



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**LA RECUPERACIÓN DE LAS PRADERAS DE PASTOS MARINOS EN UNA  
PRADERA BAJO UN RÉGIMEN DE “ROTATIONAL GRAZING” POR  
TORTUGAS VERDES (*Chelonia mydas*).**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTOR(A) EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. ISIS GABRIELA MARTÍNEZ LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. BRIGITTA INE VAN TUSSENBROEK RIBBINK**

**(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE  
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS, UNAM)**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS**

**(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,  
UNIDAD MAZATLÁN, UNAM)**

**DR. EDGAR GERARDO MENDOZA BALDWIN**

**(INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM)**

**DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**

**(INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM)**

**DRA. MAITE MASCARO MIQUELAJAUREGUI**

**(UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E  
INVESTIGACIÓN DE SISAL, UNAM)**

**PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, SEPTIEMBRE, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**LA RECUPERACIÓN DE LAS PRADERAS DE PASTOS MARINOS EN UNA PRADERA BAJO UN RÉGIMEN DE “ROTATIONAL GRAZING” POR TORTUGAS VERDES (*Chelonia mydas*).**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTOR(A) EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. ISIS GABRIELA MARTÍNEZ LÓPEZ**

**TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:**

**DRA. BRIGITTA INE VAN TUSSENBROEK RIBBINK**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS**

(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,  
UNIDAD MAZATLÁN)

**DR. EDGAR GERARDO MENDOZA BALDWIN**

(INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM)

**DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**

(INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM)

**DRA. MAITE MASCARO MIQUELAJAUREGUI**

(UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN DE SISAL)

**PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, SEPTIEMBRE 2024**

## Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías CONAHCYT por la beca otorgada (beca nacional número 210565/202636).

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología PCMyL por el apoyo durante el doctorado.

Al financiamiento SEMARNAT (PROCER/CCER/DRPYYCM/02/2016) otorgados a la Dra. Brigitta Ine van Tussenbroek Ribbink y los cuales financiaron este proyecto de investigación.

Mi especial aprecio y agradecimiento a mi tutora principal Brigitta Ine van Tussenbroek Ribbink por la dirección y orientación a lo largo de mis años de doctorado, ¡muchos años! Estoy muy agradecida por la confianza que me otorgó para aprender y cometer errores en el proceso, pero siempre con el respaldo de sus consejos y experiencia. Su entusiasmo por entender la vida, y en particular la de los pastos marinos, seguirán siendo una fuente de motivación. Brigit gracias por siempre darte el tiempo para dialogar con tus estudiantes. También mi agradecimiento para los miembros del comité tutor, F. Alberto Abreu Grobois, Edgar G. Mendoza Baldwin, Juan S. Núñez Farfán y Maite Mascaró Miquelajauregui. Sus contribuciones enriquecieron cada uno de los capítulos de este trabajo, gracias por la paciencia. Mi agradecimiento especial a Maite por la orientación en la parte estadística y todas sus observaciones, han hecho de esta tesis un mejor trabajo.

Al personal de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA-UNAM). Gracias a José Edgar Escalante-Mancera y Miguel Ángel Gómez Reali (Servicio Académico de Monitoreo Meteorológico y Oceanográfico) por los datos meteorológicos del Capítulo 1. Por el apoyo en campo en numerosas ocasiones, y en la realización de pruebas para calcular la reducción del movimiento de agua de las cajas de acrílico utilizadas en el Capítulo 4 y 5 de este trabajo, también por las imágenes de dron del Capítulo 5. Gracias a Amauri Mendoza López por todo el apoyo en campo y para el armado de mucho del material utilizado para este proyecto de tesis como las jaulas de exclusión.

Agradezco al grupo del laboratorio de Pastos Marinos de la UASA-UNAM. A María Guadalupe Barba Santos por su apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio para todos los capítulos. A todos los compañeros que han sido parte del grupo y que hicieron posible el trabajo de campo, Hazel María Canizales Flores, León Felipe González Morales, Ana Lilia Molina Hernández, Verónica Monroy Velázquez, Nancy Estefany Burgos Veneroso, Hunahpu Marcos, Rens Cronau, Ward Kleuskens. Mi especial agradecimiento a Marloes van Den Akker, Liene Walk (Capítulo 1) y Luuk Leemans (Capítulo 4 y 5) con quienes colaboré estrechamente para la realización y publicación de manuscritos.

A Tjisse van der Heide (Capítulo 1), Marieke M. van Katwijk (Capítulo 1, 4 y 5) por su contribución a la revisión de los manuscritos publicados.

Una gran parte del presente Proyecto se realizó en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos PNAPM por lo que agradezco las facilidades otorgadas para trabajar en esta ANP.

Mi agradecimiento a la Cooperativa Piratas de Akumal S.C. de R.L. por el apoyo logístico en la Bahía de Akumal para los Capítulos 4 y 5.

# Índice general

## Tabla de contenido

Índice general .....	1
Resumen .....	2
Abstract.....	6
Introducción General .....	10
Justificación e importancia .....	17
Objetivo general y específicos.....	18
<b>Capítulo 1:</b> Nutrient availability induces community shifts in seagrass meadows grazed by turtles .....	20
<b>Capítulo 2:</b> Tasa de recuperación después del forrajeo por “cultivation grazing” .....	54
<b>Capítulo 3:</b> ”Critical Slowing Down” como un indicador de la capacidad de recuperación de pastos marinos ante herbivoría por tortugas verdes. ....	1
<b>Capítulo 4:</b> A mutualism between unattached coralline algae and seagrasses prevents overgrazing by sea turtles .....	35
<b>Capítulo 5:</b> Coralline algal explosion in an overgrazed seagrass meadow: Conditional outcomes of intra- and interspecific interactions.....	64
Conclusiones generales.....	97
LITERATURA CITADA.....	102

## Resumen

Las praderas de pastos marinos son ecosistemas esenciales, brindan alimentación, protección de la zona costera, y son amortiguadores del clima. A pesar de su valor económico y ecológico son subvalorados y experimentan disminuciones significativas a nivel global principalmente por afectación humana, que puede agravarse en interacción con disturbios naturales; por ejemplo, sitios que sufrieron eutrofización son más afectados por huracanes o tormentas que sitios no perturbados por aporte excesivo de nutrientes. Aunque los disturbios naturales por sí solos también pueden afectar a praderas en buenas condiciones, y la recuperación natural al estado antes de disturbio puede ser en años, o hasta décadas.

La herbivoría de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) es un disturbio natural de alto impacto potencial en praderas de pastos marinos. Este herbívoro se alimenta de pastos marinos, y aunque fue una especie sobre explotada en el pasado, el éxito de los esfuerzos para su conservación y la recuperación de sus poblaciones, ha incrementado el impacto su herbivoría, incluso llevando algunas praderas de pastos al colapso. Por ello el estudio para entender su función ecológica en los ecosistemas tomó relevancia en los últimos años y continúa en aumento. Aun así, existen pocos trabajos enfocados a estudiar la recuperación de praderas de pastos marinos una vez que la herbivoría se detiene.

En el Caribe, y donde la densidad de tortugas es moderada, las tortugas se alimentan en praderas mixtas dominadas por el pasto *Thalassia testudinum*, con una estrategia de alimentación por “*rotational grazing*”, que consiste en la alimentación selectiva de hojas jóvenes de *T. testudinum* usando rotación de áreas de ramoneo. El resultado de esta estrategia son parcelas con ramoneo constante por hasta dos años y parcelas abandonadas que son

rodeadas por pastos sin herbivoría. Estas condiciones en la pradera ofrecen la oportunidad de estudiar los procesos de recuperación teniendo sitios de no herbivoría como referencia.

La herbivoría de tortugas verdes puede inducir cambios en la comunidad de pastos hacia una dominancia de especies de crecimiento rápido. En una pradera con “*rotational grazing*”, se consideró un gradiente de intensidad de herbivoría simulada, usando el periodo de tiempo (meses de herbivoría) como un proxy de la intensidad. Se encontró que al aumentar la intensidad de herbivoría disminuyó la biomasa total del pasto *T. testudinum*, y a su vez aumentó la de especies de crecimiento rápido como *S. filiforme* y algas rizofíticas. Estos cambios en biomasa se asociaron a las concentraciones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en sedimento, sugiriendo que los cambios en la comunidad de pastos están mediados por una mayor disponibilidad de recursos para las especies de crecimiento rápido cuando la especie dominante y más eficiente en la captura de recursos disminuye.

La recuperación de la comunidad de pastos marinos después de la herbivoría por “*rotational grazing*” ocurre en periodos de tiempo mayores a dos años. Se evaluó el desarrollo a largo plazo de la comunidad de pastos marinos después de inhibir el ramoneo usando jaulas de exclusión, y se consideraron áreas de la pradera sin herbivoría como condiciones de referencia. Después de tres años, el ensamblaje de especies continuó siendo diferente en los sitios en recuperación. *T. testudinum* aumentó en densidad de haces, biomasa foliar y productividad similares a los sitios de referencia, aunque las tasas de elongación de hojas por haz, ancho y largo de hoja, así como el peso por haz, permanecieron por debajo de los sitios de referencia al cabo de tres años.

La herbivoría de tortugas verdes puede afectar la recuperación del pasto *T. testudinum*, incluso puede empujar al sistema hacia un cambio de estado (e.j. de pradera a arenal).



Considerando el mismo gradiente de intensidad de herbivoría simulada, y parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas, se evaluaron las tasas de recuperación de *T. testudinum* en dos condiciones distintas: sin disturbio adicional, y con un disturbio por entierro. Los niveles de menor intensidad (herbivoría moderada) se recuperaron mejor que los niveles de mayor intensidad de herbivoría (con o sin entierro). Las parcelas abandonadas por las tortugas tuvieron un comportamiento contrastante. La recuperación de *T. testudinum* fue mayor en condiciones sin disturbio y se redujo significativamente bajo condiciones de entierro. El nivel de mayor intensidad de herbivoría perdió casi el 99% de la biomasa de *T. testudinum* cuando fue aplicado el entierro, lo que pone en evidencia que una pradera pueden acercarse a un colapso cuando la herbivoría por tortugas verdes es persistente.

En una zona con alta densidad de tortugas y herbivoría constante por al menos diez años, se observó una inesperada recuperación de la pradera sobre explotada. El cese de la herbivoría en ciertas zonas de la pradera se atribuyó a una interacción mutualista entre el pasto *T. testudinum* y algas coralinas de vida libre (rodolitos) que se congregan formando camas densas. Para determinarlo se removieron los rodolitos en parcelas de pasto sin herbivoría y se colocaron en parcelas de pasto con signos de herbivoría reciente. La estructura ramificada y filosa de los rodolitos disuadió a las tortugas de continuar ramoneando en esos sitios, al mismo tiempo los pastos marinos protegieron las algas coralinas de ser removidas por las corrientes y las olas. Esta parte del estudio destaca la importancia de las interacciones entre especies en la resiliencia y el funcionamiento de los ecosistemas.

Las interacciones mutualistas no son deterministas, muestran variación y condicionalidad. Para demostrarlo, en la misma zona se analizaron los cambios espacio-temporales de los rodolitos (2009 a 2016), se determinaron las tasas de crecimiento de las algas coralinas con

un experimento *in situ* simulando la presencia de praderas de pasto denso, y en un segundo experimento se estudió la mortalidad de algas coralinas dentro y fuera de la cama de rodolitos. Los experimentos mostraron que una combinación de reducción de luz y del movimiento del agua reduce el crecimiento de los rodolitos, y cuando están congregados su mortalidad es menor, probablemente por una reducción en la resuspensión de sedimento que se determinó en un tercer experimento. La coexistencia herbivoría intensiva y un rápido crecimiento poblacional de las algas coralinas debido a un “*feedback*” positivo de reducción de la resuspensión del sedimento por la propia cama de rodolitos permitió el surgimiento del mutualismo de protección al ramoneo entre los pastos marinos y las algas coralinas.

El presente trabajo tiene implicaciones relevantes para entender los procesos y tiempos de recuperación de praderas de pastos después del cese de la herbivoría por tortugas, pero también se ofrece información sobre posibles estrategias de manejo para proteger las praderas de pastos marinos ante la herbivoría intensiva por tortugas verdes.

## Abstract

Seagrass meadows are ecosystems that provide multiple environmental services such as food, coastal protection, and act as climate buffers. Despite their economic and ecological value, seagrasses are undervalued and experience significant global declines, mainly due to human impacts, which can be exacerbated by natural disturbances. For example, sites that have undergone eutrophication are more severely affected by hurricanes or storms than undisturbed areas due to excessive nutrient input. Although natural disturbances alone can also impact well-maintained meadows, and natural recovery to pre-disturbance conditions can take years or even decades.

Green sea turtles (*Chelonia mydas*) herbivory is a natural disturbance with high potential impact on seagrass meadows. These herbivores feed on seagrass. Turtles were overexploited in the past, but successful conservation efforts and their population recovery have increased turtle herbivory impact, sometimes leading to the collapse of seagrass meadows. Thus, understanding their ecological role has become increasingly relevant in recent years. However, few studies focus on the recovery of seagrass meadows once herbivory has ceased.

In the Caribbean, when turtle density is moderate, turtles feed in mixed meadows dominated by *Thalassia testudinum*, employing a "rotational grazing" strategy, which consist on selective feeding on young *T. testudinum* leaves and rotating grazing areas. This results in constant grazing in some patches for up to two years, and abandoned patches surrounded by ungrazed seagrass. These conditions provide an opportunity to study recovery processes with ungrazed areas as references.

Turtle herbivory can induce changes in the seagrass community toward dominance by fast-growing species. In a meadow with “rotational grazing,” a gradient of simulated grazing pressure was considered, using grazing duration (months) as a proxy for intensity. Increasing grazing pressure was associated with reduced biomass of *T. testudinum* and increased biomass of fast-growing species such as *S. filiforme* and rhizophytic algae. These biomass changes were linked to ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) concentrations in sediment, suggesting that community changes are mediated by increased resource availability for fast-growing species when the dominant species declines.

Recovery of the seagrass community after “rotational grazing” occurs over periods longer than two years. Long-term development was assessed by excluding grazing with cages, with ungrazed areas as references. After three years, *T. testudinum* abundance increased to levels similar to reference sites, and species assemblage was similar to ungrazed sites. *T. testudinum* showed increased shoot density, leaf biomass, and productivity comparable to reference sites, although leaf elongation rates, leaf width and length, and shoot weight remained below reference site levels after three years.

Green turtle grazing can affect *T. testudinum* recovery and potentially push the system toward a state change (e.g., from meadow to sand). Considering the same gradient of simulated grazing pressure and naturally abandoned patches, *T. testudinum* recovery rates were evaluated under two conditions: without additional disturbance and burial disturbance. Lower grazing pressure levels (moderate grazing) recovered better than higher grazing levels (with or without burial). Abandoned patches exhibited contrasting behavior. Recovery of *T. testudinum* was higher in undisturbed conditions and significantly reduced under burial conditions. High-intensity grazing levels lost almost 99% of *T. testudinum* biomass with

burial, highlighting that a meadow can approach collapse under persistent green turtle grazing.

In an area with high turtle density and persistent grazing for at least ten years, an unexpected recovery of the overexploited meadow was observed. The cessation of herbivory in certain meadow areas was attributed to a mutualistic interaction between *T. testudinum* and free-living coralline algae (rhodoliths) that form dense beds. To determine this, rhodoliths were removed from ungrazed seagrass plots and placed in recently grazed plots. The spiny structures of rhodoliths discouraged turtles from continuing grazing, while seagrasses protected the coralline algae from being removed by currents and waves. This part of the study underscores the importance of species interactions in ecosystem resilience and functioning.

Mutualistic interactions are not deterministic; they show variability and conditionality. To test this, spatio-temporal changes in rhodoliths (2009 to 2016) were analyzed, coralline algae growth rates were determined through an *in situ* experiment, simulating dense seagrass meadows, and a second experiment studied coralline algae mortality inside and outside rhodolith beds. The experiments showed that reduced light and water movement decreased rhodolith growth, and when congregated, their mortality was lower, likely due to reduced sediment resuspension determined by a third experiment. The coexistence of intensive grazing and rapid population growth of coralline algae, due to positive feedback from reduced sediment resuspension by rhodolith beds, enabled the emergence of a grazing protection mutualism between seagrasses and coralline algae.

This study has significant implications for understanding the recovery processes and recovery time of seagrass meadows after the cessation of turtle grazing, as well as providing insights into possible management strategies to protect seagrass meadows from intensive green turtle herbivory.

## Introducción General

Los pastos marinos son un grupo ecológico de plantas con flores (angiospermas) adaptados completamente al medio marino, donde viven fijos a un sustrato por medio de un sistema de raíces y rizomas (den Hartog y Kuo 2006). Forman praderas extensas en zonas costeras tropicales y templadas, las cuales constituyen uno de los ecosistemas más productivos del planeta (Hemminga y Duarte 2000). Al igual que otros ecosistemas, las praderas de pastos marinos son de gran valor ecológico y socioeconómico, siendo un elemento clave para el funcionamiento y sostenibilidad de las zonas costeras. Favorecen la producción pesquera al ser zonas de alimentación y refugio de peces (Lobel y Odgen 1981; Arthur *et al.* 2013); herbívoros carismáticos como las tortugas verdes, manatíes y dugongos también utilizan las praderas de pastos marinos como sitios de alimentación, por lo que estos ecosistemas tienen un aprovechamiento turístico (Smulders *et al.* 2021). Protegen y estabilizan las costas al atenuar la energía de corrientes y oleaje, y así evitan la erosión (de Boer *et al.* 2007). Son importantes productores de oxígeno, favorecen el reciclaje de nutrientes, y mitigan efectos de cambio climático al capturar carbono y almacenarlo (Orth *et al.* 2006; Waycott *et al.* 2009; Deyanova *et al.* 2017).

A pesar de su gran valor, la perspectiva global sobre los ecosistemas de pastos marinos es que se encuentran disminuyendo, con algunas regiones teniendo pérdidas rápidas y significativas, mientras que en otras el patrón de pérdida es más lento (Waycott *et al.* 2009; Dunic *et al.* 2021). El incremento de impactos humanos sobre estos ecosistemas es una de las principales causas de cambio a nivel global. En el contexto local, la presencia de múltiples estresores representa un desafío para comprender los cambios en una pradera de pastos marinos, y cuál es la atribución de nuestras actividades, para así mejorar su gestión y

conservación. Además, como ocurre con otros ecosistemas, es difícil establecer las líneas base a partir de la cual determinar sus cambios (Dunic *et al.* 2021).

En lo que respecta a los pastos marinos, el éxito de los esfuerzos para la conservación las tortugas verdes y la recuperación de sus poblaciones, ha llevado al cuestionamiento de lo que se considera una pradera de pastos marinos prístina y en buen estado (Christianen *et al.* 2021).

Conforme las poblaciones de tortugas verdes han incrementado, así lo ha sido el impacto de su herbivoría en los ecosistemas de pastos marinos (Fourqurean *et al.* 2010; Kelkar *et al.* 2013; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Samper-Villarreal *et al.* 2022). Si se considera la presencia de las tortugas verdes en números históricos previos a su sobreexplotación, las praderas que definimos como prístinas (formada por especies clímax de crecimiento lento), no representan el escenario esperado una vez que se considera la función ecológica de las tortugas verdes en estos ecosistemas (Christianen *et al.* 2021).

### *Herbivoría de tortugas verdes*

Las tortugas verdes son herbívoros marinos que consumen principalmente pasto marino como parte de su dieta en la mayoría del rango de su distribución global (Esteban *et al.* 2020). Tienen alta fidelidad a sus sitios de alimentación gracias a su gran flexibilidad para cambiar las estrategias para alimentarse, las cuales se encuentran fuertemente relacionadas con el tipo de alimento disponible (Bjorndal 1997), la presión de depredación (Heithaus *et al.* 2007) y la densidad de sus poblaciones (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Christianen *et al.* 2021).



En el Caribe el pasto clímax *Thalassia testudinum* (pasto tortuga) es su alimento principal, y del cual prefieren consumir sus hojas jóvenes, ya que les proporcionan alimento de mejor calidad al tener más contenido de nitrógeno, y menos epífitas y ligninas que facilitan su digestión (Bjorndal 1980; Molina-Hernández y van Tussenboek 2014). A bajas densidades, las tortugas realizan un tipo de alimentación en el que ramonean repetitivamente en áreas específicas de la pradera de pastos, creando parcelas con ramoneo constante que se distinguen claramente del resto de la pradera, y que se conoce como “*cultivation o rotational grazing*” (Bjorndal 1980; Preen 1995). Cuando dominan otros pastos marinos (p.ej., *Cymodocea rotundata*, *Halodule uninervis*), o bien cuando la densidad de tortugas aumenta, estas pueden cambiar su estrategia de forrajeo y ramonear de manera homogénea en extensiones grandes de una pradera de pastos sin parches específicos que mantener (Christianen *et al.* 2021).

En el tipo de alimentación por “*rotational grazing*”, las tortugas mantienen las parcelas con herbivoría (Figura 1) hasta que ya no aportan la cantidad de alimento suficiente, entonces son abandonadas y nuevas parcelas son abiertas (Lacey *et al.* 2014; Molina-Hernández y van Tussenboek 2014). Este mismo tipo de alimentación se ha descrito también para otras regiones como en Australia, en praderas de pastos mixta y especies de crecimiento rápido y donde Scott *et al.* (2020) sugieren que el objetivo de la apertura de parcelas en ese caso, está orientado a mantener especies de crecimiento rápido.

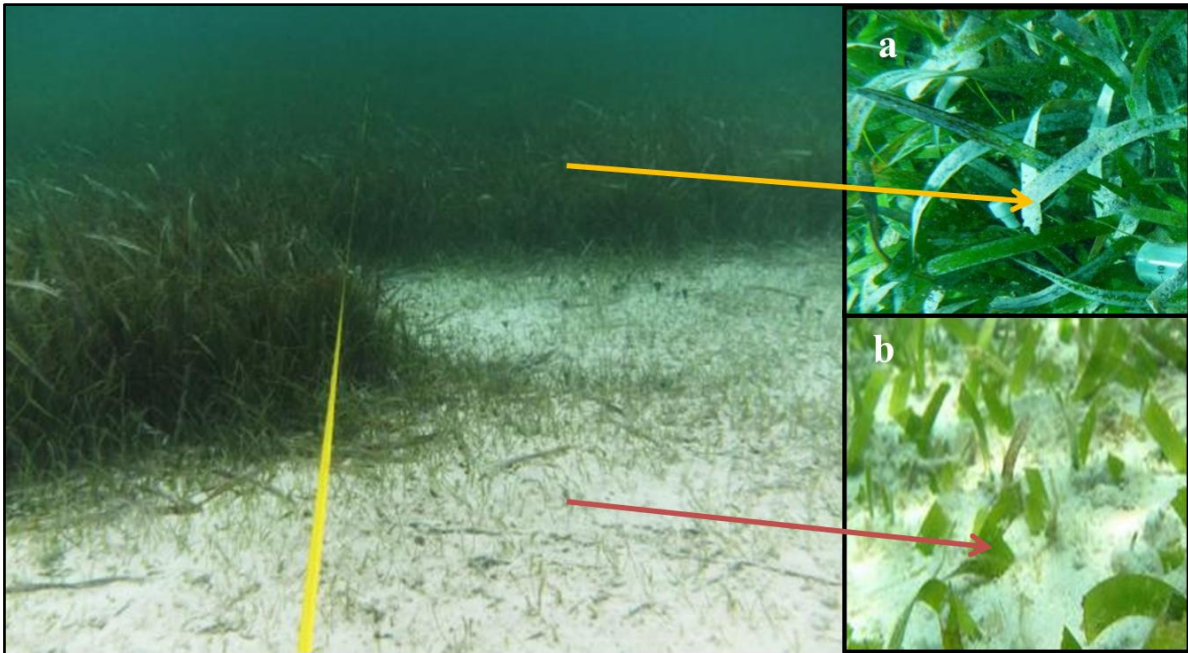


Figura 1. Pradera de pastos marinos dominada por el pasto *Thalassia testudinum* (Caribe mexicano) y donde las tortugas verdes se alimentan por “rotational grazing” creando parcelas con herbivoría constante. Condiciones de la pradera: a) sin herbivoría y b) parcela con mordidas de tortugas. Foto de B. I. van Tussenbroek.

#### *Efecto de la herbivoría de tortugas en praderas de pastos marinos*

La respuesta de los pastos marinos al efecto de la herbivoría, depende de sus características, y de otros factores como la porción de hoja que es removida, la intensidad y frecuencia de ramoneo, y del comportamiento del herbívoro (Moran y Bjorndal 2005). Bajo herbivoría constante por tortugas, el ancho y largo de las hojas disminuye, su productividad, y con ello la capacidad fotosintética de las plantas (Williams 1988; Moran y Bjorndal 2005). La densidad de haces también disminuye (Moran y Bjorndal 2005); y, eventualmente, la biomasa del rizoma al agotarse las reservas de carbohidratos solubles (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Martínez-López *et al.* 2019). Esta interacción planta-herbívoro también tiene un impacto sobre la dinámica de la comunidad de pastos (Valentine and Duffy

2006), ya que puede limitar la trayectoria de sucesión y mantener a las praderas en una etapa intermedia, con una mayor abundancia de pastos pioneros de crecimiento más rápido (Ballorain 2010; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Martínez-López *et al.* 2019). Cuando la densidad de tortugas aumenta, el efecto de su herbivoría puede ser aún más drástico y evidente. Los pastos dejan de aportar la cantidad de alimento suficiente, por lo que, en algunos casos, pueden cambiar su tipo de alimentación a consumir las partes subterráneas de los pastos (rizomas), pudiendo llevar a una pradera al colapso (Christianen *et al.* 2014).

#### *Recuperación de praderas de pastos marinos*

Existen diferentes definiciones para el término *resiliencia*, pero de manera general se define como: la capacidad de un sistema para absorber un disturbio, reorganizarse mientras ocurre el cambio, y regresar a un estado inicial previo. Manteniendo en esencia las mismas funciones, estructura, identidad y mecanismos de retroalimentación antes del disturbio (“*feedback loops*”) (Walker *et al.* 2004). Los ecosistemas costeros como los pastizales marinos son afectados por disturbios a diferentes escalas espacio-temporales. Cuando las especies que forman parte del ecosistema son tolerantes a un disturbio, éste cambiará poco y se considera que el ecosistema tiene *resistencia*, que es un componente importante de su resiliencia (Tett *et al.* 2013). Otro aspecto importante es la *recuperación*, que implica que un sistema regresará a las condiciones previas sin disturbio, una vez que el disturbio ha cesado (Walker *et al.* 2004). La recuperación es una condición que puede ser evaluada en diferentes términos y depende de la pregunta que quiera ser contestada, ya sea examinando procesos ecológicos fundamentales, la función de la comunidad, o examinando información sobre cómo son afectados los servicios ambientales del sistema (Elliot *et al.* 2007).

La resiliencia de un ecosistema resulta difícil de medir directamente; sin embargo, a partir de modelos teóricos, se ha planteado que las tasas de recuperación de un ecosistema después de un disturbio, pueden ser un buen indicador de su resiliencia (van Nes y Scheffer 2007). Las tasas de recuperación, por tanto, representan el tiempo que requiere el sistema para alcanzar su condición previa, esto después de que ha sido sometido a un disturbio. El efecto conocido como “*critical slowing down*” se presenta cuando el sistema se acerca al punto de bifurcación hacia un estado alternativo (conocido como “*tipping point*”) y su respuesta de recuperación a pequeñas perturbaciones comienza a ser más lenta (Carr *et al.* 2012).

Particularmente, la recuperación de los pastos marinos puede variar significativamente en cuanto a tiempo, desde solo unos pocos meses, hasta varias décadas. Este periodo depende de diversos factores, pero es fuertemente influido por la capacidad de los pastos marinos de modificar de manera directa o indirecta las condiciones ambientales en las que se encuentran (Bos *et al.* 2007). Por ejemplo, su dosel puede reducir la energía de las corrientes y el oleaje, lo que influye en la dinámica sedimentaria (van Katwijk *et al.* 2010). Estabilizan el sedimento no solo por el efecto del dosel sobre la hidrodinámica, sino también por la red de rizomas y raíces de los pastos que favorece la retención del sedimento y evitan su resuspensión (Grave y Binzer 2004; de Boer *et al.* 2007). De esta forma, los pastos marinos influyen en sus propias condiciones lumínicas, es decir, mantienen ciertas condiciones ambientales a través de “*positive feedbacks*” (van der Heide *et al.* 2007).

Aunque los pastos marinos tienen un papel importante en la modificación de las condiciones ambientales en las que se desarrollan, diversos estresores de carácter antropogénico como por ejemplo la eutrofización, han llevado a la pérdida de estos ecosistemas y sus servicios ambientales (Carruthers *et al.* 2005; McGlathery *et al.* 2007). Disturbios naturales, tales

como huracanes u otros eventos extremos meteorológicos o hidrodinámicos, pueden exacerbar los impactos antropogénicos llevando praderas al colapso (van Tussenbroek *et al.* 2014). Otro disturbio natural mayor sobre las praderas marinas es la herbivoría intensiva de tortugas verdes (Christianen *et al.* 2021).

El aumento en la abundancia de tortugas verdes en praderas de pastos marinos ofrece la oportunidad de evaluar el impacto de las tortugas bajo diferentes escenarios, algunos de los cuales pueden favorecer a los pastos marinos (Christianen *et al.* 2011), o a la diversidad del paisaje (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Christianen *et al.* 2022). Aunque bajo una presión alta e incesante, algunos de estos pastos marinos podrían colapsar en el corto plazo, lo que tendría consecuencias negativas en la pérdida de servicios ambientales (Lal *et al.* 2010; Kaladharan *et al.* 2013; Christianen *et al.* 2014; Christianen *et al.* 2022).

