulas de forma cúbica y 1 m de arista cuyas paredes estaban formadas por una malla plástica de 10 mm de luz y que se colocaron sobre las parcelas correspondientes según el tratamiento asignado. Así, se establecieron 12 parcelas experimentales (Figura 2) y a las que se les asignó de forma aleatoria uno de los cuatro tratamientos siguientes: 1) niveles naturales de nutrientes y acceso libre de los peces a la parcela, 2) adición de nutrientes a la columna de agua y acceso libre de los peces a la parcela, 3) niveles naturales de nutrientes y acceso restringido de los peces a la parcela, y 4) adición de nutrientes a la columna de agua y acceso restringido de los peces a la parcela. El nivel de replicación de cada tratamiento era, por tanto, de 3. El experimento se estableció durante el mes de junio de 2007 y finalizó en el mes de octubre de

2007 pues trabajos previos sugieren que es sólo durante el verano cuando la comunidad epifítica de *P. oceanica* responde a un aumento en la disponibilidad de nutrientes (Prado, 2006). Para evaluar si la adición de nutrientes aumentó su disponibilidad durante el experimento se recolectaron con una periodicidad mensual muestras de agua dentro de cada parcela para analizar las concentraciones de amonio, nitratos y nitritos y fosfatos y también de hojas de *P. oceanica* que se limpiaron de epífitos, secaron y trituraron para analizar el contenido en nutrientes (nitrógeno y fósforo) de las mismas. Así mismo se recolectaron con una periodicidad mensual 7 haces de *P. oceanica* dentro de cada parcela y se procesaron siguiendo la metodología descrita en la Actividad 1 para estimar el tamaño y biomasa de los haces y la masa de epífitos sobre las hojas.

Actividad 6. Nueva metodología para la descripción y análisis de la biodiversidad de organismos eucariotas que integran la comunidad epifítica de *Posidonia oceanica*

Durante los meses de febrero y septiembre de 2006 se recolectaron haces foliares de *Posidonia oceanica* en La Victoria, bahía de Pollença (ver Actividad 2) y se procesaron según se ha descrito en la Actividad 1 para estimar la biomasa foliar y la masa de epífitos sobre las hojas. Además, se recolectaron haces foliares adicionales que se fijaron con formol al 4% en agua de mar para identificar las especies de macroalgas epífitas con la ayuda de la lupa y el microscopio. La información así generada sobre composición específica y diversidad de la comunidad epifítica se comparó con la producida por el análisis de la secuencia génica de la subunidad 18S del ribosoma (ver Anexo I).



Figura 2a. Jaula diseñada para impedir el acceso de los peces a las parcelas experimentales



Figura 2b. Vista parcial de una de las parcelas experimentales en las que se añadieron nutrientes a la columna de agua.

Resultados y Discusión

Actividad 1. Serie temporal de biomasa y diversidad de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica*.

El tamaño de los haces foliares de *Posidonia oceanica* es mayor en Ses Salines que en Magaluf y en ambas localidades se ha observado una variación del mismo durante el periodo 2003-2007: una reducción en un 20 % de la biomasa foliar de los haces en Ses Salines mientras que en Magaluf se produjo una reducción del 50 % entre 2003 y 2006 pero una

recuperación de la misma en 2007 (Figura 3, Tabla 1). Durante el mismo periodo de tiempo se observa un aumento de la masa de epífitos sobre las hojas de *P. oceanica* en ambas localidades, aumento que es de mayor magnitud en el caso de Magaluf (Figura 3, Tabla 1). El contenido en cenizas de los epífitos es superior en Ses Salines que en Magaluf pero no se observó un cambio significativo en el mismo durante el periodo de estudio (Figura 3, Tabla 1). En ninguna de las localidades se observaron erizos dentro de la pradera mientras que la densidad de haces mostró una tendencia de aumento entre el 2004 y el 2007 en ambas localidades (Figura 4, Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los análisis de la varianza realizados para evaluar las diferencias de biomasa foliar y de epífitos sobre los haces de *Posidonia oceanica*, así como del contenido en cenizas de los epífitos y la densidad de haces foliares de la pradera en Magaluf y Ses Salines entre 2003 y 2007.

	SS	g.l.	MS	F	P
Biomasa foliar (g P.S. haz⁻¹)					
Tiempo, T	1,12865	4	0,28216	4,4955	0,002506
Localidad, L	1,31533	1	1,31533	20,9563	0,000017
T x L	0,89755	4	0,22439	3,5750	0,009824
Error	5,02122	80	0,06277		
Total	8,53219	89			
Carga de epífitos (mg P:S. g⁻¹ hoja)					
Tiempo, T	1,251451	4	0,312863	10,8367	0,000000
Localidad, L	0,967190	1	0,967190	33,5008	0,000000
T x L	0,183912	4	0,045978	1,5926	0,184356
Error	2,309650	80	0,028871		
Total	4,961500	89			
% de cenizas en epífitos					
Tiempo, T	64,1	4	16,0	1,49	0,222418
Localidad, L	224,2	1	224,2	20,80	0,000040
T x L	56,6	4	14,1	1,31	0,280063
Error	474,1	44	10,8		
Total	809,0	53			
Densidad de haces (nº haces m⁻²)					
Tiempo, T	6,674	2	3,337	27,98	0,000000
Localidad, L	5,897	1	5,897	49,44	0,000000
T x L	0,905	2	0,453	3,79	0,026649
Error	9,541	80	0,119		
Total	23,985	85			

En el momento de redactar este informe no se han realizado todavía los análisis para determinar la concentración de nutrientes en las hojas de *Posidonia oceanica* ni la identificación y cuantificación de las especies de macroalgas epífitas presentes en la comunidad.

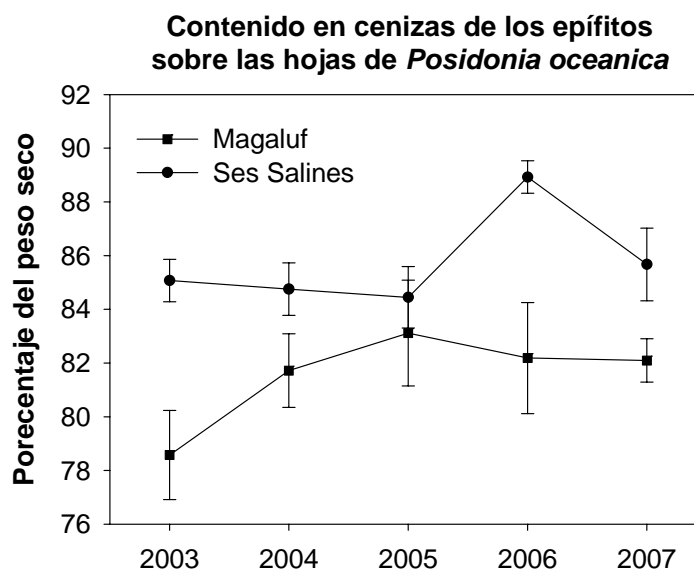
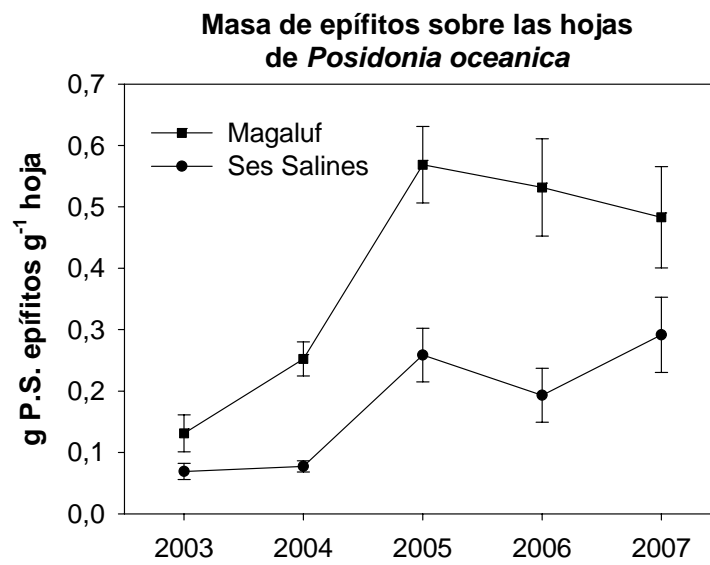
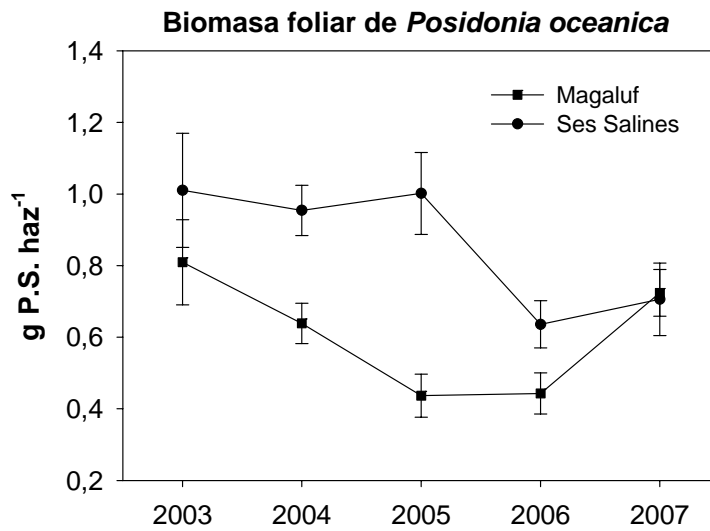


Figura 3

Densidad de haces de *Posidonia oceanica*

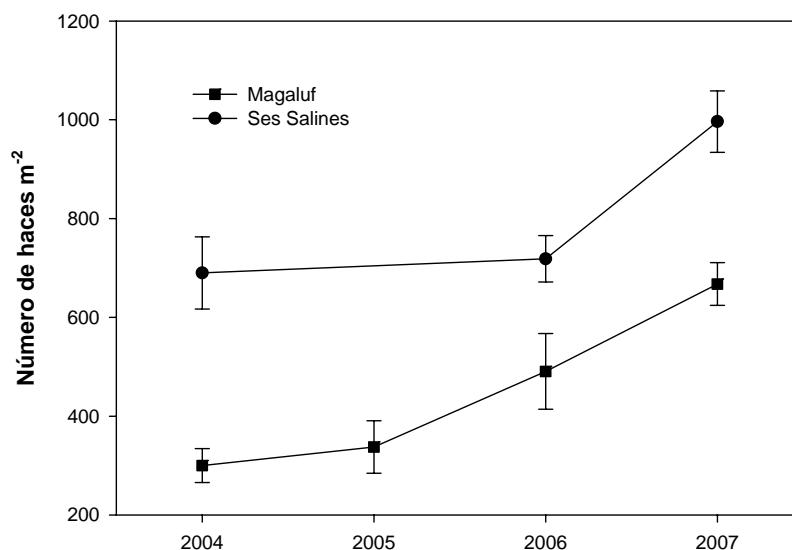


Figura 4

Los resultados obtenidos muestran que la carga de epífitos sobre las hojas de *Posidonia oceanica* se ha triplicado durante el periodo 2003-2007 en ambas localidades y que este aumento ha ido acompañado de un descenso superior a un 20% de la biomasa foliar de los haces en Ses Salines pero no en Magaluf. Además, la densidad de haces de la pradera muestra una tendencia a aumentar durante el periodo de estudio en ambas localidades. El análisis del contenido en nitrógeno y fósforo de las hojas de *P. oceanica* permitirá confirmar si se ha producido un aumento en la disponibilidad de nutrientes durante este periodo de tiempo.

Actividad 2. Comparación de la estructura de la comunidad epifítica de *Posidonia oceanica* en condiciones contrastantes de aportes de nutrientes.

Los resultados obtenidos hasta ahora (Tabla 2) muestran que tanto la densidad de haces de *Posidonia oceanica* como su biomasa y superficie foliares son menores en Torrente que en Victoria; la masa de epífitos sobre las hojas es mayor, sin embargo, en Torrente que en Victoria. Estos resultados son consistentes con nuestra clasificación *a priori* de las dos localidades y sugieren que la pradera de *P. oceanica* en Torrente está más eutrofizada que en Victoria. El análisis de las concentraciones de nutrientes en el agua intersticial del sedimento y en la columna de agua de las dos localidades y, sobre todo, del contenido en nitrógeno y fósforo de las hojas de *P. oceanica*, análisis por realizar todavía, permitirá confirmar la existencia de diferencias entre ambas localidades en la disponibilidad de nutrientes. Por otro lado, todavía no se han procesado las muestras de haces correspondientes para describir las diferencias en la estructura de la comunidad epifítica (composición de especies, riqueza, diversidad) entre las dos localidades.

Tabla 2 Densidad y tamaño de los haces de *Posidonia oceanica* y masa de epífitos sobre los mismos en dos localidades de la bahía de Pollença en agosto de 2006 y 2007.

	Victoria	Torrente
Año 2006		
Densidad de haces	647 ± 72 haces m ⁻²	360 ± 39 haces m ⁻²
Biomasa foliar del haz	0.96 ± 0.11 g P.S. haz ⁻¹	0.75 ± 0.11 g haz ⁻¹
Superficie foliar del haz	175.9 ± 16.9 cm ² haz ⁻¹	141.4 ± 16.2 cm ² haz ⁻¹
Masa de epífitos	220 ± 33 mg P.S. g ⁻¹ hojas	536 ± 50 mg P.S. g ⁻¹ hojas
% de cenizas en epífitos	85.3 ± 1.1 % del P.S.	81.7 ± 0.6 % del P.S.

Año 2007

Densidad de haces	1032 ± 65 haces m ⁻²	464 ± 40 haces m ⁻²
Biomasa foliar del haz	1.06 ± 0.08 g P.S. haz ⁻¹	0.66 ± 0.05 g haz ⁻¹
Superficie foliar del haz	178.2 ± 11.8 cm ² haz ⁻¹	145.5 ± 10.6 cm ² haz ⁻¹
Masa de epífitos	230 ± 57 mg P.S. g ⁻¹ hojas	874 ± 103 mg P.S. g ⁻¹ hojas
% de cenizas en epífitos	86 ± 1.2 % del P.S.	83.7 ± 1.6 % del P.S.

Actividad 3. Análisis de las relaciones entre el tamaño de los haces foliares de *Posidonia oceanica*, el contenido en nutrientes de las hojas y la masa de epífitos sobre las mismas.

