

VIERAEA	Vol. 35	33-42	Santa Cruz de Tenerife, octubre 2007	ISSN 0210-945X
---------	---------	-------	--------------------------------------	----------------

## Caracterización genética de *Zostera noltii* (Zosteraceae, Magnoliophyta) en Lanzarote, islas Canarias

BEATRIZ RUMEU RUIZ<sup>1</sup>, JOSÉ ANTONIO PÉREZ PÉREZ<sup>1</sup>,  
 MARIANO HERNÁNDEZ FERRER<sup>1</sup>

NAROA ALDANONDO-ARISTIZABAL<sup>2</sup> y M<sup>a</sup> CANDELARIA GIL-RODRÍGUEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Área de Genética. Universidad de La Laguna. Facultad de Biología.

<sup>2</sup> Área de Botánica. Universidad de La Laguna. Facultad de Farmacia.  
 Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna. Tenerife. Islas Canarias

Rumeu Ruiz, B, Pérez Pérez, J.A., M. Hernández Ferrer, N. Aldanondo-Aristizabal & M.C. Gil-Rodríguez (2007). Genetic characterization of *Zostera noltii* (Zosteraceae, Magnoliophyta) in Lanzarote, Canary Islands. *VIERAEA* 35: 33-42.

**ABSTRACT:** In the last years many changes have occurred in the Arrecife shore, Lanzarote Island, that have produced a worsening of eelgrass meadows (*Zostera noltii*), this has been considered an endangered species in Canary Islands with a high risk of extinction. The surviving units represent clonal individuals, which reinforces previous diagnosis on the critical state of this natural population. At the end of this article are discussed, in a population genetics context, different considerations about a future plan for restoration of the natural ecosystem of Arrecife shore.

**Key words:** *Zostera noltii*, Zosteraceae, Magnoliophyta, genetic characterization, microsatellite, Canary Islands.

**RESUMEN:** Los numerosos cambios ocurridos en la marina natural de Arrecife en los últimos años ocasionaron una regresión de las praderas de *Zostera noltii* Hornemann, planta marina catalogada en Canarias en la categoría de "Peligro de Extinción". Los ejemplares supervivientes representan individuos clónicos, lo cual refuerza el diagnóstico sobre el estado crítico de esta población natural. Se discuten, al final de este artículo, diferentes consideraciones en el contexto de la genética de poblaciones con vistas a un plan de actuación para restaurar el ecosistema de la marina de Arrecife.

**Palabras clave:** *Zostera noltii*, Zosteraceae, Magnoliophyta, caracterización genética, microsatélites, islas Canarias.

---

Nota: Este trabajo forma parte del proyecto "CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *ZOSTERA NOLTII* PRESENTE EN LA MARINA DE ARRECIFE" subvencionado por el Excmo. Ayuntamiento de Arrecife (Lanzarote).

## INTRODUCCIÓN

Los mares y océanos del mundo albergan unas 60 especies de fanerógamas marinas pertenecientes a 12 géneros diferentes (Templado, 2004). En el litoral canario se encuentran tres de ellas: *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Halophila decipiens* Ostenfeld y *Zostera noltii* Hornemann (Haroun *et al.*, 2003). Esta última se localiza únicamente en el litoral de Arrecife, isla de Lanzarote, donde crece soportando periodos de emersión en los primeros metros del sublitoral (Gil-Rodríguez *et al.*, 1987).

Los estudios realizados en la marina natural de Arrecife a finales de la década de los 80, pusieron de manifiesto la existencia de praderas muy densas del taxon en las proximidades del castillo de San Gabriel (Gil-Rodríguez *et al.*, 1987). La transformación que sufrió la zona en los años posteriores, con el cierre del brazo de tierra que unía la marina con el islote de Fermina, el aumento de vertidos contaminantes y la disposición de un aparcamiento en el islote de San Gabriel, ocasionó un importante descenso en la flora y fauna del lugar, reduciendo drásticamente la pradera de *Z. noltii* a escasos ejemplares, y provocando la desaparición de su flora epífita (Guadalupe *et al.*, 1995).