Dado el contexto de la disminución global de praderas de pastos marinos, su importancia por los servicios ecosistémicos que proporcionan, y las poblaciones de tortugas verdes en aumento, surge el interés de este estudio en examinar los procesos de recuperación en praderas de pastos marinos bajo diferentes escenarios de herbivoría por tortugas verdes. Si bien en los últimos ha incrementado considerablemente la investigación sobre la interacción tortugas verdes-pastos marinos, los estudios centrados en la recuperación son escasos. Este trabajo tiene como objetivo contribuir con nuevo conocimiento en este ámbito.

## **Justificación e importancia**

El estudio de la herbivoría de tortugas verde es esencial para comprender el estado histórico y actual de las praderas de pasto marino en las regiones tropicales y subtropicales. Antes de la disminución de los megaherbívoros en estas áreas, el ramoneo pudo haber desempeñado un papel fundamental en la conformación de la composición y la dinámica de estas praderas. Con los esfuerzos exitosos de conservación que han llevado a un aumento en las poblaciones de tortugas verdes, es probable que la función ecológica de estos megaherbívoros en los ecosistemas de pastos marinos sea cada vez más evidente. Por tanto, la intención de este estudio es investigar algunos de los factores que inhiben o hacen posible la recuperación de pastos marinos en el Caribe, con el fin de entender cómo el aumento en la abundancia de tortugas verdes y su herbivoría afectarán a las comunidades de pastos marinos y sus servicios ecosistémicos en la región del oeste del Caribe (México). Asimismo, reconocer los impactos de la herbivoría en las comunidades de pastos marinos y sus tasas de recuperación, nos permitirá comprender mejor cómo proteger y gestionar estos ecosistemas vitales y a uno de sus principales herbívoros.

## Objetivo general y específicos

### Objetivo general

Determinar la recuperación de comunidades de pastos marinos en el Caribe Mexicano con diferentes historiales de ramoneo por tortugas verdes (*Chelonia mydas*).

### Objetivos específicos (correspondientes con los capítulos)

1. *Determinar el efecto de la alimentación de tortugas verdes por “rotational grazing” sobre los nutrientes en sedimentos y la composición de especies de pastos marinos.*
2. *Evaluar el desarrollo a largo plazo (tres años) en parcelas ramoneadas después de inhibir el ramoneo de tortugas marinas mediante jaulas de exclusión en parcelas abandonadas, que fueron ramoneadas por las tortugas por cuando menos 13 meses, en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Caribe Mexicano.*
3. *Comparar las tasas de recuperación de *Thalassia testudinum* bajo diferentes niveles de intensidad de herbivoría simulada (corto, mediano, largo plazo y en recuperación), para verificar si se detecta “critical slowing down” conforme se alargan los tiempos de herbivoría.*

4. *Investigar si existe un mutualismo entre pastos marinos y algas coralinas de vida libre (rodolitos) en la bahía norte de Akumal, un sistema con presión excesiva de herbivoría de tortugas*
  
5. *Estudiar cómo el estado del sistema, sobre-explotado por las tortugas verdes en Akumal, pero mantenido por el mutualismo entre pastos marinos y rodolitos, depende de las fortalezas de las interacciones antagónicas, mutualistas y facilitadoras entre los pastos marinos, las tortugas verdes y los rodolitos*



# Capítulo 1: Nutrient availability induces community shifts in seagrass meadows grazed by turtles

## ABSTRACT

In the Caribbean, green turtles graze seagrass meadows dominated by *Thalassia testudinum* through rotational grazing, resulting in the creation of grazed and recovering (abandoned) patches surrounded by ungrazed seagrasses. We evaluated the seagrass community and its environment along a turtle grazing gradient; with the duration of (simulated) grazing as a proxy for the level of grazing pressure. The grazing levels consisted of Short-term (4 months clipping), Medium-term (8 months clipping), Long-term grazing (8 months of clipping in previously grazed areas), 8-months recovery of previously grazed patches, and ungrazed or unclipped patches as controls. We measured biomass and density of the seagrasses and rhiziphytic algae, and changes in sediment parameters. Medium- and Long-term grazing promoted a shift in community species composition. At increasing grazing pressure, the total biomass of *T. testudinum* declined, whereas that of early-successional increased. Ammonium concentrations were highest in the patches of Medium-term ( $9.23 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ) and Long-term grazing levels ( $10.96 \pm 2.2 \mu\text{M}$ ) and were lowest in the control areas ( $4.65 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ). *T. testudinum* is a late-successional species that maintains sediment nutrient concentrations at levels below the requirements of early-successional species when dominant. When the abundance of this species declines due to grazing, these resources become available, likely driving a shift in community composition towards a higher abundance of early-successional species.

**KEYWORDS:** *Chelonia mydas*; nitrogen; ammonium; rotational grazing; competition

**Publicado:** Martínez-López I. G., M. van Den Akker, L. Walk, M. M. van Katwijk, T. van Der Heide and B. I. van Tussenbroek. 2019. Nutrient availability induces community shift in seagrass meadows grazed by turtles. *PeerJ*. 7:e7570 DOI 10.7717/peerj.7570

## INTRODUCTION

Changes in the species composition of seagrass communities have been primarily attributed to bottom-up control mechanisms, such as resource availability (Touchette & Burkholder 2000; Ralph *et al.* 2007), with top-down mechanisms, such as herbivory, only playing a minor role. The drastic declines of large herbivores, like green turtles, manatees, and dugongs, caused by human overexploitation (Jackson 1997; Jackson 2001; Hughes *et al.* 2004; Valentine & Duffy 2006) has contributed to the undervaluation of top-down controls in seagrass communities. In recent decades, conservation strategies have led to local increases in abundance of green turtles (*Chelonia mydas*), with noticeable impacts of turtle grazing on seagrass communities (Zieman 1984; Kaladharan *et al.* 2013; Kelkar *et al.* 2013; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). Herbivores, particularly large herbivores such as green turtles, can alter plant species composition and community structure (Lal *et al.* 2010; Kelkar *et al.* 2013; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014).

Herbivore-induced shifts in community dynamics, structure and species composition have been widely studied for terrestrial ecosystems (Bowes 1993; Anderson & Briske 1995; Augustine & McNaughton 1998). Large herbivores may alter plant communities through numerous mechanisms, such as selective grazing which alters competitive interactions among plant species (Anderson & Briske 1995). The effects of grazing can be particularly strong when herbivores decrease the abundance of one or more dominant plant species that control resource abundance within the community (Olf & Ritchie 1998). In grasslands for example, ungulates directly influence the nitrogen cycle by adding nitrogen through urine and feces, but more importantly they indirectly affect decomposition processes in soil through changes in plant litter. Resource heterogeneity created by ungulate grazing may alter

the competition for resources, leading to an increase in plant species diversity in grazed areas (Hobbs 1996; McNaughton *et al.* 1997; Bakker *et al.* 2003; Borer *et al.* 2014). Interactions of herbivores on plant communities can also be influenced by the effects of abiotic sources of disturbance, such as fire in terrestrial grasslands (Hobbs 1996).

In the Caribbean, climax seagrass communities are dominated by the robust late-successional species *Thalassia testudinum* (slower-growing), which is the preferred food source for green turtles (Bjorndal 1980; Thayer *et al.* 1984; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). Green turtles feeding on *T. testudinum* use a cultivation or rotational feeding strategy (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014), which is also used by roaming wild ungulates in terrestrial systems (Vavra & Ganskopp 1998; Bakker *et al.* 2016). Green turtles create grazing patches within *T. testudinum* meadows which are easily recognized as they graze seagrass leaves in specific areas or patches that they maintain and revisit (Bjorndal 1980; Molina-Hernandez & van Tussenbroek, 2014). Continuous grazing on *T. testudinum* increases nitrogen content in the leaves and reduces their lignin content, which improves the quality of the food (Bjorndal 1980; Thayer *et al.* 1984; Zieman *et al.* 1984). Rotational grazing by green turtles decreases the above-ground community biomass, particularly that of *T. testudinum*. Grazed patches are maintained for one to two years after they are abandoned most likely because of reduced leaf growth due to internal carbohydrate depletion; (Fourqurean *et al.* 2010; Lacey *et al.* 2014;), and the turtles do not return to abandoned patches (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). Abandoned patches show thinner and shorter leaves of *T. testudinum*, with sparser seagrass shoots than ungrazed nearby meadows (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). Rotational grazing creates gaps (patches) allowing for colonization of faster-growing seagrass species such as *Halodule wrightii* and

rhizophytic algae (early-successional species). Thus, in these gaps, turtle herbivory drives community shifts with faster-growing species replacing slower-growing dominant species (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014, Lacey, *et al.* 2014). After abandonment, the recovery of grazed patches to pre-grazing conditions may take several years (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014).

Seagrass community structure and dynamics are highly influenced by competition for light (Fourqurean *et al.* 1995; Ralph *et al.* 2007) and nutrients (Williams 1987; Williams 1990; Fourqurean *et al.* 1995; Touchette & Burkholder 2000; Lee *et al.* 2007; Leoni *et al.* 2008). In the shallow seagrass beds in Caribbean reef lagoons, light availability is commonly high (Enríquez & Pantoja-Reyes 2005) but when *T. testudinum* is dominant, the canopy itself reduces light availability under the canopy (Williams 1987; Enríquez & Pantoja-Reyes 2005). However, in grazed patches *T. testudinum* leaves are shorter and abandoned patches have less dense canopy and thinner *T. testudinum* leaves, and the reduced seagrass canopies in the grazed and abandoned patches are not expected to attenuate light, so competition for light is unlikely in turtle-grazed areas. Instead, nutrient availability in Caribbean seagrass meadows is fundamental in the process of succession described by Williams (1990). Williams (1990) reported that during the first stages of succession, faster-growing seagrass species and rhizophytic algae are the primary successive species to recruit to new areas which stabilize sediments and increase organic matter content, and ammonium concentration in pore water. Slower-growing *T. testudinum* increases gradually in abundance, and when *T. testudinum* becomes dominant, ammonium concentration drops again because this climax species withdraws ammonium until levels below the requirements of early-successional species. Plant in the communities influence nutrient availability, but also changes in nutrient supply

influence the species composition of the community. For example, when nutrient supply increases (eutrophication), an increase in the faster-growing seagrass species, such as *Halodule wrightii* or *Syringodium filiforme* and rhizophytic macroalgae may occur, eventually replacing *T. testudinum* (Fourqurean *et al.* 1995; Davis & Fourqurean 2001; Ferdie & Fourqurean 2004).

To date, there is little data on the underlying mechanisms associated with community shifts due to turtle grazing. Fourqurean *et al.* (2010), Ballorain (2010) and Christianen *et al.* (2011, 2014) studied changes in seagrass communities when recovering from grazing after placement of turtle exclusion cages; but the recovery trajectory not necessarily is the precise reverse of the trajectory of impact. Thus, following changes in the seagrass meadow when grazing pressure increases may be a better approach to discern the main drivers for the shifts in the seagrass vegetation. In the present study, we monitored changes in patches that were clipped/grazed for different duration (which we consider equivalent to grazing pressure). By comparing different levels of grazing pressure (grazing duration), we aim to answer two questions: i) does rotational grazing change nutrient availability in sediments? and ii) if such changes occur, what are the consequences for the species composition of the vegetation? We hypothesize that early-successional rhizophytic algae and seagrass species (faster-growing) will become more abundant if nutrient availability changes under increasing grazing pressure.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study site*

The study was carried out in Puerto Morelos reef lagoon, on the northeastern coast of the Yucatan Peninsula, Mexican Caribbean. The reef lagoon is delimited by a fringing reef that extends parallel to the coast from north to south. The lagoon is governed by marine conditions, and is between 550 and 3000 m wide, with a mean depth of 3-4 m (INE 2000; Rodriguez-Martinez *et al.* 2010). The calcareous sandy bottom is covered with a mixed macrophyte community dominated by *Thalassia testudinum*, accompanied by *Syringodium filiforme*, *Halodule wrightii* and rhizophytic algae (i.e. *Halimeda* spp. *Penicillus* spp., *Rhypocephalus* spp., *Udotea* spp.; van Tussenbroek 2011). While most of the extensive seagrass bed is not grazed by turtles, specific locations are frequently visited by them. In these locations, turtles create a mosaic of grazed (grazed continuously), ungrazed and recently abandoned patches (Molina Hernández & van Tussenbroek 2014). The site of this study was such an area located 650 m from the coast (20°51'44.1" N, 86°51'46" W), at a depth of 3-4 m.

### *Simulated turtle grazing*

We established four levels of grazing pressure (based on grazing duration): Control as a reference condition, Short-term, Medium-term and Long-term grazing, and one level of Recovery (Table 1) with five replicates (patches) for each level. The experimental patches were created in two different previous conditions: ungrazed or previously grazed by green turtles. Control patches were established in ungrazed sections of the seagrass bed without

clipping. Short-term and Medium-term experimental patches were created also in the ungrazed seagrass bed. We simulated turtle grazing by “clipping” leaves of seagrasses (*T. testudinum* and *S. filiforme*) and thalli of rhizophytic algae ~3 cm above sediment level with scissors (which is the average size of shoot leaves after being grazed by green turtles), removing the clipped portions of the seagrasses and algae to mimic ingestion by turtles. Although *S. filiforme* and calcareous green algae are not preferred food for the turtles, they do crop them incidentally. In addition, our objective was to show how grazing of all species, without preference, can still lead to changes in competitive hierarchy and therefore species composition. In this way we mimicked turtle patches with irregular shape and 6-12 m<sup>2</sup> in size, which is the minimal patch size registered by Molina-Hernández & van Tussenbroek (2014) in the same reef lagoon. Distances between adjacent patches were  $\geq 1.5$ m, which corresponded with the median distance of naturally created grazing patches by turtles in the study site. Seagrasses were re-clipped at ~15 d intervals which coincide with the time needed for *T. testudinum* blades to regrow  $\geq 5$  cm above the blade/sheath junction (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). The Short- and Medium-term patches were clipped for 4 and 8 months, respectively. The Long-term grazing areas were created in previously grazed patches that had been abandoned by turtles, which were easily identified, presenting sparse vegetation of *T. testudinum* with thinner and shorter leaves than the surrounding ungrazed seagrass bed (Molina-Hernandez & van Tussenbroek 2014); the leaves in these patches did not have evidence of turtle bites which are clearly visible when present. Within the previously grazed patches, experimental quadrats of 1 m<sup>2</sup> were established and seagrasses and algae were clipped as described above for 8 months. The Long-term treatment represents a seagrass scenario under heavy grazing pressure. The remaining areas in the same patches were assigned for the Recovery level without clipping. At 4 occasions in different patches (out of



18 times that clipping was applied), the turtles visited our experimentally clipped patches, which it was evident by short-cropped leaves; manual clipping was ceased when this occurred.

Table 1 Grazing levels of the experiment, with dates of start and duration of the treatments. Recovery level was marked in June 2015 and then was undisturbed till the end of the experiment (8 months). The experiments were finished in February–March 2016.

<b>Previous seagrass condition</b>	<b>Experimental clipping</b>	<b>Explanation</b>	<b>Initiation of Clipping</b>
<b>Ungrazed</b>	None	Control	
<b>Ungrazed</b>	4 months	Short-term	October 2015
<b>Ungrazed</b>	8 months	Medium-term	June 2015
<b>Previously grazed *</b>	8 months	Long-term **	June 2015
<b>Previously grazed *</b>	None	Recovery	

#### *Sediment and pore-water analysis*

Sediment samples were collected to determine organic matter content at the end of our grazing treatments in February 2016. Three samples were taken randomly at each patch using 5 cm diameter tubes at a depth of 10 cm. The samples were pooled per patch, homogenized after removing plant material, and dried at 60°C (~48 h) to be weighed afterwards. Subsamples of 20 dry g were used to determine organic matter content through loss of dry weight after dissolution in hydrochloric acid (12.5%), which dissolves the carbonate

sediments. The remaining sediment samples were used to granulometric analysis (Particle Analyzer CAMSIZER, Institute of Engineering, UNAM).

Pore-water samples were taken anaerobically at each patch at four different times starting one month after cessation of clipping, on 3 March, 5, 11 April and 6 May 2016. A rhizon pore water sampler (0.2  $\mu\text{m}$  pore size, 5 cm depth; Eijkelkamp Agri-Search Equipment, Giesbeck, the Netherlands) connected to a 50 mL syringe was introduced in the sediment, and for 90-120 minutes allowing the syringe to slowly fill with porewater. In the laboratory, sulfide concentrations were measured in 4 ml of each sample within 4 hours of collection. Sulfide concentrations were measured in a mixture of 50% sample and 50% Sulfide Anti-Oxidation Buffer (SAOB) (Lamers *et al.* 1998) with a HI 4115 Silver/Sulphide combination electrode (Hanna Instruments, Woonsocket RI USA), and a WTW multimeter (multi 340i/SET). The remaining pore-water of the samples was frozen (-20 °C) until further analysis. Concentrations of phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) were measured on an Analytical order 1000640-1 3 System AutoAnalyser (Bran&Lubbe, 2 Seal Model II systems; continuous analysis Norderstedt, Germany) with ammonium molybdate, hydrazine sulfate and salicylate, respectively. Detection limits for the analysis was 1  $\mu\text{M}$  for sulfide concentrations, 0.2  $\mu\text{M}$ , for ammonium concentrations, and 0.1  $\mu\text{M}$  for nitrate and phosphate concentrations.

### *Seagrass and rhizophytic algae*

Samples were obtained with permit PPF/DGOPA-012/17 of Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. At the end of the experiment (February-March 2016), foliar shoots of seagrasses and thalli of rhizophytic algae were counted for each species in a randomly placed PVC ring (diameter = 30 cm area = 0.07 m<sup>2</sup>). In each patch, two core samples (diameter = 11.2 cm, h = ~ 40 cm) were taken after 25 days of the last clipping, allowing for regrowth of leaves and thalli before harvesting. In patches with low density of *T. testudinum*, additional foliar shoots of *T. testudinum* were collected randomly by cutting the vertical rhizome below the substratum to complete 15 shoots for morphometric measurements. One of the core samples was processed for *T. testudinum* and the other for the early-successional plants (rhizophytic algae and *S. filiforme*).

In the laboratory, plant samples were stored in a refrigerator and processed within 15 days after collection. The core samples were rinsed and for each seagrass species, material was separated into below-ground roots, horizontal rhizome, vertical rhizome, sheaths, and above-ground leaf sections. The leaves were cleaned of epiphytes with a razor blade. Complete thalli of rhizophytic algae were also selected from core samples. Thalli were rinsed but attached sand grains to the rhizoids were not removed. Epiphytes were also removed with a razor blade. The plant fractions and thalli of rhizophytic algae were placed in a drying oven for at least 36 hours at 60°C until completely dry, after which their dry weight was determined on an analytical balance. Dried horizontal rhizomes and leaves for *T. testudinum* were preserved for further analysis.

For each *T. testudinum* shoot, the width of the second youngest leaf was measured at the base with a dial caliper (precision 0.02mm). Total horizontal rhizome length of *T. testudinum* per core sample was measured with a ruler.

#### *Nutrients and soluble carbohydrates analyses in late-successional seagrass species T. testudinum*

Tissue nitrogen (N) and carbon (C) were measured from 3 mg dried and ground leaves of *T. testudinum* with a carbon-nitrogen-sulphur analyser (type NA1500, Carlo Erba Thermo Fisher Scientific, USA), coupled via an interface (Finnigan Conflo III) to a mass spectrometer (Thermo Finnigan Delta Plus, USA). Total concentration of phosphorous (P) in *T. testudinum* leaves, was measured with inductively-coupled- plasma emission spectrometry (IRIS Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA), after digestion with nitric acid, following Smolders *et al.* (2006). Total soluble carbohydrates were measured in *T. testudinum* horizontal rhizomes. The sugars were extracted from ground rhizomes in ethanol at 80°C. Extracts were then evaporated until dry at room temperature, under a stream of compressed air and subsequently re-dissolved in dH<sub>2</sub>O. Samples were analyzed with a spectrophotometer using a hydrochloric acid/resorcinol assay standardized to sucrose (Huber & Israel 1982).

#### *Statistical analysis*

A one-way ANOVA was applied to analyze the effects of the different levels of grazing pressure on the percentage of organic matter content in sediments, and in the percentage of

fine sediments (0.3-0.189 mm of grain size). Nested ANOVA analyses were used to test grazing effect on phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) concentrations in pore-water samples, with pore-water samples per patch were nested within grazing level. Differences among levels were determined with a post-hoc Tukey HSD tests. To test for grazing effects on seagrass community, a two-way ANOVA was applied to the total biomass and density per species group per patch, with grazing pressure and species (group) as fixed factors. *S. filiforme* and rhizophytic algae were considered together as early-successional plants and *T. testudinum* as the late-successional species. Using a one-way ANOVA analysis, we also tested the relative contribution of early-successional species to the total density of the vegetation ( $((S. filiforme + \text{rhizophytic algae}) / (S. filiforme + \text{rhizophytic algae} + T. testudinum))$ ). To test for grazing effects on *T. testudinum*, a one-way ANOVA was applied to the percentage of nitrogen, carbon, and phosphorous concentration in leaves, and for the soluble carbohydrates in rhizomes ( $\mu\text{mol g DW}^{-1}$ ). Differences among levels were determined with a post-hoc Tukey HSD tests. Density data were log transformed prior to analysis ( $\log+1$ ), and percentages were arcsine transformed prior to analysis. All analyses were conducted using Systat 11 software. Assumptions of normality and homoscedasticity were tested through graphical analysis of the residuals. For the two-way ANOVA analysis, two outliers in *T. testudinum* total biomass data and one for early-successional species were removed after residual analysis. In the same way, four outliers in density data of the early-successional species were removed. For the one-way ANOVA analysis of the relative contribution of early-successional species to density, one outlier was removed. To test the relationship of total biomass of *T. testudinum* and pore-water ammonium concentrations, a linear regression was performed using sub-replicates of ammonium measurements within each patch and the total biomass of this species in each patch. Five outliers were removed.

## RESULTS

### *Simulated turtle grazing*

We simulated green turtle rotational grazing as closely as possible at appropriate temporal and spatial scales. Re-clipping intervals mimicked natural turtle grazing rates and size of the experimental patches corresponded with the minimal size created by green turtles in the area. The fact that turtles grazed on 4 separate occasions in our clipped patches (which were different Medium-term patches) could be indicative that the manual manipulation to copy the grazing behavior by turtles was sufficiently realistic. Visits to our experimental patches were frequent and therefore we could always establish that turtles had visited the site; their grazing and our clipping were applied with almost the same frequency, thus creating a minimal bias.

Table 2 Average values (+SE) and results of sediment analysis. One-way ANOVAs tested differences in the percentage of organic matter content and fine sediments (%) among grazing levels: No grazing (Control), Short-term, Medium-term, Long-term and Recovery. Data were arcsine transformed. Different letters represent significant pairwise comparisons among the levels.

	Control	Short-term	Medium-term	Long-term	Recovery	ANOVA Results		
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	df	F	p
Organic matter (%)	1.70 $\pm$ 0.32	1.56 $\pm$ 0.34	1.87 $\pm$ 0.33	1.52 $\pm$ 0.34	1.55 $\pm$ 0.53	4	0.25	0.905
Fine sediments (%)	54.75 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>	53.67 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>	41.5 $\pm$ 11.03 <sup>a,c</sup>	7.83 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	17.90 $\pm$ 6.27 <sup>c</sup>	4	11.2	<0.001

### *Sediment and pore-water analyses in grazing levels*

Sediment analysis showed no differences in organic matter content among grazing levels [ $F_{(4,20)} = 0.2523$   $p = 0.9049$ ; Table 2] while percentage of fine sediments were significantly lower for the Long-term and Recovery levels [ $F_{(4,20)} = 11.2993$   $p < 0.01$ ; Table 2]. Ammonium concentrations in sediment pore-water were significantly different among levels [ $F_{(4,20)} = 3.398$   $p < 0.05$ ; Table 3] Ammonium concentrations ( $\text{NH}_4^+$ ) were lowest for the Controls (mean  $\pm$  SE =  $4.6 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$ ), and highest for the Medium- and Long-term levels (mean  $\pm$  SE =  $9.2 \pm 0.8$   $\mu\text{M}$  and  $11.0 \pm 2.2$   $\mu\text{M}$ , respectively; Fig. 1). Pore-water nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) concentrations were almost below detection level and no differences among levels were found (Table 3). Sulfide concentrations varied too much within and among levels with values below the detection limit (1  $\mu\text{M}$ ) and a highest concentration of 382.5  $\mu\text{M}$ ; no statistical analyses were applied to these data.

Table 3 Nested ANOVAs used to test differences in ammonium [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], phosphate [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] and nitrate [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] concentrations (μM) from sediment pore-water as a function of the grazing levels. Grazing levels are Control (n = 18), Short-term (n = 20), Medium-term (n = 20), Long-term (n = 19) and Recovery (n = 19).

<b>Nested ANOVA results</b>					
<b>Pore-water Parameter</b>	<b>SS</b>	<b>d.f.</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Ammonium (μM)</b>					
Treatment	315.375	4	87.844	3.398	< <b>0.013</b>
Subreplicate	1691.851	20	84.593	3.273	< <b>0.001</b>
Residuals	1886.948	73	25.849		
<b>Nitrate (μM)</b>					
Treatment	0.024	4	0.006	0.264	0.900
Subreplicate	0.294	20	0.015	0.648	0.862
Residuals	1.657	73	0.023		
<b>Phosphate (μM)</b>					
Treatment	0.119	4	0.030	0.498	0.738
Subreplicate	1.558	20	0.078	0.207	0.207
Residuals	4.311	72	0.060		



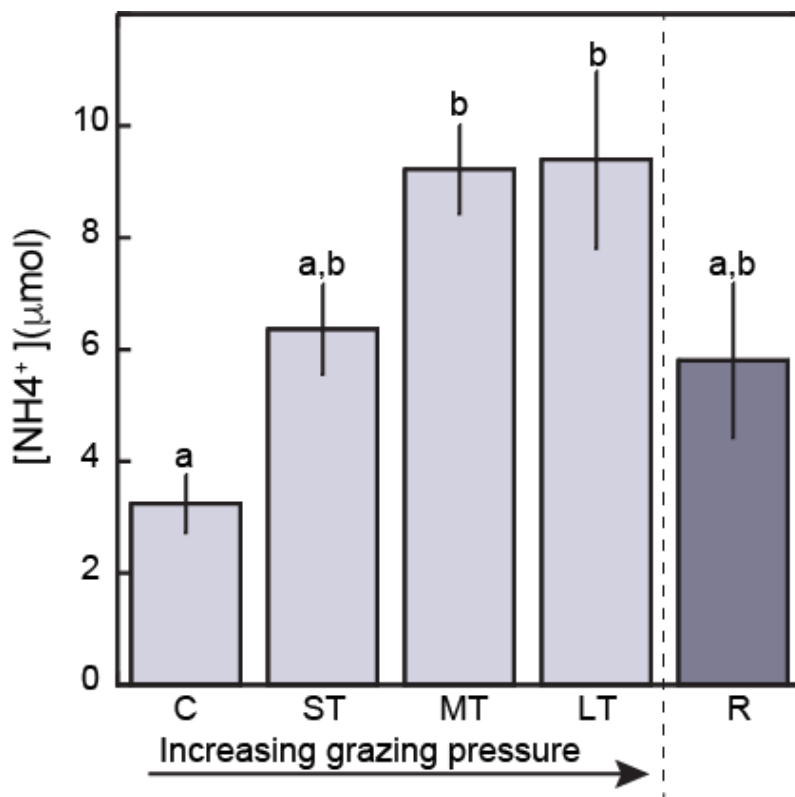


Figure 1. Bar graphs displaying mean ( $\pm$  SE) ammonium concentration in sediment pore-water as function of treatments. The grazing levels significantly affected ammonium concentration in sediment ( $p=0.013$ ), with different letters representing significant pairwise comparisons between treatments. C Control, ST Short-term, MT Medium-term, LT Long-term, R Recovery.

#### *Seagrasses and rhizophytic algae response to grazing pressure*

Responses to grazing levels of the macrophyte community were species-specific. The total biomass of *Thalassia testudinum* decreased as the grazing pressure increased; it was highest for the Controls (mean  $\pm$  SE=  $1161.5 \pm 73.6$  gr DW m<sup>-2</sup>), and lowest in the Long-term patches (mean  $\pm$  SE=  $220.1 \pm 73.4$  gr DWm<sup>-2</sup>). *T. testudinum* biomass was slightly higher after 8 months of recovery from grazing but still lower when compared with Control level (Fig. 2). Trends with grazing pressure in the total biomass of the early-successional species (*Syringodium filiforme* and rhizophytic algae) differed from those registered for the late-

successional species, *T. testudinum*. Total biomass of the early-successional plants was higher for the Medium- and Long-term levels (mean  $\pm$  SE= 40.1  $\pm$  9.5 gr DW m<sup>-2</sup> and 51.3  $\pm$  25.4 gr DW m<sup>-2</sup>, respectively) than for the Short-term level (mean  $\pm$  SE= 34.6  $\pm$  13.6 gr DW m<sup>-2</sup>), which had a decline in biomass of early-successional species in comparison with the Controls (mean  $\pm$  SE= 107.0  $\pm$  24.5 gr DW m<sup>-2</sup>). Recovery level had similar values as the Short-term level (mean  $\pm$  SE= 34.3  $\pm$  27.1 gr DW m<sup>-2</sup>) (Fig.2). Trends in density were like those of biomass (Supplementary material Table A). The two-way ANOVA analysis, testing for differences in total biomass per species group (early- and late-successional) and grazing levels resulted in a significant interaction between species group and levels [ $F_{(4,37)} = 21.2575$   $p < 0.01$ ] confirming that the trends of changes in biomass differed between the late- and early-successional species for the grazing levels. The two-way ANOVA for density showed the same results [ $F_{(4,36)} = 8.356$   $p < 0.01$ ]. When we considered the relative contribution of early-successional species to the total density of vegetation we found that the contribution of *S. filiforme* and rhizophytic algae to the total density was significantly higher in the Long-term patches in comparison with the other grazing levels (one-way ANOVA [ $F_{(4,19)} = 8.2385$   $p < 0.01$ ] Fig. 3, Supplementary material Table B). The linear regression to test the relationship between ammonium availability and *T. testudinum* total biomass showed a significant inverse relationship [ $r^2 = 0.753$   $p < 0.001$   $n = 20$ ]. Ammonium concentrations in sediment increased in relation with a decrease in *T. testudinum* total biomass (Fig. 4).