Los resultados obtenidos en las dos localidades seleccionadas de la Bahía de Palma muestran que los haces de *Posidonia oceanica* son más grandes en el Cap Enderrocat que en el Coll d'en Rebassa. El peso seco medio por haz en el cabo es un 61% superior que en el Coll d'en Rebassa. Asimismo se encuentran diferencias del 10% y 72% en el número medio de hojas por haz y superficie foliar del haz respectivamente (Figura 5).

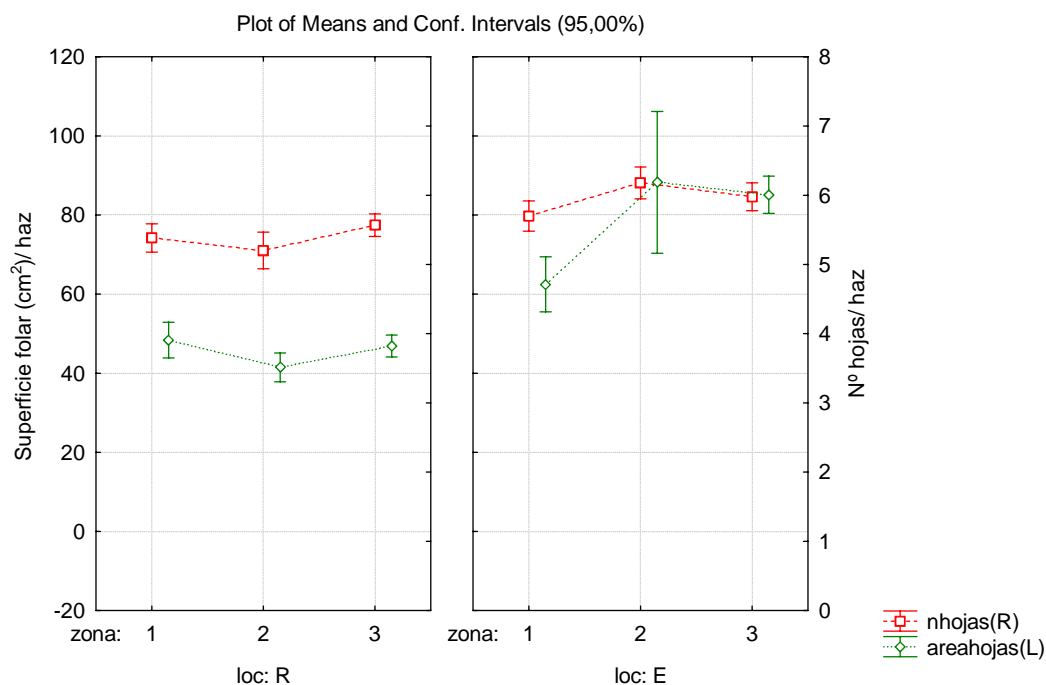


Figura 5. Superficie foliar y número de hojas por haz de *Posidonia oceanica* en dos localidades de la Bahía de Palma. R representa a la localidad Coll d'en Rabassa mientras que E representa a Cap Enderrocat

La heterogeneidad en las características de los haces se mantiene en todas las escalas espaciales estudiadas como muestran los resultados del ANOVA anidado en la Tabla 3. Se encuentran diferencias significativas tanto en las tres estaciones muestreadas en cada localidad como en los grupos muestreados dentro de éstas.

Tabla 3. Análisis de las diferencias a distintas escalas espaciales en las características de los haces de *Posidonia oceanica* en la bahía de Palma

	g.l.	SS	MS	F	p
Nº hojas / haz					
Intercept	1	17273,69	17273,69	18488,39	0,000000
loc	1	41,66	41,66	44,59	0,000000
zona(loc)	4	16,21	4,05	4,34	0,001866
grupo(loc*zona)	12	38,62	3,22	3,45	0,000070
cuad(loc*zona*grupo)	36	67,68	1,88	2,01	0,000614
Error	483	451,27	0,93		
Total	536	615,97			
Superficie foliar (cm²)					
Intercept	1	2074123	2074123	1397,362	0,000000
loc	1	145289	145289	97,883	0,000000
zona(loc)	4	37942	9486	6,391	0,000051
grupo(loc*zona)	12	59072	4923	3,316	0,000121
cuad(loc*zona*grupo)	36	101810	2828	1,905	0,001527
Error	483	716924	1484		
Total	536	1061730			
Peso seco haz (g)					
Intercept	1	110,9077	110,9077	18171,03	0,000000
loc	1	1,6182	1,6182	265,12	0,000000
zona(loc)	4	0,5542	0,1386	22,70	0,000000
grupo(loc*zona)	12	0,5115	0,0426	6,98	0,000000
cuad(loc*zona*grupo)	36	1,0809	0,0300	4,92	0,000000
Error	483	2,9480	0,0061		
Total	536	6,7256			

En cuanto a los resultados de carga de epífitos por haz foliar se observa que en el Coll d'en Rebassa la pradera soporta una biomasa de epífitos del orden de un 50% superior a la del Cap Enderrocat (Figura 6). Al igual que ocurre con las características de los haces de *Posidonia oceanica* la carga de epífitos sobre los mismos muestra un alto nivel de heterogeneidad reflejado en la existencia de diferencias significativas de la misma a todas las escalas espaciales estudiadas. Sólo cuando la carga de epífitos se expresa por unidad de superficie foliar del haz se observa una homogeneidad en la biomasa de epífitos entre grupos que corresponden a muestras separadas decenas de metros entre sí (Tabla 4).

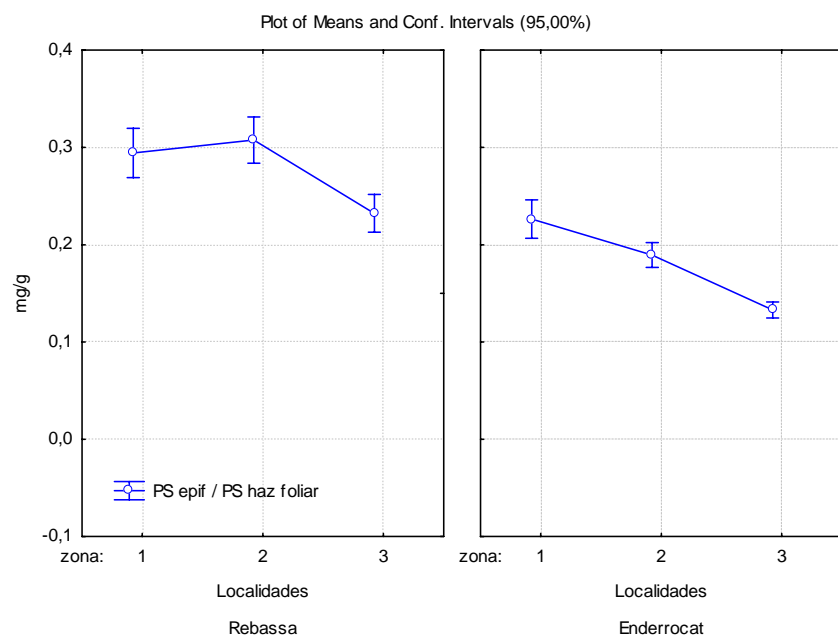


Figura 6. Carga de epífitos sobre los haces de *Posidonia oceanica* en dos localidades de la bahía de Palma.

Tabla 4 Análisis de las diferencias a distintas escalas espaciales en la carga de epífitos sobre los haces de *Posidonia oceanica* en la bahía de Palma

	g.l.	SS	MS	F	p
PS epif/PS hz (mg/g)					
Intercept	1	0,414913	0,414913	20837,48	0,000000
loc	1	0,005126	0,005126	257,41	0,000000
zona(loc)	4	0,002779	0,000695	34,89	0,000000
grupo(loc*zona)	12	0,000465	0,000039	1,95	0,027397
cuad(loc*zona*grupo)	36	0,002702	0,000075	3,77	0,000000
Error	481	0,009578	0,000020		
Total	534	0,020679			
PS epif/area foliar hz (mg/cm²)					
Intercept	1	29,35932	29,35932	3607,380	0,000000
loc	1	1,34315	1,34315	165,033	0,000000
zona(loc)	4	0,73470	0,18368	22,568	0,000000
grupo(loc*zona)	12	0,08268	0,00689	0,847	0,602198
cuad(loc*zona*grupo)	36	1,37025	0,03806	4,677	0,000000
Error	481	3,91471	0,00814		
Total	534	7,46549			

El contenido en nitrógeno de la hojas de *Posidonia oceanica* es un 12% superior en las muestras procedentes del Cap Enderrocat que en las del Coll d'en Rabassa (Tabla 5). El análisis preliminar de la heterogeneidad a distintas escalas espaciales del contenido en nitrógeno de las hojas sugiere que éste es similar en haces separados unos pocos metros entre sí y diferente entre haces separados entre sí por decenas de metros o kilómetros.

Tabla 5 Análisis parcial de las diferencias a distintas escalas espaciales en el contenido en nitrógeno (proporción C:N) de las hojas de *Posidonia oceanica* en la bahía de Palma

g.l.	SS	MS	F	p
-------------	-----------	-----------	----------	----------

Intercept	1	33211,45	33211,45	4794,388	0,000000
Loc	1	101,71	101,71	14,683	0,000491
grupo(loc)	4	79,33	19,83	2,863	0,037054
cuad(loc*grupo)	12	148,98	12,42	1,792	0,087424
Error	36	249,38	6,93		
Total	53	579,40			

Actividad 4. Diseño y ensayo de una trampa para el muestreo la comunidad de mesoherbívoros que viven en la pradera de *Posidonia oceanica*.

En primer lugar se verificó el funcionamiento de las trampas colocándolas al azar en una pradera y utilizando luces químicas como atractores. Se comprobó que es un método adecuado para la captura de mesoherbívoros.

Posteriormente se colocaron las tres trampas en distintas ocasiones y en praderas sometidas a distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes y presión de herbívoros. Al principio se utilizaron pequeñas linternas de buceo como fuente de luz para atraer a los mesoherbívoros a las trampas durante la noche. La inundación de algunas de las linternas puso de manifiesto la importancia de la existencia de una fuente de luz para aumentar la cantidad de mesoherbívoros capturados. Los principales de grupos de mesoherbívoros capturados por las trampas corresponden a las especies más móviles de crustáceos, moluscos y poliquetos. La observación de los crustáceos capturados indica que se encuentran en un estado adecuado de conservación en cuanto a la integridad de su cuerpo y apéndices lo que hará factible su identificación.

En el momento de la realización de este informe todavía no se han identificado las especies capturadas. Aunque se espera encontrar diferencias en la composición de la comunidad derivadas de las diferentes condiciones de las praderas donde se colocaron las trampas; es probable que los cambios en las fuentes de luz representen en sí mismas una fuente importante de variación.

Actividad 5. Evaluación experimental del efecto de un aumento de la disponibilidad de nutrientes en la biomasa de macroalgas epífitas de *Posidonia oceanica* y de la influencia que la comunidad íctica ejerce en dicho proceso

En el momento de realizar este informe se ha iniciado el procesado y análisis de las distintas muestras recolectadas por lo que no se dispone de resultados correspondientes a esta actividad. Un avance de los mismos puede estar disponible en el plazo de 2 meses.

Actividad 6. Nueva metodología para la descripción y análisis de la biodiversidad de organismos eucariotas que integran la comunidad epifítica de *Posidonia oceanica*

El análisis de la secuencia génica de la subunidad 18S del ribosoma de los organismos eucariotas integrantes de la comunidad epífita de las hojas de *Posidonia oceanica* mediante extracción del ADN, su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa y separación por medio de electroforesis en gradiente de temperatura (ver Anexo I) proporciona una información sobre la diversidad de la comunidad coherente con la obtenida mediante las técnicas de taxonomía clásica (identificación de los organismos con la lupa y el microscopio). Para una información más detallada ver el Anexo I

Conclusiones

Estas conclusiones deben ser consideradas como preliminares pues en el momento de redactar este informe no se ha completado el procesado y análisis de todas las muestras recolectadas.

1. La carga de epífitos sobre las hojas de *Posidonia oceanica* se ha triplicado durante el periodo 2003-2007 en las dos localidades estudiadas (Magaluf, Ses Salines) y este aumento ha ido acompañado de un descenso superior a un 20% de la biomasa foliar de los haces en Ses Salines pero no en Magaluf. Este resultado sugiere que el nivel de eutrofización de la pradera de *P. oceanica* en ambas localidades ha aumentado durante el periodo de estudio y que dicho nivel no está causando, por el momento, efectos negativos en las praderas pues su densidad muestra una tendencia a aumentar durante el mismo periodo de tiempo. El análisis del contenido en nitrógeno y fósforo de las hojas de *P. oceanica* permitirá confirmar si se ha producido un aumento en la disponibilidad de nutrientes durante el periodo de estudio.

2. El tamaño de los haces foliares de *Posidonia oceanica* y la carga de epífitos sobre los mismos son menor y mayor, respectivamente, en las plantas frente a la desembocadura del torrent de Sant Jordi (Bahía de Pollença) que en La Victoria. El análisis del contenido en nitrógeno y fósforo de las hojas de *P. oceanica* en ambas localidades permitirá confirmar si la disponibilidad de nutrientes es mayor frente al torrent de Sant Jordi que en la Victoria.

3. Los haces de *Posidonia oceanica* son mayores y presentan una menor carga de epífitos en el Cap Enderrocat que en el Coll d'en Rabassa. El contenido en nitrógeno de las hojas de *P. oceanica* es también mayor en el Cap Enderrocat que en el Coll d'en Rabassa. Así, en el ámbito de la bahía de Palma no parece existir una correlación positiva entre la disponibilidad de nutrientes y la carga de epífitos sobre los haces de *P. oceanica*, al menos durante el otoño. Existe un alto grado de heterogeneidad tanto en el tamaño de los haces foliares como en el de la carga de epífitos sobre los mismos y en el contenido en nitrógeno de las hojas; esta heterogeneidad se manifiesta a distintas escalas espaciales (metros, decenas de metros, centenares de metros, kilómetros).