Se sabe que *Z. noltii* llegó casi a desaparecer en la marina en el año 2000; esta alarmante situación llevó a incluir esta planta marina en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC 2001/097) en la categoría de “Peligro de Extinción”. Recientemente Aldanondo *et al.*, (2005.) constataron la incipiente recuperación de las praderas.

## MATERIAL Y MÉTODO

La población actual de *Z. noltii* en la marina de Arrecife esta reducida a tres núcleos o manchas de unos pocos metros cuadrados; en la periferia de cada uno de los núcleos localizados (UTM 0641509 / 3204120; UTM 0641528 / 3204194; UTM 0641491 / 3204167) se recolectaron ejemplares de la fanerógama, procurando siempre la máxima separación física entre ellos. Parte del material fue incluido, in situ, en bolsas plásticas con silicagel para, *a posteriori*, realizar el análisis genético. Algunos ejemplares fueron prensados e incluidos en el herbario TFC (nº 47.436; 47.437; 47.438)

### Extracción de ADN genómico

Las purificaciones del ADN genómico, a pequeña escala, se realizaron a partir de las muestras de *Z. noltii* empleando el sistema comercial de Sigma (*GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). La calidad y concentración del ADN genómico purificado fue comprobada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE.

### Secuenciación de ADN

El locus *tRNA-K* del genoma de cloroplastos fue amplificado a partir de una de las muestras de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los cebadores universales TRNK1 (gggTTgCCCgggACTCgAAC) y TRNK2 (CAACggTAGAgTACTCggCTTTTA) descritos por Demesure *et al.* (1995). La PCR correspondiente se realizó en un volumen de 20 µl que incluía: la muestra de ADN genómico (100 ng); los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (200 µM de cada uno); MgCl<sub>2</sub> (2 mM); los dos cebadores específicos (1 µM cada uno); la Taq DNA polimerasa (0'025 unidades/µl) y el tampón de reacción (1X). La enzima, el tampón de reacción y la solución de MgCl<sub>2</sub> fueron suministrados por EcoGen. El perfil térmico programado en el termociclador fue el siguiente:

**Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en la amplificación de mikrosatélites.** Se muestran también algunos datos sobre los mikrosatélites implicados según Coyer *et al.* (2004a). Todos los cebadores empleados fueron suministrados por Invitrogen. F-U1 → cebador directo con cola universal; R → cebador reverso.

	Microsatélite	Rango de tamaño	Nº alelos	Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos (5'→3')
Universal marcado				Uni-1 FAM	CgTCggAgTCgTTgATTTAg
Locus ZnB1	(GA) <sub>n</sub> G(GA) <sub>n</sub>	100-124	13	ZnB1 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgTTgACAAAAgTAggTggAgTTgA
				ZnB1 R	ggCAgAaAgAaAgCAgTACACg
Locus ZnB3	(GA) <sub>n</sub>	188-222 pb	16	ZnB3 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgCTTTcTTCgTTCATAAAgCA
				ZnB3 R	CCCAATTCTCATcACAACC
Locus ZnB8	(GA) <sub>n</sub>	129-161	6	ZnB8 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgAgATggCggAAATCAAACC
				ZnB8 R	CCTgTCACTTgCCACTTgTC
Locus ZnE7	(GA) <sub>n</sub>	135-171	11	ZnE7 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgAAACAaggAACgCgAAgAAgA
				ZnE7 R	TggTgACCTTTCTCATTggA
Locus ZnF8	(CT) <sub>n</sub>	197-221	10	ZnF8 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgggCCACgACAATgTgAACAAC
				ZnF8 R	CgTgATgAATgAAAgAgCgA
Locus ZnF11	(CT) <sub>n</sub> C(GT) <sub>n</sub>	273-288	8	ZnF11 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgAgACgCAgACTCggACTCAT
				ZnF11 R	gAAGATgCATTATTTCACCC
Locus ZnH10	(CT) <sub>n</sub>	158-168	7	ZnH10 F-U1	CgTCggAgTCgTTgATTTAgTCTgCCggTgTgTgAAACT
				ZnH10 R	CgTCgTTTTAAATTgCCTCTT

Desnaturalización inicial → 94°C, 2 minutos.