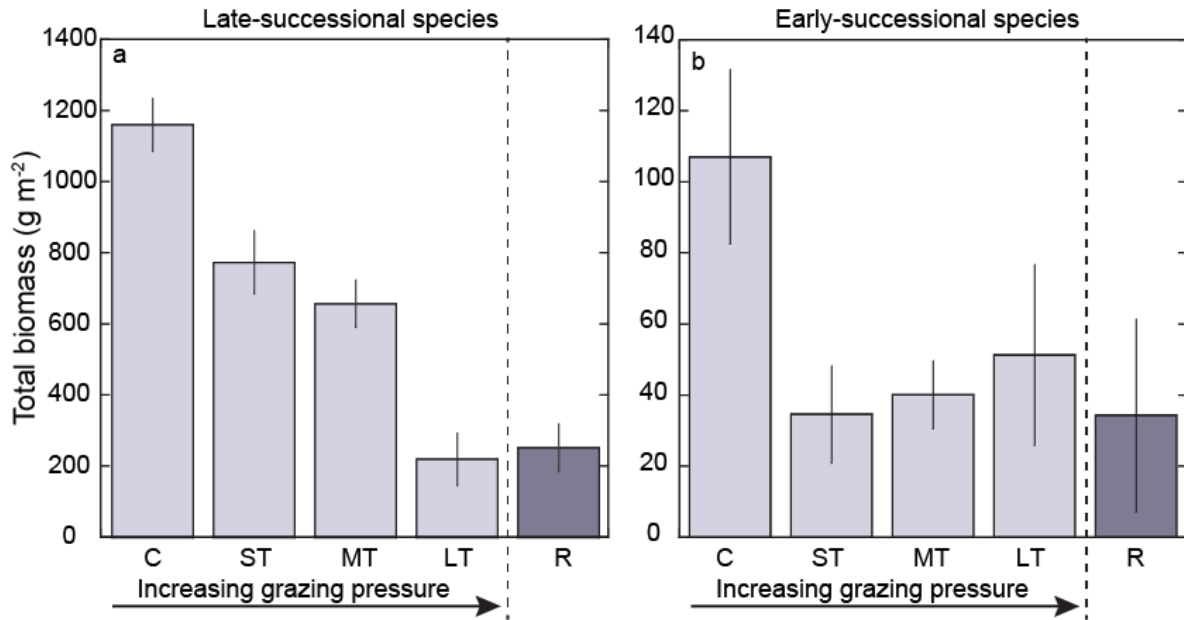


Figure 2. Bar graphs displaying mean ( $\pm$  SE) total biomass (above- and below-ground) of late-successional species *Thalassia testudinum* (a) and early-successional species (*Syringodium filiforme* and rhizophytic algae) (b), as a function of grazing levels. C Control, ST Short-term, MT Medium-term, LT Long-term, R Recovery. Note differences in Y-axis

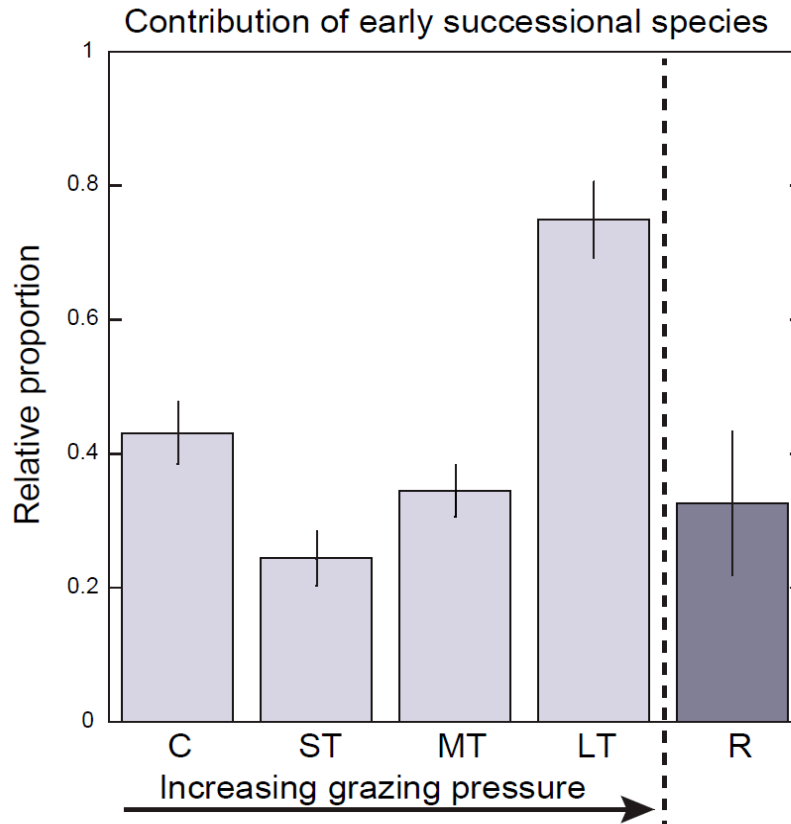


Figure 3. Bar graphs displaying mean ( $\pm$  SE) of the relative contribution of early-successional species (*Syringodium filiforme* and rhiziphytic algae) to total density as function of grazing levels. C Control, ST Short-term, MT Medium-term, LT Long-term, R Recovery.

#### *Seagrass nutrient and carbohydrate content*

Simulated grazing resulted in an increase of nitrogen (N%) in *T. testudinum* leaves. All grazing levels, including the Long-term level showed significant higher N concentrations when compared with control level [ $F_{(4,17)} = 77.020$ ,  $p < 0.01$ ]. The N concentrations in the recovery level also was significant higher compared to control level. In contrast, Carbon (C%) did not show significant differences among levels [ $F_{(4,19)} = 1.180$ ,  $p = 0.35$ ]. Consequently, the control and recovery level showed significant higher tissue C:N in *T.*

*testudinum* when compared to the grazed levels ([F(4,19)= 5.511 p< 0.01] in C:N ratio). Contrary, N:P ratio did not show significant differences among grazing levels ([F(4,19)= 1.059 p= 0.40]). Soluble carbohydrates content in *T. testudinum* horizontal rhizome had significant differences among all levels [F(4,19) = 5.511, p< 0.01]; it decreased at higher grazing pressure with a drastic decline in Long-term patches (Table 4).

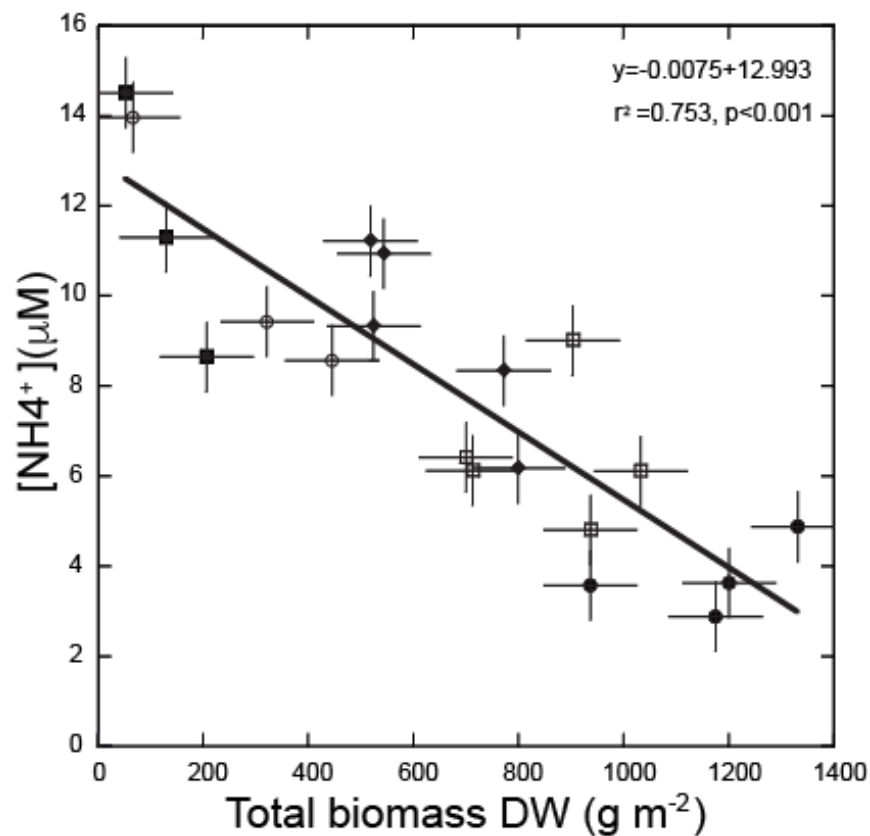


Figure 4. Relationship between ammonium concentration in pore-water of sediments and total biomass of *Thalassia testudinum*. Control (filled circles), Short-term (open squares), Medium-term (filled diamonds), Long-term (filled squares) and Recovery (open circles). Error bars  $\pm$  SE.

Table 4 Average values (+SE) and one-way ANOVA results used to test differences in *Thalassia testudinum* nitrogen, carbon and phosphorous content in leaves (%) and soluble carbohydrate reserves in rhizomes among grazing levels.

		Control	Short-term	Medium-term	Long-term	Recovery	ANOVA results		
	Sample	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	df	F	p
Leaf nitrogen (N%)	shoot	1.65 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.02 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	2.00 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.00 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	1.94 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	4	7.394	< <b>0.001</b>
Leaf carbon (C%)	shoot	34.34 $\pm$ 0.73	34.8 $\pm$ 0.69	35.69 $\pm$ 0.83	35.3 $\pm$ 0.73	36.13 $\pm$ 0.47	4	1.180	0.351
Leaf C:N ratio	shoot	20.92 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	17.3 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	16.84 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	17.63 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	18.66 $\pm$ 0.57 <sup>a,b</sup>	4	5.511	< <b>0.004</b>
Leaf N:P ratio	shoot	18.27 $\pm$ 0.79	18.79 $\pm$ 1.00	20.87 $\pm$ 1.08	19.84 $\pm$ 1.35	20.03 $\pm$ 0.93	4	1.059	0.404
Rhizome carbohydrates ( $\mu$ M g DW <sup>-1</sup> )	core	89.83 $\pm$ 14.41 <sup>a</sup>	60.6 $\pm$ 6.86 <sup>b</sup>	33.65 $\pm$ 2.66 <sup>c</sup>	9.79 $\pm$ 1.72 <sup>d</sup>	30.26 $\pm$ 4.53 <sup>e</sup>	4	77.020	< <b>0.001</b>

## DISCUSSION

Large herbivores such as green turtles may be important agents of change in ecosystems. Rotational grazing by turtles has negative effects on the above-ground community biomass and causes changes in species composition of the vegetation. We found changes in the species composition and pore-water ammonium content with increasing grazing pressure, suggesting that the continuous removal of above-ground biomass of the dominant *Thalassia testudinum*

enhances nutrient availability, which in turn drives the shift in the species composition of the vegetation (Fig. 5).

#### *Changes in *Thalassia testudinum* under a rotational grazing regime*

Simulated turtle grazing increased food quality, as nitrogen (N) content in *T. testudinum* leaves increased, which was also reported by Bjorndal (1980), Moran & Bjorndal (2007), and Molina-Hernández & van Tussenbroek (2014). Phosphorus (P) content instead did not change among grazing levels. Holzer & McGlathery (2016) studied responses of *T. testudinum* to grazing in a phosphorus limited environment in Bermuda in plots with and without artificial fertilizers; and found that the cultivation grazing response of the turtles depended on the availability of phosphorus. In carbonate sediments phosphorus (P) is often the growth-limiting nutrient of many tropical seagrasses (Fourqurean *et al.* 1995). For seagrasses, tissue N:P ratio reflects the relative availability of these elements in the environment. In *T. testudinum* leaves, a N:P ratio around 30:1 is present when there is a critical level and balance in the availability of both nutrients (Fourqurean & Zieman 2002). As the N:P ratios of this study were never higher than 21, we can assume that P was not limiting in our experiments. Molina-Hernández & van Tussenbroek (2014) found much higher N:P ratios (>34) in turtle-grazed areas within the same reef lagoon in 2011. Differences between the two study areas in terms of P availability within the lagoon maybe due to differences in location or may be attributed to the massive influx of *Sargassum* spp. in 2015, during which enormous amounts of organic matter and nutrients were imported, resulting in higher P availability, and therefore higher P concentrations in seagrass tissues

throughout the lagoon (Van Tussenbroek *et al.* 2017). Thus, N and not P was limiting to *T. testudinum* (and likely the other seagrasses), during our study.

The leaf N content was similar at all levels of grazing. The Long-term patches were previously grazed patches abandoned by the turtles. Thus, depletion of nutrient (N) content in leaves was not the reason for turtles to abandon the patches. The paradigm about N depletion in tissues as a patch abandonment cue is not supported by our data nor to those reported in previous studies (Moran & Bjorndal 2007; Fourqurean *et al.* 2010). Turtles most likely stopped grazing because not much new tissue was formed, as shoot density decreased (this study) or the leaves stopped growing as suggested by Lacey, *et al.* (2014), which was likely driven by the decline in soluble carbohydrates content (table 4, Moran & Bjorndal 2007). Robust seagrass species like *T. testudinum* have a large proportion of tissue in non-photosynthetic plant parts such as roots and rhizomes that are maintained by photosynthesis in the leaves, which are reduced due to grazing (Williams 1988; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014; Bakker *et al.* 2016). At first, the carbohydrate reserves in the rhizomes are used to maintain the metabolism of below-ground structure, but when these are depleted, below-ground tissues are lost resulting in a decrease in shoot density. Other indicators of the stress of grazing on seagrasses are reduced leaf length (direct effect of grazing) and width (most likely due to metabolic stress) as reported by Moran & Bjorndal (2005), Fourqurean *et al.* (2010), and Molina-Hernández & van Tussenbroek (2014). The widths of the leaves increased slightly in the Recovery level, but after 8 months of recovery the leaves were still narrower than those of the Control level. These data emphasize the detrimental effect of prolonged turtle grazing on the shoots of *T. testudinum*.



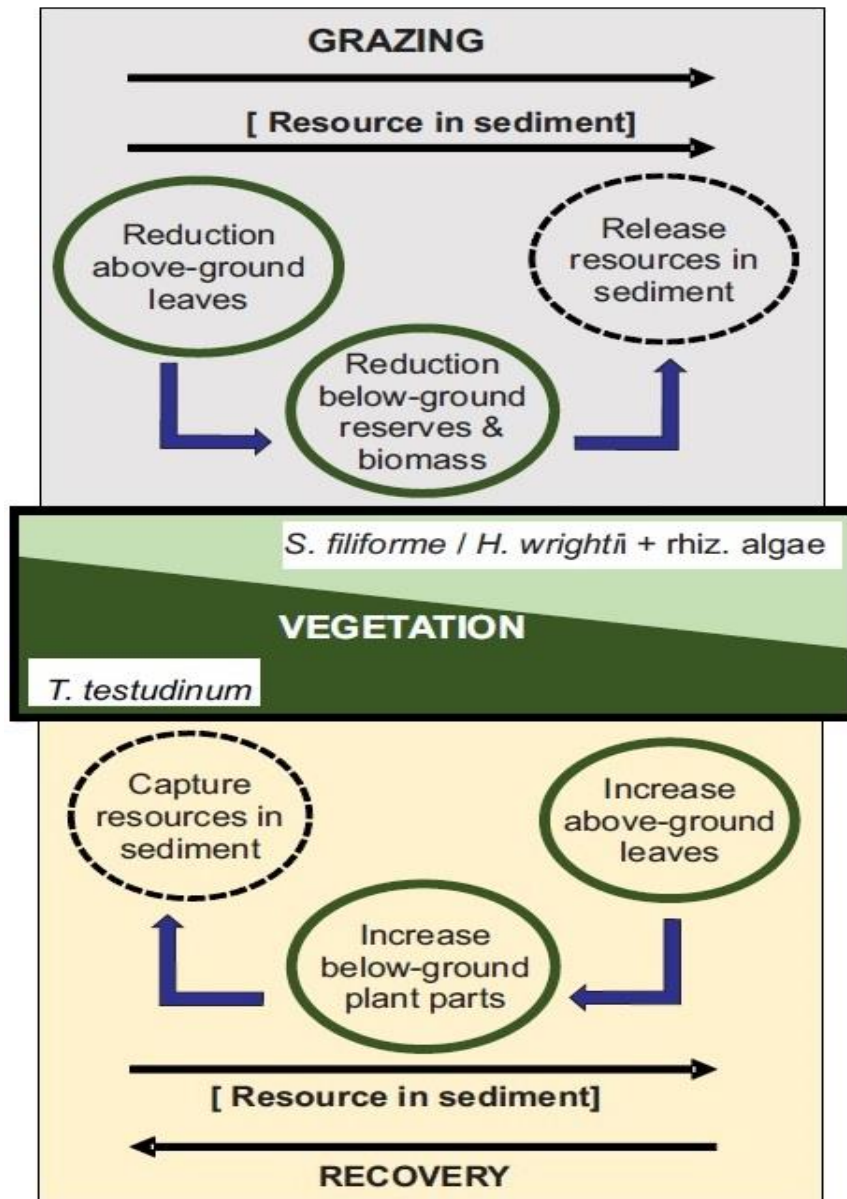


Figure 5. Shift in the species composition of a Caribbean seagrass community under a regime of rotational grazing, showing the principal processes involved in the transition from late seral state to earlier seral state during grazing and vice versa during recovery. Resource in the sediment may be N, P, Fe, depending which is limiting under the prevailing conditions. Tt *Thalassia testudinum*, Sf *Syringodium filiforme*, Hw *Halodule wrightii*, rhiz. algae rhizophytic algae.

*Does rotational grazing change nutrient availability in sediments?*

In terrestrial and marine systems, the impact of grazing on plants results from both top-down (grazing) and bottom-up effects (nutrients; De Mazancourt *et al.* 1998; Holzer & McGlathery 2016). Ammonium concentrations in pore-water sediments showed the inverse tendency to *T. testudinum* density and biomass; which decreased when grazing pressure increased. *T. testudinum* is a late-successional species that as succession progresses outcompetes early-successional species by withdrawing nutrients below the earlier seral species requirement levels (Williams, 1990). The decrease in *T. testudinum* biomass induced by grazing pressure increased ammonium availability in pore-water, likely because less ammonium was utilized by *T. testudinum*. This was supported by the inverse relationship between pore-water ammonium concentrations and *T. testudinum* total biomass.

In terrestrial systems, nutrient input from urine and feces may also alter nutrient cycling (Hobbs 1996; Bakker *et al.* 2003). However, in marine systems green turtles often defecate at their resting areas when they become active (Bjorndal 1980), and turtle feces floats, so urine and feces may not make a substantial contribution to changes in ammonium availability within sediment of grazed patches (Thayer *et al.* 1984; Moran & Bjorndal 2005; Moran & Bjorndal 2007). Changes of organic matter in sediments are also expected to influence nutrient availability. We expected that simulated grazing, especially in Long-term grazed patches, would result in decreased organic content of sediments, as turtles removed leaf material, and the short-cut grazed leaves were less likely to attenuate waves which increases trapped organic matter (Thayer *et al.* 1984; Moran & Bjorndal 2005; Christianen *et al.* 2011). However, we did not find differences in organic sediment content among the grazing levels, even though the capacity to trap fine particles was reduced in grazed levels, as indicated by

the lower proportion of fine sediments in the Long-term grazed and Recovery patches. Most likely, dying below-ground tissues build-up at increased grazing levels, contributing to organic matter in the sediments. Also, Moran & Bjorndal (2007) found no changes in organic matter content in sediments after 16 months of simulated turtle grazing, with the effects of grazing on sediments possibly being site and species-dependent.

*Can changes in the macrophyte community composition by selective turtle grazing be associated with nutrient availability?*

Rotational grazing reduced the total biomass of the macrophyte community, but the trends of change differed for early- and late-successional species, resulting in a shift in community towards faster-growing early-successional species, also reported by Molina-Hernández & van Tussenbroek (2014). While *T. testudinum* decreased with prolonging grazing pressure, early-successional species decreased in abundance at Short-term grazing pressure, remained stable during Medium-term grazing, but increased when grazing was Long-term. *S. filiforme* is an early-successional species crop occasionally and incidentally by green turtles. Our Short-term grazing level showed a decrease in *S. filiforme* biomass, probably due to its thinner rhizomes and less carbohydrate reserves to compensate the losses of photosynthetic tissue (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014), but they can also occupy open spaces and utilize available resources faster than *T. testudinum* because they have higher rhizome elongation rates (Williams 1987, Marba & Duarte 1998). Grazing has been shown to disrupt competitive hierarchies (Anderson & Briske 1995), by compromising a species ability to cope with its competitors or by facilitating growth potentials of otherwise subdominant plant species. Changes in seagrass dominance in relation with mega herbivore grazing in tropical

seagrasses have been reported before (Lal *et al.* 2010; Liebvre *et al.* 2017). Liebvre *et al.* 2017 reported that exclusion cages established in a manatee grazing area led a mixed seagrass community of *S. filiforme* and *H. wrightii* (both important in manatee diets) to shift to a dominant *S. filiforme* seagrass bed. They suggested higher rates of production, lateral branching and space occupation improved the competitive superiority of *S. filiforme* over that of *H. wrightii* for acquisition of nutrients, occupation of space, and anchorage in sediments. Our study showed that when *T. testudinum* declined at higher grazing pressure, ammonia concentrations in sediments increased. Therefore, this nutrient increase likely contributed to the competitive balance in favor to *S. filiforme* and rhizophytic algae. This process is reversed during recovery (Fig. 5).

### *Implications*

Large herbivores like green turtles can have significant impacts as ecosystem engineers. Rotational grazing by turtles alters plant productivity and habitat structure (Moran & Bjorndal 2005; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). However, on a landscape-scale, it increases species and structural diversity (Molina Hernández & van Tussenbroek 2014), by creating gaps allowing for the colonization of early-successional species like *S. filiforme*, *H. wrightii* and rhizophytic algae. Changes in morphology and species richness of seagrasses have been related with changes in the abundance and diversity of their associated fauna (Ray *et al.* 2014); and whether this applies to meadows under a rotational-grazing regime merits further investigation.

When turtles reach a density beyond the carrying capacity for turtle grass recovery (represented by our Long-term grazing level), they drive species replacement of a whole seagrass bed towards a higher dominance of faster-growing and early successional seagrass (Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014), inducing a pattern shift through meadows in lower successional stages (Kelkar *et al.* 2013) or cause complete loss of the meadow (Fourqurean *et al.* 2010). Herbivorous sea turtles may act as switches controlling transitions between alternative ecosystem states as they can affect the susceptibility of the ecosystem to abiotic disturbances, like ungulates in terrestrial systems. Ungulates may provide a switch between a fire-prone or a fire-resistant ecosystem, which also depends on environmental factors controlling primary productivity (Hobbs 1996). Turtle grazing is also increasing as a consequence of successful conservation of green turtles and the absence of top predators like sharks (Fourqurean *et al.* 2010; Christianen *et al.* 2014; Heithaus *et al.* 2014; Molina-Hernández & van Tussenbroek 2014). These trends could significantly impact seagrass meadows, and consequences of reduction or loss of *T. testudinum* maybe synergistic with other disturbances (van Tussenbroek *et al.* 2014). For example, *T. testudinum* is a deeply rooted species with a well-developed below-ground rhizome-root system and resists hurricanes better than faster-growing seagrass species with less below-ground biomass (Cruz-Palacios & van Tussenbroek 2005). Reduction of *T. testudinum* by grazing may thus enhance the vulnerability of the total seagrass bed to hurricanes.

Our study shows that turtle grazing influences nutrient cycling, likely by reducing the abundance of the dominant competitor for nutrients in the sediments, thereby allowing for an increase in abundance of faster-growing species that take advantage of the newly available resources (Fig. 5). Eutrophication, now widespread in the Caribbean, has similar

consequences for seagrass plant communities (van Tussenbroek *et al.* 2014). Turtle grazing herbivory may potentially threaten stability of meadows throughout the Caribbean; especially in synergy with other human-induced or natural stressors like eutrophication and hurricanes. Christianen *et al.* (2018) provided evidence of green turtle grazing as a main factor contributing to invasion of the non-native seagrass species *Halophila stipulacea* in the Caribbean.

## CONCLUSIONS

Rotational grazing by turtles has negative effects on the above-ground community biomass and causes changes in species composition of the vegetation. Our study showed that when *Thalassia testudinum* biomass declined at higher grazing pressure, ammonium concentrations in the pore-water sediment increased, suggesting that the continuous removal of above-ground biomass of the dominant *T. testudinum* enhances nutrient availability in sediment. We found that even simulated grazing of all species (*Syringodium filiforme* and rhiziphytic algae) without preference, can still lead to changes in competitive hierarchy and therefore species composition. Therefore, green turtles may be important agents of change in ecosystems. When turtles reach a density beyond the carrying capacity for turtle grass recovery, they may drive species replacement of a whole seagrass bed inducing a pattern shift through meadows in lower successional stages or may cause the complete loss of a meadow. In this way, herbivorous sea turtles act as switches controlling transitions between alternative ecosystem states as they can affect the susceptibility of the ecosystem to abiotic disturbances, like ungulates in terrestrial systems. To establish better conservation strategies, it is necessary to continue studying the interactions between turtle grazing and seagrasses, including the

implications of seagrass community shifts due to turtle grazing to the stability and maintenance of ecosystem services of the seagrass meadows.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Guadalupe Barba Santos, Hazel M. Canizales Flores, Luuk Leemans, Nancy E. Burgos Veneroso supported this study in the field. The Academic Service of Meteorological and Oceanographic Monitoring (SAMMO) provided meteorological data. Useful comments and input during development of this manuscript from Darren Brown are acknowledged. The first author acknowledges The Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for providing PhD fellowship support.

## REFERENCES

- Anderson VJ, DD Briske. 1995. Herbivore-induced species replacement in grasslands: Is it driven by herbivory tolerance or avoidance? *Ecological Applications*. 5 (4): 1014-1024.
- Augustine DJ, SJ McNaughton. 1998. Ungulate effects on the functional species composition of plant communities: herbivore selectivity and plant tolerance. *Journal of Wildlife Management*. 62 (4): 1165-1183.
- Bakker C, JM Blair, AK Knapp. 2003. Does resource availability, resource heterogeneity or species turnover mediate changes in plant species richness in grazed grasslands? *Oecologia*. 137: 385-391.
- Bakker ES, JF Pagès R Arthur, T Alcoverro. 2016. Assessing the role of large herbivores in the structuring and functioning of freshwater and marine angiosperm ecosystems. *Ecography*: 39:162-179.
- Ballorain K. 2010. Ecologie trophique de la tortue verte *Chelonia mydas* dans les herbiers marins et algues du sud-ouest de l'océan Indien. Ph Thesis. Université de la Réunion. 286 pp.
- Bjorndal KA. 1980. Nutrition and grazing behavior of the green turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*. 56: 147-154.
- Borer E, EW Seabloom, DS Gruner, WS Harpole, H Hillebrand, EM Lind, PB Adler, J Alberti, TM Anderson, JD Bakker, L Biederman, D Blumenthal, CS Brown, LA Brudvig, YM Buckley, M Cadotte, C Chu, EE Cleland, MJ Crawley, P Daleo, EI

- Damschen, KF Davies, NM DeCrappeo, G Du, J Firn, Y Hautier, RW Heckman, A Hector, JHR Lambers, O Iribarne, JA Klein, JMH Knops, KJ La Pierre, ADB Leakey, W Li, AS MacDougall, RL McCulley, BA Melbourne, CE Mitchell, JL Moore, B Mortensen, LR O'Halloran, JL Orrock, J Pascual, SM Prober, DA Pyke, AC Risch, M Schuetz, MD Smith, CJ Stevens, LL Sullivan, RJ Williams, PD Wragg, JP Wright, LH Yang. 2014. Herbivores and nutrients control grassland plant diversity via light limitation. *Nature*. 508: 517.
- Bowes MA. 1993. Influence of herbivorous mammals on an old-field plant community: Years 1-4 after disturbance. *Oikos*. 67 (1): 129-141.
- Christianen MJ, LL Govers, TJ Bouma, W Kiswara, JGM Roelofs, LPM Lamers, MM van Katwijk. 2011. Marine megaherbivore grazing may increase seagrass tolerance to high nutrient loads. *Journal of Ecology*. 100(2): 546-560.
- Christianen, MJ, PMJ Herman, TJ Bouma, LPM Lamers, MM van Katwijk, T van der Heide, PJ Mumby, BR Silliman, SL Engelhard, M van der Kerk, W Kiswara, J van de Koppel. 2014. Habitat collapse due to overgrazing threatens turtle conservation in marine protected areas. *Proceedings of the Royal Society B*. 281: 20132890.
- Christianen MJ, FOH Smulders, MS Engel, MI Nava, S Willis, AO Debrot, PJ Palsbøll, JA Vonk, LE Becking. 2018. Megaherbivores may impact expansion of invasive seagrass in the Caribbean. *Journal of Ecology*. 1-13.
- Cruz-Palacios V, BI van Tussenbroek. 2005. Simulation of hurricane-like disturbances on a Caribbean seagrass bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 324: 44-60.
- Davis, BC, JW Fourqurean. 2001. Competition between the tropical alga, *Halimeda incrassata*, and the seagrass, *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*. 71: 217-232.
- De Mazancourt, C, M Loreau, L Abbadie. 1998. Grazing optimization and nutrient cycling: when do herbivores enhance plant production? *Ecology*. 79: 2242-2252.
- Enríquez S, NI Pantoja-Reyes. 2005. Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia*. 145: 235-243.
- Ferdie M, JW Fourqurean. 2004. Responses of seagrass communities to fertilization along a gradient of relative availability of nitrogen and phosphorus in a carbonate environment. *Limnology and Oceanography*. 49 (6): 2082-2094.
- Fourqurean JW, GVN Powell, WJ Kenworthy, JC Zieman. 1995. The effects of long-term manipulation of nutrient supply on competition between the seagrasses *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii* in Florida Bay. *Oikos*. 72: 349-358.
- Fourqurean JW, J Zieman. 2002. Nutrient content of the seagrass *Thalassia testudinum* reveals regional patterns of relative availability of nitrogen and phosphorus in the Florida Keys USA. *Biogeochemistry*. 61: 229-245.
- Fourqurean JW, S Manuel, KA Coates, WJ Kenworthy, SR Smith. 2010. Effects of excluding sea turtle herbivores from seagrass bed: Overgrazing may have led to loss of seagrass meadows in Bermuda. *Marine Ecology Progress Series*. 419: 223-232.
- Heithaus MR, T Alcoverro, R Arthur, DA Burkholder, KA Coates, MJA Christianen, N Kelkar, SA Manuel, AJ Wirsing, WJ Kenworthy, JW Fourqurean,. 2014. Seagrasses in the age of sea turtle conservation and shark overfishing. *Frontiers in Marine Science*. 1 (28): 1-6.
- Hobbs T. 1996. Modification of ecosystems by ungulates. *The Journal of Wildlife Management*. 60 (4): 695-713.