4. La carga de epífitos sobre las hojas de *Posidonia oceanica* ha aumentado en Magaluf, bahía de Palma durante los últimos tres años y es similar a la mostrada por las plantas situadas frente a la desembocadura del torrent de Sant Jordi en la bahía de Pollença, una localidad donde el aporte de nutrientes es importante y la pradera de *P. oceanica* se encuentra muy degradada.

5. El análisis de la secuencia génica de la subunidad 18S del ribosoma de los organismos eucariotas integrantes de la comunidad epífita de las hojas de *Posidonia oceanica* mediante extracción del ADN, su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa y separación por medio de electroforesis en gradiente de temperatura proporciona una información sobre la diversidad de la comunidad coherente con la obtenida mediante las técnicas de taxonomía clásica (identificación de los organismos con la lupa y el microscopio).

Transferencia de conocimientos y actividades de divulgación

Se ha iniciado la transferencia de conocimiento a la comunidad científica por medio de los cauces habituales (presentación de resultados en reuniones científicas y publicación de los mismos en revistas científicas).

Publicaciones y comunicaciones a congresos

1. F.J. Medina-Pons, J. Terrados, R. Rosselló-Mora. Assessment of the structure of the eukaryotic leaf-epiphytic community of *Posidonia oceanica* using a molecular fingerprinting technique (TGGE). Manuscrito enviado a la revista Marine Ecology Progress Series en diciembre de 2007. Ver Anexo I.
2. F.J. Medina-Pons, J. Terrados, R. Rosselló-Mora. Assessment of the structure of the eukaryotic leaf-epiphytic community of *Posidonia oceanica* using a molecular fingerprinting technique (TGGE). Comunicación oral que se presentará en las V Jornades de Medi Ambient de les Illes Balears que se celebrarán en Palma de Mallorca en febrero de 2008.

3. I. Castejón, J. Terrados, B. Morales-Nin. Patterns of spatial variability in *Posidonia oceanica* nutrient content and epiphytes load; a scaled approach in Palma Bay. Comunicación póster que se presentará en las V Jornades de Medi Ambient de les Illes Balears que se celebrarán en Palma de Mallorca en febrero de 2008.

Otras actividades

Las actividades realizadas en este proyecto forman parte de los proyectos de investigación orientados a la obtención del título de doctor de Inés Castejón Silvo y Francisco Javier Medina Pons.

Referencias internacionales (al menos 3 referencias esenciales)

Heck, K.L., Pennock, J.R., Valentine, J.F., Coen, L.D., Sklenar, S.A., 2000. Effects of nutrient enrichment and small predator density on seagrass ecosystems: an experimental assessment. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1041-1057.

Valentine, J.F., Duffy, J.E., 2006. The central role of grazing in seagrass ecology. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, Dordrecht, pp. 463-501.

RECOMENDACIONES

1. Mantener la serie temporal de datos sobre biomasa y diversidad de epífitos sobre las hojas de *Posidonia oceanica* iniciada en 2003 en Magaluf y Ses Salines realizando los muestreos correspondientes cada nuevo año. Los datos sobre biomasa de epífitos deben ser complementados con información sobre el contenido en nutrientes de las hojas de *P. oceanica* para poder correlacionar el desarrollo epifítico con la disponibilidad de nutrientes. La descripción de la estructura de la comunidad epifítica requiere una gran dedicación por lo que puede ser aconsejable realizarla con una periodicidad bienal. Esta serie temporal proporcionará información de primer orden para evaluar el grado de eutrofización y la evolución temporal del mismo en las praderas de *P. oceanica* en Mallorca.

Bibliografía

- Alcoverro, T., Duarte, C.M., Romero, J., 1997. The influence of herbivores on *Posidonia oceanica* epiphytes. *Aquat. Bot.* 56, 93-104.
- Carpenter, S.R., Kitchell, J.F., Hodgson, J.R., 1985. Cascading Trophic Interactions and Lake Productivity. *BioScience* 35, 634-638.
- Cebrián, J., Duarte, C.M., Marbà, N., Enríquez, S., Gallegos, M.E., Olesen, B., 1996. Herbivory on *Posidonia oceanica*: magnitude and variability in the Spanish Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 130, 147-155.
- Duarte, C.M., 1995. Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. *Ophelia* 41, 87-112.
- Gacia, E., Littler, M.M., Littler, D.S., 1999. An experimental test of the capacity of food web interactions (fish-epiphytes-seagrasses) to offset the negative consequences of eutrophication on seagrass communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48, 757-766.
- Hairston, N.G., Smith, F.E., Slobodkin, L.B., 1960. Community structure, population control and competition. *Am. Nat.* 44, 421-425.
- Hauxwell, J., Cebrián, J., Furlong, C., Valiela, I., 2001. Macroalgal canopies contribute to eelgrass (*Zostera marina*) decline in temperate estuarine ecosystems. *Ecology* 82, 1007-1022.
- Hauxwell, J., Cebrián, J., Valiela, I., 2003. Eelgrass *Zostera marina* loss in temperate estuaries: relationship to land-derived nitrogen loads and effect of light limitation imposed by algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 247, 59-73.
- Heck, K.L., Pennock, J.R., Valentine, J.F., Coen, L.D., Sklenar, S.A., 2000. Effects of nutrient enrichment and small predator density on seagrass ecosystems: an experimental assessment. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1041-1057.
- Heck, K.L., Orth, R.J., 2006. Predation on seagrass Beds. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, Dordrecht, pp. 537-550.
- Heck, K.L., Valentine, J.F., 2006. Plant-herbivore interactions in seagrass meadows. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 330, 420-436.
- Hemminga, M.A., Duarte, C.M., 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 298, págs.
- Hobson, E.S., Chess, J.R., 1979. Zooplankters that emerge from the lagoon floor at night at Kure and Midway Atolls, Hawaii. *Fishery Bulletin* 77: 275-280.
- Hughes, A.R., Bando, K.J., Rodríguez, L.F., Williams, S.L., 2004. Relative effects of grazers and nutrients on seagrasses: a meta-analysis approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 282, 87-99.
- Jennings, S., Reñones, O., Morales-Nin, B., Polunin, N.V.C., Moranta, J., Coll, J., 1997. Spatial variation in the ^{15}N and ^{13}C stable isotope composition of plants, invertebrates and fishes on Mediterranean reefs: implications for the study of trophic pathways. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146, 109-116.
- Lapointe, B.E., Barile, P.J., Matzie, W.R., 2004. Anthropogenic nutrient enrichment of seagrass and coral reef communities in the Lower Florida Keys: discrimination of local versus regional nitrogen sources. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308, 23-58.
- Leoni, V., Pasqualini, V., Pergent-Martini, C., Vela, A., Pergent, G., 2006. Morphological responses of *Posidonia oceanica* to experimental nutrient enrichment of the canopy water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339, 1-14.
- Lepoint, G., Nyssen, F., Gobert, S., Dauby, P., Bouquegneau, J.M., 2000. Relative impact of a seagrass bed and its adjacent epilithic algal community in consumer diets. *Mar. Biol.* 136, 513-518.
- Menge, B.A., 1992. Community Regulation: Under What Conditions Are Bottom-Up Factors Important on Rocky Shores? *Ecology* 73, 755-765.
- Menge, B.A., 2000. Top-down and bottom-up community regulation in marine rocky intertidal habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 250, 257-289.
- Neckles, H.A., Wetzel, R.L., Orth, R.J., 1993. Relative effects of nutrient enrichment and grazing on epiphyte-macrophyte (*Zostera marina* L.) dynamics. *Oecologia* 93, 285-295.
- Paine, R.T., 1980. Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. *Journal of Animal Ecology* 49, 667-685.
- Prado, P., 2006. Magnitude of herbivory in *Posidonia oceanica* (L.) delile and factors responsible for spatial variation, Ph. D. thesis, Univ. Barcelona.
- Prado, P., Tomas, F., Alcoverro, T., Romero, J., 2007. Extensive direct measurements of *Posidonia oceanica* defoliation confirm the importance of herbivory in temperate seagrass meadows. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 340, 63-71.
- Prado, P., Alcoverro, T., Martínez-Crego, B., Vergés, A., Pérez, M., Romero, J., 2007. Macrograzers strongly influence patterns of epiphytic assemblages in seagrass meadows. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 350, 130-143.
- Ralph, P.J., Tomasko, D.A., Moore, K.A., Seddon, S., Macinnis-Ng, C.M.O., 2006. Human Impacts on Seagrasses: Eutrophication, Sedimentation and Contamination. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, Dordrecht, pp. 567-593.
- Romero, J., Lee, K.S., Pérez, M., Mateo, M.A., Alcoverro, T., 2006. Nutrient dynamics in seagrass ecosystems. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology, and Conservation*, Springer, Dordrecht, pp. 227-254.
- Short, F.T., Burdick, D.M., Kaldy III, J.E., 1995. Mesocosm experiments quantify the effects of eutrophication on eelgrass, *Zostera marina*. *Limnol. Oceanogr.* 40, 740-749.
- Short, F.T., Burdick, D.M., 1996. Quantifying Elgrass Habitat Loss in Relation to Housing Development and Nitrogen Loading in Waquoit Bay, Massachusetts. *Estuaries* 19, 730-739.
- Short, F.T., Burdick, D.M., Granger, S., Nixon, S.W., 1996. Long-term decline in eelgrass, *Zostera marina* L., linked to increased housing development. In: Kuo, J., Phillips, R.C., Walker, D.I., Kirkman, H. (Eds.), *Seagrass Biology. Proceedings of an international workshop*, Faculty of Sciences, University of Western Australia, Nedlands, pp. 291-298.
- Shurin, J.B., Borer, E.T., Seabloom, E.W., Anderson, K., Blanchette, C.A., Broitman, B.R., Cooper, S.D., Halpern, B.S., 2002. A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades. *Ecology Letters* 5, 785-791.
- Strong, D.R., 1992. Are trophic cascades all wet? Differentiation and donor-control in speciose ecosystems. *Ecology* 73, 747-754.
- Tomas, F., Turón, X., Romero, J., 2005. Effects of herbivores on a *Posidonia oceanica* seagrass meadow: importance of epiphytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 287, 115-125.
- Tomas, F., Turón, X., Romero, J., 2005. Seasonal and small-scale spatial variability of herbivory pressure on the temperate seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 301, 95-107.

- Tomasko, D.A., Lapointe, B.E., 1991. Productivity and biomass of *Thalassia testudinum* as related to water column nutrient availability and epiphyte levels: field observations and experimental studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75, 9-17.
- Tomasko, D.A., Dawes, C.J., Hall, M.O., 1996. The effects of anthropogenic nutrient enrichment on turtle grass (*Thalassia testudinum*) in Sarasota Bay, Florida. *Estuaries* 19, 448-456.
- Valentine, J.F., Duffy, J.E., 2006. The central role of grazing in seagrass ecology. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C.M. (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, Dordrecht, pp. 463-501.
- Vizzini, S., Sarà, G., Michener, R.H., Mazzola, A., 2002. The role and contribution of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile organic matter for secondary consumers as revealed by carbon and nitrogen stable isotope analysis. *Acta Oecologica* 23, 277-285.
- Williams, S.L., Ruckelshaus, M.H., 1993. Effects of nitrogen availability and herbivory on eelgrass (*Zostera marina*) and epiphytes. *Ecology* 74, 904-918.

1 **ASSESSMENT OF THE STRUCTURE OF THE EUKARYOTIC LEAF-**
2 **EPIPHYTIC COMMUNITY OF *POSIDONIA OCEANICA* USING A**
3 **MOLECULAR FINGERPRINTING TECHNIQUE (TGGE)**

4
5 Running head: Eukaryotic epiphytes of *Posidonia oceanica* leaves

6
7 **F.J. Medina-Pons^{*}, J. Terrados, R. Rosselló-Mora**

8 **Institut Mediterrani d'Estudis Avançats IMEDEA (CSIC-UIB) Miquel Marqués, 21 07190,**

9 **Esporles, Mallorca, Spain**

10
11 ABSTRACT: Seagrass leaves have been recognised as the main hard substratum in
12 shallow sedimentary environments, providing suitable conditions for the establishment
13 of a species-rich community of epiphytes. Seasonal differences in eukaryotic leaf-
14 epiphyte structure of seagrass *P. oceanica* (L.) Delile have been largely studied using
15 classical techniques (dissecting microscope and/or microscope). Variability in epiphyte
16 biomass and specific composition along the succession has been related to seasonality
17 of growth and high turn-over rates of *P. oceanica* leaves. Our main goal was to develop
18 a molecular methodology (DNA extraction, PCR (Polymerase chain reaction) and
19 TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)), largely used in microbial studies,
20 to detect structural changes between two stages of the succession (winter vs. summer-
21 early autumn) of leaf-epiphytic community. Patterns obtained using TGGE and classical
22 techniques were generally consistent. Higher complexity of leaf-epiphytic community
23 was obtained at the end of the succession (summer) related to the presence of
24 Rhodophyta, Phaeophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta and Zooepiphytes. Lower
25 diversity was obtained in winter and the community was characterised by a mixture of

* Address for correspondence E-mail: vieafmp4@uib.es

1 encrusting Rhodophyta and Phaeophyta. Sampling size (minimum number of *P.*
2 *oceanica* shoots) to adequately represent the structure of eukaryotic leaf-epiphytic
3 community was of the same order of magnitude when these two techniques were
4 applied. To conclude, TGGE reflects in great extend results obtained using classical
5 techniques and was less time consuming. Both reasons make this molecular technique
6 an excellent parallel approach for comparative studies about the structure of the *P.*
7 *oceanica* epiphytic community.

8

9 KEY WORDS: Eukaryotic leaf-epiphyte structure · TGGE · Seagrass leaves · *Posidonia*
10 *oceanica*

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

INTRODUCTION

Seagrasses are a group of flowering plants distributed worldwide that can colonize depths from mean sea level down to 90 m (Duarte 1991) and that provide important ecological services such as the maintenance of marine biodiversity, the regulation of the quality of coastal waters, and the protection of the coast line (Procaccini et al. 2003, Terrados & Borum 2004). Seagrass leaves have been recognised as the main hard substratum in shallow sedimentary environments (Kendrick & Lavery 2001) for the establishment and growth of a species-rich community of epiphytes (fungi, bacteria, micro- and macro-algae and sessile invertebrates) (Borowitzka et al. 2006). Seagrass leaves have been considered as a suitable substratum for epiphytes because of higher light intensities, greater nutrient supply and less sedimentation in relation to conditions down this substratum (Trautman & Borowitzka 1999).