Amplificación (38 ciclos) → Desnaturalización: 94°C, 20 segundos

Anillado: 70°C, 30 segundos

Extensión: 68°C, 2'5 minutos con un incremento de 5 segundos por ciclo.

Extensión final → 68°C, 10 minutos

El proceso de secuenciación automática incluyó reactivos de Applied Biosystems (*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*) y el sistema de electroforesis capilar ABI 3700 de la empresa NBT (Sevilla). La reacción de secuenciación se realizó a partir de 50 ng de producto de amplificación purificado (*Wizard® SVgel and PCR Clean-up System*; Promega) y utilizando el cebador TRNK2.

### Genotipado de mikrosatélites

La estrategia de genotipado de mikrosatélites mediante PCR y detección automática fluorescente se basó en las recomendaciones de Boutin-Ganache *et al.* (2001). Consistió en la adición de una “cola universal” al extremo 5' de uno de los dos cebadores específicos empleados en la PCR (cebador directo o “*forward*”). También se incorporó a la reacción de amplificación un cebador universal marcado con un compuesto fluorescente (FAM). El cebador universal tiene la misma secuencia de nucleótidos que la cola añadida a los cebadores específicos directos. En la tabla 1 están recogidas las secuencias de nucleótidos de los cebadores específicos de cada locus y la del cebador universal de diseño propio, así como el motivo mikrosatélite implicado en cada caso, el rango de tamaños de los amplicones y el número de alelos diferentes descritos por Coyer *et al.*, (2004a).

Las reacciones de amplificación de mikrosatélites se realizaron en un volumen de 10 µl que contenían: la muestra de ADN genómico (50 ng); los cuatro desoxinucleótidos

trifosfato (150  $\mu\text{M}$  de cada uno);  $\text{MgCl}_2$  (2 mM); el cebador específico reverse (1  $\mu\text{M}$  cada uno); una mezcla 1:10 (1  $\mu\text{M}$ ) del cebador específico directo y el cebador universal; la Taq DNA polimerasa (0'025 unidades/ $\mu\text{l}$ ); y el tampón de reacción (1X). La enzima, el tampón de reacción y la solución de  $\text{MgCl}_2$  fueron suministrados por EcoGen. El perfil térmico programado en el termociclador fue el siguiente:

Desnaturalización inicial  $\rightarrow$  94°C, 2 minutos.

Amplificación (35 ciclos)  $\rightarrow$  Desnaturalización: 94°C, 10 segundos

Anillado y extensión: 65°C, 40 segundos

Extensión final  $\rightarrow$  65°C, 5 minutos

El resultado de cada reacción fue visualizado en geles de agarosa al 1'5% en tampón TBE, para comprobar la especificidad de la amplificación (tamaño esperado) y el rendimiento de la misma. A continuación, las reacciones fueron diluidas con agua (1/2 – 1/20) en función de la cantidad de producto de amplificación obtenido y con la finalidad de igualar la concentración de amplicón marcado. El tamaño de los amplicones fue estimado mediante electroforesis capilar de una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  de reacción diluida y detección fluorescente automática (Instituto Anatómico Forense de Las Palmas de Gran Canaria, ULPGC).

## RESULTADOS

La reacción de amplificación empleando cebadores universales para el locus tRNA-K (Demesure *et al.*, 1995) rindió un fragmento específico con un tamaño aproximado de 2'6 kilobases y un fragmento no deseado de unos 200 pares de bases (pb). Este último, dado su tamaño, no pudo ser eliminado mediante la purificación con las columnas de cromatografía y, en consecuencia, las primeras 200 posiciones del electroforegrama de secuenciación resultaron ilegibles. No obstante se pudo obtener una lectura limpia de una secuencia con 326 nucleótidos de longitud, que pertenece a un segmento 5' del intrón del locus *tRNA-K*. Esta secuencia exhibe una sola diferencia con respecto a la secuencia correspondiente de *Z. japonica*, pero un total de 10 sustituciones nucleotídicas con respecto a la secuencia de *Z. marina*.