- Holzer KK, KJ McGlathery. 2016. Cultivation grazing response in seagrass may depend on phosphorus availability. *Marine Biology*. 163: 88.
- Huber SC, DW Israel. 1982. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr.) leaves. *Plant Physiology*. 69: 691-696.
- Hughes AR, KJ Bando, LF Rodriguez, SL Williams. 2004. Relative effects of grazers and nutrients on seagrasses: a meta-analysis approach. *Marine Ecology Series*. 282: 87-99.
- Instituto Nacional de Ecología INE. 2000. Programa de manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. México. Dirección Ejecutiva de Participación Social, Enlace y Comunicación. 244 pp.
- Jackson JBC. 1997. Reefs since Columbus. *Coral Reefs*. 16 Suppl: S23-S32. DOI:10.1007/s003380050238
- Jackson JBC. 2001. What was natural in the coastal oceans? *PNAS*. 98 (10): 5411-5418. DOI:10.1073/pnas.091092898
- Kaladharan P, KP Saidkoya, VA Kunhikoya, A Anasukoya. 2013. Turtle herbivory of seagrass ecosystems in the Lakshadweep atolls: concerns and need for conservation measures. *Journal of the Marine Biological Association of India*. 55 (1): 25-29.
- Kelkar N, R Arthur, N Marbà, T Alcoverro. 2013. Greener pastures? High-density feeding aggregations of green turtles precipitate species shifts in seagrass meadows. *Journal of Ecology*. 101: 1158-1168.
- Lacey EA, L Collado-Vides, JW Fourqurean. 2014. Morphological and physiological responses of seagrasses (Alismatales) to grazers (Testudines: Cheloniidae) and the role of these responses as grazing patch abandonment cues. *Revista Biología Tropical*. 62 (4): 1535-1548.
- Lal A, R Arthur, N Marbà, AWT Lill, T Alcoverro. 2010. Implications of conserving an ecosystem modifier: Increasing green turtle (*Chelonia mydas*) densities substantially alters seagrass meadows. *Biological Conservation*. 143: 2730-2738.
- Lamers LPM, HBM Tomassen, JGM Roelofs. 1998. Sulfate-induced eutrophication and phytotoxicity in freshwater wetlands. *Environmental Science and Technology*. 32: 199-205.
- Lee K, SR Park, YKKim. 2007. Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: A review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 350: 144-175.
- Leieuvre LW, JA Provancha, D. H. Slone & W. J. Kenworthy. 2017. Manatee grazing impacts on a mixed species seagrass bed. *Marine Ecology Progress Series*. 564:29-45
- Leoni V, A Vela, V Pasqualini, C Pergent-Martini, G Pergent. 2008. Effects of experimental reduction of light and nutrient enrichment (N and P) on seagrasses: a review. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 18: 202-220.
- Marbà N, CM Duarte. 1998. Rhizome elongation and seagrass clonal growth. *Marine Ecology Progress Series*. 174: 269-280.
- McNaughton SJ, FF Banyikwa, MM McNaughton. 1997. Promotion of the cycling of diet-enhancing nutrients by African grazers. *Science*. 278 (5344): 1798-1800.
- Molina-Hernández AL, BI van Tussenbroek. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea-turtles. *Marine Ecology Progress Series*. 517:143-157.

- Moran KL, KA Bjorndal. 2005. Simulated green turtle grazing affects structure and productivity of seagrass pastures. *Marine Ecology Progress Series*. 305: 235-247.
- Moran KL, KA Bjorndal. 2007. Simulated green turtle grazing affects nutrient composition of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Marine Biology*. 150: 1083-1092.
- Olf H, ME Ritchie. 1998. Effects of herbivores on grassland plant diversity. *Trends in Ecology and Evolution*. 13 (7): 261-265.
- Ralph, PJ, MJ Durako, S Enríquez, CJ Collier, MA Doblin. 2007. Impact of light limitation on seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 350: 176-193.
- Ray BR, MW Johnson, K Cammarata, DL Smee. 2014. Changes in seagrass species composition in Northwestern Gulf of Mexico estuaries: Effects on associated seagrass fauna. *PLoS ONE*. 9 (9): e10.
- Rodríguez-Martínez RE, F Ruíz-Rentería, B van Tussenbroek, G Barba-Santos, E Escalante-Mancera, G Jordán-Garza, E Jordán-Dahlgren. 2010. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 58(3): 23-43.
- Smolders AJP, M Moonen, K Zwaga, E Lucassen, LPM Lamers, JGM Roelofs. 2006. Changes in pore water chemistry of desiccating freshwater sediments with different Sulphur contents. *Geoderma*. 132: 372-383.
- Thayer GW, KA Bjorndal, JC Ogden, SL Williams, JC Zieman. 1984. Role of larger herbivores in seagrass communities. *Estuaries*. 7: 351-376.
- Touchette BW, JM Burkholder. 2000. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrass. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 250: 133-167.
- Valentine JF, JE Duffy. 2006. The central role of grazing in seagrass ecology. En: Larkum, AWD, Orth, RJ, Duarte CM (Eds.). *Seagrasses: Biology, ecology and conservation* (pp. 463-501). The Netherlands: Springer.
- van Tussenbroek, BI. 2011. Dynamics of seagrasses and associated algae in coral reef lagoons. *Hidrobiológica*. 21(3): 293-310.
- van Tussenbroek BI, J Cortés, R Collin, AC Fonseca, PMH Gayle, HM Guzman, GE Jácome, R Juman, KH Koltés, HA Oxenford, A Rodríguez-Ramirez, J Samper-Villarreal, SR Smith, JJ Tschirky, E Weil. 2014. Caribbean-wide, long-term study of seagrass beds reveals local variations, shifts in community structure and occasional collapse. *PlosOne* March 3rd 2014.
- van Tussenbroek BI, HA Hernández Arana, RE Rodríguez-Martínez, J Espinoza Avalos, HM Canizales-Flores, CE González-Godoy, MG Barba-Santos, A Vega-Zepeda, L Collado-Vides. 2017. Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin* 122: 272-281.
- Williams SL. 1987. Competition between the seagrasses *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme* in a Caribbean lagoon. *Marine Ecology Progress Series*. 35: 91-98.
- Williams SL. 1988. *Thalassia testudinum* productivity and grazing by green turtles in a highly disturbed seagrass bed. *Marine Biology*. 98: 447-455.
- Williams SL. 1990. Experimental studies of Caribbean seagrass bed development. *Ecological Monographs*. 60 (4): 449-469.
- Zieman JC, RL Iverson, JC Ogden. 1984. Herbivory effects on *Thalassia testudinum* leaf growth and nitrogen content. *Marine Ecology Progress Series*. 15: 151-158.

## Capítulo 2: Tasa de recuperación después del forrajeo por “rotational grazing”

### RESUMEN

En el Caribe, la tortuga verde tiene una estrategia de alimentación conocida como “rotational grazing”, que origina parcelas con diferentes grados de presión de ramoneo en praderas dominadas por el pasto marino *Thalassia testudinum*. Estas parcelas pueden ser ramoneadas hasta por dos años, y luego son abandonadas por las tortugas. Se estudió la recuperación de parcelas recién abandonadas, comparando a lo largo del tiempo (julio de 2012 hasta agosto de 2015) sus características con sitios de referencia (controles; pradera sin ramoneo) para determinar los tiempos requeridas para una recuperación a condiciones pre-herbivoría. Para evitar el ramoneo de las tortugas en estas parcelas, se colocaron jaulas de exclusión de tortugas. Después de tres años, las praderas abandonadas continuaron siendo diferentes en su composición específica, con respecto a la de los controles. Los índices del pasto *T. testudinum* a nivel de pradera (productividad e IAF) se recuperaron hasta condiciones pre-herbivoría. Sin embargo, las dimensiones de los haces foliares de *T. testudinum* de las parcelas abandonadas continuaron siendo más pequeño que las de los controles al cabo de tres años. Así mismo, la tasa de elongación foliar por haz aumentó a lo largo del tiempo en las parcelas abandonadas, pero no alcanzó la tasa de las parcelas control después de los tres años de observación. Se concluye que los efectos de “rotational grazing” fueron reversibles, pero

las parcelas ramoneadas tardaron  $\geq 3$  años para recuperarse. Este trabajo permite inferir que praderas con las condiciones del presente estudio puede soportar el ramoneo bajo el régimen de “*rotational grazing*”, cuando solo aproximadamente un 25% de su área es mantenido con herbivoría constante. Esta información podrá ser cada vez más necesaria considerando el incremento poblacional de las tortugas verdes en las últimas décadas.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de pastos marinos son altamente productivos y dan sustento a una gran diversidad de herbívoros, desde pequeños organismos como anfípodos e isópodos (mesoherbívoros; Zimmerman *et al.* 1979), macrofauna como erizos (Eklöf *et al.* 2008) y peces (Lobel y Ogden 1981), hasta grandes animales como las tortugas verdes, manatíes y dugongos (megaherbívoros; Aragonés *et al.* 2006). La actividad de todos estos herbívoros sobre la regulación del ecosistema se conoce como efecto “*top-down*” (Eklöf *et al.* 2008) y puede afectar la producción de las plantas (Valentine *et al.* 1997; Moran y Bjorndal 2005), la estructura del dosel (Lal *et al.* 2010), la diversidad de especies (Molina-Hernández y van Tussenbroek) y los flujos de materia orgánica y nutrientes (Thayer *et al.* 1984; Christianen *et al.* 2022).

De los megaherbívoros, las tortugas verdes son las únicas que en su vida adulta se alimentan casi exclusivamente de pastos marinos y algas. En el Caribe, las tortugas verdes se alimentan utilizando una estrategia de alimentación selectiva llamada “*rotational grazing*” o “*cultivation grazing*” en áreas donde las praderas marinas son extensas. Esta estrategia consiste en que las tortugas mantienen con ramoneo constante parcelas de pasto *Thalassia testudinum*; al concentrarse en áreas con alta biomasa digerible (hojas jóvenes), las tortugas maximizan su consumo (Moran y Bjorndal 2007; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Gulick *et al.* 2022). La estrategia de alimentación por “*rotational grazing*” da origen a la creación, mantenimiento y abandono de parcelas de ramoneo. Las parcelas pueden ser mantenidas (i.e., ramoneadas regularmente) entre 13 meses hasta más de dos años en el área de estudio en el Caribe mexicano. Una vez que la parcela no aporta ya la cantidad suficiente de alimento al disminuir su producción de hojas, las parcelas son abandonadas y nuevas son

abiertas (Lacey *et al.* 2014). La presencia de estas parcelas de ramoneo en una pradera, aumenta la heterogeneidad a nivel de paisaje, con parcelas en distintos momentos de su desarrollo (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014).

La respuesta de los pastos marinos a la herbivoría depende de sus características, y de otros factores como el ambiente, la porción de hoja que es removida, la intensidad y frecuencia de ramoneo, y del comportamiento del herbívoro (Moran y Bjorndal 2005). La alimentación por “*rotational grazing*” al ser selectiva sobre *T. testudinum*, disminuye su biomasa y modifica sus características morfológicas como la longitud y el ancho de sus hojas (Moran y Bjorndal 2005; Lacey *et al.* 2014), además, a nivel de pradera, modifica la composición de especies (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014, Martínez-López *et al.* 2019).

Se ha reportado que al inhibir la herbivoría por tortugas, *T. testudinum* muestra signos de recuperación. Sin embargo, aún se desconoce el tiempo necesario para que los pastos se recuperen por completo (Fourqurean *et al.* 2010; Samper-Villareal *et al.* 2022). En una pradera donde las tortugas utilizan “*rotational grazing*” como estrategia de alimentación, Molina-Hernández y van Tussenbroek (2014) observaron una recuperación parcial después de un año de observaciones en parcelas abandonadas por las tortugas naturalmente.

A pesar del aumento continuo de literatura sobre los efectos de la herbivoría de tortugas sobre los pastos marinos y los servicios ecosistémicos que estos proveen, aún son escasos los estudios que incluyan el monitoreo a largo plazo del desarrollo de las comunidades de pastos una vez que la herbivoría por tortugas cesa o se inhibe. La mayoría de los estudios presentes, como los antes mencionados, no extienden la evaluación más allá de 13 meses, lo que llama al cuestionamiento sobre la duración del proceso de recuperación de las praderas de pastos marinos hasta las condiciones de pre-herbivoría. Conocer este tipo de información permitirá afinar los esfuerzos para establecer capacidades de carga de una pradera utilizada como sitio

de alimentación por las tortugas, para así desarrollar mejores estrategias de manejo y conservación de estos ecosistemas.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el proceso de recuperación de parcelas creadas por las tortugas verdes a través del forrajeo por “*rotational grazing*”. Se utilizaron jaulas de exclusión de tortugas que fueron colocadas en parcelas abandonadas y previamente ramoneadas por las tortugas por al menos un año. Se realizaron mediciones de la condición de los pastos marinos para determinar el tiempo necesario para una recuperación hasta una condición de pre-herbivoría, teniendo zonas sin herbivoría por el al menos el mismo periodo de tiempo como referencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

El sitio de estudio se localiza en la parte sur de la laguna arrecifal de Puerto Morelos (20° 50' 27.2'' N, 86° 52' 26.1'' W) en el Caribe mexicano (Figura 1). La profundidad en del área de estudio es entre 1-3.8 m, y se caracteriza por tener sedimento calcáreo estabilizado por praderas de pastos marinos dominados por la especie *Thalassia testudinum*, acompañada de *Syringodium filiforme* y/o *Halodule wrightii*, así como de algas rizofíticas (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). Este sitio es frecuentado por la tortuga verde *Chelonia mydas* (tortuga de aquí en adelante) desde cuando menos 2010 (van Tussenbroek datos sin publicar). Los patrones de rotación de parcelas ramoneadas y abandonadas por las tortugas fueron descritos por Molina-Hernández y van Tussenbroek (2014) para este sitio. Estos autores describieron a las parcelas ramoneadas como áreas de la pradera (5-11 m de longitud y con ancho variable) donde las hojas de *T. testudinum* están cortadas de manera casi homogénea a ~3 cm de longitud, con bordes claramente definidos que las distinguen del resto

de la pradera de pastos con hojas intactas y largas. Estas parcelas pueden ser mantenidas por el ramoneo constante de las tortugas por periodos de hasta dos años, hasta que son abandonadas y nuevas son abiertas. Las parcelas abandonadas presentan haces de *T. testudinum* más escasas, con hojas más delgadas y cortas en comparación con pasto sin herbivoría (algunas en las que el ápice redondeado por mordidas antiguas está ausente).

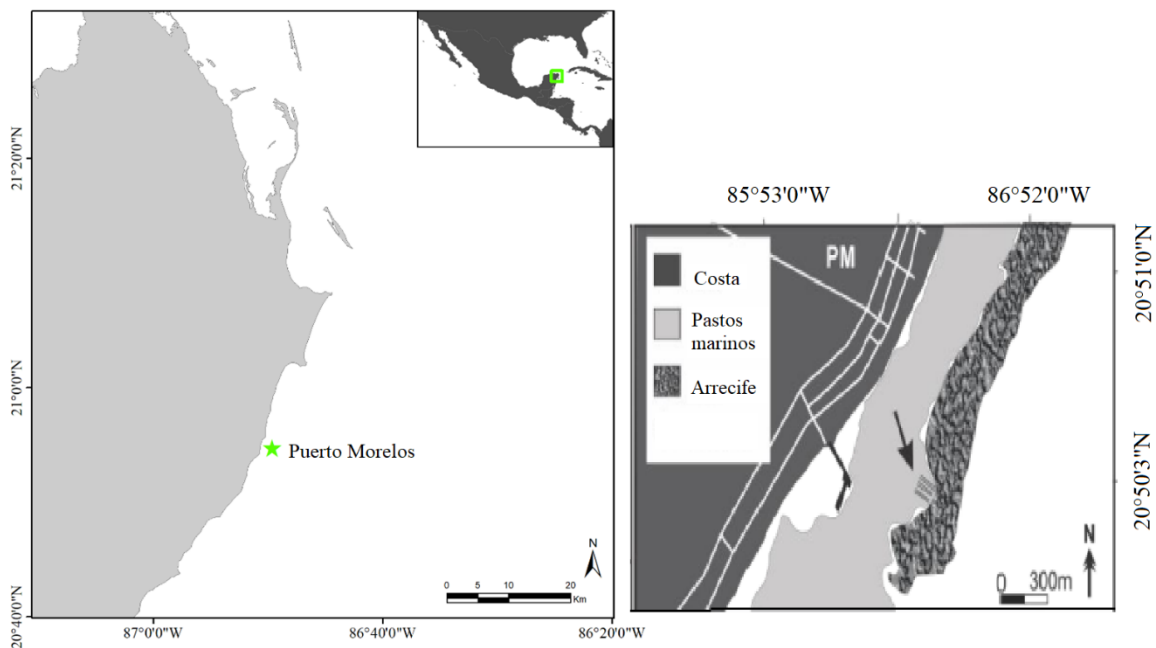


Figura 1. Zona de alimentación de las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) y sitio de estudio ubicado al sur de la laguna arrecifal de Puerto Morelos en el Caribe Mexicano. Mapa modificado de Molina-Hernández y van Tussenbroek (2014).



### *Diseño experimental*

El sitio de estudio fue visitado a intervalos de dos a tres meses desde junio de 2011, permitiendo el registro del historial de ramoneo en las parcelas creadas por las tortugas. En julio de 2012, se seleccionaron tres parcelas ramoneadas al menos desde el inicio de las visitas al sitio, y que fueron abandonadas recientemente de manera natural. Además, fueron seleccionadas y delimitadas áreas adyacentes a cada parcela, pero sin ramoneo por el mismo periodo de tiempo (i.e., pradera bien desarrollada desde junio de 2011). Estas parcelas fueron usadas como referencia para determinar una recuperación hasta condiciones pre-herbivoría (Figura 2). El tratamiento R (recuperación, Figura 3a y b) consistió en una jaula de exclusión de tortugas de 170 x 170 x 60 cm colocada sobre una parcela recién abandonada. Las jaulas fueron construidas con varillas de acero de ½ pulgada y una malla de acero con apertura de 20 cm en las cinco caras de la jaula, la cual permite el acceso a pequeños peces y otros animales de menor tamaño, pero evita el acceso a las tortugas. La altura de la jaula excedía la altura del dosel de la pradera adyacente bien desarrollada, evitando interferir con el crecimiento de los pastos y asegurando que las hojas siempre estuvieran protegidas del ramoneo por tortugas. El tratamiento CP (control de procedimiento; Figura 3d) consistió en la colocación de una jaula de exclusión en la pradera adyacente bien desarrollada y se implementó con la finalidad de determinar un posible efecto de las jaulas sobre la recuperación de los pastos marinos. El tratamiento C (control, Figura 3c) fue un área del mismo tamaño que la jaula en la pradera adyacente delimitado por cuatro varillas de acero de ½ pulgada en cada esquina. Asimismo, para evitar la translocación de nutrientes de haces ubicados fuera de las parcelas hacia el interior, se cortaron los rizomas a 30 cm de profundidad en todo el perímetro de los tratamientos.

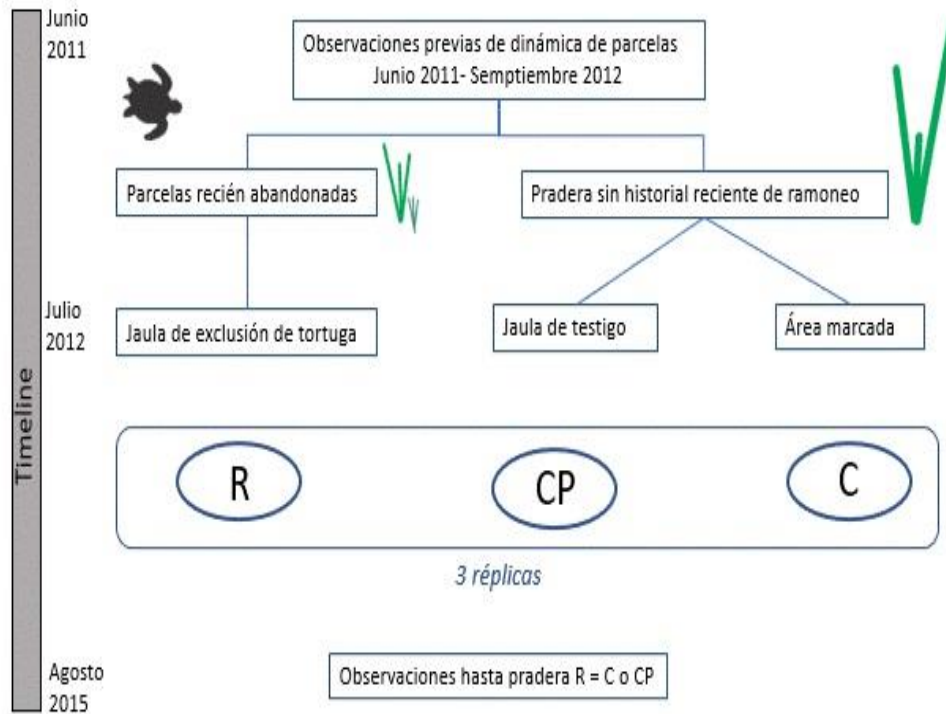


Figura 2. Esquema del diseño experimental para estudiar la recuperación de pastos marinos bajo la estrategia de alimentación por rotación de parcelas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos.

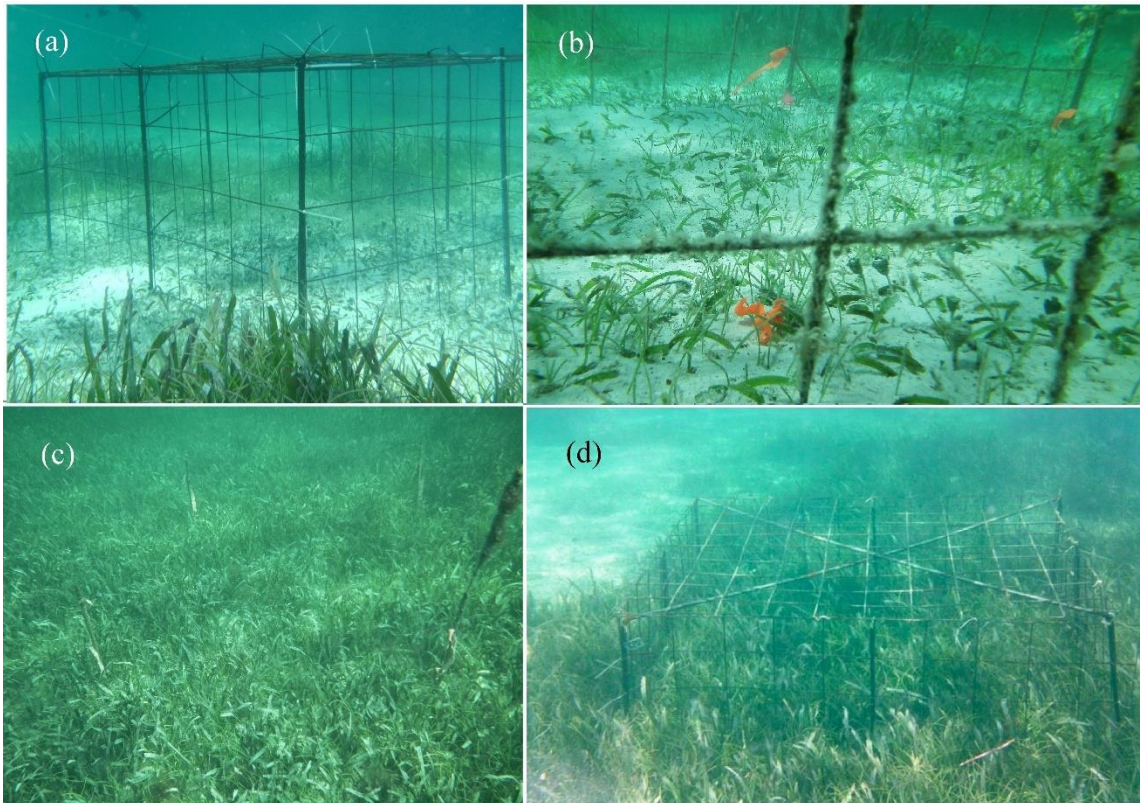


Figura 3. Fotografías en campo de los tratamientos experimentales: (a y b) Tratamiento de recuperación **R** (jaula de exclusión sobre parcela abandonada por tortugas verdes), se distingue por presentar hojas de *Thalassia testudinum* delgadas y con longitud mayor a 3 cm, que indica que las tortugas han dejado de ramonear en las parcelas, (c) tratamiento control **C** en pradera sin historial reciente de ramoneo (d) y tratamiento control de procedimiento **CP** jaula de exclusión sobre pradera con las mismas características que el tratamiento control (d).

#### *Recuperación de la comunidad vegetativa*

Para evaluar el desarrollo de la comunidad vegetativa, visualmente se determinó la cobertura (escala de Braun-Blanquet, Tabla 1; Wikum Shanholtzer 1978; van der Maarel 2007) de las especies de pasto marino y el grupo de algas rizofíticas (*Halimeda* spp. *Penicillus* spp., *Rhipocephalus* spp., *Udotea* spp.) en las parcelas cada dos a cuatro meses, de julio de 2012 a agosto de 2015. Al mismo tiempo, se realizó un registro fotográfico de la comunidad en

cada parcela y las jaulas fueron limpiadas con un cepillo para remover organismos incrustantes (principalmente algas e hidrozoarios).

Tabla 1. Equivalencia de la escala Braun-Blanquet a cobertura (%) basada en el promedio del rango del valor o categoría de Braun-Blanquet. Un individuo es un haz foliar de un pasto marino o un talo de un alga rizofíticas.

Valor	Escala Braun-Blanquet	Valor medio (%)
R	Escaso: uno o dos individuos o cobertura 0.1	0.02
+	Pocos individuos o cobertura de 0.5%	0.1
1	Varios individuos o cobertura de < de 5%	2.5
2	Muchos individuos o cobertura entre 5 y 25 %	15
3	Cobertura entre el 26-50%	37.5
4	Cobertura entre 51-75 %	62.7
5	Cobertura entre 76-100%	87.5

#### *Recuperación de Thalassia testudinum*

Cada dos a cuatro meses, se colocaron dos cuadrantes de 20 x 10 cm en cada parcela. A la altura del cuadrante (2-3 cm arriba del sustrato), se marcaron las hojas de *T. testudinum* con perforaciones hechas con aguja hipodérmica. Después de 8-9 días, se realizó el mismo procedimiento aplicando una segunda marca, y los haces marcados fueron colectados cortando la vaina abajo en sustrato con un cuchillo. En el laboratorio, se removieron los

epifitos de las hojas raspándolas con una navaja. Se contaron los haces foliares en los cuadrantes. Por haz foliar, se cortaron las hojas a la altura de la segunda marca, y de cada hoja se midió su ancho (con vernier precisión de 0.02 mm) y el largo (en cm, con regla) hasta la primera marca y hasta el ápice. Se cortaron las hojas en dos secciones: de la base (segunda marca) hasta la primera marca (= nuevo crecimiento) y de la primera marca hasta el ápice (=tejido viejo). Por cuadrante, estas secciones de hojas fueron secadas en una estufa durante 36 hr a 60°C para determinar su peso seco.

A nivel de haz, se determinaron cuatro índices que dan información sobre el grado de estrés o déficit en las reservas energéticas a nivel de la planta: 1. el ancho de la segunda hoja más joven de cada haz, 2. largo de la segunda hoja más joven de cada haz, 3. peso foliar por haz (peso seco de las hojas/número de haces por cuadrante), 4. la tasa de elongación foliar por haz (la suma de los largos de las secciones de nuevo crecimiento de todas las hojas por haz).

A nivel de pradera, se determinaron 4 indicadores sobre su condición: 1. densidad de haces (no. haces m<sup>-2</sup>), derivado del conteo de haces, 2. biomasa foliar (g seco m<sup>-2</sup>) derivado del peso seco de todas las secciones de las hojas, 3. productividad (g seco m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), que es la suma de los pesos de las secciones nuevas, dividido por el intervalo de tiempo entre primer y segundo marcaje, 4. IAF (Índice de Área Foliar). Para el IAF, se calculó el área (cm<sup>-2</sup>) de las hojas por haz como la suma de largo\*ancho de cada uno de sus hojas, y posteriormente se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{IAF} = \frac{(\text{área promedio por haz [cm}^{-2}\text{)])} \times \text{densidad de haces [haces m}^{-2}\text{]}}{10,000}$$

10,000

### *Análisis estadísticos*

Para determinar la recuperación de la composición de la comunidad vegetativa entre los tres tratamientos (control C, control de procedimientos CP y recuperación R), y a lo largo de los cuatro años de estudio (julio 2012- agosto 2015) se analizaron los datos de cobertura de las tres especies de pastos marinos y el grupo de algas rizofíticas. Se utilizó la equivalencia de la escala Braun-Blanquet a cobertura (%) basada en el promedio del rango del valor o categoría de Braun-Blanquet (van der Maarel 2007). Posteriormente se realizó un análisis de varianza permutacional y multidimensional (PERMANOVA), utilizando una matriz de similitud de Bray-Curtis con transformación de raíz cuadrada. El análisis consistió en un modelo de dos vías con Tratamiento\*Año como factores fijos. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para visualizar las variaciones en la cobertura de las especies de pastos y el grupo de las algas rizofíticas entre los tratamientos y los años.