Posidonia oceanica (L.) Delile is a seagrass restricted to Mediterranean Sea where it forms dense meadows in infralitoral bottoms (Procaccini et al. 2003). Eukaryotic leaf-epiphytes of *P. oceanica* have been reported as significant contributors to the biomass, primary productivity, and the nutrient cycling of the assemblage (Ballesteros 1987, Romero 1988, Lepoint et al. 2007) playing, therefore, an important role in ecosystem functioning. Because of seasonality of growth and high turn-over rates of *P. oceanica* leaves (Romero 1989, Pergent & Pergent-Martini 1993), different stages in the structure of the epiphytic community during the year have been distinguished. These different stages are related with the time elapsed since colonization of these leaves and result in structural changes of the epiphytic community along the succession (Van der Ben 1971, Ballesteros 1987, Romero 1988, Mazzella et al. 1989). Temporal differences in the structure of the eukaryotic epiphytic community have been largely studied assessing variations of epiphyte biomass and of the species composition of the community among

1 seasons. The highest values of epiphyte biomass have been reported in spring and
2 summer (Ballesteros 1987, Romero 1988), when the community is dominated by
3 Phaeophyta (*Giraudia sphacelarioides* and *Cladosiphon sp.*) and Rhodophyta
4 (encrusting Corallinaceae and Ceramiales), respectively (Van der Ben 1971, Ballesteros
5 1987, Romero 1988). Rhodophyta (especially Ceramiales) have been described as the
6 most important group in autumn (Van der Ben 1971, Mazzella et al. 1989), whereas
7 epifauna (especially Bryozoa) can be dominant in winter (Romero 1988) and reach an
8 important development in spring (Ballesteros 1987). The species richness of the
9 community increases from the beginning (autumn) to the end (summer) of the
10 succession when the highest similarity among the eukaryotic epiphytic community
11 established in each *P. oceanica* shoot is expected (Ballesteros 1987).

12 The structure of the epiphytic community of *P. oceanica* leaves has been
13 traditionally assessed through the identification and quantification of the species present
14 using dissecting microscopes and/or optical microscopes (Ballesteros 1987, Romero
15 1988, Mazzella et al. 1989, Lepoint et al. 1999). The use of molecular techniques to
16 study the structure of the prokaryotic epiphytic community of seagrasses has just started
17 (Uku et al. 2007) and, to the best of our knowledge, the eukaryotic epiphytic community
18 has never been studied by molecular methods. Molecular microbial ecology has focused
19 on the use of the gene sequence of the small ribosome subunit (SSU, rDNA 16S for
20 prokaryotes, or 18S in eukaryotes) to describe the structure and dynamics of microbial
21 communities with independence of culture techniques (Head et al. 1998, Acinas et al.
22 2004). This approach, classically used for prokaryotes, has also been adapted to study
23 community structures of microscopic eukaryotes as marine planktonic picoeukaryotes
24 (Díez et al. 2001a, Díez et al. 2001b, Massana et al. 2002, Gadanho & Sampaio 2004),

1 estuarine fungi (Heuer et al. 1997, Lefèvre et al. 2007), soil nematodes (Foucher &
2 Wilson 2002), and ruminant tract protozoa (Regensbogenova et al. 2004).

3 Among the commonly used molecular tools, DNA fingerprinting techniques, like
4 temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) or denaturing gradient gel
5 electrophoresis (DGGE), have been extensively applied (Ovreas et al. 1997, Nübel et al.
6 1999, Gast et al. 2004). These techniques allow the simultaneous processing of large
7 number of samples, and provide data on diversity with independence of the knowledge
8 of the species composition. TGGE or DGGE are based on the segregation of amplified
9 gene fragments of identical size but different in sequence along a chemical (DGGE) or
10 thermal (TGGE) gradient (Muyzer and Smalla 1998, Muyzer 1999). Sequence
11 segregation occurs on acrylamide gels with a denaturing gradient, in where each
12 fragment migrates according to its melting point (directly related with its GC content)
13 (Muyzer 1999, Gadanho & Sampaio 2004). A mixed community exhibits, after the
14 electrophoresis, a banding pattern in where each single band may correspond with a
15 single sequence. In this regard, the complexity of the amplification pattern is directly
16 related to the community structure.

17 In this study, we describe the application of TGGE to the assessment of the changes
18 on the community structure of the epiphytic biota of *P. oceanica* leaves. We present a
19 modification of a DNA isolation method used primarily for soils (Zhou et al. 1996),
20 combined with a protocol of purification that renders suitable DNA for PCR
21 (Polymerase chain reaction) and TGGE. Our main objective was to evaluate the
22 usefulness of this molecular approach to describe the structure changes of the *P.*
23 *oceanica* leaf-epiphytic community. Prior to this we had to elucidate the sample size
24 needed to describe the structure of the community and its seasonality. Then we compare
25 the structure of the epiphytic community in two different stages of its development

1 along the year (winter vs. end of summer-early autumn) as described by the TGGE with
2 the results provided by standard techniques (direct identification of epiphytic species
3 under optical microscope).

4

5

MATERIALS AND METHODS

6 **Study site and sample collection.** The study was performed in a *P. oceanica*
7 meadow located at a depth of 7 m in La Victoria (39° 51' N, 3° 11' E, Alcudia Bay,
8 Majorca, Spain). We sampled in February 2006 and September 2006 to target two
9 different stages of the development of the leaf epiphytic community (Ballesteros 1987).
10 Twenty *P. oceanica* shoots were haphazardly collected within a 0.25 m² surface at each
11 sampling date by SCUBA divers to be processed using the TGGE technique (see ahead)
12 to describe the structure of leaf-epiphytic community. Five shoots were collected along
13 each of two 10 m long transects, which were 30 m apart of each other, to estimate shoot
14 biomass and epiphyte load at each sampling date. In order to identify the species of
15 epiphytes present, five (February) or ten (September) additional shoots were harvested
16 along one or two, respectively, of the transects and preserved in 4% formalin seawater
17 until their processing.

18 **Shoot and epiphyte biomass.** Epiphytes in all the leaves of each shoot were
19 scraped using a razor blade (Dauby & Poulicek 1995) and collected in pre-weighed
20 Whatman GF/C glass fibre filters which were dried (60°C, 48 h) to estimate the dry
21 weight (g DW). Six samples of each sampling date were randomly chosen and burned
22 (450°C, 6 h) to estimate the ash content of the epiphytes of each shoot (% DW). In
23 addition, the epiphyte-cleaned leaves were dried (60°C, 48 h) to estimate the mass of
24 each shoot (g DW shoot). The epiphyte load (DW) was standardized to the mass of the
25 shoots (g DW g⁻¹ DW shoot⁻¹).

1 **DNA Extraction.** Shoots harvested for molecular studies were kept frozen at -80 °C
2 upon arrival to the laboratory until its processing. A modification of a DNA extraction
3 aggressive method (Zhou et al. 1996) combined with a purification of DNA isolated
4 (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) was developed for our purpose. The epiphyte layers of
5 all leaves of each shoot were carefully scraped into sterile filtered seawater with a clean
6 razor blade. Epiphytes were then collected by centrifugation at 3900 rpm for 15 min.
7 Biomass (around 1 g of wet weight) was ground with liquid nitrogen and stainless steels
8 beads (5 mm Qiagen Ref.: 69989) to a fine powder by vigorous stirring using a vortex.

9 Fine powder was suspended in 13.5 ml of extraction buffer (100 mM TrisHCl (pH =
10 8), 20 mM EDTA (pH = 8), 1.4 M NaCl, 2 % PVP and 2 % CTAB (Modified of
11 Porebski et al. 1997)) and 100 µl of proteinase K (10 mg/ml). Tubes were horizontally
12 incubated at 37°C for 1 h with shaking. Then, 1.5 ml of 25 % SDS was added to each
13 tube and samples were incubated for 2 h in a 65 °C water bath, and tubes were mixed by
14 inversion each 10-15 minutes. Extracts were then left at room temperature for at least 20
15 minutes. Upon incubation, 15 ml equilibrated phenol (pH = 8) was added to each
16 sample and mixed vigorously. After that, samples were centrifuged 15 minutes at 3900
17 rpm. Supernatant was collected and mixed with 15 ml of chloroform : isoamyl alcohol
18 (24:1), vigorously shaken, and centrifuged at 3900 rpm for 10 minutes. This step was
19 repeated at least 2 times until no interface was seen. Finally, 1/9 vol. of Ac Na 3M (pH
20 = 7) and 0.6 vol. of isopropanol were mixed with the supernatant to precipitate DNA.
21 Samples were stored at 4°C overnight. DNA was collected by centrifugation at 3900
22 rpm for 30' and the supernatant was discarded. Precipitated DNA was dried at room
23 temperature and finally resuspended in 200 µl MiliQ sterile water.

24 In order to remove PCR inhibitors, isolated DNA was further purified using DNeasy
25 Plant Mini kit (Qiagen Cat. 69104) following manufacturer's instructions. Quality and

1 Quantity of DNA isolated and purified was assessed in 1% agarose gel with Ethidium
2 Bromide (EtBr). DNA bands were revealed using an ultraviolet lamp.

3 **PCR conditions.** Eukaryotic 18S ribosomal DNA gene fragments were amplified
4 using (rDNA)-specific primers Euk1A and EukNew-516r-GC (Table 1), which result as
5 a modification of previously published oligonucleotides (Diez et al. 2001a). The GC-
6 clamp tail is necessary at the 5' reverse primer in order to generate suitable fragments
7 for TGGE (Gadanho & Sampaio 2004), and acts as a high melting domain preventing
8 the two DNA strands from complete dissociation into single strands in TGGE (Muyzer
9 and Smalla 1998). A 600 pb fragment was generated with PCR using a Master Mix
10 (Eppendorf) in a final volume of 20 µl according to manufacturer's instructions. DMSO
11 5 % was added in order to increase specificity of the reaction (Sambrook & Russell
12 2001). The PCR program included an initial denaturation at 94°C for 3 minutes,
13 followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 48°C for 1
14 minute, and extension at 72°C for 3 minutes. A final extension step of 72°C for 10
15 minutes was done. Amplicons were visualized in a 3% MS-8 Agarose gel (Pronadisa.
16 Ref.: 8066) with Et Br using “ Real Escala N°2 ” as a quantification and size marker
17 (Durviz. Ref.: RBMM2).

18 **TGGE.** PCR products were resolved by using the Biometra TGGE Maxi System
19 with the procedure in accordance with the manufacturer's instructions. Acrylamide gel
20 was prepared with 6% acrylamide/bisacrylamide (37.5:1), 8 M urea, 2 % glycerol, TAE
21 1X and 20 % deionized formamide and polymerized with 38 µl TEMED and 63 µl
22 ammonium persulfate (APS) 10 % for at least 3 hours (modified of Van Dillewijn et al.
23 2002). 70 ng of each product were run in a gel with a TAE 1X buffer at a constant
24 voltage of 130 V, for 17 h. A narrow thermal gradient 35-45°C was chosen as it
25 provides a good resolution of bands. Samples were charged with 1 µl TAE 4X loading

1 buffer. Finally, gels were silver-stained. The solutions used were 10 % (vol / vol)
2 ethanol plus 0.5 % acetic acid for fixation (10 min), 0.2 % (wt / vol) silver nitrate for
3 staining (30 min), and freshly prepared developed solution containing sodium
4 borohydride (around 0.12 g l⁻¹), 0.15 % formaldehyde and 1.5 % (wt / vol) NaOH.
5 Finally, 0.75 % (wt / vol) sodium carbonate solution to stop the development (10 min.)
6 was used. Gels were conserved with 25 % ethanol and 10 % glycerol until dried
7 (modified of Heuer et al. 1997).

8 **Structure of the leaf-epiphytic community under optical microscope.** The
9 epiphytic community present in the 10 cm apical portion of the oldest leaf (both outer
10 and inner leaf sides) of each shoot was chosen because, generally, no additional taxa are
11 present in the younger leaf portions of seagrass shoots (Vanderklift & Lavery 2000,
12 Lepoint et al. 2007). Moreover, the species richness and biomass of epiphytes in the
13 apical portion of seagrass leaves are usually higher than those of the basal portions
14 (Reyes & Sansón 1998, Trautman & Borowitzka 1999, Lepoint et al. 2007). Random
15 scrapings (around three and five) of this apical segment were mounted on slides for the
16 identification of epiphytic taxa (Reyes & Sansón 1997). A list of species (or genera,
17 when determination of species was not possible) found in these slides was recorded
18 using an optical microscope.

19 **Data analysis.** Statistical analysis were done using PRIMER 5 (Plymouth Routines
20 in Multivariate Ecological Research) (Clarke & Gorley 2001), SIGMAPLOT 8.0 and
21 STATISTICA 7.1 software

22 Differences of shoot mass, the ash content of the epiphytes, and epiphyte load
23 between the two sampling dates were assessed by one-way ANOVA. Data were
24 previously tested for homogeneity of variances and normality using Levene's test ($p >$

1 0.05) and Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.05$), respectively. Variances were
2 homogeneous and data followed normal distribution

3 TGGE band profiles were translated into a binary (presence/absence) matrix for
4 each sampling date. All bands migrating with an identical velocity in TGGE were
5 identified as unique OTUs (operational taxonomic units) (Rosselló-Mora & López-
6 López in press) for all statistical calculations. In order to standardise and compare the
7 band profile of two sampling dates, some of the February samples were charged in the
8 September TGGE. An elevated number of permutes (999) of the band profile of the
9 twenty shoots collected in each sampling date were done to build an average rarefaction
10 curve (cumulative number of different OTUs vs. number of shoots).

11 Although, sample size has been recognised as a basic question in ecological studies
12 (Ballesteros 1986), few studies about necessary sampling effort to describe the structure
13 of this community have been done (Panayotidis & Boudouresque 1981, Ballesteros
14 1987). For this reason, we estimated the minimum number of shoots required to
15 adequately represent the band richness of the 20-shoot sample for each sampling date.
16 We considered that minimum sample was reached when the increase of band richness,
17 after including any additional shoot in the analysis, was smaller than 5 % of the total
18 number of different OTUs (Ballesteros 1986).