### Análisis de microsatélites

Los marcadores moleculares elegidos para el análisis de la variabilidad intraespecífica en *Z. noltii* fueron los loci polimórficos de tipo microsatélite descritos en esa especie por Coyer *et al.* (2004a). No se detectó variación genética entre las nueve muestras vegetales analizadas, es decir, todas mostraron el mismo genotipo en cada uno de los siete loci analizados. El tamaño estimado para los alelos detectados se muestra en la figura 1.

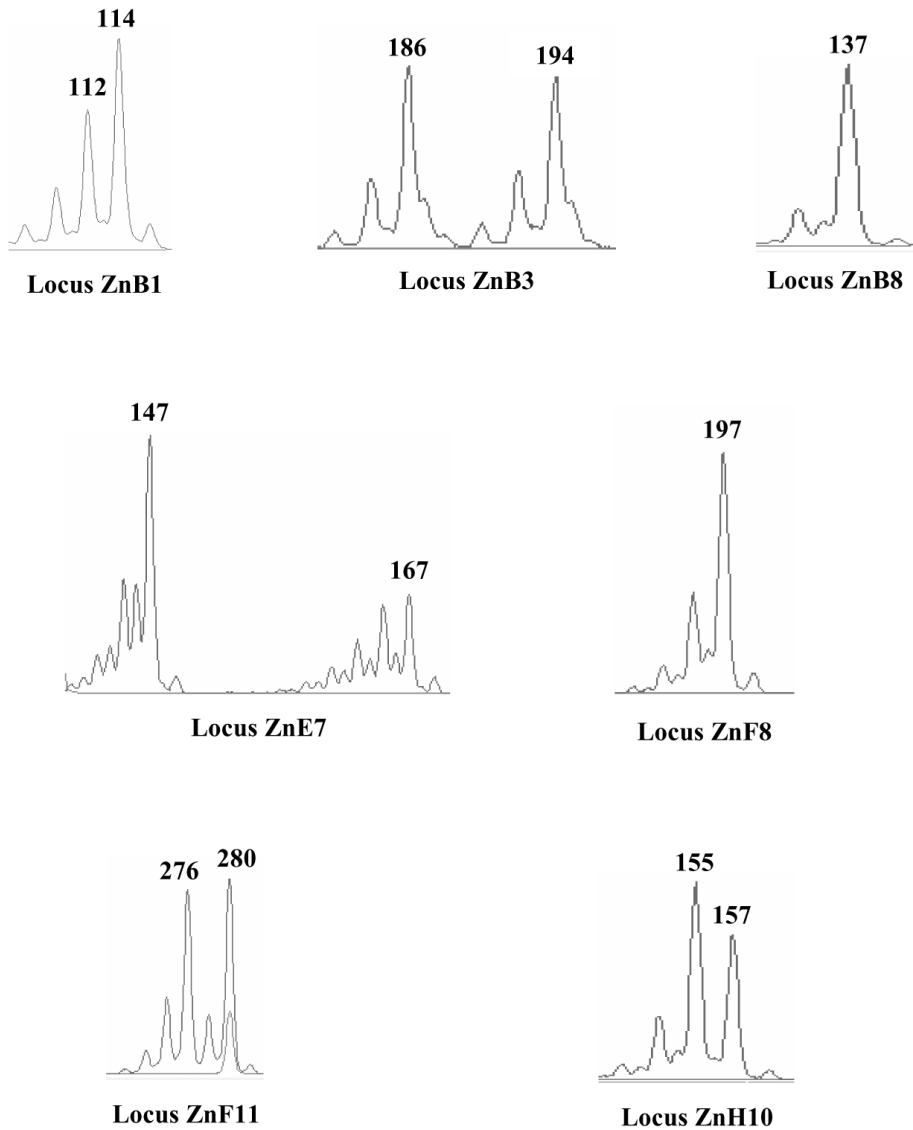
## DISCUSIÓN

La angiospermas marinas del género *Zostera* conforman importantes ecosistemas a lo largo de todo el mundo. Aparte de actuar como productores primarios, se trata de especies modificadoras del hábitat que facilitan el reciclado de nutrientes. Las praderas