Algunos índices de la planta y pradera de *Thalassia testudinum*, son interdependientes o no mostraron mucha diferencia entre los tratamientos; por esta razón, se seleccionaron los siguientes índices para evaluar la recuperación de este pasto marino; a nivel de planta fueron seleccionados 1. Ancho de la hoja (índice de estrés de la planta), 2. Peso foliar por haz (índice de tamaño del haz), 3. Elongación foliar por haz (índice de dinámica foliar), y a nivel de pradera fueron: 1. IAF (índice de la condición de la pradera), 2. Productividad (índice a nivel de pradera). Se realizaron dos análisis de varianza permutacional y multidimensional (PERMANOVA) uno con a los índices a nivel de haz y otro a nivel de pradera. Los valores fueron normalizados y se utilizó una matriz con distancia Euclideana. El análisis incluyó el Tratamiento\*Año como factores fijos. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para visualizar las variaciones de los diferentes índices entre los tratamientos y los años.

Para todos los análisis se usaron 9999 permutaciones para evaluar la significancia estadística con base en los residuos del modelo reducido, y utilizando sumas de cuadrados tipo III. Los análisis se realizaron utilizando el programa PRIMER v.6.1 + PERMANOVA (Anderson *et al.* 2008).

## RESULTADOS

### *Recuperación de la comunidad vegetativa*

El análisis de la cobertura de las tres especies de pasto (*Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii*) y del grupo de algas rizofíticas mostró interacción significativa entre el tratamiento y el año (Pseudo-F = 32.596  $p < 0.001$ ; Tabla 2). A lo largo de los años de estudio no se encontraron diferencias significativas en la cobertura de las especies de pastos marinos y algas rizofíticas entre los controles C y controles de procedimiento CP (Tablas 3), por lo que se concluye que la colocación de jaula no tuvo efecto significativo sobre la cobertura de la comunidad vegetativa. En cambio, el tratamiento de recuperación R se mantuvo significativamente diferente respecto a los tratamientos controles (C y CP) para todos los años (Tabla 3). El análisis de coordenadas principales (PCO1) mostró que las especies que contribuyeron a la mayor disimilitud entre los tratamientos fue *Syringodium filiforme* explicando el 62.2 % de la variación. El PC2 explicó un adicional 21% de la variación dada por la cobertura de *H. wrightii* y las algas rizofíticas (Figura 1; Anexo 1). Al finalizar el estudio, la cobertura de *T. testudinum* alcanzó valores similares a las condiciones pre-herbivoría de referencia (C+CP), mientras que *S. filiforme* continuó siendo menor en el tratamiento R. El pasto pionero *H. wrightii* y las algas rizofíticas mostraron en general una cobertura mayor en las parcelas en recuperación (Figura 4).

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza permutacional y multidimensional (PERMANOVA) de la cobertura de las tres especies de pastos marinos y el grupo de algas rizofíticas. Análisis de tres vías (Tratamiento\*Año como factores fijos). Valores significativos son mostrados en negritas ( $p < 0.05$ ).

Fuentes de variación	gl	Pseudo-F	P
Modelo (dos vías)			
Tratamiento	2	32.596	<b>0.0001</b>
Año	3	14.431	<b>0.0001</b>
Trat x Año	6	3.321	<b>0.0001</b>
Residuales	132		

Tabla 3. Pruebas pareadas a posteriori de comparación de cobertura de pastos (*T. testudinum*, *S. filiforme* y *H. wrightii*) y algas rizofíticas entre tratamientos **C** control y **R** recuperación para cada año. Como parte de los resultados del PERMANOVA Permutacional y Multidimensional.

Grupos/ Tratamientos	Cobertura de pastos marinos							
	2012		2013		2014		2015	
	t	p	t	p	t	p	t	p
C vs CP	0.811	0.583	0.655	0.634	1.4256	0.156	1.305	0.201
C vs R	3.026	<b>0.003</b>	3.421	<b>0.001</b>	3.616	<b>0.0001</b>	2.492	<b>0.001</b>
CP vs R	2.94	<b>0.006</b>	3.846	<b>0.0002</b>	3.810	<b>0.0002</b>	3.381	<b>0.0001</b>



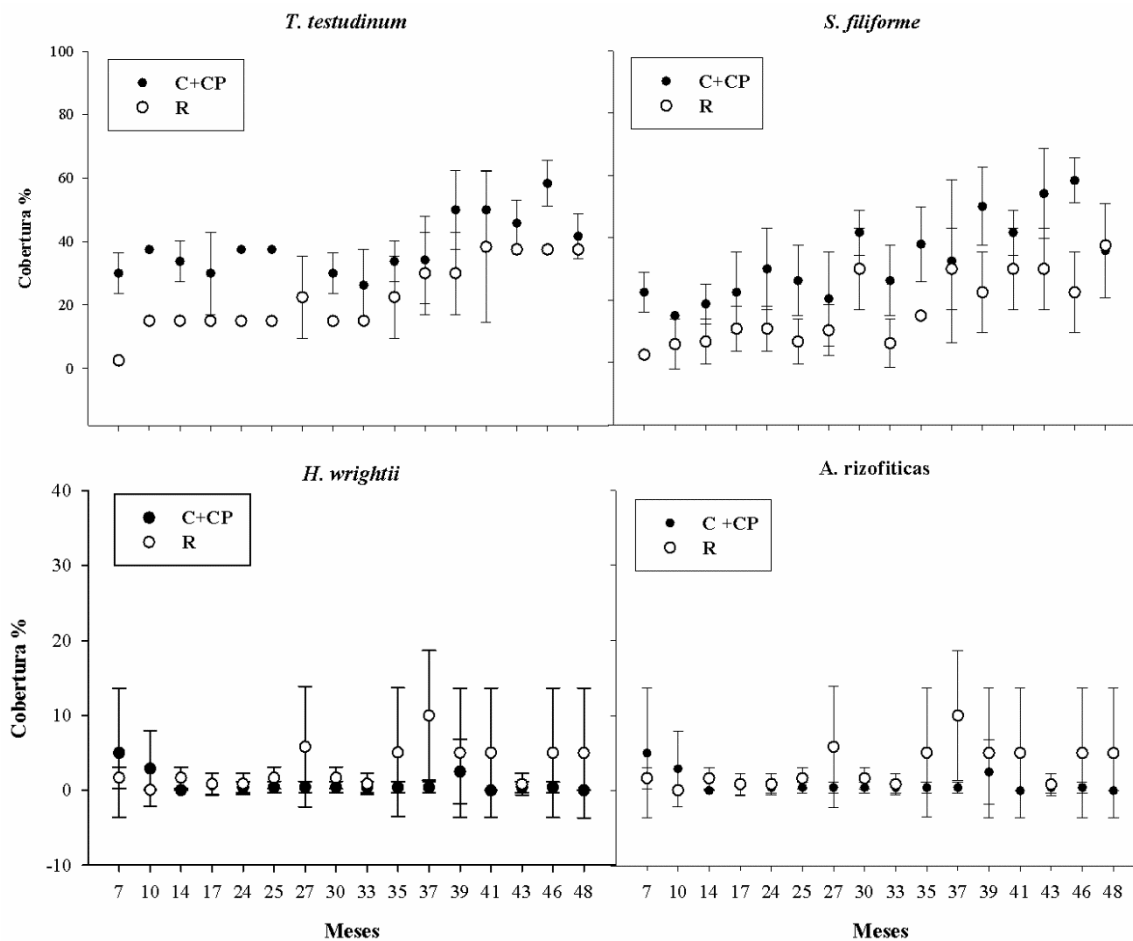


Figura 4. Cobertura de las especies de pastos (*T. testudinum*, *S. filiforme*, *H. wrightii*) y el grupo de algas rizofíticas entre el tratamiento de recuperación **R** y los tratamientos control **C+CP** (control y procedimiento) en los tres años de estudio 2012-2015 (media  $\pm$  DE).

#### Recuperación de *Thalassia testudinum*

El análisis (PERMANOVA) de los índices seleccionados para evaluar la recuperación del pasto *Thalassia testudinum* a nivel de pradera (IAF y productividad), fue significativo para la interacción tratamiento y año (Pseudo-F 3.450  $p < 0.01$ ; Anexo 2). No se encontraron diferencias significativas entre C y CP en los años de estudio, por lo tanto, se concluyó que

las jaulas de exclusión no afectaron a *T. testudinum* (Tabla 4). Al inicio del experimento (julio 2012), los índices del pasto *T. testudinum* fueron marcadamente menores en el tratamiento R con respecto a los tratamientos C y CP, a excepción de la densidad de haces (Tabla 5). Durante los tres años de estudio, de 2012 hasta 2015, la recuperación de *T. testudinum* siguió una tendencia de aumento hacia condiciones pre-herbivoría en los índices a nivel de pradera (Figura 5), pero fue hasta 2015 que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas pareadas a posteriori de comparación de los índices en *Thalassia testudinum* entre tratamientos **C** **CP** control y **R** recuperación para cada año. Como parte de los resultados del PERMANOVA Permutacional y Multidimensional. Los índices a nivel de haz incluyeron: ancho de la hoja (cm), peso foliar por haz (g peso seco m<sup>-2</sup>), y elongación foliar (cm de hoja nueva haz<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) por haz. Los índices a nivel de pradera fueron el IAF (índice de área foliar) y productividad (g peso seco m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>).

Índices de <i>Thalassia testudinum</i>								
Grupos/ Tratamientos	2012		2013		2014		2015	
	t	p	t	p	t	p	t	p
<i>Pradera</i>								
C vs CP	0.708	0.545	1.242	0.232	1.336	0.197	1.786	0.073
C vs R	8.857	<b>0.002</b>	3.622	<b>0.002</b>	4.246	<b>0.002</b>	1.868	0.073
CP vs R	6.170	<b>0.002</b>	6.415	<b>0.003</b>	3.817	<b>0.005</b>	0.798	0.5
<i>Haz</i>								
C vs CP	0.885	0.51	1.125	0.266	1.056	0.356	0.791	0.62
C vs R	7.318	<b>0.001</b>	5.517	<b>0.002</b>	2.956	<b>0.014</b>	4.152	<b>0.003</b>
CP vs R	6.594	<b>0.003</b>	5.335	<b>0.001</b>	2.896	<b>0.01</b>	4.335	<b>0.003</b>

Tabla 5. Tabla de resultados de los índices de *Thalassia testudinum* (media  $\pm$  DE) para los diferentes tratamientos en cada año. Tratamientos control **C**, control de procedimiento **CP** y de recuperación **R** para el periodo anual del estudio (2012-2015).

<i>Thalassia testudinum</i>								
Índices	2012		2013		2014		2015	
	n	Valor	n	Valor	n	Valor	n	Valor
<b>CONTROL</b>								
<i>Pradera</i>								
IAF	6	1.615 $\pm$ 0.430	6	1.483 $\pm$ 0.374	5	2.109 $\pm$ 0.766	6	2.430 $\pm$ 0.498
Productividad (g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	6	2.273 $\pm$ 0.508	6	2.308 $\pm$ 1.059	5	2.598 $\pm$ 0.661	6	3.056 $\pm$ 0.485
Biomasa foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	70.790 $\pm$ 12.478	6	70.224 $\pm$ 18.707	5	88.480 $\pm$ 28.352	6	109.833 $\pm$ 20.593
Densidad (haces m <sup>-2</sup> )	6	475 $\pm$ 68.920	6	500 $\pm$ 154.919	5	600 $\pm$ 106.066	6	675 $\pm$ 154.110
P:B	6	0.032 $\pm$ 0.006	6	0.033 $\pm$ 0.010	5	0.030 $\pm$ 0.006	6	0.028 $\pm$ 0.004
<i>Haz</i>								
Ancho de hoja (cm)	6	1.165 $\pm$ 0.127	6	1.205 $\pm$ 0.075	5	1.106 $\pm$ 0.056	6	1.192 $\pm$ 0.078
Peso foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	0.152 $\pm$ 0.036	6	0.146 $\pm$ 0.042	5	0.146 $\pm$ 0.038	6	0.141 $\pm$ 0.032
Elongación foliar (cm haz <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	6	1.267 $\pm$ 0.328	6	0.913 $\pm$ 0.197	5	1.075 $\pm$ 0.205	6	0.877 $\pm$ 0.169
Longitud hoja (cm)	6	17.860 $\pm$ 2.633	6	17.248 $\pm$ 4.847	5	21.281 $\pm$ 5.738	6	20.119 $\pm$ 4.769
<b>CONTROL PROCEDIMIENTO</b>								
<i>Pradera</i>								
IAF	6	1.978 $\pm$ 0.798	6	1.611 $\pm$ 0.381	6	1.713 $\pm$ 0.571	6	2.076 $\pm$ 0.419
Productividad (g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	6	2.247 $\pm$ 0.708	6	3.014 $\pm$ 0.772	6	2.043 $\pm$ 0.366	6	2.440 $\pm$ 0.536
Biomasa foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	75.596 $\pm$ 36.615	6	66.888 $\pm$ 19.138	6	69.729 $\pm$ 25.660	6	87.463 $\pm$ 16.980
Densidad (haces m <sup>-2</sup> )	6	416.667 $\pm$ 125.166	6	558.333 $\pm$ 131.972	6	500 $\pm$ 161.245	6	583.333 $\pm$ 121.106
P:B	6	0.033 $\pm$ 0.008	6	0.048 $\pm$ 0.019	6	0.033 $\pm$ 0.015	6	0.028 $\pm$ 0.004

<i>Haz</i>								
Ancho de hoja (cm)	6	1.113 ± 0.141	6	1.118 ± 0.157	6	1.118 ± 0.138	6	1.169 ± 0.105
Peso foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	0.179 ± 0.069	6	0.124 ± 0.019	6	0.148 ± 0.066	6	0.151 ± 0.014
Elongación foliar (cm haz <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	6	1.108 ± 0.215	6	1.01 ± 0.130	6	0.909 ± 0.142	6	0.787 ± 0.145
Longitud hoja (cm)	6	20.571 ± 4.990	6	16.092 ± 1.408	6	18.752 ± 4.999	6	20.881 ± 3.180

## RECUPERACIÓN

<i>Pradera</i>								
IAF	6	0.093 ± 0.074	6	0.478 ± 0.092	6	0.676 ± 0.282	6	1.639 ± 0.758
Productividad (g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	6	0.260 ± 0.197	6	0.913 ± 0.283	6	1.177 ± 0.459	6	2.384 ± 0.892
Biomasa foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	3.888 ± 2.950	6	19.771 ± 4.146	6	31.014 ± 11.155	6	72.783 ± 24.721
Densidad (haces m <sup>-2</sup> )	6	283.333 ± 132.916	6	533.333 ± 252.323	6	483.333 ± 206.556	6	758.333 ± 106.849
P:B	6	0.070 ± 0.014	6	0.045 ± 0.007	6	0.040 ± 0.007	6	0.033 ± 0.004
<i>Haz</i>								
Ancho de hoja (cm)	6	0.544 ± 0.114	6	0.835 ± 0.063	6	0.940 ± 0.068	6	1.002 ± 0.061
Peso foliar (g m <sup>-2</sup> )	6	0.012 ± 0.006	6	0.043 ± 0.015	6	0.070 ± 0.037	6	0.079 ± 0.019
Elongación foliar (cm haz <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	6	0.450 ± 0.121	6	0.599 ± 0.125	6	0.705 ± 0.274	6	0.556 ± 0.107
Longitud hoja (cm)	6	3.116 ± 1.330	6	6.249 ± 1.952	6	11.360 ± 2.942	6	12.129 ± 2.459

---

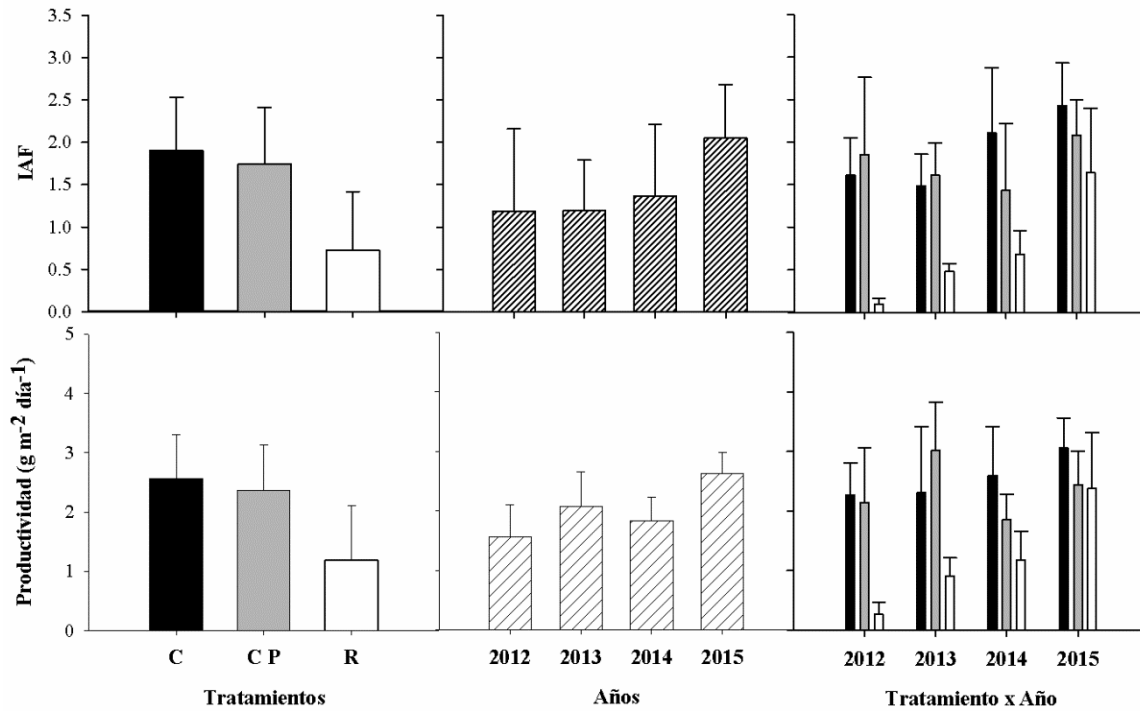


Figura 5. Índices para evaluar recuperación de *Thalassia testudinum* a nivel de pradera: IAF (índice de área foliar) y productividad (media  $\pm$  DE) para los tratamientos control **C**, control de procedimiento **CP** y de recuperación **R** para el periodo anual del estudio (2012-2015).

El análisis (PERMANOVA) de los índices seleccionados para evaluar la recuperación del pasto *Thalassia testudinum* a nivel de haz (ancho de hoja, peso foliar por haz y elongación foliar por haz), fue significativo para la interacción tratamiento y año (Pseudo-F 3.961  $p < 0.001$ ; Anexo 2). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre C y CP en los años de estudio, por lo tanto, se concluyó que las jaulas de exclusión no afectaron a *T. testudinum*. Aunque los haces de *T. testudinum* mostraron recuperación hacia condiciones de pre-herbivoría durante años de estudio (2012 hasta 2015), este tratamiento continuó mostrando diferencias significativas con los tratamientos control (C y CP) para todos los años (Tabla 4; Figura 6).

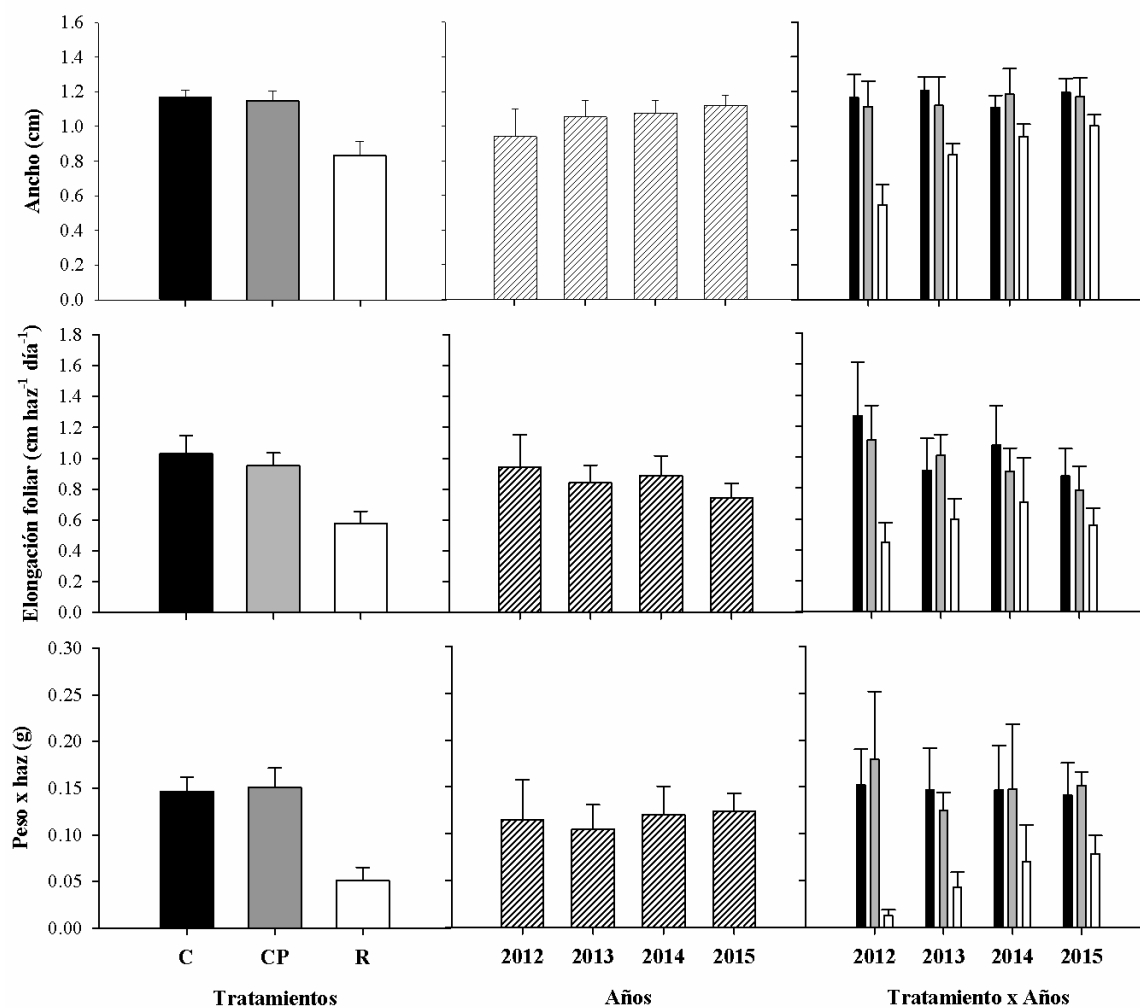


Figura 6. Índices para evaluar recuperación de *Thalassia testudinum* a nivel de haz: ancho, elongación foliar y peso por haz (media  $\pm$  DE) para los tratamientos control **C**, control de procedimiento **CP** y de recuperación **R** para el periodo anual del estudio (2012-2015).

El análisis de coordenadas principales (PCO1) mostró que los índices que contribuyeron a la mayor disimilitud entre los tratamientos fue el peso por haz (g peso seco haz<sup>-1</sup>) explicando el 80.5 % de la variación. El PC2 explicó un adicional 14 % de la variación dada por la elongación foliar (cm haz<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) por haz (Figura 7).

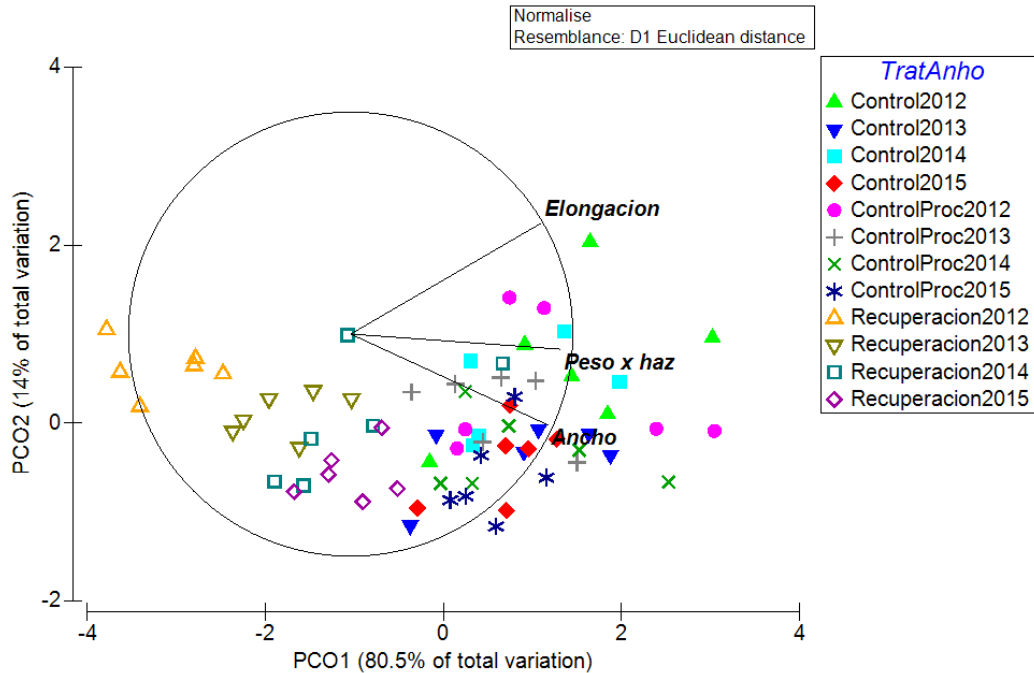


Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCoA= por sus siglas en inglés), revela diferencias entre el tratamiento de recuperación **R** y los tratamientos control **C** y control procedimiento **CP** en los índices de *Thalassia testudinum* a nivel de haz (ancho de la hoja, peso foliar por haz, y elongación foliar por haz). Los vectores de correlación fueron generados mediante correlaciones múltiples de Pearson.

## DISCUSIÓN

### *El estudio de recuperación*

En este estudio se estableció que los efectos de “rotational grazing” son reversibles, pero que las praderas tardarán varios años para recuperarse. Hasta nuestro conocimiento, este trabajo es el primer estudio que ha considerado el historial de ramoneo. La selección de parcelas recién abandonadas es un buen método de estandarización del historial de ramoneo,

ya que para un estudio de recuperación a condiciones pre-herbivoría es importante que las réplicas (parcelas) tengan un historial de herbivoría similar; no es lo mismo colocar jaulas de exclusión sobre secciones de la pradera con historial de ramoneo reciente, a colocarlas sobre parcelas donde las reservas de *T. testudinum* se han agotado, como ocurre cuando las parcelas han sido abandonadas (carbohidratos solubles en sus rizomas, Lacey *et al.* 2014, ver capítulo tres).

Estudios previos y similares a este trabajo, también utilizaron jaulas de exclusión, pero no consideraron el historial de ramoneo, o bien, no es mencionado (Fourqurean *et al.* 2010; 2019; Samper-Villarreal *et al.* 2022; Gulick *et al.* 2022). Además, la comparación ha sido entre sitios con y sin herbivoría, o bien, con exclusión de tortugas por periodos de máximo trece meses. Otro factor a considerar es que varios de estos estudios se han realizados en zonas de alimentación con densidades altas de tortugas, y donde las tortugas no se alimentan por “*rotational grazing*”, o bien donde las parcelas ramoneadas ya no están claramente delimitadas, faltando una pradera de referencia para determinar recuperación hasta un estado pre-herbivoría.

#### *Recuperación de la comunidad vegetativa*

Después de tres años de la implementación de jaulas de exclusión sobre parcelas abandonadas, la cobertura de pastos y algas rizofíticas continuó siendo significativamente diferente entre las parcelas de R y los controles los controles (C + CP) al finalizar el estudio. El pasto *Thalassia testudinum* mostró signos de recuperación hacia las condiciones pre-herbivoría, pero la cobertura de *Syringodium filiforme* continuó siendo menor en el tratamiento R. En el mismo tratamiento, la cobertura de *H. wrightii* y las algas rizofíticas, en general, fue mayor con respecto a los tratamientos control.



En ecosistemas con estados alternativos como las praderas de pastos marinos, la trayectoria de recuperación depende de la histéresis del sistema (Litzow y Hunsicker 2016); es decir, el sistema no regresa inmediatamente a su estado original (e.j. dominancia del pasto clímax *T. testudinum*), su recuperación depende de su historial de perturbación. Por tanto, la trayectoria de recuperación será diferente a la trayectoria seguida durante el disturbio (Litzow y Hunsicker 2016; Collins *et al.* 2021). Al inicio del estudio, las parcelas abandonadas presentaron características similares en los índices evaluados y la composición de la comunidad. Después de tres años de recuperación, aunque el pasto *T. testudinum* alcanzó una cobertura similar a las condiciones pre-herbivoría (C+CP), el tratamiento R continuó con una composición de la comunidad diferente a la de los tratamientos control. Una vez establecidas, especies pioneras como *H. wrightii* y las algas rizofíticas pueden permanecer estables en la comunidad cuando no hay disturbios presentes (Cruz-Palacios y van Tussenbroek 2005; van Tussenbroek 2011). Su coexistencia con especies clímax como *T. testudinum*, se atribuye a la diferenciación de nichos, como diferentes profundidades de arraigo o utilización de recursos (Williams 1990).

Nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Collins *et al.* (2021) en ecosistemas terrestres. En pastizales que dependen del fuego (disturbio) para mantener la estructura de la comunidad, aumentar la frecuencia de incendios puede contrarrestar la expansión de vegetación arbustiva, y mantener una composición de la comunidad comparable a la de otras praderas con incendios frecuentes. Sin embargo, eliminar los incendios en áreas que los experimentan con frecuencia, aumenta la vegetación arbustiva, pero la composición de la comunidad resultante no coincide con la comunidad encontrada en praderas usadas como referencia de condiciones con poca frecuencia de incendios.

### *Recuperación de Thalassia testudinum*

Después del cese de la herbivoría en este estudio, *T. testudinum* comenzó a mostrar signos de recuperación en las parcelas abandonadas (R). La densidad de haces de *T. testudinum* en las parcelas del tratamiento R mantuvo valores similares a los tratamientos (C + CP) después del primer año de recuperación. Al cabo de tres o cuatro años, los índices de esta especie a nivel de pradera (productividad e Índice de Área Foliar) ya no presentaron diferencias significativas entre las parcelas R y los tratamientos control (C y CP). Fourqurean *et al.* (2010) reportaron tendencias similares en una pradera sub-tropical (Bahamas), bajo herbivoría intensiva por tortugas verdes, donde después de un año de exclusión de tortugas (jaulas), la densidad de haces de *T. testudinum* había aumentado hasta niveles mayores de áreas sin herbivoría. Sin embargo, los autores no especificaron por cuanto tiempo sus áreas experimentales habían sido expuestas al ramoneo continuo por parte de las tortugas.

A nivel del haz, se registró un aumento gradual en el ancho de las hojas, peso por haz y elongación de las hojas a lo largo de los años. Sin embargo, el tratamiento R continuó siendo significativamente diferente en estos índices con respecto a los tratamientos control al finalizar el estudio. Es difícil distinguir si este contraste en dimensiones de los haces hasta el cuarto año se puede atribuir a un efecto del ramoneo per se, o a una competencia intraespecífica como consecuencia del ramoneo (histéresis del sistema).

Los cambios en rasgos morfológicos de las plantas durante un disturbio, y luego durante su recuperación al mismo, pueden afectar directamente las interacciones planta-planta (Chieppa *et al.* 2022). Durante los años de recuperación, los haces de *T. testudinum* posiblemente tardaron en obtener su área foliar original, resultando en mayor reclutamiento de haces. Los pastos marinos son organismos clonales que tienen crecimiento vegetativo de módulos fisiológicamente integrados. A nivel de pradera, su incremento en biomasa puede ocurrir por

el aumento en el tamaño de la planta (ramet), el incremento de ramets (densidad), o por ambos (Vasco *et al.* 2018). El aumento gradual del IAF en el tratamiento R refleja el aumento de área de tejidos fotosintéticamente activos al término del estudio, dado principalmente por el incremento en la densidad de haces (Enríquez y Pantoja-Reyes 2005); mientras que mantener haces pequeños, permitió disminuir el auto-sombreo (Enríquez *et al.* 2019; Gulick *et al.* 2021).

El crecimiento compensatorio (expresado como tasa de crecimiento relativo, crecimiento específico en peso o proporción de la productividad sobre biomasa aérea P:B) en *T. testudinum* (Moran y Bjordal 2005; Fourqurean *et al.* 2010; Gulick *et al.* 2020) se ha reportado como respuesta a la herbivoría de tortugas verdes. Cabe mencionar que este tipo de crecimiento se ha medido en praderas bajo ramoneo por tortugas previo a su exclusión, y no sobre parcelas abandonadas como en este estudio. Las praderas ramoneadas tienen hojas más cortas, lo que aumenta la irradiancia ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a nivel del dosel, el crecimiento compensatorio se atribuye a un incremento de la actividad fotosintética de las hojas que estimula su crecimiento (Gulick *et al.* 2021). En este estudio, el tratamiento R mostró crecimiento compensatorio solo al inicio, llegando a los valores de referencia de condiciones de pre-herbivoría (C y CP) después del primer año, que coincide con la presencia de hojas más cortas de *T. testudinum* en comparación con los siguientes años de recuperación.

En este estudio, al cabo de tres años, las praderas abandonadas recuperaron su estructura y productividad, pero aún mantuvieron haces de *T. testudinum* más pequeños (menor longitud y ancho de hoja, y peso por haz) en comparación con los controles, y mayor cobertura de *H. wrightii* y algas rizofíticas, que podrán ser un resultado de histéresis. Esta información resulta novedosa ya que se proporciona el tiempo para que ocurran los procesos naturales de recuperación hasta condiciones funcionales pre-herbivoría. Es importante conocer las tasas

de recuperación de las praderas de pastos marinos, para así poder determinar la capacidad de carga de un sitio de alimentación; p.ej. si las tortugas ramonean en promedio una parcela por un año y medio, y la recuperación tarda tres años; implica que solamente pueden ramonear en 1/4 parte del área total de la pradera (Figura 8). Si se excede esta proporción, habrá sobreexplotación de la pradera por parte de las tortugas, con consecuencias negativas para la recuperación de los pastos marinos, e incluso una posible pérdida de la pradera como ha sido reportado ya por diversos autores (Fourqurean *et al.* 2010; Christianen *et al.* 2014; Kelkar *et al.* 2013; Molina-Hernández y van Tussenbroek *et al.* 2014). Es notorio que, en Akumal se registró un cambio de estrategia de ramoneo por “*rotational grazing*” a ramoneo continuo, con un consecuente cambio permanente (shift) en la comunidad, cuando > 25-30% de la pradera fue ramoneada (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014), que concuerda con los tiempos de recuperación registrados en este estudio.

El éxito en las acciones de conservación de las tortugas verdes es un claro ejemplo de lo que se puede lograr con esfuerzos de conservación concertados. Sin embargo, aún es necesario que estos esfuerzos incluyan la protección y manejo de las praderas de pastos marinos. Garantizar la conservación de estos ecosistemas, no solo contribuirá a aumentar su resiliencia, sino que también asegurará mantener el éxito en la protección de las de tortugas verdes al mantener sus principales zonas de alimentación.

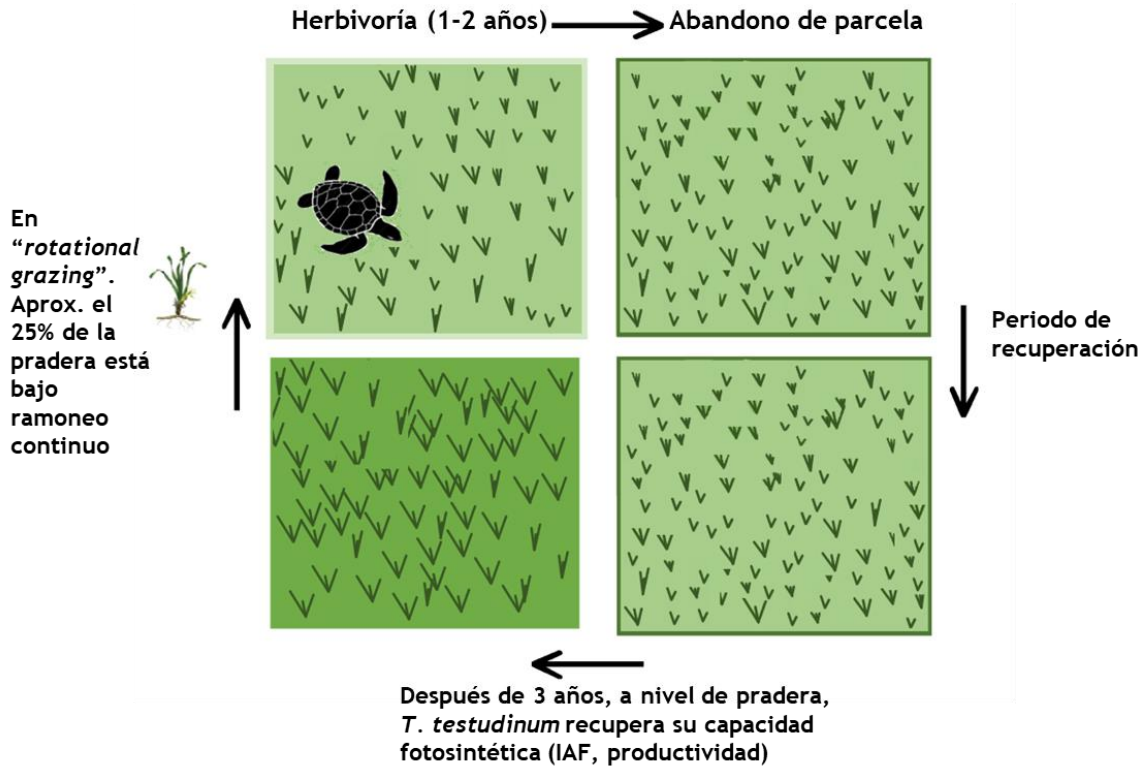


Figura 8. Esquema de la herbivoría por "rotational grazing" y la recuperación de *Thalassia testudinum* después de la herbivoría por tortugas verdes. Las parcelas pueden ser ramoneadas por 1-2 años antes de ser abandonadas. La recuperación de la pradera y del pasto *T. testudinum* ocurre al menos después de 3 años. El ramoneo en solo aproximadamente un 25% de la pradera con "rotational grazing" evita su sobre explotación y el eventual cambio de las tortugas a otras estrategias de alimentación.

## AGRADECIMIENTOS

León Felipe González Morales, Guadalupe Barba Santos, Hazel M. Canizales Flores, por el apoyo en el trabajo en campo y procesamiento de muestras y a Maite Mascaró Miquelajauregui por la asesoría en el análisis de datos.

## LITERATURA CITADA

- Aragones, LV, IR Lawler, W J Foley, H Marsh. 2006. Dugong grazing and turtle cropping: grazing optimization in tropical seagrass systems? *Oecologia*: 149: 635-647.
- Bakker ES, Pagès JF, Arthur R, Alcoverro T. 2016. Assessing the role of large herbivores in the structuring and functioning of freshwater and marine angiosperm ecosystems. *Ecography* 39(2):162–179 DOI 10.1111/ecog.01651.
- Bjorndal KA. 1980. Nutrition and Grazing Behavior of the Green Turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*. 56: 147-154.
- Chieppa J, SA Power, UN Nielsen, DT Tissue. 2022. Plant functional traits affect competitive vigor of pasture grasses during drought and following recovery. *Ecosphere*: 13: e4156. DOI: 10.1002/ecs2.4156
- Christianen MJA, J van Belzen, P M.J Herman, M M van Katwijk, LPM Lamers, PJM. van Leen, TJ Bouman. 2013. Low Canopy Seagrass Beds Still Provide Important Coastal Protection Services. *PLoS ONE*. 8(5): e62413. DOI: 10.1371/journal.pone.0062413.
- Christianen, MJA, PMJ Herman, TJ Bouma, LPM Lamers, MM van Katwijk, T van der Heide, PJ Mumby, BR Silliman, SL Engelhard, M van de Kerk, W Kisware, J van de Koppel. 2014. *Proceedings of The Royal Society B*. 281: 20132890. DOI: 10.1098/rspb.2013.2890
- Christianen, MJA, MM van Katwijk, B I van Tussenbroek, JF Pagès, K Ballorain, N Kelkar, R Arthur, T Alcoverro. 2021. A dynamic view of seagrass meadows in the wake of successful green turtle conservation. *Nature Ecology and Evolution*. 5, 553–555. DOI: 10.1038/s41559-021-01433-z
- Christianen, MJA, FO Smulders, JA Vonk, LE Becking, TJ Bouma, Engel SM, James R. K., Nava M. I., Smit J. C., van der Zee J. P., Palsbøll P. J, ES Bakker. 2022. Seagrass ecosystem multifunctionality under the rise of a flagship marine megaherbivore. *Global Change Biology*. 2015-230. DOI: 10.1111/gcb.16464
- Collins SL, JB Nippert, JM Blair, JM Briggs, P Blackmore, Z Ratajczak. 2021. Fire frequency, state change and hysteresis in tallgrass prairie, *Ecology Letters*. 1-12. DOI: 10.1111/ele.13676
- Cruz-Palacios V, BI van Tussenbroek. 2005. Simulation of hurricane-like disturbances on a Caribbean seagrass bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 324: 44-60. DOI: 10.1016/j.jembe.2005.04.002
- Eklöf, JS, M de la Torre- Castro, M Gullström, J Uku, N Muthiga, T Lyimo, SO Bandeira. 2008. Sea urchin overgrazing of seagrasses: A review of current knowledge on causes, consequences and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 79: 569-580.
- Enríquez S, NI Pantoja-Reyes. 2005. Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia*. 145: 235-243. DOI 10.1007/s00442-005-0111-7
- Enríquez S, I Olivé, N Cayabyab, JD Hedley. 2019. Structural complexity governs seagrass acclimatization to depth with relevant consequences for meadow production, macrophyte diversity and habitat carbon storage capacity. *Scientific Reports*. 9:14657 DOI: 10.1038/s41598-019-51248-z 1

- Fourqurean, JW, S Manuel, KA Coates, WJ Kenworthy, SR Smith. 2010. Effects of excluding sea turtle herbivores from seagrass bed: Overgrazing may have led to loss of seagrass meadows in Bermuda. *Marine Ecology Progress Series*. 419: 223-232.
- Gulick GA, RA Johnson, CG Pollock, Z Hills-Start, AB Bolten, KA Bjorndal. 2020. Recovery of a large herbivore changes regulation of seagrass productivity in a naturally grazed Caribbean ecosystem. *Ecology*.101(12): 2020 d03180 DOI: 10.1002/ECY.3180
- Gulick GA, RA Jhonson, CG Pollock, Z Hillis-Starr, AB Bolten, KA Bjorndal. 2021. Recovery of a cultivation grazer: A mechanism for compensatory growth of *Thalassia testudinum* in a Caribbean seagrass meadow grazed by green turtles. *Journal of Ecology*. 109:3031–3045. DOI: 10.1111/1365-2745.13718
- Gulick GA, RA Johnson, LA Palma, AM Kusel, CG Pollock, Z Hills-Start, AB Bolten, KA Bjorndal. 2022. An underwater Serengeti: Seagrass-mediated effects on intake and cultivation grazing behavior of a marine megaherbivore. *Costal and Marine Ecology*.2022. 13:e4259.DOI: 10.1002/ecs2.4259Gulick GA
- Kelkar N, R Arthur, N Marba, T Alcoverro. 2013. Green turtle herbivory dominates the fate of seagrass primary production in the Lakshadweep islands (Indian Ocean). 485: 235-243. DIO: 10.3354/meps10406
- Lacey EA, L Collado-Vides, JW Fourqurean. 2014. Morphological and physiological responses of seagrasses (Alismatales) to grazers (Testudines: Cheloniidae) and the role of these responses as grazing patch abandonment cues. *Rev. Biol. Trop*: 62 (4): 1535-1548.
- Lal A, R Arthur, N Marbà, AWT Lill, T Alcoverro. 2010. Implications of conserving an ecosystem modifier: Increasing green turtle (*Chelonia mydas*) densities substantially alters seagrass meadows.
- Litzow MA, ME Hunsicker. 2016. Early warning signals, nonlinearity, and signs of hysteresis in real ecosystems. *Ecosphere*. 7(12): e01614. DOI: 10.1002/ecs2.1614
- Lobel PS, JC Ogden. 1981. Foraging by the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*. *Marine Biology*. 64: 173-183.
- Martínez-López IG, M van Den Akker, L Walk, MM van Katwijk, T van Der Heide and BI van Tussenbroek. 2019. Nutrient availability induces community shift in seagrass meadows grazed by turtles. *PeerJ*. 7:e7570 DOI 10.7717/peerj.7570
- Molina-Hernández AL, BI van Tussenbroek. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by Green sea-turtles. *Marine Ecology Progress Series*.
- Moran KL, KA Bjorndal. 2005. Simulated green turtle grazing affects structure and productivity of seagrass pastures. *Marine Ecology Progress Series*. 305: 235-247.
- Moran KL, KA Bjorndal. 2007. Simulated green turtle grazing affects nutrient composition of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Marine Biology*. 150: 1083-1092. DOI 10.1007/s00227-006-0427-9
- Samper-Villareal J, J Moya-Ramírez, J Cortés. 2022. Megaherbivore exclusion led to more complex seagrass canopies and increased biomass and sediment C<sub>org</sub> pools in a tropical meadow. DOI:10.3389/fmars.2022.945783
- Thayer GW, KA Bjorndal, JC Ogden, SL Williams, JC Zieman. 1984. Role of larger herbivores in seagrass communities. *Estuaries*. 7: 351–376.

- Thorhaug A. 1981. Biology and management of seagrass in the Caribbean. *Ambio*. 10 (6): 295-298.
- Vasco MN, CS Vieira, IE Lopes, JC Creed. 2018. The biomass-density relationship in seagrasses and its use as an ecological indicator. *BMC Ecology*. 18:44. DOI:10.1186/s12898-018-0200-1
- Valentine JF, KL Heck Jr., J Busby. 1997. Experimental evidence that herbivory increase shoot density and productivity in a subtropical turtlegrass (*Thalassia testudinum*) meadow. *Oecologia*. 112: 193-200.
- Valentine JF, KL Heck Jr., 2020. Herbivory in seagrass meadows: an evolving paradigm. *Estuaries and Coasts*. DOI: 10.1007/s12237-020-00849-3
- Valentine JF, E Duffy. 2006. The Central Role of Grazing in Seagrasses Ecology. En: Larkum AWD, RJ Orth, CM Duarte (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 463-501). The Netherlands: Springer.
- Van der Maarel E. 2007. Transformation of cover-abundance values for appropriate numerical treatment- Alternatives to the proposals by Podani. *Journal of Vegetation Science*. 18; 767-770. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2007.tb02592.x
- van Tussenbroek BI, LF González Morales. 2017. Grazing by green sea-turtles does not affect reproductive fitness in *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*. 141: 10-16. DOI:10.1016/j.aquabot.2017.05.003
- Zimmerman R, R Gibson, J Harrington. 1979. Herbivory and detritivory among gammaridean amphipods from a Florida seagrass community. *Marine Biology*. 54: 41-47.
- Walker L, R Del Moral. 2009. Transition dynamics in succession: Implications for rates, trajectories, and restoration. En: Hobbs RJ, KN Suding (Eds.), *New models for ecosystem dynamics and restoration* (pp. 33- 49). EUA. Island Press.
- Williams SL. 1990. Experimental studies of Caribbean seagrass bed development. *Ecological Monographs*. 60(4): 449-469. DOI:10.2307/1943015
- Wikum DA, GF Shanholtzer. 1978. Application of the Braun-Blanquet Cover-Abundance Scale for vegetation análisis in land development studies. *Environmental Management*, 2(4): 323-329. DOI:10.1007/BF01866672



# ANEXOS

## Anexo 1

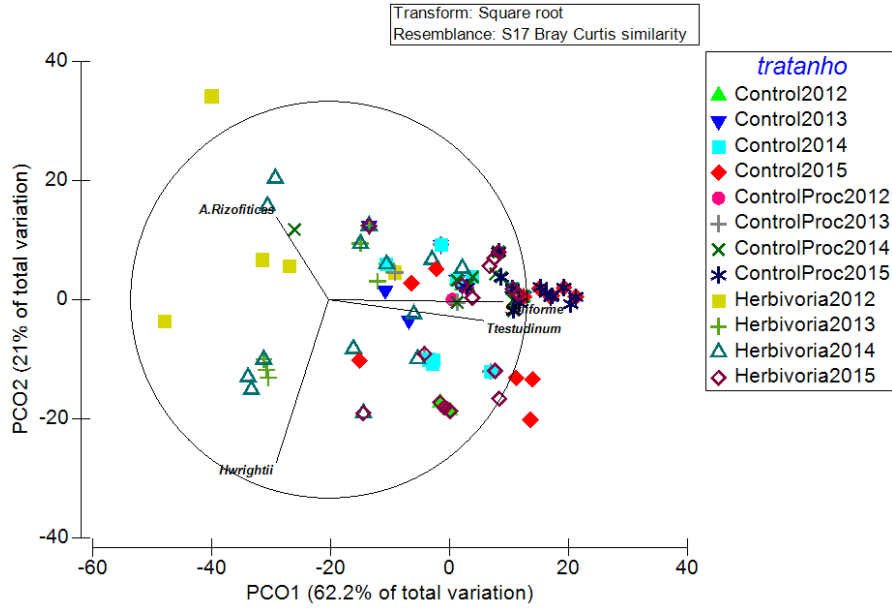


Figura 1. Análisis de coordenadas principales (PCoA= por sus siglas en ingles), revela diferencias en la cobertura de las especies de pastos (*T. testudinum*, *S. filiforme*, *H. wrightii*) y el grupo de algas rizofíticas entre el tratamiento de recuperación **R** y los tratamientos control **C** y control procedimiento **CP**. Los vectores de correlación fueron generados mediante correlaciones múltiples de Pearson.

Anexo 2. Resultados del análisis de varianza permutacional y multidimensional (PERMANOVA; Tratamiento\*Año como factores fijos), para los índices de *Thalassia testudinum* entre tratamientos **C CP** control y **R** recuperación para cada año. Los índices a nivel de haz incluyeron: ancho de la hoja (cm), peso foliar por haz (g peso seco m<sup>-2</sup>), y elongación foliar (cm de hoja nueva haz<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) por haz. Los índices a nivel de pradera fueron el IAF (índice de área foliar), biomasa foliar, productividad (g peso seco m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>), y densidad de haces. Valores significativos son mostrados en negritas (p <0.05).

**Pradera**

Fuentes de variación	gl	Pseudo-F	P
<i>Modelo (dos vías)</i>			
Tratamiento	2	54.942	<b>0.0001</b>
Año	3	4.257	<b>0.0003</b>
Trat x Año	6	3.961	<b>0.0001</b>
Residuales	59		

**Haz**

Fuentes de variación	gl	Pseudo-F	P
<i>Modelo (dos vías)</i>			
Tratamiento	2	44.998	<b>0.0001</b>
Año	3	10.847	<b>0.0001</b>
Trat x Año	6	2.422	<b>0.005</b>
Residuales	59		

### **Capítulo 3:** Desaceleración crítica (*Critical Slowing Down*) como un indicador de la capacidad de recuperación de pastos marinos ante herbivoría por tortugas verdes.

#### RESUMEN

Predecir el riesgo de transición crítica como el colapso de un ecosistema resulta importante para la conservación y el manejo. Un sistema cercano a esta transición muestra una recuperación más lenta después de un disturbio menor, fenómeno conocido como “*critical slowing down*” (CSD). Siguiendo este concepto, se analizó la capacidad de recuperación del pasto marino *Thalassia testudinum* bajo diferentes intensidades de herbivoría por tortugas verdes con atención especial a las parcelas abandonadas. Se consideró un gradiente de herbivoría utilizando la duración de ramoneo (simulado) como indicador del nivel de intensidad. Los niveles consistieron en: 1. Herbivoría a corto plazo (4 meses de corte en áreas sin ramoneo previo), 2. mediano plazo (8 meses de corte en áreas sin ramoneo previo), 3. largo plazo (8 meses de corte en áreas previamente ramoneadas y abandonadas), 4. en recuperación (por 8 meses en parcelas abandonadas). El disturbio fue el entierro de pastos por dos pulsos que se aplicó a 5 réplicas por nivel, con sus respectivos controles sin entierro. La tasa de incremento de densidad de haces foliares de *T. testudinum* fue considerada como indicador de recuperación. La recuperación fue mayor en los pastos que no fueron sujetos al disturbio (controles), y se registró una desaceleración de la recuperación del nivel 1, 2 y 3 (herbivoría de largo plazo), indicando CSD. Cuando se incluyó el disturbio por entierro a la intensidad de herbivoría, este efecto de desaceleración fue aún más notorio, y en el nivel 3

(de largo plazo, parcelas abandonadas expuestas a 8 meses más de herbivoría simulada), la recuperación de *T. testudinum* fue virtualmente nula, con una pérdida casi total de su biomasa (99%) después del entierro; indicador de un colapso en la pradera de *T. testudinum*. En las parcelas abandonadas (nivel 4, en recuperación), se registró un aumento en el número de haces (recuperación) en los controles, mientras que con entierro, la tasa de recuperación disminuyó significativamente. Este trabajo aporta evidencia empírica de la ocurrencia de “*critical slowing down*” en praderas del Caribe dominadas por *T. testudinum* cuando están bajo herbivoría intensiva por tortugas verdes (simulada) y que las tortugas alimentándose bajo un régimen de “*rotational grazing*” abandonaron las parcelas que mantuvieron con ramoneo frecuentemente, justo antes de que ocurriera un cambio de fase crítico para la pradera, permitiendo así su recuperación natural.

## INTRODUCCIÓN

Los esfuerzos para la conservación de tortugas verdes desde la década de 1970, han llevado a un aumento notable en varias poblaciones locales (McClenachan *et al.* 2006), evidenciando los efectos de su herbivoría sobre las praderas de pastos marinos (Kelkar *et al.* 2013; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Kaladharan *et al.* 2013; Fourqurean *et al.* 2019; Christianen *et al.* 2021). Las tortugas verdes pueden alterar significativamente estos ecosistemas, ya que mantienen una alta fidelidad a los sitios de alimentación, al cambiar con gran flexibilidad sus estrategias de alimentación, dependiendo en gran medida de la densidad de tortugas y las características de la pradera (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Christianen *et al.* 2021).

En el Mar Caribe, las tortugas verdes se alimentan principalmente del pasto marino *Thalassia testudinum* siguiendo un tipo de forrajeo mediante un sistema de rotación de áreas de alimentación o “parcelas” (Bjorndal 1980; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). Esta estrategia de alimentación ocurre cuando las tortugas ramonean pastos marinos continuamente y mantienen hojas jóvenes podadas a una altura aproximada de 3 cm por encima del sustrato (Bjorndal 1980; Zieman *et al.* 1984). El principal beneficio de esta estrategia de alimentación es un incremento del contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum*, aunque también se considera que favorece un menor contenido de algas epífitas y lignina, lo que puede optimizar la digestión de las tortugas (Moran y Bjorndal 2007; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). Eventualmente, la productividad de estas parcelas disminuye, y aproximadamente después de uno o dos años, cuando el pasto *T. testudinum* ya no aporta la cantidad suficiente de alimento al disminuir su producción de hojas, las tortugas dejan de alimentarse en esa parcela, la abandonan y abren nuevas (Lacey

*et al.* 2014; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). Las parcelas abandonadas se reconocen por tener escasa vegetación, similar a las parcelas ramoneadas; pero a diferencia de estas, tienen menos haces foliares de *T. tetudinum*, con hojas angostas, pero con el ápice foliar intacto (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Martínez-López *et al.* 2019).

Cuando la densidad de tortugas aumenta y la alimentación por rotación de parcelas cambia hacia una estrategia de alimentación más aleatoria y persistente, ocurre un cambio de fase en la pradera, caracterizado por el reemplazo del pasto *T. testudinum* hacia especies de pastos pioneras y de crecimiento rápido (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Martínez-López *et al.* 2019). Si estas especies pioneras también disminuyen, o su crecimiento no es suficientemente rápido para contrarrestar el efecto de la herbivoría, puede eventualmente provocar una pérdida total (colapso) de la pradera marina (Figura 1; Christianen *et al.* 2021).

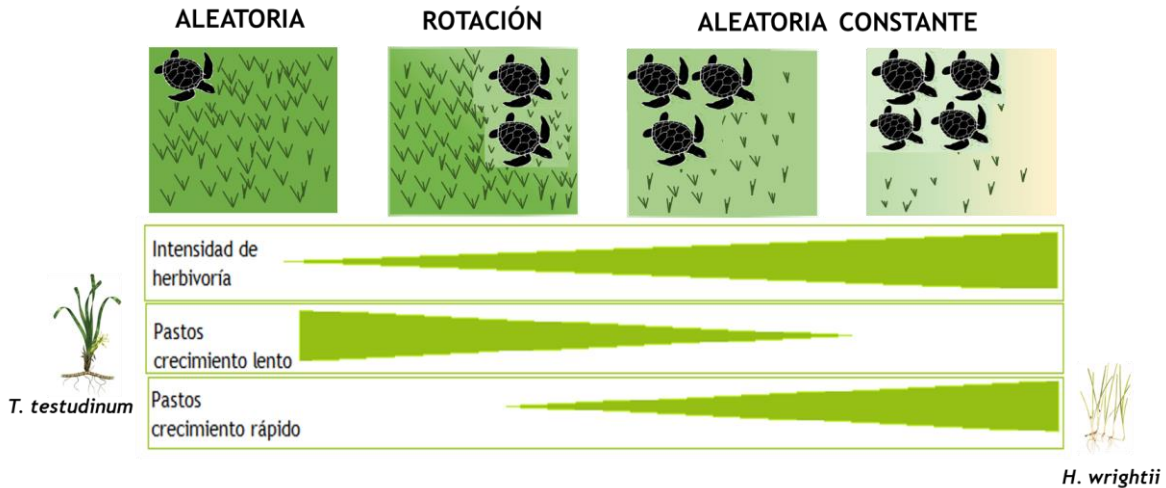


Figura 1. Herbivoría por tortugas verdes y su impacto en praderas de pastos marinos. Las tortugas tienen diferentes estrategias de forrajeo para mantener alta fidelidad a sus sitios de alimentación y que se asocian a los cambios en la densidad de tortugas en un sitio. En las praderas de pastos ocurren cambios a nivel de paisaje, productividad primaria, y composición de especies. En el Caribe, la especie clímax *Thalassia testudinum*, y principal alimento de las tortugas, bajo herbivoría intensiva y constante, es reemplazada gradualmente por especies pioneras como *Halodule wrightii*.

Los ecosistemas de pastos marinos se mantienen en gran medida mediante mecanismos de retroalimentación positiva conocidos como “*positive feedbacks*”, que ocurren porque los pastos marinos ejercen una fuerte influencia en el mantenimiento de condiciones ambientales, tales como la irradiancia, concentración de nutrientes, transparencia del agua, y estabilización del sedimento (dependiendo del entorno, van der Heide *et al.* 2007 Maxwell *et al.* 2016). Estos ecosistemas se consideran bi-estables (Maxwell *et al.* 2016), ya que bajo las mismas condiciones ambientales puede existir un estado con o sin vegetación (estados alternativos; van der Heide *et al.* 2007).