19 A MDS analysis using the Bray-Curtis similarity index was done on the binary
20 matrix built with data of the two sampling dates in order to visually inspect differences
21 between them. Significant differences in band profiles between February and September
22 were assessed with an analysis of similarity (ANOSIM).

23 Differences in number of OTUs per shoot between sampling dates were assessed by
24 one-way ANOVA. Data were previously tested for homogeneity of variances and

1 normality using Levene's test ($p > 0.05$) and Kolmogorov-Smirnov test ($p > 0.05$),
2 respectively. Variances were homogeneous and data followed normal distribution.

3 Similarly, we built an average rarefaction curve with data obtained from optical
4 microscope (cumulative number of different epiphyte species vs. number of shoots) to
5 estimate the minimum number of shoots required to adequately represent the species
6 richness of the epiphytic community at each sampling date. Then, we performed a MDS
7 analysis to evaluate the differences in the species composition of the epiphytic
8 community between two sampling dates. Significant differences in species composition
9 between February and September were assessed with an analysis of similarity
10 (ANOSIM).

11 Differences in the number of species per shoot between sampling dates were
12 assessed by one-way ANOVA. Data were previously tested for homogeneity of
13 variances and normality using Levene's test ($p > 0.05$) and Kolmogorov-Smirnov test (p
14 > 0.05), respectively. Although data followed normal distribution, a logarithmic
15 transformation of the data values was needed to achieve the homogeneity of variances.

16 Thus we compare the results provided by the TGGE analysis and the direct
17 identification of species using the optical microscope to evaluate the consistency of the
18 information provided by both approaches about the structure of the epiphytic
19 community.

20

21

RESULTS

22

Shoot and epiphyte biomass

23

24

25

Epiphyte and shoot biomass data obtained in February and September are shown in
Table 2. One-way ANOVA did not reveal significant differences of the epiphyte load (g
 $\text{DW g}^{-1} \text{DW shoot}^{-1}$), shoot biomass and % ash content between the two sampling dates

DNA extraction, amplification, and electrophoresis optimization

We have combined and modified different methods in this study in order to optimize the detection of the real epibiota. To achieve an optimization of the DNA-based detection of the epiphytic biota, we first compared the efficiency of the DNA extraction of fresh shoots versus that frozen stored. Preliminary results (data not shown) indicated similar DNA yields. As detailed in the methods section, we modified an aggressive DNA extraction method suitable for soil samples (Zhou et al. 1996), and combined with the purification of the DNA. All tests (results not shown) indicated that it provided better results than the sole use of sonication, frozen-thawed cycles, or disruption with beads independently. The combination yielded high quality of amplifiable DNA exempt of PCR inhibitors.

By comparing 18S rRNA gene sequence alignments as implemented in the ARB-SILVA project (www.arb-silva.de, Pruesse et al. 2007), and by the use of the primer search tool implemented in the ARB software package (www.arb-home.de, Ludwig et al. 2004), we detected that Rhodophyta would be not complemented by the universal primers proposed by Diez et al. 2001a. Thus we modified this primer set obtaining the new set Euk1A / EukNew 516r-GC (Table 1). In addition, we discarded another set of primers (EukA / EukB) (Diez et al. 2001a), because it generated fragments too long for TGGE purposes (Muyzer and Smalla 1998). Among the different PCR conditions assayed we concluded that adding 5 % DMSO in the amplification mixture would render the best amplicon yields.

Finally, different thermal gradient amplitudes for TGGE electrophoresis conditions were assayed, and concluded that a 35-45°C gradient yielded the best resolution. In addition, silver staining allowed the detection of larger numbers of bands than those assays stained with ethidium bromide.

1 **Sample size optimization to the study of the structure of the epiphytic community**
2 **in February and September applying TGGE**

3 TGGE profiles of February and September (Fig.1) were produced and independently
4 compared in order to evaluate the minimal set of shoots to be studied for each season.
5 Rarefaction curves were logarithmic in both sampling dates (Fig. 2a), but showed
6 different saturation profiles as an indication of the diversity of the banding fingerprints.
7 For the February sample community, 6 shoots were necessary to infer 95 % of diversity
8 of epiphytic assemblage in 0.25 m². However, in September, 4 shoots were enough (Fig.
9 2b).

10 **Similarities in *P. oceanica* epiphytic community between February and September**
11 **applying TGGE**

12 Forty three different OTUs were identified for the complete set of samples of
13 February and September. The February complete sample contained 30 of the total
14 identified OTUs, whereas that of September exhibited 38 of them. The number of OTUs
15 per shoot varied between 4 and 23 in February with a mean (\pm SD) of 11.9 ± 5.2 OTUs
16 shoot⁻¹. In contrast, the September set showed between 16 to 30 OTUs with a mean of
17 22.3 ± 3.9 OTUs shoot⁻¹ (Table 5). One-way ANOVA revealed significant differences
18 in number of OTUs shoot⁻¹ among February and September samples (Table 3).

19 Clustering dendrogram (data not shown) produced a clear separation of both
20 samples at a similarity level of 50 %, and MDS analysis provided a similar result (Fig.
21 3). Results from ANOSIM confirmed the significance of the differences among the
22 samples of the two sampling dates ($R = 0.761$, $p < 0.01$). The epiphytic assemblage was
23 more homogeneous for the September shoots (clustering above 60 %) than that of the
24 February samples (below 60 %) (data not shown).

1 **Similarities in epiphytic community between *Posidonia oceanica* shoots in**
2 **February and September using optical microscope**

3 A list of epiphytic species identified in the February and September shoots using
4 optical microscope is shown in Table 4. While some epiphytes were found in all
5 samples (brown and red encrusting algae (*Myrionema magnusii* and
6 *Hydrolithon+Pneophyllum spp.*) or almost all samples (filamentous red algae such as
7 *Audouinella daviesii*, *Audouinella sp.*, *Erythrotrichia carnea* and *Spermothamnion sp.*),
8 others were mostly present in February (brown algae *Giraudia sphacelarioides*) or
9 September (Ceramiales algae, Chlorophyta and Zooepiphytes) shoots. In general, the
10 February epiphytic community was basically composed of Rhodophyta and Phaeophyta,
11 whereas in September, the community was much more complex and it included
12 Rhodophyta, Phaeophyta, Chlorophyta, and Zooepiphytes. The number of Rhodophyta
13 and Phaeophyta were similar in February shoots but the former (Ceramiales mainly)
14 dominated in September shoots. Zooepiphytes were less abundant than algae in both
15 sampling dates. The main zooepiphytes in September shoots were Bryozoa and
16 Foraminifera while the main Chlorophyta taxa were *Pringsheimiella sp.*, *Phaeophila*
17 *dendroides* and *Cladophora sp.* (Fig. 4).

18 The total number of epiphytic species identified was 10 in February shoots and 38 in
19 September shoots. The mean number of species per shoot (\pm SD) was higher in
20 September (14.7 ± 4.5) than in February (6 ± 2.1) (Table 5). One-way ANOVA
21 revealed significant differences in species richness shoot⁻¹ among February and
22 September samples (Table 3). The minimum number of shoots necessary to represent
23 the species richness of the epiphytic community was 5 in February and 8 in September
24 (Fig. 5). Cluster analysis and MDS (Fig. 3) showed that the similarity of the epiphytic
25 community among February shoots was higher than that among September. Results

1 from ANOSIM (R value = 0.784, $p < 0.01$) confirmed the significance of the differences
2 among the epiphytic community in February and September shoots shown by MDS.

10 **DISCUSSION**

11 Our purpose was to evaluate the applicability of TGGE to the study of the epiphytic
12 eukaryotic community of *P. oceanica* leaves, and compare it with the traditional species
13 cataloguing by the morphotype identification and quantification. For this intention we
14 had to produce an improved protocol for DNA extraction and amplification due to the
15 fact that we expected a dominant fraction of photophilous algae in the epiphytic biota
16 (Lepoint et al. 1999). DNA isolation of marine algae has proven to be very difficult due
17 to the co-isolation of polysaccharides and secondary metabolites which can inhibit PCR
18 (Hong et al. 1997, Vidal et al. 2002). Our preliminary results gave satisfactory
19 amplification yields and clear TGGE banding patterns that can be easily compared.

20 The study shows that the TGGE approach was able to detect seasonal differences in
21 the structure of the leaf epiphytic community of *P. oceanica*. The banding profiles of
22 the September study were more complex than those of February. For our diversity
23 analysis, identically migrating bands were considered to be a unique OTU. Each OTU
24 can be considered as the TGGE analogue to any different taxon detected by traditional
25 techniques. However, it is important to note that we cannot yet correlate a single band
26 (unique 18S rRNA gene sequence fragment) with a single morphotype or
27 morphospecies.

28 When counting the average of different number of OTUs detected in each shoot, we
29 observed that the September samples showed larger number than that of February. This
30 higher number of OTUs per shoot in September compared to that of February is
31 consistent with previous classical studies (Antolic 1986, Ballesteros 1987). There, the

1 species richness of the epiphytic community of *P. oceanica* increased along the seasonal
2 succession. In addition, TGGE showed that the similarity among the epiphytic
3 communities installed in each single *P. oceanica* shoot was higher in September than in
4 February, a fact that is as well in agreement with previous observations (Ballesteros
5 1987). The latter stages of the succession of the *P. oceanica* epiphytic community are
6 characterized by a group of species that are common to all shoots (Ballesteros 1987).
7 With this results, we could observe that the minimum number of shoots required to
8 represent the structure of the epiphytic community (as depicted by the OTUs diversity)
9 was higher in February (6 shoots) than in September (4 shoots). These values were of
10 the same order of magnitude than those estimated by other classical studies (Panayotidis
11 & Boudouresque 1981, Ballesteros 1987).

12 MDS and ANOSIM analysis from TGGE banding pattern clearly showed that the
13 structure of the epiphytic communities installed on the February shoots were different
14 from those of September. Our observations agree with previous results describing
15 significant differences between early and late stages of the succession (Antolic 1986,
16 Ballesteros 1987). Despite the significant differences observed, the two stages of the
17 epiphytic community showed a large number of common bands (around 50%). This is
18 an indication of the presence of permanent OTUs in the community. These common
19 bands, serve as well as internal electrophoresis markers that allow reliable comparisons
20 of the banding patterns between different gels. Previous studies show also the presence
21 of a permanent group of species along the succession of the epiphytic community of *P.*
22 *oceanica* (Mazzella et al. 1989). There, the structures of May and November shared
23 about 35 % similarity.

24 The changes of species composition and richness of the epiphytic community from
25 February to September described by us through the direct identification of species using

1 the optical microscope were similar to those described previously (Van der Ben 1971,
2 Ballesteros 1987, Mazzella et al. 1989). These studies found higher species richness in
3 latter stages of the succession and a transition from an encrusting layer to a filamentous
4 plus an encrusting layer from the beginning to the end of the succession of *P. oceanica*
5 epiphytic community. Despite the higher complexity of the community in September
6 samples, we did not find differences in the total biomass of the epiphytic community
7 between two sampling dates, which contrasts with previous studies that found higher
8 epiphyte biomass per shoot at the end of the succession (Ballesteros 1987, Romero
9 1988).

10 The high species richness of the epiphytic community installed in September shoots
11 was explained mostly by the presence of numerous Rhodophyta species (especially
12 filamentous Ceramiales), as it have been previously recognised in *Posidonia oceanica*
13 (Van der Ben 1971, Antolic 1986). On the other hand, the community of February
14 samples was characterised by a encrusting layer of Rhodophyta and Phaeophyta, which
15 is consistent with previous studies (Ballesteros 1987, Mazzella et al. 1989). Although
16 the epiphytic community of September shoots was composed mainly by filamentous
17 macroalgae species, the epiphyte ash content expressed as % DW was not significant
18 different between two sampling dates. Whereas Rhodophyta, Phaeophyta and
19 Bacillariophyta were found in February and September samples, Chlorophyta were
20 totally absent in winter, which was consistent with Tsirika et al. 2007. In contrast to
21 these results, significant differences in the presence of Chlorophyta taxa were not found
22 among seasons in other studies (Antolic 1986). Zooepiphytes were found in two
23 sampling dates but they were clearly more abundant at the end of the succession. This
24 latter result contrasts with other studies that have described a dominance of

1 zoepiphytes in winter (Romero 1988), but it was in agreement with Ben Brahim et al.
2 2006, which basically found zoepiphytes in summer.

3 The results indicate that the information provided by the TGGE technique about the
4 structure of the epiphytic community of *P. oceanica* leaves is consistent with that
5 provided by the direct identification for epiphytic species using the optical microscope.
6 In addition, our observations are also consistent with those about the changes in species
7 richness and the structure of the epiphytic community along the succession (Van der
8 Ben 1971, Ballesteros 1987, Mazzella et al. 1989). In our case, TGGE gave similar
9 indications on the sample complexity, interseasonal differences, and minimum number
10 of representative shoots (4-6 shoots for molecular and 5-8 shoots for traditional studies).
11 In accordance with classical studies (Ballesteros 1987), similarity between epiphytic
12 community of September shoots was higher than between February samples when
13 TGGE were applied.

14 It is clear to us that both approaches are complementary and do not give identical
15 information. In first instance TGGE targets all eukaryotic individuals of the sample,
16 whereas the traditional study focuses only on macroalgae or macroinvertebrates. Thus,
17 the first approach may as well target microscopic eukaryotes not detectable under our
18 observational conditions, and this is reflected by the higher number of OTUs that TGGE
19 renders. In addition, DNA-based methods are biased (Dahllöf 2002) towards the
20 detection of those organisms that yield higher efficiency on the nucleic acid extraction
21 (i.e. cell wall-free organisms or those synthesising complex protective structures may
22 render lower yields than unprotected cells, or multicellular organisms may contribute
23 differently in the proportion of template DNA); or PCR amplification (i.e. mismatching
24 oligonucleotide complementary stretches, or higher abundant may be favoured towards
25 that in lower abundance). However, the optical identification and quantification of

1 individuals may be biased towards favouring macroepiphytic types and by the
2 taxonomical expertise of the researcher.