de *Zostera* aportan una estructura espacial compleja que permite la retención y protección de las puestas de peces e invertebrados, sirviendo además como fuente de alimento para numerosas especies incluyendo algunas aves acuáticas (Jackson *et al.*, 2001; Williams & Heck, 2001; Polte *et al.*, 2005; Polte & Asmas, 2006; Schaffmeister *et al.*, 2006). Una gestión efectiva de la recuperación del ecosistema sustentado por *Z. noltii* requiere información sobre la dinámica reproductiva de la especie, de la diversidad genética de la población afectada y de las potenciales poblaciones donadoras de nuevos individuos (Petit *et al.*, 1998; Waycott, 1998; Booy *et al.*, 2000; Reusch, 2001; Williams, 2001; Duarte, 2002). Estudios recientes (Hughes & Stachowicz, 2004; Reusch *et al.*, 2005) han demostrado que la diversidad genética y de genotipos en ecosistemas soportados por unos pocos productores primarios, como el representado por *Zostera marina*, incrementan la productividad del ecosistema, su capacidad de resistencia y la velocidad de recuperación frente a perturbaciones ambientales, desempeñando un papel análogo al desempeñado por la diversidad de especies en los ecosistemas más complejos. Se trata de un efecto basado más en la complementación entre diferentes genotipos que en la selección de un genotipo robusto particular.

Una vez confirmada, mediante la comparación de secuencias de nucleótidos, que las muestras vegetales correspondían a *Z. noltii*, se procedió al análisis de la variación genética dentro de la población de esa especie presente en la marina de Arrecife. Los loci de tipo microsatélite descritos por Coyer *et al.* (2004a) presentan un elevado número de alelos diferentes y un alto nivel de heterocigosidad (hasta 16 y 0'968, respectivamente, para el locus ZnB3), por lo que pueden ser considerados loci hipervariables y, por lo tanto, útiles para la obtención de huellas genéticas que permitan la identificación de individuos (Coyer *et al.*, 2004b; Diekmann *et al.*, 2005). El análisis de esos microsatélites reveló en nuestro caso que los haces, al menos, de los tres individuos físicos estudiados corresponden con alta probabilidad al mismo individuo genético o "geneto". Una población de *Z. noltii* pequeña, aislada y clonal como la de la marina de Arrecife, se encuentra en una situación delicada, en términos genéticos y ecológicos, siendo muy alta la probabilidad de extinción (Newman & Pilson, 1997; Booy *et al.*, 2000).

En el único individuo genético de *Z. noltii* presente en la marina de Arrecife, son heterocigotos cinco de los siete loci analizados, algo normal en los individuos de otras poblaciones de *Z. noltii*, como también es común la presencia de clones con un tamaño normalmente inferior a los 3 m<sup>2</sup> (Coyer *et al.*, 2004a,b; Diekmann *et al.*, 2005). La ausencia de diversidad entre individuos en la población de Arrecife probablemente refleje una colonización reciente y el poder de multiplicación vegetativa propia de la especie. Si, por el contrario, se tratase de una población antigua y de una reducción de tamaño acompañada de deriva génica, dicha reducción no pudo ser lenta porque con tamaños poblacionales pequeños y reproducción sexual se tiende al estado de homocigosis. Si se tratase de una reducción drástica de una población antigua, el genotipo presente en la actualidad puede ser resultado del azar o, más interesante, representar el genotipo más resistente o mejor adaptado; en cualquiera de los casos los alelos presentes en la actualidad no necesariamente reflejan los alelos que fueron más frecuentes en la población ancestral.



**Figura 1.** Genotipado de microsatélites. Se muestra, para cada locus, un electroforegrama representativo del genotipo detectado en todas las muestras analizadas.