Cambios en la estructura o composición de especies en una pradera de pastos, pueden alterar estos mecanismos y causar transiciones a estados alternativos, a veces de forma rápida e inesperada al alcanzar un punto crítico de transición de estado conocido como “*tipping point*” (van der Heide *et al.* 2007; Maxwell *et al.* 2016). Determinar la cercanía a este punto crítico es difícil, pero en muchos casos cuando el sistema se aproxima a un “*tipping point*”, su recuperación de disturbios menores será cada vez más lenta, fenómeno conocido como desaceleración crítica o “Critical Slowing Down” (CSD; van Nes y Scheffer 2007; Scheffer *et al.* 2015). Un indicador indirecto para inferir si un sistema está cerca de un “*tipping point*”, es medir las tasas de recuperación después de un disturbio menor (Scheffer *et al.* 2009). Si el sistema está cerca de un “*tipping point*”, se espera que estas tasas disminuyan, indicando una menor capacidad para regresar a las condiciones previas al disturbio (Veraart *et al.* 2012).

El pasto *T. testudinum* es la especie clímax en el proceso de sucesión, y domina en las praderas de pastos marinos del Caribe (van Tussenbroek *et al.* 2014). Además, es una especie importante para mantener los mecanismos de “*positive feedbacks*” en estas praderas, como la estabilización y persistencia del sedimento (Cruz-Palacios y van Tussenbroek 2005); particularmente importante, en zonas costeras expuestas a eventos como huracanes y tormentas tropicales (van Tussenbroek *et al.* 2008). Entre los efectos de estos fenómenos meteorológicos se encuentra el entierro de áreas de la pradera, e incluso mortalidad de haces de pastos y algas rizofíticas por sedimentación (Cruz-Palacios y van Tussenbroek 2005). Sin embargo, a diferencia de otras especies de pastos marinos en las lagunas arrecifales, *T. testudinum* generalmente es resistente al impacto de huracanes (van Tussenbroek *et al.* 2008; 2014), permitiendo así que las praderas de pastos marinos permanezcan a pesar sufrir estos impactos periódicamente. Sin embargo, praderas dominadas por las otras especies de pastos



marinos, probablemente no tendrán esta resistencia a impactos por disturbios mayores tales como huracanes, tormentas, etc. (van Tussenbroek *et al.* 2008; 2014), razón por la cuál es importante entender los mecanismos que mantienen a las praderas marinas del caribe en etapa clímax dominadas por el pasto marino *T. testudinum*.

En este contexto, el objetivo del estudio fue entender cómo se mantienen las praderas dominadas por *T. testudinum* sujetas a herbivoría por tortugas verdes. Para este fin se determinaron las tasas de recuperación del pasto *T. testudinum* en diferentes niveles de intensidad de herbivoría simulada y se prestó especial atención en las parcelas abandonadas por las tortugas. Se planteó la hipótesis que, ante un régimen de ramoneo por rotación de parcelas (“*rotational grazing*”), las tortugas abandonan las parcelas antes de que ocurra un cambio de estado en el sistema dominado por *T. testudinum*, permitiendo así su recuperación. Es decir, en un régimen de ramoneo por “*rotational grazing*” mantiene la integridad del sistema de praderas marinas, y las tortugas cesan de frecuentar las parcelas antes de sobrepasar un punto de transición o “*tipping point*”.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

El estudio se realizó en la laguna arrecifal del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos, situada en la parte norte del Caribe mexicano (20° 51'44.1"N, 86° 51'46"W; Figura 2). El fondo de esta laguna se caracteriza por la presencia de pastos marinos, los cuales se encuentran arraigados al sedimento calcáreo, favoreciendo así su estabilidad. En zonas específicas de la laguna, las tortugas verdes se alimentan del pasto marino *Thalassia*

*testudinum* mediante el forrajeo por rotación de parcelas. Como sitio de estudio, se eligió una sección de la pradera de pastos marinos a 650 metros de la costa y a una profundidad de 4 metros, y donde se ha registrado la presencia de parcelas de forrajeo abandonadas naturalmente por las tortugas. Las parcelas abandonadas se identifican por tener una menor densidad de haces de *T. testudinum*, así como pastos con hojas más delgadas y cortas, en comparación con áreas de la pradera adyacente sin signos de herbivoría por tortugas. La comunidad de pastos marinos en el sitio de estudio, está dominada principalmente por el pasto marino *T. testudinum*, seguido por *Syringodium filiforme*, *Halodule wrightii*, y algas rizofíticas (ver Martínez-López *et al.* 2019 para más detalle del sitio de estudio).

La laguna arrecifal de Puerto Morelos se encuentra dentro de una zona geográfica con trayectorias de tormentas y huracanes, los cuales han impactado las diferentes zonas arrecifales, incluyendo la pradera de pastos marinos (van Tussenbroek *et al.* 2008; Rodríguez-Martínez *et al.* 2010). Los impactos de los huracanes y tormentas sobre los pastos marinos han sido variables; como la pérdida de hojas, raíces y rizomas, sin destruir la pradera, mientras que otros causan daño por erosión o deposición de sedimentos en diferentes áreas de la pradera. Sin embargo, monitoreos a lo largo del tiempo han demostrado que estas praderas en general son resilientes al efecto de tormentas y huracanes (van Tussenbroek *et al.* 2008).

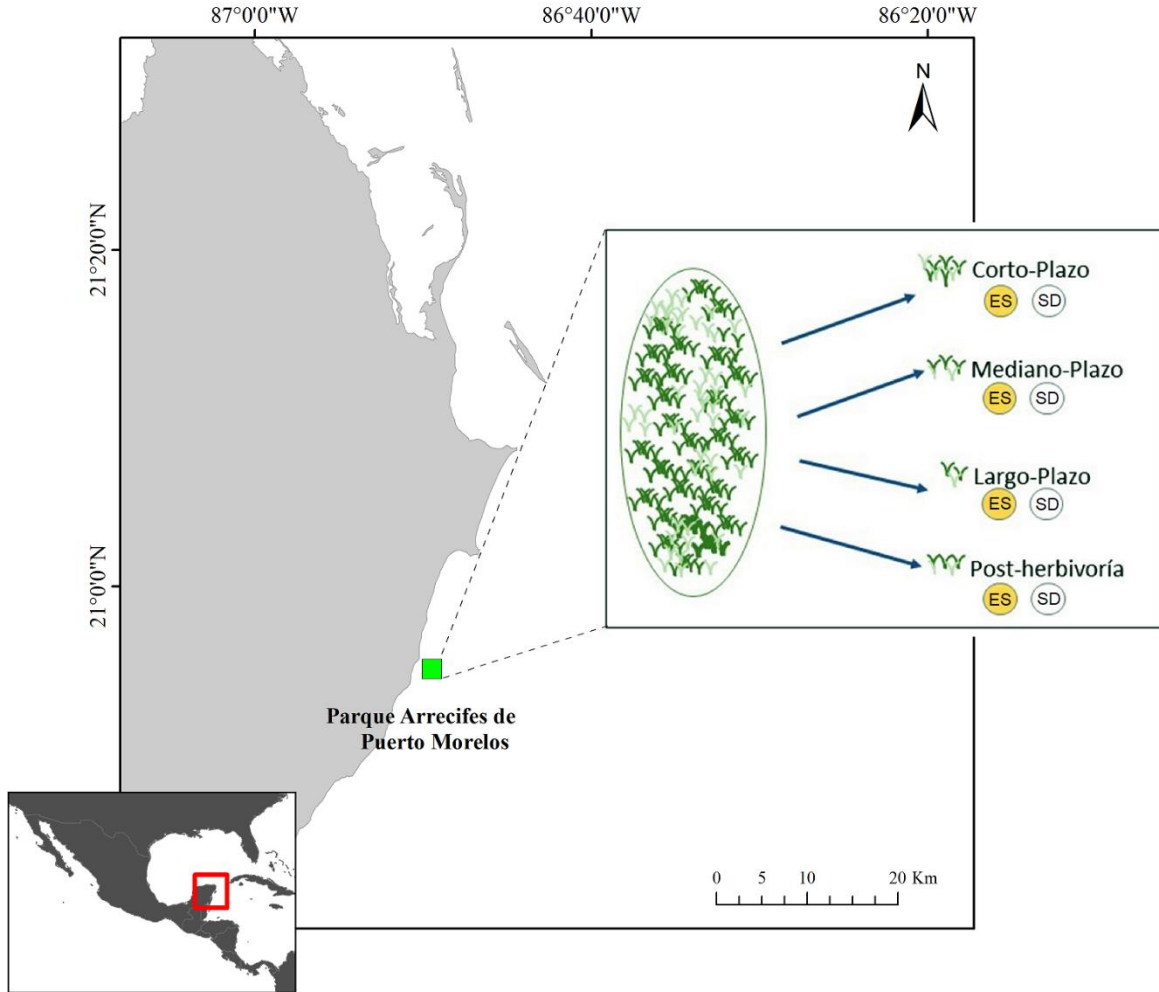


Figura 2. Área de estudio: laguna arrecifal del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos, Caribe Mexicano. El experimento se realizó en una sección de la pradera de pastos dominada por *Thalassia testudinum*, se estableció un gradiente de intensidad de herbivoría por tortugas verdes (recuadro verde) con dos condiciones distintas: naturales o sin disturbio (SD), y con disturbio por entierros experimentales sucesivos (ES).

### *Experimento 1: Recuperación de *Thalassia testudinum* bajo diferentes niveles de intensidad de herbivoría*

Para evaluar las tasas de recuperación del pasto marino *Thalassia testudinum* bajo diferentes niveles de intensidad de herbivoría por tortugas verdes, se estableció un gradiente de herbivoría (tiempo de exposición) simulando el ramoneo natural de estas tortugas. Simular la herbivoría permitió mantener los mismos periodos de tiempo en las parcelas de cada nivel. Se definieron tres periodos diferentes de tiempo de exposición al ramoneo como una aproximación de la intensidad: (1) corto plazo (Cp), que representa 4 meses de exposición, y (2) mediano plazo (Mp), con una exposición durante 8 meses, ambos en áreas sin evidencia de herbivoría previa; (3) largo plazo (Lp), con una exposición de herbivoría simulada durante 8 meses en parcelas abandonadas por las tortugas naturalmente. Considerando que las tortugas en esta laguna arrecifal abandonan las parcelas después de forrajear en ellas por 13 meses hasta > 2 años (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014), el efecto de herbivoría en las parcelas de largo plazo es considerado de una exposición de 21 meses. Se consideró un tratamiento adicional (4) post-herbivoría (Post), que corresponde a parcelas abandonadas naturalmente en la zona de estudio que solo fueron delimitadas (Figura 3).

Para cada nivel de herbivoría se crearon y/o delimitaron 5 parcelas de 6-11 m<sup>2</sup> de área con forma irregular, simulando las parcelas creadas por las tortugas. La herbivoría simulada (“clipping”) consistió en cortar los pastos con tijeras a una altura aproximada de 3 cm por encima del sustrato (tamaño promedio de las hojas de los haces ramoneados por tortugas). El “clipping” fue realizado cada 15-20 días, que es la frecuencia necesaria para que las hojas de *T. testudinum* crezcan  $\geq 5$  cm sobre el sustrato (metodología detallada en Martínez-López *et al.* 2019).

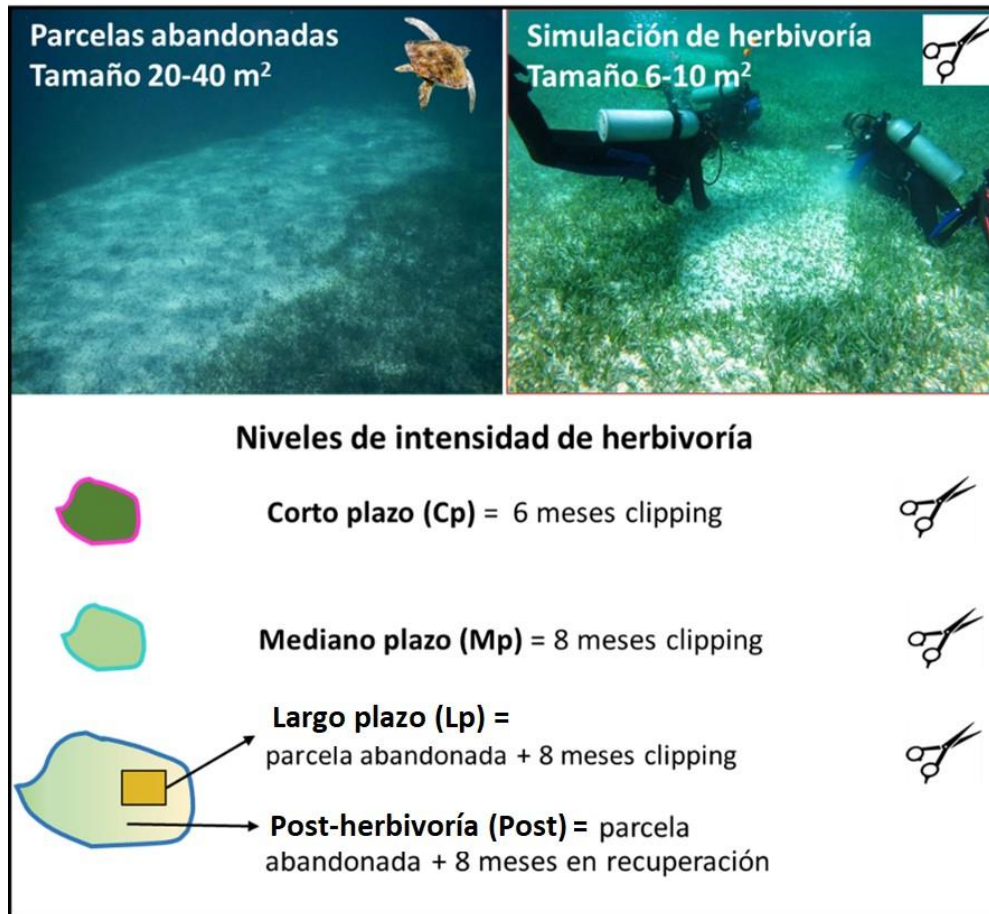


Figura 3. Establecimiento de niveles de herbivoría de tortugas verdes (natural y simulada). Los niveles de herbivoría simulada fueron **Cp** corto plazo ( $n=5$ ), **Mp** mediano plazo ( $n=5$ ), **Lp** largo plazo ( $n=5$ ), y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría ( $n=5$ ). Las réplicas fueron las parcelas naturales o creadas artificialmente al cortar los pastos con tijeras.

En cada parcela, se delimitó un área de 0.07 m<sup>2</sup> por medio de un anillo de PVC con 5 cm de altura, donde se cortaron los rizomas en su circunferencia, y se contaron los números de haces foliares. Estas áreas sirvieron para evaluar las condiciones sin disturbio (SD). Se cortaron las hojas por encima de la vaina muerta dejando intacto el meristemo, con la finalidad de estandarizar las condiciones foliares con el Experimento 2. El número de haces

de *T. testudinum* se registró en cuatro periodos de tiempo (cuatro, seis, ocho y diez semanas posteriores a la estandarización de condiciones foliares), y las tasas de recuperación fueron calculadas utilizando la siguiente formula:

$$\text{Tasa} = \frac{\text{densidad de haces (m}^{-2}\text{)tiempo}_n - \text{densidad de haces (m}^{-2}\text{)tiempo}_{n \text{ previo}}}{\text{intervalo entre tiempos}}$$

donde, el **tiempo<sub>n</sub>** representa el final de cada intervalo de tiempo de recuperación (6, 8 y 10 semanas) y **tiempo<sub>n</sub> previo** el inicio de cada intervalo (4, 6 y 8 semanas). Las tasas de recuperación fueron calculadas para cada una de las cinco réplicas por nivel de herbivoría (área de 0.07 m<sup>2</sup>). Se determinó también la tasa promedio de recuperación al final de las 10 semanas, utilizando la misma fórmula (agrupando todas las semanas).

Para determinar los cambios en la biomasa de *T. testudinum* se colectaron en cuatro réplicas por nivel de herbivoría (seleccionando aquellas con mayor número de haces), dos núcleos (11.2 cm de diámetro y 45 cm de profundidad) al inicio y otro al final del experimento.

### *Experimento 2: Disturbio por entierro*

En cada parcela del experimento 1 descritos previamente, se instaló adicionalmente un tubo de PVC de 0.07 m<sup>2</sup> (30 x 45 cm de altura). Los rizomas de los pastos, al igual que el primer experimento, fueron cortados en la periferia del tubo para evitar la traslocación de carbohidratos u otros productos de fotosíntesis desde los haces adyacentes fuera del tubo. Los tubos de PVC en las parcelas fueron rellenos con sedimento (arena del mismo sitio) a una altura de 10 cm. El entierro fue por pulsos realizados en dos ciclos con una duración de 40 días cada uno y con un intervalo de otros 40 días entre estos, con la finalidad de

inspeccionar el estado de los pastos marinos después del primer entierro, y en caso de que los pastos estuvieran vivos, repetir el entierro, considerando que un estrés repetido generalmente es más severo (Burton *et al.* 2020; Figura 4). Al finalizar el periodo de disturbio repetido, se retiraron los tubos de entierro y se marcaron las áreas con anillos de PVC de 5 cm de altura. Aunque algunos haces foliares de *T. testudinum* sobrevivieron el entierro, estos fueron reducidos y mostraron pérdida de pigmento en comparación de los haces en las áreas sin disturbio, se estandarizaron las condiciones foliares en los tratamientos. Finalmente, se determinaron las tasas de recuperación de haces de *T. testudinum* y los cambios en la biomasa de acuerdo a lo descrito para el experimento 1.

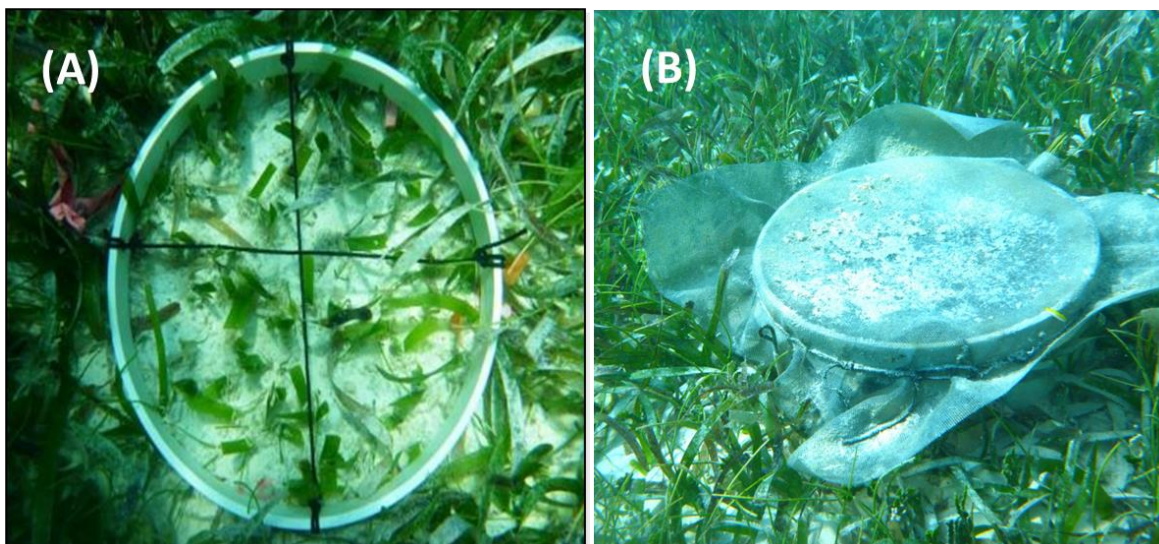


Figura 4. Condiciones utilizadas en experimento 1 y 2 por cada nivel de herbivoría de tortugas verdes. (A) *Condición sin disturbio SD*: área de de  $0.07 \text{ m}^2$  únicamente delimitada con un aro de PVC. (B) *Condición con entierro ES*: disturbio por entierros sucesivos utilizando un tubo de PVC de  $0.07 \text{ m}^2$  (30 x 45 cm de altura). Se usó una malla encima para contener la arena y mantener la altura a 10 cm por encima del nivel del sedimento.

### *Análisis estadísticos*

Para ambos experimentos se obtuvieron los promedios  $\pm$  DE para cada variable en cada uno de los niveles de herbivoría. Previo a la realización de las pruebas estadísticas se evaluó la normalidad y homocedasticidad de todos los datos.

Para el experimento 1 (sin disturbio, SD), se analizaron por medio de un ANOVA de una vía las diferencias en las tasas de recuperación promedio de *T. testudinum* entre los niveles de herbivoría al finalizar el experimento (10 semanas). Para el experimento 2 (entierro, ES), debido a que no se cumplieron los supuestos de normalidad, se realizó una prueba ANOVA de una vía basada en rangos (Kruskal-Wallis) para analizar las tasas de recuperación de *T. testudinum* en los diferentes niveles de herbivoría. Se realizaron las comparaciones múltiples pareadas *a posteriori* utilizando el método de Dunn para identificar los niveles de herbivoría que dieron las diferencias.

Se realizó además un modelo lineal generalizado (GLM) para evaluar el efecto de los niveles de herbivoría, y las condiciones con y sin disturbio, así como su interacción sobre la biomasa total (la suma de la biomasa arriba y por debajo del sustrato, g de peso seco m<sup>-2</sup>) de *T. testudinum* al final de los dos experimentos. Para el modelo se utilizó una distribución Gamma con enlace logarítmico (log), y se realizaron las comparaciones múltiples con el método de tukey.

Adicionalmente, se calculó el cambio en la biomasa total (en % de biomasa) entre el inicio y final de cada experimento. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados con los paquetes estadísticos Rstudio (R Core Team 2018), Statistica (8.0 StatSoft



Power Solutions, Inc.) y Sigma Plot 11.0 (Systat software, Inc.) utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS

### *Experimento 1: Recuperación de *Thalassia testudinum* bajo diferentes niveles de intensidad de herbivoría*

La tasa promedio de recuperación de haces de *Thalassia testudinum*, al finalizar la manipulación, no mostró diferencias significativas entre los diferentes niveles de herbivoría (ANOVA,  $F_3 = 2.176$ ,  $p > 0.05$ ). Sin embargo, el nivel 3 (Lp, abandonado + 8 meses clipping) mostró una tasa promedio de recuperación menor al resto de los niveles de herbivoría, con una tasa promedio de  $1.90 \pm 3.10$  haces  $m^{-2} \text{ sem}^{-1}$  (Figura 5 A y B, Tabla 1). Se registró una tendencia positiva en las tasas de recuperación de *T. testudinum* en el nivel de Post-herbivoría en recuperación (Post), mostrando la mayor tasa promedio de recuperación de haces con  $11.90 \pm 9.06$  haces  $m^{-2} \text{ sem}^{-1}$ .

Tabla 1. Valores promedio ( $\pm$  DE) del pasto *Thalassia testudinum* en el experimento 1 SD. Se incluye la densidad de haces ( $\text{m}^{-2}$ ), tasas de recuperación (haces  $\text{m}^{-2}$  semana $^{-1}$ ), biomasa total al inicio y al final del experimento (peso seco  $\text{gr m}^{-2}$ ), y su porcentaje de cambio (%). Los niveles de intensidad de herbivoría simulada fueron, de **Cp** corto plazo (n=5), **Mp** mediano plazo (n=5), **Lp** largo plazo (n=5), y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (n=5). Los tiempos de recuperación corresponden a las semanas 6, 8 y 10 después de la estandarización de haces foliares.

Intensidad	Densidad de haces ( $\text{m}^{-2}$ )				Tasa de recuperación (haces $\text{m}^{-2}$ semana $^{-1}$ ) <sup>1)</sup>			Biomasa total ( $\text{g m}^{-2}$ )		Biomasa Final
	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Inicial	Final	(%)
	4	6	8	10	6	8	10			
Corto			760 $\pm$	780 $\pm$				781.73 $\pm$	522.23 $\pm$	
plazo	722 $\pm$ 213	740 $\pm$ 218	231	245	8.57 $\pm$ 7.80	10.00 $\pm$ 11.95	10.0 $\pm$ 15.54	247.22	290.60	-33.08
Mediano			542 $\pm$	563 $\pm$					414.52 $\pm$	
plazo	494 $\pm$ 172	511 $\pm$ 170	184	185	8.57 $\pm$ 7.81	15.71 $\pm$ 15.48	10.00 $\pm$ 8.14	579.80 $\pm$ 32.12	164.11	-27.13
Largo								169.86 $\pm$	144.47 $\pm$	
plazo	151 $\pm$ 82	154 $\pm$ 84	162 $\pm$ 92	162 $\pm$ 92	1.43 $\pm$ 3.19	4.29 $\pm$ 6.38	0.00 $\pm$ 0.00	114.50	126.24	-18.33
Post-			551 $\pm$	568 $\pm$				299.64 $\pm$	314.58 $\pm$	
herbivoría	497 $\pm$ 146	531 $\pm$ 171	181	178	17.14 $\pm$ 16.44	10.00 $\pm$ 11.95	8.57 $\pm$ 7.82	209.63	114.63	74.99

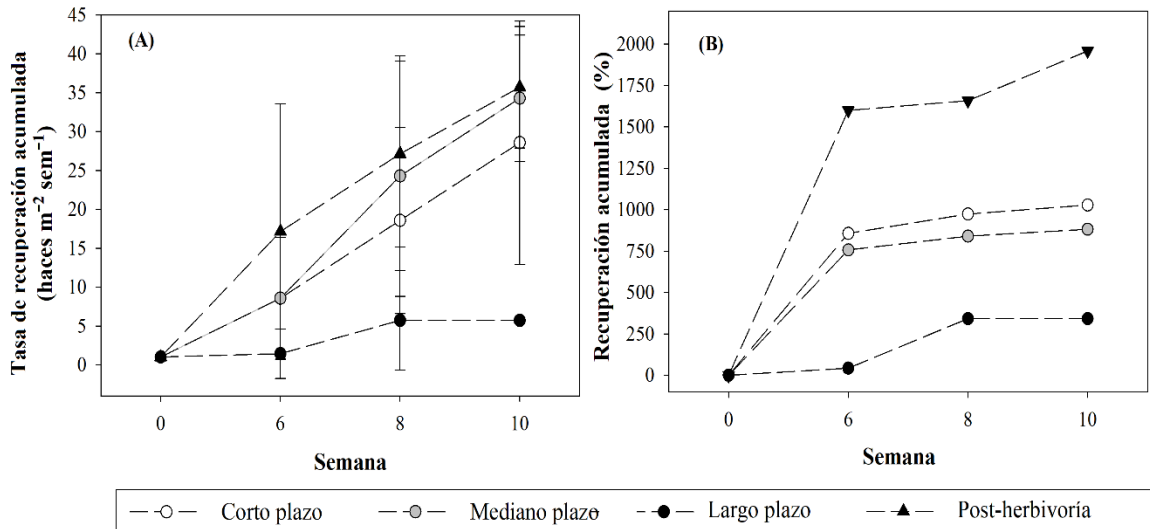


Figura 5. Recuperación del pasto *Thalassia testudinum* en experimento 1 (SD). (A) Tasa de recuperación acumulada haces m<sup>-2</sup> sem<sup>-1</sup> ( $\pm$  DE), y (B) porcentaje de recuperación acumulada %. Los niveles de herbivoría simulada son: **Cp** corto plazo, **Mp** mediano plazo, **Lp** largo plazo, y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas).

Con respecto a la biomasa total de *Thalassia testudinum* (por arriba y debajo del sustrato g peso seco m<sup>-2</sup>), los niveles de herbivoría de corto y mediano plazo, así como el nivel de largo plazo, registraron una disminución en la biomasa total entre el 18 al 33% (Figura 6). En cambio, en el nivel de post-herbivoría (parcelas naturalmente abandonadas por las tortugas) la biomasa total incrementó, con un 75% más con respecto a su biomasa inicial ( $299.64 \pm 209.63$  y  $314.58 \pm 114.63$  g peso seco m<sup>-2</sup> al inicio y final respectivamente).

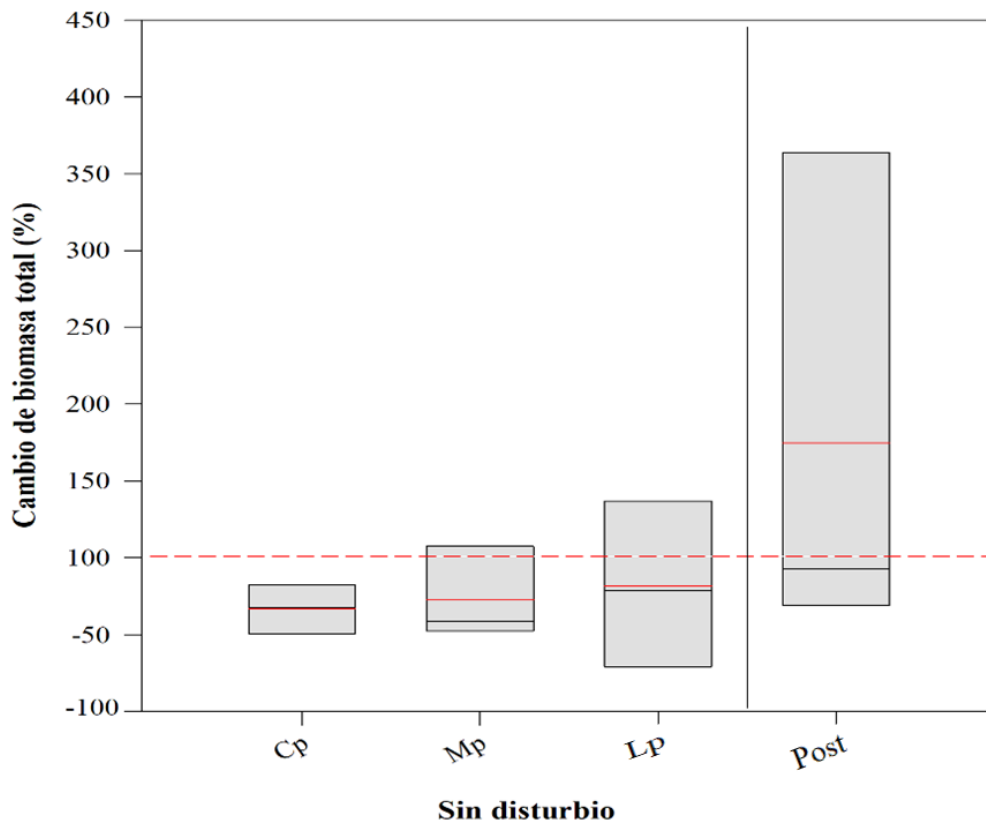


Figura 6. Porcentajes de cambio (%) en la biomasa total del pasto *Thalassia testudinum* en condiciones sin disturbio (SD). La línea roja punteada representa la biomasa de referencia (inicial = 100%), la línea roja solida es la media y la línea negra solida la mediana. Los niveles de herbivoría simulada son: **Cp** corto plazo, **Mp** mediano plazo, **Lp** largo plazo, y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas).