3 In any case, the easiness of the TGGE method permits the simultaneous handling of
4 large amounts of samples. In addition, we showed that it reflects in great extend the
5 results of classical methods. Both reasons make TGGE an excellent parallel approach
6 for comparative studies about the structure of the *P. oceanica* epiphytic community.
7 Furthermore, TGGE also allows the study of the whole set of eukaryotic organisms,
8 thus giving an idea of the whole community and not only on specific groups. A practical
9 benefit of the technique is that it relaxes the level of taxonomical expertise necessary to
10 describe the complete community structure. This goal is generally hampered by the fact
11 that taxonomists are relatively specialized, and seldom can identify organisms that are
12 excluded of their taxonomic expertise. Hence, fingerprinting techniques like TGGE
13 appear as an alternative approach to the study of the structure of the epiphytic
14 assemblage of *P. oceanica* leaves. Further research is needed to reveal the sequence
15 identity of each single band obtained when applying TGGE (i.e. the OTUs) in order to
16 establish comparable taxonomic information to that retrieved by the classical
17 approaches.

18
19

20 *Acknowledgements.* We are very grateful to Microbiology Marine Group of IMEDEA
21 for facilities and A. Gómez-Garreta and members of ‘Departament de Productes
22 Naturals, Biología Vegetal y Edafología’ of University of Barcelona (UB) for their help
23 with macroalgae epiphyte taxonomy. This study was funded by Ministerio de
24 Educación y Ciencia (Acción Complementaria CTM2005-23775-E), Govern de les Illes
25 Balears (Acció Especial de recerca, desenvolupament tecnològic i innovació, year
26 2006), Ministerio de Medio Ambiente, Red de Parques Nacionales (research project
27 055/2002) and CSIC (Proyectos Intramurales Frontera 200530F0033 and
28 200530F0182). F.J.M.P would like to thank ‘Conselleria de Economia, Hisenda e
29 Innovació’ of Balearic Government for a PhD grant (FPI05) that supported this work.

30
31
32
33

LITERATURE CITED

- 1
2 Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL, Polz MF (2004)
3 Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430
4 (6999):551-554.
- 5 Antolic B (1986) Epiphytic flora on leaves of *Posidonia oceanica* (L.) Delile from the
6 area of Dubrovnik (South Adriatic). *Acta Adriat.* 27 (1-2):37-49.
- 7 Ballesteros E (1986) Métodos de análisis estructural en comunidades naturales, en
8 particular del fitobentos. *Oecologia aquatica* 8:117-131.
- 9 Ballesteros, E (1987) Estructura i dinàmica del poblament algal de les fulles de
10 *Posidonia oceanica* (L.) Delile als herbeis de Tossa de Mar (Girona). *Butll. Inst.*
11 *Cat. Hist. Nat.. Sec.Bot.*, 6:13-30.
- 12 Ben Brahim M, Hamza A, Bouain A (2006) Spatio-Temporal distribution of macro-
13 epiphytic organisms in *Posidonia oceanica* leaves in the Gulf of Gabes (Tunisia).
14 *Biologia Marina Mediterranea* 13 (4):126-129.
- 15 Borowitzka MA, Lavery PS, Van Keulen M (2006) Epiphytes of seagrasses. In: Larkum
16 AWD, Orth RJ, Duarte CM (Eds.) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation.*
17 Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 18 Clarke KR, Gorley RN (2001). *Primer (Plymouth Routines In Multivariate Ecological*
19 *Research) V5: User Manual/Tutorial.* Primer-E Ltd, Plymouth.
- 20 Dahllöf (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Current opinion in*
21 *Biotechnology*, 13:213-217.
- 22 Dauby P, Poulicek M (1995) Methods for removing epiphytes from seagrasses: SEM
23 observations on treated leaves. *Aquatic Botany* 52 (3):217-228.
- 24 Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh TL, Massana, R (2001a) Application of denaturing
25 gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic

1 assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied*
2 *and Environmental Microbiology* 67 (7):2942-2951.

3 Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R (2001b) Study of genetic diversity of eukaryotic
4 picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and
5 sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7):2932-2941.

6 Duarte CM (1991) Seagrass Depth Limits. *Aquatic Botany* 40 (4):363-377

7 Foucher A, Wilson M (2002) Development of a polymerase chain reaction-based
8 denaturing gradient gel electrophoresis technique to study nematode species
9 biodiversity using the 18s rDNA gene. *Molecular Ecology Notes* 2 (1):45-48.

10 Furnari G, Giaccone G, Cormaci M, Alongi G, Serio D (2003) Biodiversità marina delle
11 coste italiane: catalogo del macrofitobenthos. *Biologia Marina Mediterranea*, Vol.
12 10, fasc. 1. Società Italiana di Biologia Marina, Genova.

13 Gadanho M, Sampaio JP (2004) Application of temperature gradient gel electrophoresis
14 to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *Fems Yeast*
15 *Research* 5 (3):253-261.

16 Gast RJ, Dennett MR, Caron DA (2004) Characterization of protistan assemblages in
17 the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and*
18 *Environmental Microbiology* 70 (4):2028-2037.

19 Head IM, Saunders JR, Pickup, RW (1998). Microbial evolution, diversity, and
20 ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms.
21 *Microbial Ecology* 35 (1):1-21.

22 Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH (1997) Analysis of
23 actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA

1 and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and
2 Environmental Microbiology 63 (8):3233-3241.

3 Hong YK, Sohn CH, Lee KW, Kim HG (1997) Nucleic acid extraction from seaweed
4 tissues for polymerase chain reaction. Journal of Marine Biotechnology 5 (2-3):95-
5 99.

6 Kendrick GA, Lavery PS (2001) Assessing biomass, assemblage structure and
7 productivity of algal epiphytes on seagrasses. In: Short FT, Coles RG, Short CA
8 (eds) Global Seagrass Research Methods. Elsevier, Amsterdam.

9 Lefèvre E, Bardot C, Noel C, Carrias JF, Viscogliosi E, Amblard C, Sime-Ngando T
10 (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes:
11 evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. Environmental
12 Microbiology 9 (1):61-71.

13 Lepoint G, Havelange S, Gobert S, Bouquegneau JM (1999) Fauna vs flora contribution
14 to the leaf epiphytes biomass in a *Posidonia oceanica* seagrass bed (Revellata Bay,
15 Corsica). Hydrobiologia 394:63-67.

16 Lepoint G, Jacquemart J, Bouquegneau JM, Demoulin V, Gobert S (2007) Field
17 measurements of inorganic nitrogen uptake by epiflora components of the seagrass
18 *Posidonia oceanica* (Monocotyledons, Posidoniaceae). Journal of Phycology 43
19 (2):208-218.

20 Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T,
21 Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann
22 S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel
23 B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode
24 A, Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic
25 Acids Research 32:1363-1371. <http://www.arb-home.de/>.

- 1 Massana R, Guillou L, Diez B, Pedros-Alio C (2002) Unveiling the organisms behind
2 novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Applied and*
3 *Environmental Microbiology* 68 (9):4554-4558.
- 4 Mazzella L, Scipione MB, Buia MC (1989) Spatio-Temporal Distribution of Algal and
5 Animal Communities in a *Posidonia-Oceanica* Meadow. *Marine Ecology-*
6 *Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napoli I* 10 (2):107-129.
- 7 Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis
8 (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.
9 *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular*
10 *Microbiology* 73 (1):127-141.
- 11 Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural
12 ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2 (3):317-322.
- 13 Nübel U, Garcia-Pichel F, Kuhl M, Muyzer G (1999) Quantifying microbial diversity:
14 Morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in
15 microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2):422-430.
- 16 Ovreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in
17 meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel
18 electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied*
19 *and Environmental Microbiology* 63 (9):3367-3373.
- 20 Panayotidis P, Boudouresque CF (1981) Vegetation marine de l'Ile de Port-Cros (Parc
21 National) XXI. Aire Minimale et patchiness de la flore epiphyte des feuilles de
22 *Posidonia oceanica*. *Trav.sci.Parc nation.Port-Cros* 7:71-84.

- 1 Pergent G, Pergent-Martini C (1993) Leaf renewal cycle of *Posidonia oceanica* in the
2 bay of Lacco Ameni (Ischia, Italy) using Lepidochronological method. *Posidonia*
3 *Newsletter*, 4(2): 11-20.
- 4 Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction
5 protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components.
6 *Plant Molecular Biology Reporter* 15 (1):8-15.
- 7 Procaccini G, Buia MC, Gambi MC, Pérez M, Pergent G, Pergent-Martini C, Romero J
8 (2003) The seagrasses of the Western Mediterranean. In: Green EP, Short FT (eds)
9 *World Atlas of Seagrasses*. UNEP World Conservation Monitoring Centre.
10 University of California Press, Berkeley, USA.
- 11 Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs B, Ludwig W, Peplies J, Glöckner F O (2007)
12 SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal
13 RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*; doi:
14 10.1093/nar/gkm864. <http://www.arb-silva.de/>.
- 15 Regensbogenova M, Pristas P, Javorsky P, Moon-van der Staay SY, van der Staay
16 GWM, Hackstein JHP, Newbold CJ, McEwan, NR (2004) Assessment of ciliates
17 in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 39 (2):144-147.
- 18 Reyes J, Sansón M (1997) Temporal distribution and reproductive phenology of the
19 epiphytes on *Cymodocea nodosa* leaves in the Canary Islands. *Botanica Marina* 40
20 (3):193-201.
- 21 Reyes J, Sansón M, Afonso-Carrillo J (1998) Distribution of the epiphytes along the
22 leaves of *Cymodocea nodosa* in the Canary Islands. *Botanica Marina* 41 (6):543-
23 551.

- 1 Romero J (1988) Epífitos de las hojas de *Posidonia oceanica*: variaciones estacionales y
2 batimétricas de biomasa en la pradera de las islas Medes (Girona). *Oecologia*
3 *aquatica* 9:19-25.
- 4 Romero J (1989) Seasonal pattern of *Posidonia oceanica* production: growth, age and
5 renewal of leaves. In: Boudouresque CF, Meinesz A, Fresi E, Gravez V (eds)
6 International Workshop on Posidonia Beds. GIS Posidonie publ., Marseille, pp 63-
7 67.
- 8 Rosselló-Mora R, López-López A (in press) The least common denominator - species or
9 OTU's. In: Zengler K (ed) *Accessing Uncultivated Microorganisms. From the*
10 *environment to organisms and genomes and back*. ASM press, Washington, USA.
- 11 Sambrook J, Russell DW (2001) *In Vitro Amplification of DNA by PCR. Molecular*
12 *cloning: a laboratory manual, 3rd Edition, Vol. II*. Cold Spring Harbor Laboratory
13 Press, New York.
- 14 Terrados J, Borum J (2004) Why are seagrass important? – Goods and services
15 provided by seagrass meadows. In: Borum J, Duarte CM, Krause-Jensen D, Greve
16 TM (Eds.) *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*.
17 The M&MS project (EVK3-CT-2000-00044), Hillerød. <http://www.seagrasses.org/>
- 18 Trautman DA, Borowitzka MA (1999) Distribution of the epiphytic organisms on
19 *Posidonia australis* and *P.sinuosa*, two seagrasses with differing leaf morphology.
20 *Marine Ecology-Progress Series* 179:215-229.
- 21 Tsirika A, Skoufas G, Haritonidis S (2007) Seasonal and bathymetric variations in
22 epiphytic microflora on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in the National Marine
23 Park of Zakynthos (Greece). *Marine Ecology* 28 (Suppl. 1): 146-153.

1 Uku J, Bjork M, Bergman B, Diez B (2007) Characterization and comparison of
2 prokaryotic epiphytes associated with three east african seagrasses. Journal of
3 Phycology 43 (4):768-779.

4 Van der Ben D (1971) Les épiphytes des feuilles de *Posidonia oceanica* Delile sur les
5 côtes françaises de la Méditerranée. Mém Inst. R. Sci. Nat. Belgique, 168:1-101.

6 Van Dillewijn P, Villadas PJ, Toro N (2002) Effect of a *Sinorhizobium meliloti* strain
7 with a modified putA gene on the rhizosphere microbial community of alfalfa.
8 Applied and Environmental Microbiology 68 (9):4201-4208.

9 Vanderklift MA, Lavery PS (2000) Patchiness in assemblages of epiphytic macroalgae
10 on *Posidonia coriacea* at a hierarchy of spatial scales. Marine Ecology-Progress
11 Series 192:127-135.

12 Vidal R, Meneses I, Smith M (2002) Enhanced DNA extraction and PCR amplification
13 of SSU ribosomal genes from crustose coralline algae. Journal of Applied
14 Phycology 14 (3):223-227.

15 Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse
16 composition. Applied and Environmental Microbiology 62 (2):316-322.