Las poblaciones de *Z. noltii* se reparten en la actualidad por la costa Este del océano Atlántico desde Mauritania hasta el sur de Noruega y por las costas el mar Mediterráneo, mar Negro y mar de Azov. Los loci analizados en la población de Arrecife ya han sido objeto de estudio en todo el rango de distribución de la especie (Coyer *et al.*, 2004b). El análisis filogenético realizado en dicho estudio revela que las poblaciones de Europa del

Norte, Mauritania y mares Negro/Azov forman grupos bien diferenciados, mientras que las poblaciones mediterráneas y de la costa atlántica de la Península Ibérica no conforman grupos consistentes. Así mismo, Coyer *et al.*, (2004b) consiguen identificar variantes genéticas únicas en todas las poblaciones analizadas. La comparación de las variantes detectadas en los individuos de *Z. noltii* de la marina de Arrecife con las variantes “únicas” mencionadas, y en general la comparación con los alelos más frecuentes en las poblaciones de costas continentales, quizás arroje luz sobre la afinidad genética o el origen de la población de *Z. noltii* en Arrecife.

La diversidad genética y la riqueza en alelos alcanza su máximo en las poblaciones mauritanas de *Z. noltii* y decrece hacia el norte, sugiriendo una potencial ruta de recolonización post-glacial (Coyer *et al.*, 2004b). Esto, junto al buen estado de las grandes poblaciones de *Z. noltii* en las costas de Mauritania, las convierte en atractivas donadoras de genotipos para la restauración del ecosistema de la marina de Arrecife. Una alternativa quizás más económica o viable estratégicamente sean las poblaciones atlánticas de la Península Ibérica. Esta opción resulta adecuada si se tiene en cuenta:

1. Las poblaciones atlánticas de la Península Ibérica ocupan en los árboles filogenéticos una posición intermedia entre las poblaciones del Norte de Europa, mar Mediterráneo y Mauritania, aunque ligeramente más próximas a las de Mauritania.
2. Tanto las costas de Mauritania como las del mar Mediterráneo fueron posibles refugios durante el último máximo glacial (hace unos 18-20 mil años).
3. El régimen actual de corrientes marinas señalan a las poblaciones de la costa atlántica de la Península Ibérica como un potencial origen natural de genotipos para las islas Canarias.
4. La diversidad genética en las poblaciones de *Z. noltii* de la costa atlántica de la Península Ibérica está entre las más altas dentro de su rango de distribución (heterocigosidad observada,  $H_{obs} = 0'545-0'652$ ; número de alelos por locus,  $\alpha = 4'7-7'2$ . Diekmann *et al.*, 2005), aproximándose considerablemente a los valores observados en Mauritania ( $H_{obs} = 0'568-0'659$ ;  $\alpha = 6'2-6'3$ . Coyer *et al.*, 2004b).
5. En las costas atlánticas de la Península Ibérica el hábitat de *Z. noltii* se encuentra fragmentado. Por otro lado, se ha estimado una distancia mínima de 100-150 km entre poblaciones de *Z. noltii* para el inicio de una diferenciación genética significativa entre las mismas (Coyer *et al.*, 2004b; Diekmann *et al.*, 2005). Esta situación facilitaría la recolección de diversidad genética para la recuperación de la marina de Arrecife.

La posibilidad de que el genotipo que sobrevive en la actualidad en la marina de Arrecife, represente la combinación de alelos que mejor resistió las perturbaciones de su hábitat por

factores humanos y/o naturales, aconseja invertir esfuerzo en preservarlo y expandirlo en cierto grado, a la vez que se incorporan genotipos variados de poblaciones donadoras.

El proceso de recuperación de *Z. noltii* en la marina de Arrecife puede ser guiada por experiencias previas con esta especie o con otras relacionadas (Hootsmans, 1987; Loques *et al.*, 1990; Meinesz *et al.*, 1993; Van Katwijk, 2000; Williams, 2001; Bernard *et al.*, 2005; Bos *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2005). La diversidad de genotipos entre los individuos importados puede ser controlada con las mismas técnicas aplicadas en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

La principal conclusión de este trabajo es que la población de *Z. noltii* en la marina de Arrecife está formada por individuos clónicos resultantes de la multiplicación vegetativa. Esta situación puede ser clasificada de crítica desde el punto de vista genético y ecológico, pues la existencia de un único individuo genético disminuye drásticamente la probabilidad de supervivencia ante cualquier tipo de estrés ambiental y merma considerablemente su capacidad de recuperación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Concejalía de Medio Ambiente del Excmo. Ayuntamiento de Arrecife, a Dña. Rut Hernández y a D. Jesús Alonso Barreto de la Agencia de Desarrollo Local del Excmo. Ayuntamiento de Arrecife, su colaboración y apoyo logístico.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALDANONDO-ARISTIZABAL, N., J. BARQUÍN DÍEZ & M.C. GIL-RODRÍGUEZ (2005). Estudio preliminar de las poblaciones de *Zostera noltii* (Zosteraceae, Magnoliophyta) en Lanzarote, islas Canarias. *Vieraea* 33: 145-150.
- BERNARD G., BONHOMME, P. & BOUDOURESQUE, CF. (2005). Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Étang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). *Hydrobiologia* 539: 157 – 161.
- BOC Nº 97/2001, 1/8/2001. Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se crea el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias.
- BOOY, G. HENDRIKS, RJJ., SMULDERS, MJM., VAN GROENENDAEL, JM & VOSMAN, B. (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* 2: 379-395.
- BOS, AR., DANKERS, N., GROENEWEG, AH., HERMUS, DCR., JAGER, Z, DE JONG, DJ., SMIT, T., DE VLAS, J., VAN WIERINGEN, M. & VAN KATWIJK, MM. (2005). Eelgrass (*Zostera marina* L.) in the western Wadden Sea: monitoring, habitat suitability model, transplantations and communication. En: Herrier JL, Mees J, Salman A, Seys J, van Nieuwenhuysen H & Dobbelaere L (eds). *Proceedings 'Dunes and Estuaries 2005' – International Conference on Nature Restoration*, p.: 95-109.



- BOUTIN-GANACHE, I., RAPOSO, M., RAYMOND, M., & DESCHEPPER, CF. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* 31: 24-28.
- COYER, JA., DIEKMANN, OE., SERRÃO, EA., PROCACCINI, G., MILCHAKOVA, N., PEARSON, GA., STAM, WT., & OLSEN, JL. (2004b). Population genetics of dwarf eelgrass *Zostera noltii* throughout its biogeographic range. *Marine Ecology Progress Series* 281: 51-62.
- COYER, JA., REUSCH, TBH., STAM, WT., SERRÃO, EA., PEARSON, G., PROCACCINI, G., & OLSEN, JL. (2004a). Characterization of microsatellite loci in the dwarf eelgrass *Zostera noltii* (Zosteraceae) and cross-reactivity with *Z. japonica*. *Molecular Ecology Notes* 4: 497-499.
- DEMASURE, B., SODZIN, & PETIT, RJ. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- DIEKMANN, OE., COYER, JA., FERREIRA, J., OLSEN, JL., STAM, WT., PEARSON, GA., & SERRÃO, EA. (2005). Population genetics of *Zostera noltii* along the west Iberian coast: consequences of small population size, habitat discontinuity and near-shore currents. *Marine Ecology Progress Series* 290: 89-96.
- DUARTE, CM. (2002). The future of seagrass meadows. *Environmental Conservation* 29: 192-206.
- GIL-RODRÍGUEZ, M.C., J. AFONSO-CARRILLO & W. WILDPRET DE LA TORRE (1987). Praderas marinas de *Zostera noltii* (Zosteraceae) en las Islas Canarias. *Vieraea* 17: 143-146.
- GUADALUPE GONZÁLEZ, M.E., M.C. GIL-RODRÍGUEZ & M.C. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ (1995). *Flora y vegetación marina de Arrecife de Lanzarote. Islas Canarias*. Fundación César Manrique, Lanzarote. Ed. Torcusa. Madrid. 269 pp.
- HAROUN, R., M.C. GIL-RODRÍGUEZ & W. WILDPRET DE LA TORRE (2003). *Plantas Marinas de las Islas Canarias*. Canseco Editores. 319 pp.
- HOOTSMANS, MJM., VERMAAT, JE. & VAN VIERSSSEN, W. (1987). Seed-bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from the Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany* 28: 275-285.
- HUGHES, AR. & STACHOWICZ, JJ. (2004). Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101: 8998-9002.
- JACKSON, EL., ROWDEN, AA., ATTRILL, MJ., BOSSEY, SJ. & JONES, MB. (2001). The importance of seagrass beds as a habitat for fishery species. *Oceanography and Marine Biology* 39: 269-303.
- LOQUES, F., CAYE, G. & MEINESZ, A. (1990). Germination in the marine phanerogam *Zostera noltii* Hornemann at Golfe Juan, French Mediterranean. *Aquatic Botany* 38: 249-260.
- MARTINS, I., NETO, JM., FONTES, MG., MARQUES, JC., & PARDAL, MA. (2005). Seasonal variation in short-term survival of *Zostera noltii* transplants in a declining meadow in Portugal. *Aquatic Botany* 82:32-142.