17
18
19
20
21
22
23
24
25

1 Table 1. Primers tested (Díez et al. 2001a)

Set	Sequence (5'-3')	<i>Saccharomyces</i>	
		<i>cerevisiae</i> 18S gene position	Specificity
Euk A (Forward)	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	1 to 21	Eukarya
Euk B (Reverse)	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	1795 to 1772	Eukarya
Euk 1A (Forward)	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukarya
Euk 516r-GC ^a (Reverse)	ACCAGACTTGCCCTCC	563 to 548	Eukarya
Euk 1A (Forward)	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukarya
Euk New516r-GC ^a (Reverse)	ACCAGACTTGCCCTC	562 to 548	Eukarya

2 ^a GC clamp was: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG

3 CCC G

4

5

6

7

8

9

10

11

1 Table 2 . Mean values (\pm SD) of epiphyte and shoot biomass and results of one-way ANOVA
 2 testing differences between two sampling dates; ns: nonsignificant differences ($p > 0.05$)

Variable	February	September	Source of variation	df	MS	F	p
Shoot biomass			Between groups	1	0,095413	1,2153	ns
(g DW)	0,77 \pm 0,077	0,63 \pm 0,107	Within groups	18	0,078507		
			Total	19			
Epiphyte ash			Between groups	1	63,95	4,006	ns
content (% DW)	84,1 \pm 2,13	88,7 \pm 1,36	Within groups	10	15,96		
			Total	11			
Epiphyte load			Between groups	1	0,000832	0,2113	ns
(g DW g⁻¹ DW shoot⁻¹)	0,157 \pm 0,0170	0,144 \pm 0,0240	Within groups	18	0,003939		
			Total	19			

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

1 Table 3. Summary of one-way ANOVA results testing differences in number of OTUs shoot⁻¹
 2 and species richness shoot⁻¹ (log-transformed) between two sampling dates. Significant differences
 3 when $p < 0.05$

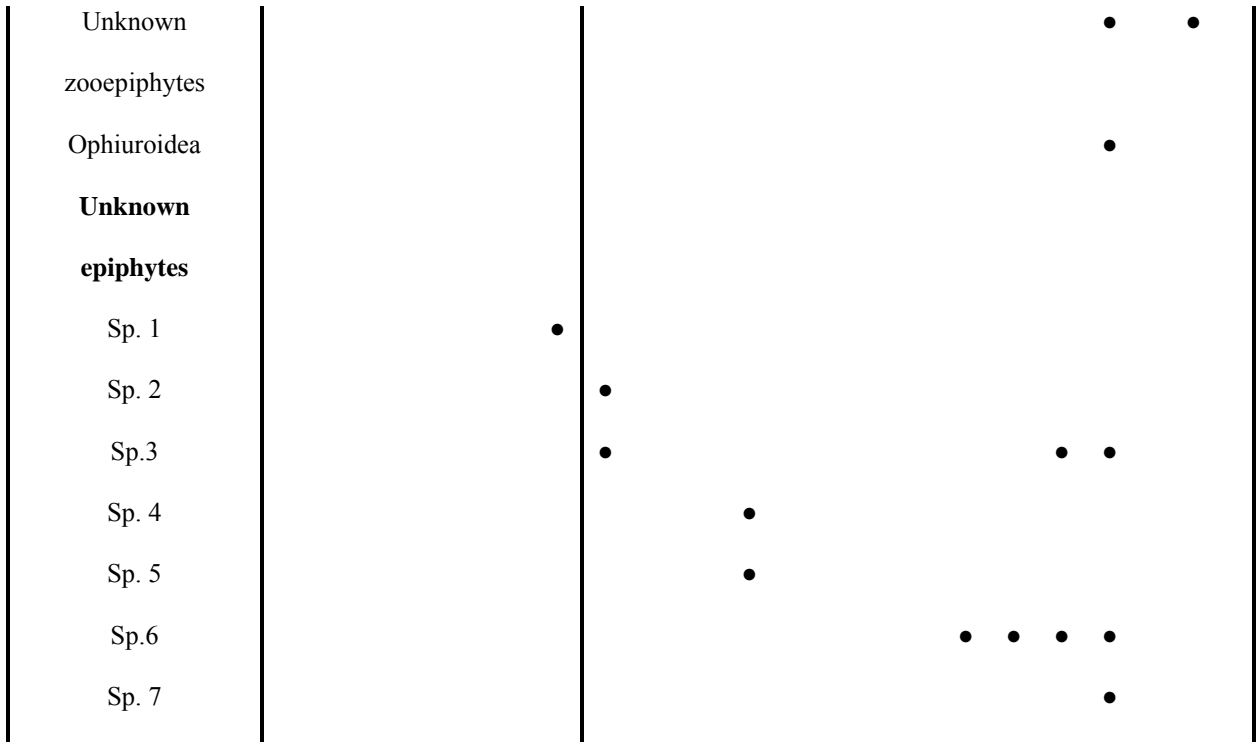
Variable	Source of variation	df	MS	F	p
Number of OTUs shoot⁻¹	Between groups	1	11084,24	48,5382	<0.01
	Within groups	36	1021,29		
	Total	37			
Species richness shoot⁻¹	Between groups	1	3,78948	32,6259	<0.01
	Within groups	13	0,11615		
	Total	14			

4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18

1 Table 4. List of leaf-epiphytes found in February and September shoots (taxonomy
 2 names according to Furnari et al. 2003)
 3

Shoots Species	February					September									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bacillariophyta															
Tube dwelling diatoms	•		•						•			•	•	•	•
Chlorophyta															
<i>Chaetophorales</i>															
F. Chaetophoraceae														•	
<i>Pringsheimiella sp.</i>								•		•		•	•	•	•
<u>Cladophorales</u>															
<i>Cladophora sp.</i>								•				•	•	•	•
<u>Phaeophilales</u>															
<i>Phaeophila dendroides</i>								•	•		•	•	•	•	•
Phaeophyta															
<u>Ectocarpales</u>															
<i>Giraudia sphacelarioides</i>	•	•		•		•	•					•	•		
<i>Myrionema magnusii</i>	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•
Rodophyta															
<u>Acrochaetiales</u>															
<i>Audouinella daviesii</i>	•	•		•	•	•	•	•		•		•	•	•	•
<i>Audouinella sp.</i>				•		•	•					•	•	•	•
<u>Ceramiales</u>															

<i>Anotrichium tenue</i>						•												
<i>Callithamnion</i>										•								
<i>corymbosum</i>																		
Ceramiacea 1										•								•
Ceramiacea 2											•							
Ceramiacea 3												•						
<i>Ceramium codii</i>							•		•				•		•			
<i>Chondria sp.</i>													•	•			•	
<i>Chondria or</i>								•							•			
<i>Laurencia sp.</i>																		
<i>Dasya sp.</i>															•			•
<i>Griffithsia sp`.</i>																		•
<i>Herposiphonia</i>							•		•	•					•	•		•
<i>secunda</i>																		
<i>Lophosiphonia sp.</i>															•	•	•	
<i>Polysiphonia sp.</i>							•		•			•		•	•	•	•	•
Rodomelacea 1																		•
<i>Spermothamnion sp.</i>		•			•		•	•		•			•	•	•	•	•	•
<u>Cryptonemiales</u>																		
<i>Hydrolithon +</i>	•	•		•		•		•	•	•	•		•		•	•	•	•
<i>Pneophyllum spp.</i>																		
<u>Erythropeltidales</u>																		
<i>Erythrotrichia</i>		•				•				•	•	•		•			•	•
<i>carnea</i>																		
<u>Stylonematales</u>																		
<i>Stylonema alsidii</i>																		•
Zooepiphytes																		
Bryozoans															•	•	•	•
Hydrozoans							•										•	
Foraminifera										•	•	•		•		•	•	•



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

1 Table 5. Summary of main results of this study

Variable	February	September
Number of OTUs shoot⁻¹ (TGGE) (Mean values±SD)	11.9±5.2	22.3±3.9
Species richness shoot⁻¹ (Optical microscope) (Mean values±SD)	6±2.1	14.7±4.5
Cumulative number of different OTUs (TGGE)	30	38
Cumulative number of species richness (Optical microscope)	10	38
Necessary sampling effort (number of shoots) (TGGE)	6	4
Necessary sampling effort (number of shoots) (Optical microscope)	5	8

2

3

4

1 **Figure captions**

2

3 Figure 1. TGGE showing some of the September samples

4

5 Figure 2. Average rarefaction curves of the epiphytic community (a) and relative
6 increase of the OTU richness of the epiphytic community (b) as a function of the
7 number of shoots analysed using TGGE in February and September. The dashed line (in
8 b) shows the 5% level considered to indicate when the number of shoots provides an
9 adequate representation of the OTUs richness of the community (see Methods).

10

11 Figure 3. MDS ordination based on Bray-Curtis similarities of February and September
12 samples using TGGE (a) and optical microscope (b).

13

14 Fig. 4. Mean species richness (\pm SD) of major groups of epiphytes in February and
15 September samples. Bac: Bacillariophyta, Chl=Chlorophyta, Pha=Phaeophyta,
16 Rho=Rhodophyta, Unk=Unknown epiphytes, Zoo=Zooepiphytes.

17

18 Fig. 5. Average rarefaction curves of epiphytic community (a) and relative increase in
19 species richness of the epiphytic community increasing number of shoots (b) using
20 optical microscope in February and September. Discontinuous line (in b) showed
21 representative sampling effort in two sampling dates.

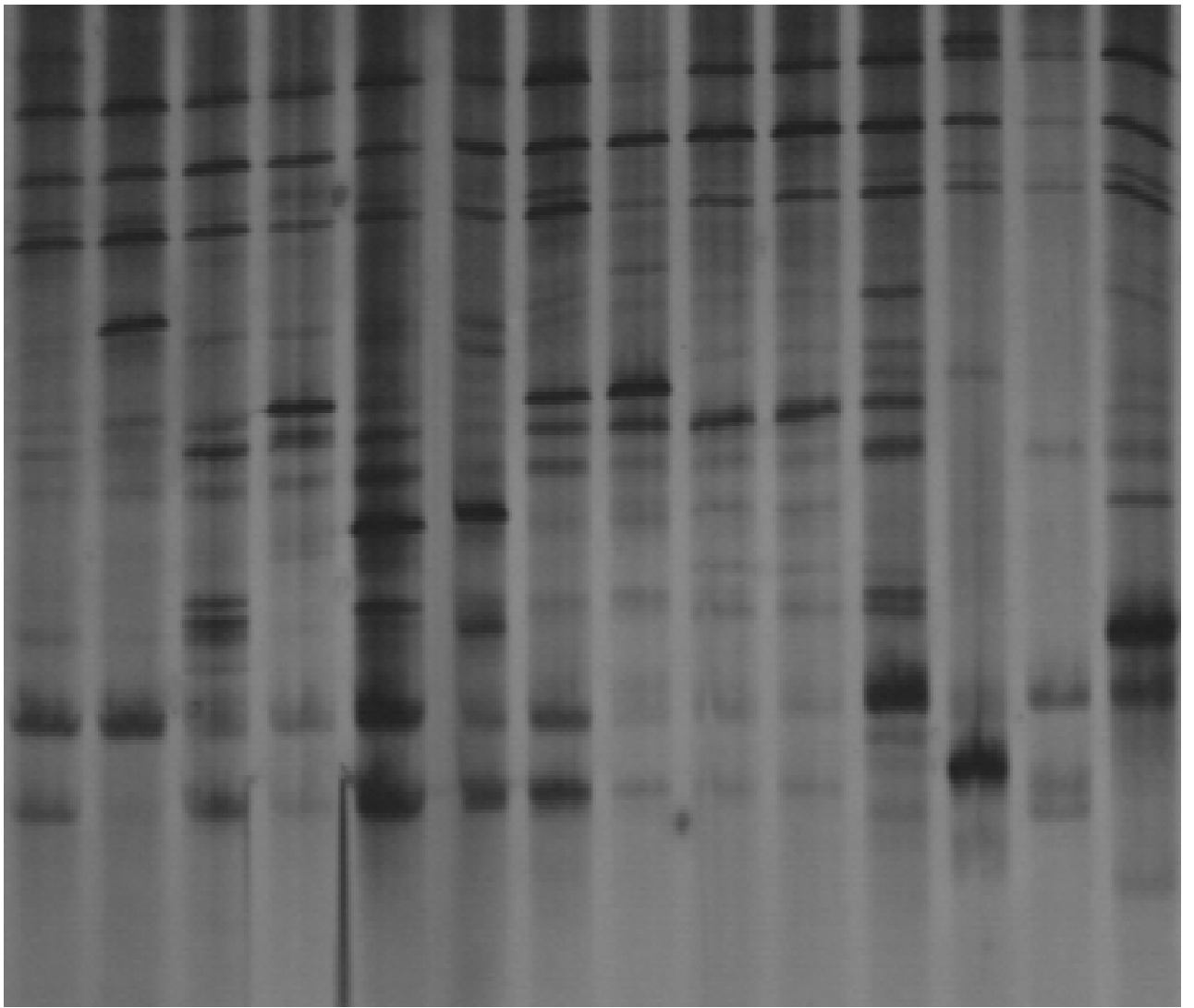
22

23

24

25

1 Fig. 1



2

3

4

5

6

7

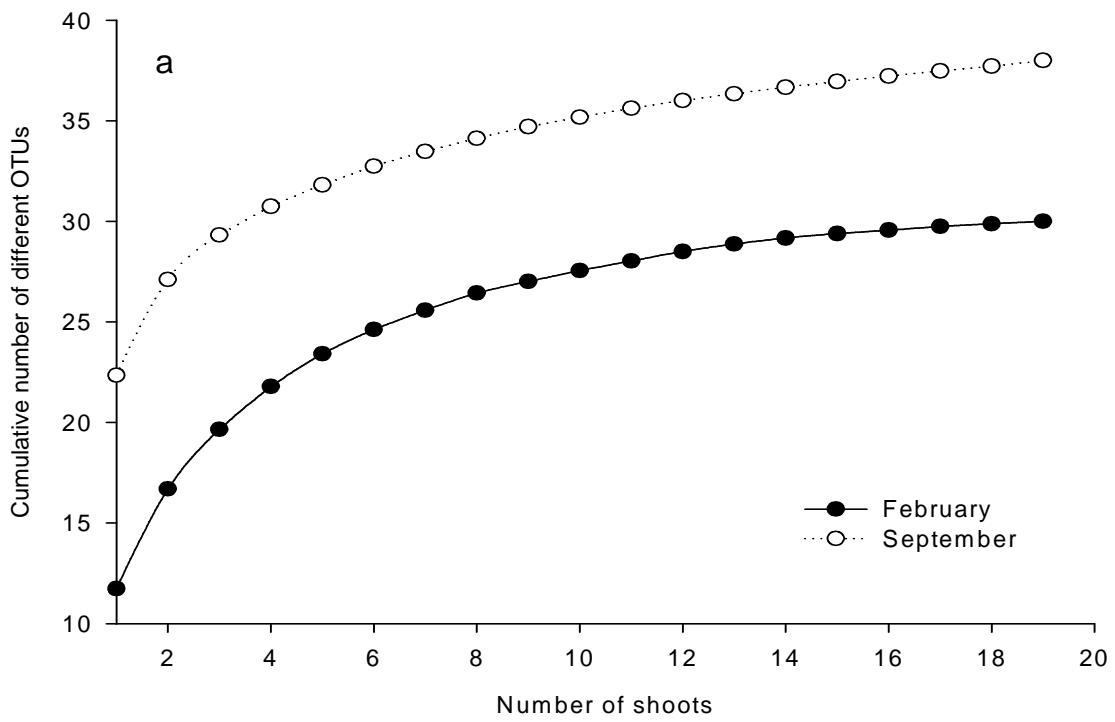
8

9

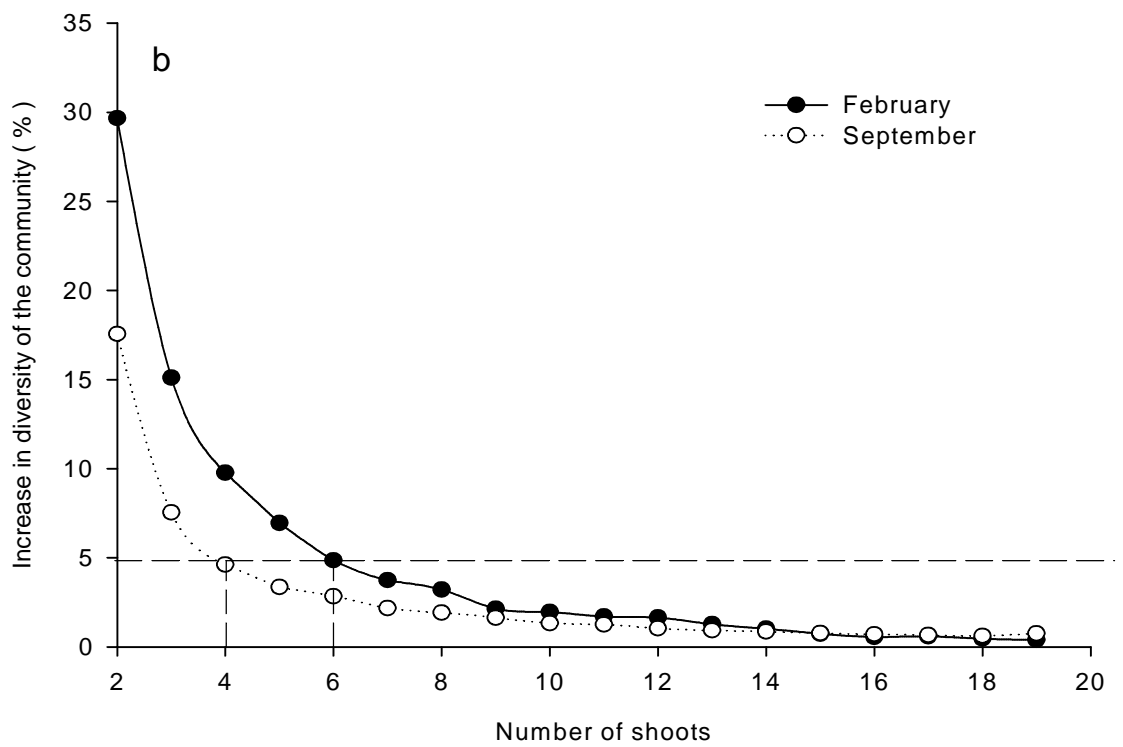
10

11

1 Fig. 2

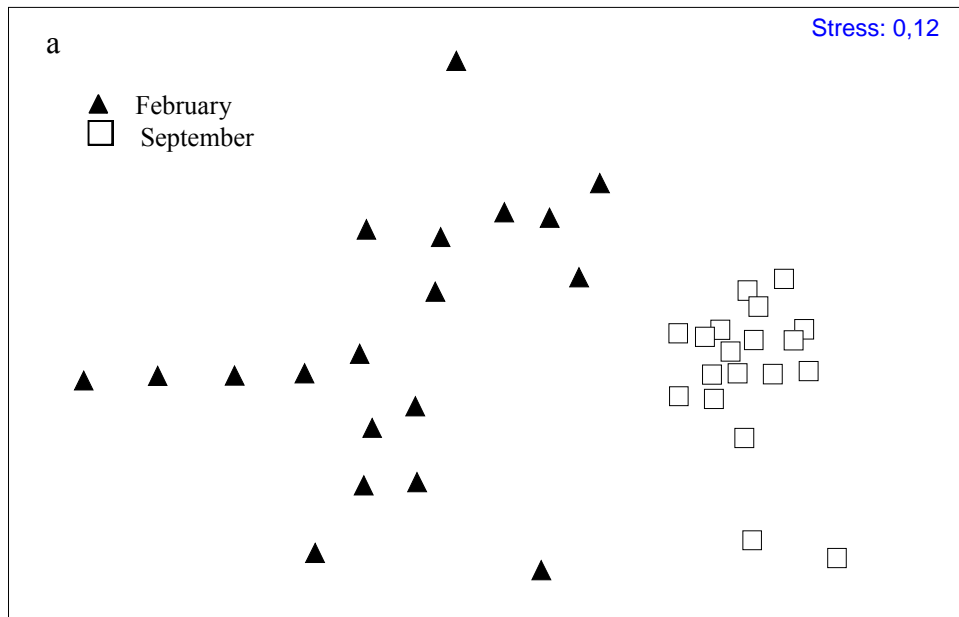


2
3



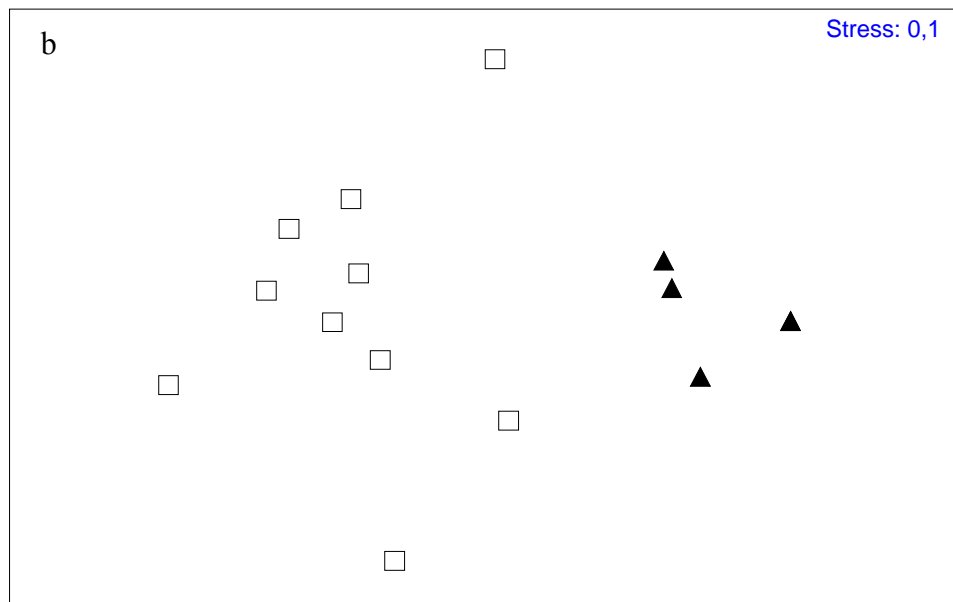
4
5
6

1 Fig. 3



2
3

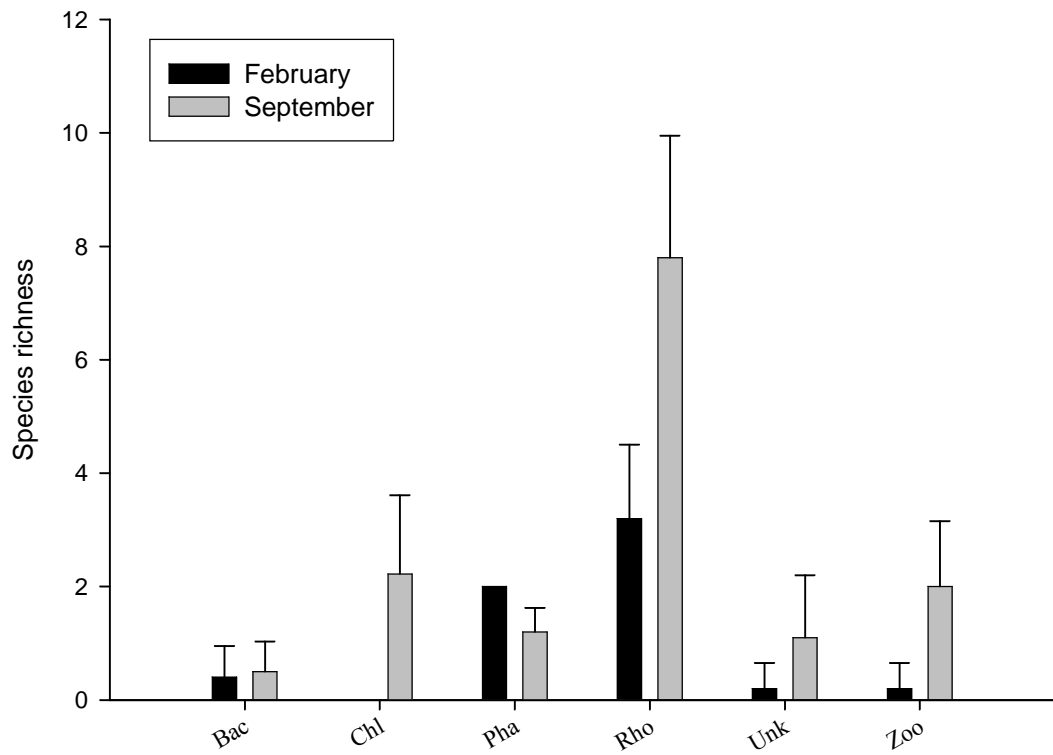
4



5

6

1 Fig. 4



2
3

4

5

6

7

8

9

10

11

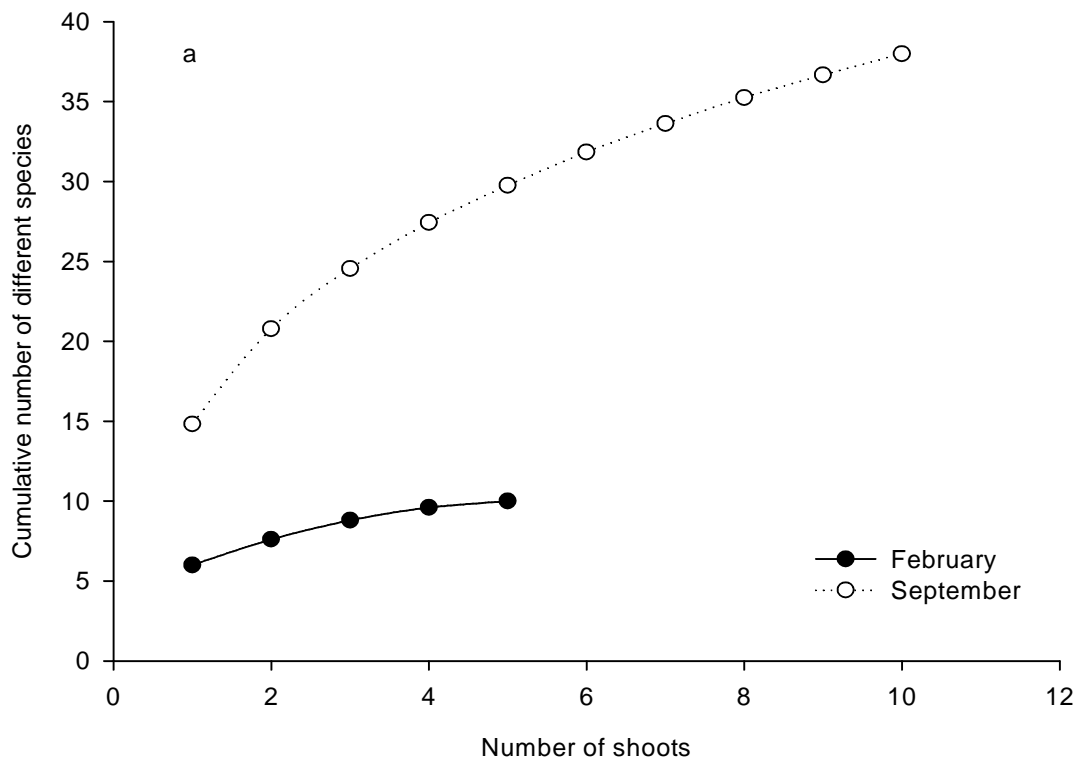
12

13

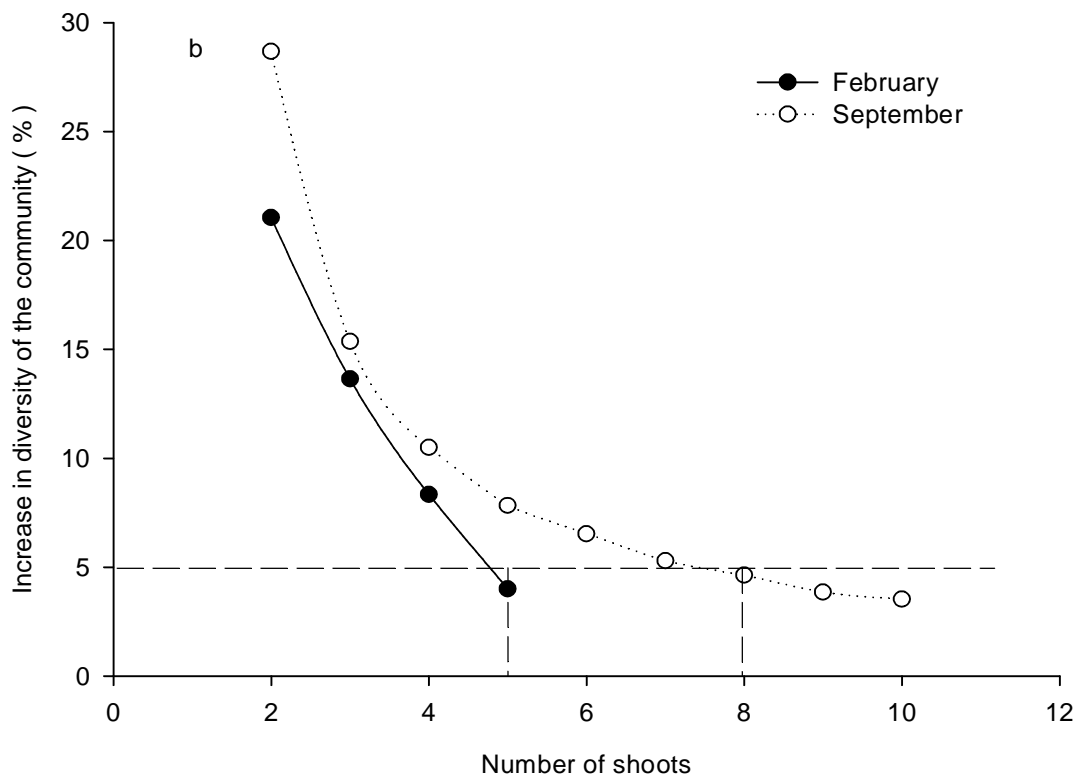
14

15

1 Fig. 5



2



3
4