- MEINESZ, A., MOLENAAR, H. & CAYE, G. (1993). Transplantation of marine phanerogams in the Mediterranean Sea. *Boll. Oceanol. Teor. Appl.* 11: 83-190.
- NEWMAN, D. & PILSON, D. (1997). Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51: 354-362.
- PETIT, R.J., EL MOUSADIK, A. & PONS, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.
- POLTE, P. & ASMUS, H. (2006). Influence of seagrass beds (*Zostera noltii*) on the species composition of juvenile fishes temporarily visiting the intertidal zone of the Wadden Sea. *Journal of Sea Research* 55: 244-252.
- POLTE, P., SCHANZ, A. & ASMUS, H. (2005). The contribution of seagrass beds (*Zostera noltii*) to the function of tidal flats as a juvenile habitat for dominant, mobile epibenthos in the Wadden Sea. *Marine Biology* 147: 813-822.
- REUSCH, TBH. (2001). New markers-old questions: population genetics of seagrasses. *Marine Ecology Progress Series* 211: 261-274.
- REUSCH, TBH., EHLERS, A., HÄMMERLI & WORM, B. (2005). Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102: 2826-2831.
- SCHAFFMEISTER, BE., HIDDINK, JG. & WOLFF, WJ. (2006). Habitat use of shrimps in the intertidal and shallow subtidal seagrass beds of the tropical Banc d'Arguin, Mauritania. *Journal of Sea Research* 55: 230-243.
- TANAKA, N., KUO, J., OMORI, Y., NAKAOKA, M. & AIOI, K. (2003). Phylogenetic relationships in the genera *Zostera* and *Heterozostera* (Zosteraceae) based on *matK* sequence data. *Journal of Plant Research* 116: 273-279.
- TEMPLADO, J. (2004). *Introducción. Las praderas de fanerógamas marinas. En: Luque, Á.A. y Templado, J. (Coords.). Praderas y bosques marinos de Andalucía*, pp. 57-59. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, 336 pp.
- VAN KATWIJK, MM. (2000). Reintroduction of eelgrass (*Zostera marina* L.) in the Dutch Wadden Sea: a research overview and management vision. En: Wolff WJ, Essink K, Kellermann A and van Leeuwe MA (eds.), *Challenges to the Wadden Sea. Proceedings of the 10th International Scientific Wadden Sea Symposium*, Groningen.
- WAYCOTT, M. (1998). Genetic variation, its assessment and implications to the conservation of seagrasses. *Molecular Ecology* 7: 793-800.
- WILLIAMS, SL. (2001). Reduced genetic diversity in eelgrass transplantation affects both population growth and individual fitness. *Ecology Applied* 11: 1472-1488.
- WILLIAMS, SL. & HECK, KL. (2001). *Seagrass community ecology*. En: Bertness MD, Gaines SD, Hay ME (eds) *Marine community ecology*. Sinauer, Sunderland, MA, p 317-337.