### *Experimento 2: Disturbio por entierro*

A diferencia de las condiciones sin disturbio en el experimento 1, la tasa promedio de recuperación de *Thalassia testudinum* en los tratamientos con entierros sucesivos (ES) mostró diferencias significativas de acuerdo al nivel de herbivoría ( $H_3 = 9.603$ ,  $p < 0.05$ ).

Después de 10 semanas de concluir el entierro se registró que la tasa promedio de recuperación de *T. testudinum* fue significativamente mayor en las parcelas de corto y mediano plazo de herbivoría (Figs. A y B), en comparación con las tasas de recuperación registradas en el nivel de largo plazo ( $p < 0.05$  para ambos casos). En este último nivel, la tasa promedio de recuperación fue de  $0.48 \pm 1.06$  haces  $m^{-2} \text{ sem}^{-1}$  (Tabla 2). El caso más notorio fue la respuesta diferencial de *T. testudinum* en las parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas (i.e. nivel post-herbivoría) al considerar las condiciones sin disturbio y con entierro. En este nivel y con entierro, la tasa promedio de recuperación de haces ( $3.81 \pm 5.98$  haces  $m^{-2} \text{ sem}^{-1}$ ) disminuyó con respecto a los niveles de corto y mediano plazo, y fue más cercana a la registrada para el nivel de largo plazo sin ser estas diferencias significativas (Figura 7).

Tabla 2. Valores promedio ( $\pm$  DE) del pasto *Thalassia testudinum* en el experimento 2 (con entierro ES). Se incluye la densidad de haces ( $m^{-2}$ ), tasas de recuperación (haces  $m^{-2}$  semana $^{-1}$ ), biomasa total al inicio y al final del experimento (peso seco gr  $m^{-2}$ ), y su porcentaje de cambio (%). Los niveles de intensidad de herbivoría simulada fueron, de **Cp** corto plazo (n=5), **Mp** mediano plazo (n=5), **Lp** largo plazo (n=5), y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (n=4). Los tiempos de recuperación corresponden a las semanas 6, 8 y 10 después de la estandarización de haces foliares.

Intensidad	Densidad de haces ( $m^{-2}$ )				Tasa de ruperación (haces $m^{-2}$ semana $^{-1}$ )			Biomasa total ( $g m^{-2}$ )		Biomasa Final
	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Semana	Inicial	Final	(%)
	4	6	8	10	6	8	10			
			174 $\pm$	189 $\pm$	1.43 $\pm$ 3.19	5.71 $\pm$ 9.31	7.14 $\pm$ 5.05	781.43 $\pm$	225.13 $\pm$	-70.22
Corto plazo	160 $\pm$ 143	163 $\pm$ 144	155	156				247.22	117.68	
Mediano								579.80 $\pm$	106.28 $\pm$	
plazo	54 $\pm$ 40	71 $\pm$ 44	74 $\pm$ 42	89 $\pm$ 45	8.57 $\pm$ 5.97	1.43 $\pm$ 3.19	7.14 $\pm$ 8.74	32.12	95.87	-81.18
								169.86 $\pm$		
Largo plazo	17 $\pm$ 23	20 $\pm$ 24	20 $\pm$ 24	20 $\pm$ 24	1.43 $\pm$ 3.19	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	114.50	1.75 $\pm$ 3.50	-99.46
Post-	40 $\pm$ 60	40 $\pm$ 60	43 $\pm$ 61	45 $\pm$ 59				299.64 $\pm$	26.30 $\pm$ 25.22	-85.87
herbivoría					0.00 $\pm$ 0.00	1.43 $\pm$ 3.20	1.43 $\pm$ 3.20	209.63		

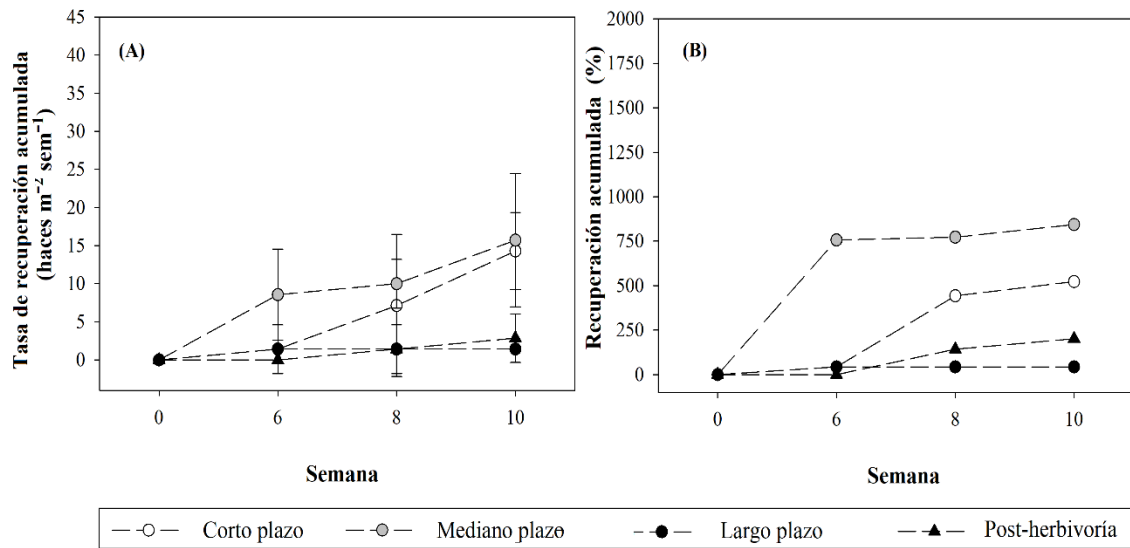


Figura 7. Recuperación del pasto *Thalassia testudinum* en experimento 2 (con entierro ES). (A) Tasa de recuperación acumulada haces m<sup>-2</sup> sem<sup>-1</sup> ( $\pm$  DE), y (B) porcentaje de recuperación acumulada %. Los niveles de herbivoría simulada son: **Cp** corto plazo, **Mp** mediano plazo, **Lp** largo plazo y un nivel adicional **Rec** de recuperación (parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas).

La biomasa total de *Thalassia testudinum* (por arriba y debajo del sustrato g peso seco m<sup>-2</sup>) al finalizar el experimento con entierro, disminuyó en todos los niveles de herbivoría. En los niveles de corto y mediano plazo, la biomasa total que se perdió fue entre el 70 y 81% de la biomasa total inicial. Las parcelas del nivel de post-herbivoría mostraron también una disminución del 85% de la biomasa total ( $299.64 \pm 209.63$  y  $26.30 \pm 25.22$  g peso seco m<sup>-2</sup> al inicio y final respectivamente). El nivel de largo plazo tuvo la mayor pérdida de biomasa total con un 99% (Figura 8).

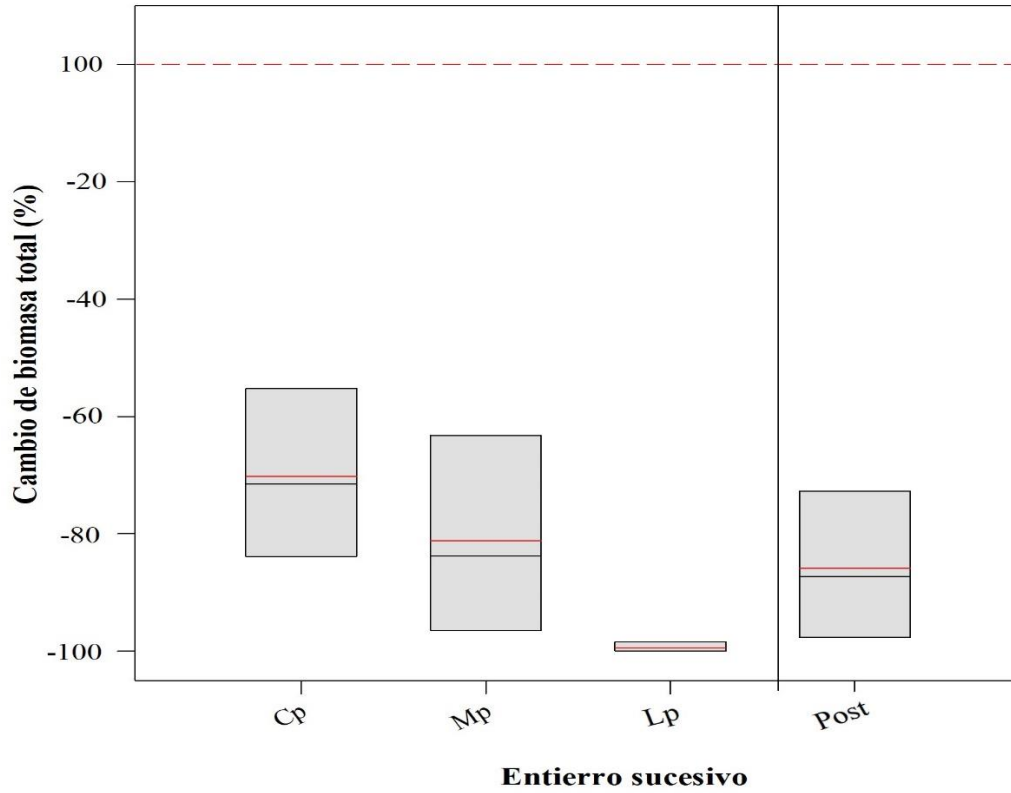


Figura 8. Porcentajes de cambio (%) en la biomasa total del pasto *Thalassia testudinum* en condiciones con entierro al término del experimento 2 (ES). La línea roja punteada representa la biomasa de referencia (inicial = 100%), la línea roja sólida es la media y la línea negra sólida la mediana. Los niveles de herbivoría simulada son: **Cp** corto plazo, **Mp** mediano plazo, **Lp** largo plazo, y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas).



El análisis GLM para analizar el efecto de los niveles de herbivoría y la condición (sin disturbio o con entierro) sobre la biomasa total de *T. testudinum* (encima y debajo del sustrato g peso seco m<sup>-2</sup>) al finalizar los experimentos, presentó una reducción en la desviación residual (16.151, gl = 24), en comparación con la desviación nula (62.571, gl = 31), indicando un buen ajuste a los datos. Las comparaciones múltiples mostraron diferencias significativas en la biomasa total entre la condición sin disturbio y con entierro solo para los niveles de largo plazo y nivel de post-herbivoría (Figura 9). En el nivel de post-herbivoría bajo la condición con entierro, la biomasa total de *T. testudinum* disminuyó, manteniendo solo el 14% de la biomasa total original, a diferencia del incremento del 75% para el mismo nivel, pero en la condición sin disturbio (p<0.01). En el nivel de largo plazo, la biomasa total fue significativamente menor entre ambas condiciones ( $169.86 \pm 114.50$  vs  $1.75 \pm 3.50$  g peso seco m<sup>-2</sup>; p<0.0001), y respecto al resto de los niveles de herbivoría en la condición de entierro (p<0.01). Cabe destacar que el pasto *T. testudinum* en el nivel de largo plazo, tuvo tres réplicas con menos de 0.0001 gr de biomasa (Tabla 2, Figura 9).

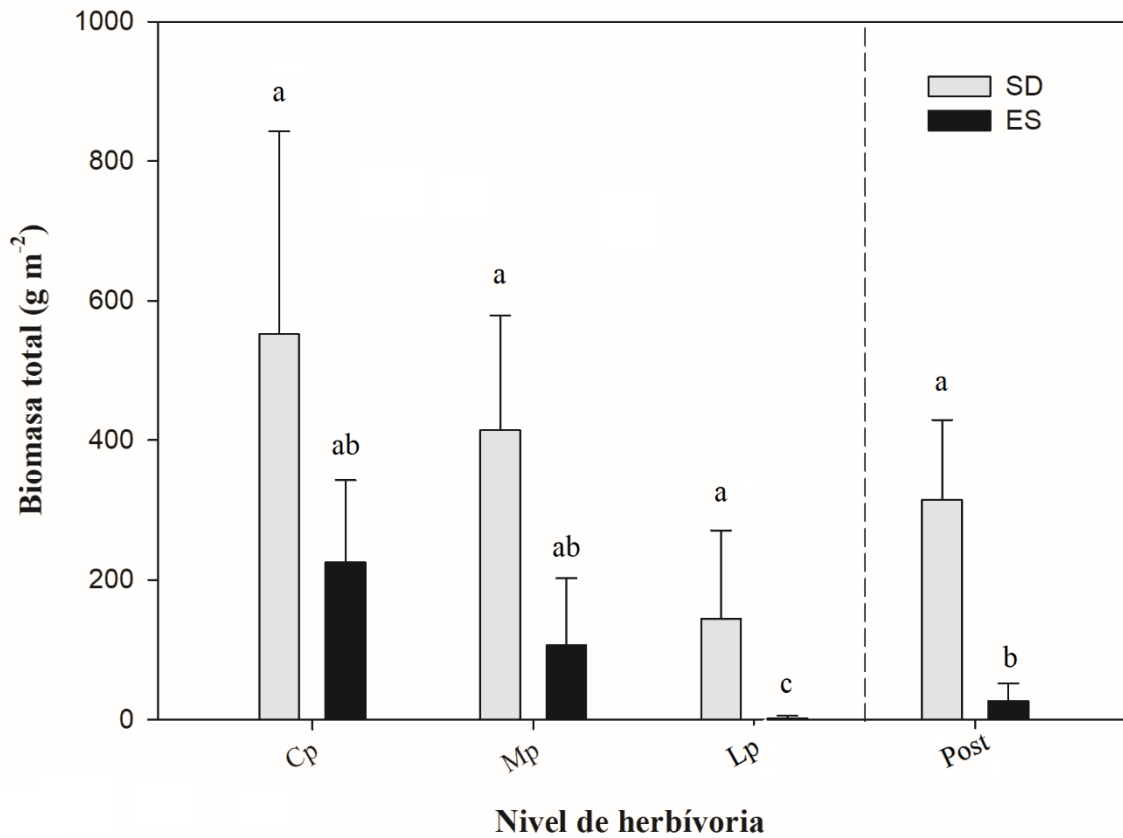


Figura 9. Valores promedio ( $\pm$  DE) de la biomasa total (g peso seco g m<sup>-2</sup>) del pasto *Thalassia testudinum* al finalizar la manipulación de los experimentos y al cabo de 10 semanas de recuperación para la condición natural sin disturbio (SD), y la condición con disturbio (ES). Los niveles de herbivoría simulada son: **Cp** corto plazo, **Mp** mediano plazo, **Lp** largo plazo, y un nivel adicional **Post** de post-herbivoría (parcelas abandonadas naturalmente por las tortugas). Diferencias estadísticas mostradas por diferentes letras ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSIÓN

Los cambios de estado en sistemas naturales pueden ocurrir de forma repentina y abrupta cuando las condiciones biológicas y ambientales son modificadas, principalmente aquellas relacionadas con mecanismos de retroalimentación, o “positive feedbacks”, del propio ecosistema (Carr *et al.* 2010; van der Heide *et al.* 2007). Se ha sugerido que estos cambios de estado pueden ser promovidos por la herbivoría de tortugas verdes cuando ocurre de forma intensiva (Christianen *et al.* 2021). Los resultados de este estudio concuerdan con el patrón que se esperaría encontrar en un sistema antes de una transición hacia un estado alternativo siguiendo el concepto teórico de “Critical Slowing Down (CSD)” (Scheffer *et al.* 2009).

La idea fundamental del concepto de CSD consiste en que, conforme un sistema se aproxima a un punto crítico hacia un cambio de estado, su recuperación es más lenta (Scheffer *et al.* 2009; Scheffer *et al.* 2012), lo que primeramente se comprobó con las tasas de recuperación en las parcelas aún sin aplicar el disturbio. La disminución de la tasa de recuperación en el nivel de largo plazo, en comparación de los niveles de corto y mediano plazo, y cuyas tasas de recuperación eran comparables, evidenció que en el nivel de largo plazo la pradera estaba acercándose a un “tipping point”. Al aplicar el disturbio menor de entierro sucesivo, este nivel pasó el umbral del “tipping point” al presentar ausencia de recuperación, y pérdida casi total de biomasa de *T. testudinum*.

### *Herbivoría de rotación “rotational grazing”*

La estrategia de alimentación por rotación de parcelas, ocurre en praderas extensas cuando las tortugas verdes se alimentan de especies de pasto competitivamente dominantes y de crecimiento lento, como ocurre típicamente en el Caribe con *Thalassia testudinum* (Bjorndal 1980; Zieman; 1984; Christianen *et al.* 2021). Los tratamientos de corto y mediano plazo

representan escenarios en los que las tortugas continúan frecuentando las parcelas bajo esta estrategia de alimentación. Una vez cesado la herbivoría, y sin aplicar el disturbio, *T. testudinum* presentó tasas de recuperación similares entre estos dos niveles de herbivoría, a pesar de que la densidad de haces y la biomasa subterránea fue menor en el tratamiento de 8 meses de herbivoría (Mp), indicando la resiliencia de esta especie al ramoneo de tortugas. El nivel de post-herbivoría (Post) representa una pradera que fue recientemente ramoneada por tortugas, pero que dejaron de visitar, por falta de crecimiento de las hojas (por ende, capacidad fotosintética) y reservas de carbohidratos en los rizomas (Lacey *et al.* 2014; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Martínez López *et al.* 2019). En este nivel, se observó que, una vez que las tortugas abandonan las parcelas, inicia la recuperación de *T. testudinum*, que para este estudio fue un incremento del 75% de su biomasa total al cabo de 19-20 meses, considerando el tiempo de recuperación a partir de la delimitación de estas parcelas.

En el tratamiento de largo plazo, al seguir cortando las hojas en estas parcelas recién abandonadas, se esperaba simular una condición en las praderas en las que la rotación por parcelas se pierde, cuando la densidad de tortugas aumenta, y no se desplazan a una pradera cercana para abrir nuevas zonas de herbivoría, tal como se reportó en el sitio Akumal del estudio de Molina-Hernández y van Tussenbroek (2014). Bajo estas condiciones de herbivoría intensiva, la pérdida de hojas, y eventualmente de biomasa de rizomas, disminuyen respectivamente la capacidad fotosintética de los pastos, y su principal almacenamiento de sustancias de reserva (Lacey *et al.* 2014; Martínez-López *et al.* 2019). La herbivoría por tortugas verdes tiene un efecto directo sobre la longitud de las hojas y biomasa por encima del sustrato, y a largo plazo, aunque de forma indirecta, sobre la biomasa

subterránea, compuesta por rizomas, raíces y vaina (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014; Lacey *et al.* 2014; Martínez-López *et al.* 2019); por ello los cambios en la biomasa de rizomas son considerados como un buen indicador del estado de praderas de pastos marinos (Vonk *et al.* 2015), por ser éstos una reserva energética importante cuando disminuye la disponibilidad de luz para los pastos. En zonas templadas, por ejemplo, el contenido de carbohidratos solubles en rizomas es indicativo del crecimiento exitoso de trasplantes del pasto marino *Zostera noltii* durante el invierno (Govers *et al.* 2014; Soisson *et al.* 2016). En este estudio, la pérdida de biomasa fue mayor conforme aumentó el nivel de intensidad de herbivoría, siendo más severo en la condición con disturbio por entierros sucesivos para todos los niveles, y principalmente en el nivel de largo plazo (Lp) que tuvo la menor biomasa total (encima y debajo del sustrato) de *T. testudinum*.

#### *Tendencias generales de recuperación*

Las tasas de recuperación de haces foliares de *T. testudinum* posteriores al disturbio por entierro, mostraron en general una recuperación menor que los pastos que no fueron sujetos a disturbio; sin embargo, este efecto fue menor bajo condiciones de intensidad de herbivoría moderada (niveles de corto y mediano plazo). Particularmente, *T. testudinum* expuesta al nivel de herbivoría de largo plazo no mostró una recuperación de haces después del disturbio por entierro, que coincide con una pérdida de biomasa subterránea de más del 99%, con 3 de las 5 réplicas sin biomasa subterránea viva al finalizar el disturbio; por lo que se puede concluir que bajo estas condiciones se llegó al colapso de la pradera dominada por *T. testudinum*, induciendo un cambio de estado. Tal cambio de estado bajo un régimen de

herbivoría persistente, fue registrado en Bermuda por Fourqurean *et al.* (2019), Indonesia por Christianen *et al.* (2014), y Akumal, Mexico por Molina-Hernández y van Tussenbroek (2014).

El contraste de recuperación foliar y de biomasa de *T. testudinum* entre condiciones sin y con entierro en las parcelas abandonadas (Post) resulta interesante. Sin entierro, estas parcelas mostraron las tasas de recuperación de haces foliares superiores (con incremento en biomasa total) a las de los otros niveles de herbivoría; mientras que con entierro registraron tasas de recuperación muy reducidas, apenas por arriba de las tasas registradas en las parcelas de largo plazo, acompañado también por pérdida de biomasa. Cabe recordar que el tratamiento de largo plazo consistió en continuar cortando las hojas en parcelas ya abandonadas por las tortugas. Considerando esto, se puede concluir que las parcelas abandonadas por las tortugas (Post) están cercanas al punto de sobrepasar el umbral a partir del cual, cualquier disturbio podrá causar un cambio de estado del sistema; ya sea, por entierro sucesivo o continuación de corte (“clipping”) de las hojas. Es notorio que las tortugas abandonan parcelas dominadas por *T. testudinum* donde ramonearon por > 1 a 2 años (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014), justo cuando estos están cercanos a un punto de inflexión hacia un cambio de estado. En los casos en que las praderas escasas, y el ramoneo por tortugas es persistente, porque ya no pueden abrir nuevas áreas para alimentarse, estas praderas colapsan (p.ej. Bermuda, Fourqurean *et al.* 2010, 2019), o sufren un cambio de comunidad vegetativa en presencia de otras especies de pastos marinos (p.ej. Akumal; Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). El cambio en la comunidad tiende hacia especies de crecimiento rápido que carecen de rizomas gruesos y reservas energéticas suficientes (Christianen *et al.* 2021), lo que hace a las praderas más susceptibles ante disturbios futuros. El hecho de que las tortugas abandonen

las parcelas justamente antes de llegar al umbral de un cambio de fase, probablemente ha facilitado la coexistencia de este pasto marino y la tortuga *C. mydas*, promoviendo así el uso de su nombre coloquial de “hierba tortuga”. En ese sentido, se sabe que *T. testudinum* posee características que reducen el daño por herbivoría, como el crecimiento clonal, su sistema de rizomas y raíces (reservas energéticas), así como la regeneración rápida de sus hojas (Valentine y Duffy 2006; Valentine y Heck 2020). Bajo herbivoría moderada por tortugas verdes, *T. testudinum* presenta flores y frutos más cortos que se posicionan más cerca del sustrato, y los frutos no son ingeridos por las tortugas, de esta manera, se mantiene una producción estable de frutos y semillas, y no se altera la capacidad de recolonización de las praderas por medio de semillas (van Tussenbroek y González Morales 2017). Los patrones de ramoneo anteriormente descritos, minimizan el impacto de la herbivoría constante, permitiendo la coexistencia de *T. testudinum* y las tortugas verdes, así como su permanencia en el tiempo.

#### *Consideraciones sobre el diseño experimental*

El concepto teórico de “critical slowing down” (CSD) ha sido propuesto como un indicador de señales tempranas de un ecosistema cercano al colapso, y aunque la evidencia empírica en ecología aún es escasa, su uso ya ha sido planteado para ecosistemas de pastos marinos (Carr *et al.* 2012; Soissons *et al.* 2014; El-Hacen *et al.* 2018). Este trabajo aporta evidencia empírica de la ocurrencia de “critical slowing down” en praderas del Caribe dominadas por *Thalassia testudinum* cuando están bajo herbivoría intensiva por tortugas verdes (simulada en este estudio), así como una disminución en las tasas de recuperación de sus haces foliares cuando la intensidad de herbivoría aumenta, haciendo a esta especie vulnerable frente a

otros estresores. Este estudio recomienda considerar el tamaño del área sobre la cual se genera el disturbio, debido a que la recuperación puede estar mediada en parte por las interacciones de competencia y de facilitación con otras especies dependiendo de la escala espacial (El-Hacen *et al.* 2018). Se recomienda tomar en cuenta el aislamiento de las áreas experimentales sobre las que se generará el disturbio. Los pastos marinos son especies clonales, por lo que su respuesta también dependerá de qué tan bien integrados están a través del rizoma horizontal, especies con mejor integración clonal (rizomas intactos) proveen soporte a aquellos haces sujetos a estrés (Sim Ooi *et al.* 2011). En lo que respecta a la herbivoría, en este estudio se simularon áreas comparables a los tamaños mínimos de parcelas de ramoneo, con tamaño mucho mayor al generalmente usado en experimentos de herbivoría artificial (que suelen ser de 1x1m o menor; Holzer y McGlathery 2016).

Ante el aumento de tortugas verdes y las amenazas actuales sobre los ecosistemas de pastos marinos, se esperan más praderas con altas densidades de tortugas verdes (Meylan *et al.* 2022), lo que eventualmente puede llevar a las tortugas a cambiar sus estrategias de alimentación como lo es la rotación de parcelas (Molina-Hernández y van Tussenbroek 2014). La pérdida de este tipo de alimentación, y con ello más praderas bajo herbivoría persistente, pueden llevar a las praderas de pastos a un punto de transición hacia un estado alternativo con otras características, o incluso sin pastos marinos (Fourqurean *et al.* 2019; Christianen *et al.* 2021). Evaluar si un sistema está bajo estrés extremo, cercano a un colapso, o cambio de estado, resulta difícil, en especial en aquellos sistemas que se mantienen por mecanismos de retroalimentación positiva, como los ecosistemas de pastos marinos, ya que estos mecanismos mantienen el sistema constante hasta llegar al “tipping point”. Medir las tasas de recuperación después de un disturbio, resulta una alternativa de indicador para



aportar información sobre la vulnerabilidad de las praderas de pastos en futuros escenarios, donde la interacción entre pastos marinos y tortugas verdes sea mayor.

## AGRADECIMIENTOS

Guadalupe Barba Santos, Hazel M. Canizales Flores, Hunahpu Marcos por el apoyo en el trabajo en campo y procesamiento de muestras y a José de Jesús Adolfo Tortolero por la asesoría en el análisis de datos.

## LITERATURA CITADA

- Bjorndal, KA. 1980. Nutrition and Grazing Behavior of the Green Turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*. 56: 147- 154. <https://doi.org/10.1007/BF00397131>
- Burton, PJ, A Jentsch, LR Walker. 2020. The ecology of disturbance interactions. *BioScience*. 70 (10): 854 – 870. DOI:10.1093/biosci/biaa088
- Carr J, PD´Odorico, K McGlathery, P Wiberg. 2010. Stability and bistability of seagrass ecosystems in shallow coastal lagoons: Role of feedbacks with sediment resuspension and light attenuation. *Journal of Geophysical Research*. 115, G03011. DOI: 10.1029/2009JG001103
- Carr J, PD´Odorico, K. McGlathery, P Wiberg. 2012. Modeling the effects of climate change on eelgrass stability and resilience: future scenarios and leading indicators of collapse. *Marine Ecology Progress Series* 448:289-301. DOI: 10.3354/meps09556
- Christianen, MJA, PMJ Herman, TJ Bouma, LP Lamers, MM van Katwijk, T van der Heide, PJ Mumby, BR Silliman, SL Engelhard, M van de Kerk, W Kiswara, J van de Koppel. 2014. Habitat collapse due to overgrazing threatens turtle conservation in marine protected areas. *Proceedings of The Royal Society B*. 281: 20132890. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.2890>
- Christianen, MJA, MM van Katwijk, BI van Tussenbroek, JF Pagès, K Ballorain, N Kelkar, R Arthur and T Alcoverro. 2021. A dynamic view of seagrass meadows in the wake of successful green turtle conservation. *Nature Ecology and Evolution*. 5, 553–555. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01433-z>
- Cruz-Palacios V, BI van Tussenbroek. 2005. Simulation of hurricane-like disturbances on a Caribbean seagrass bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 324: 44-60. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.04.002>
- El-Hacen, EM, TJ Bouma, GS Fivash, AA Sall, T Piersma, H Oloff, LL Govers. 2018. Evidence for “critical slowing down” in seagrass: a stress gradient experiment at the

- southern limit of its range. *Scientific Reports*. 8(1): 17263. doi: 10.1038/s41598-018-34977-5
- Fourqurean JW, SA Manuel, KA Coates, WJ Kenworthy, SR Smith. 2010. Effects of excluding sea turtle herbivores from a seagrass bed: Overgrazing may have led to loss of seagrass meadows in Bermuda. *Marine Ecology Progress Series*. 419: 233 – 232. DOI: 10.3354/meps08853
- Fourqurean J W, SA Manuel, KA Coates, SC Massey, WJ Kenworthy. 2019. Decadal monitoring in Bermuda show a widespread loss of seagrasses attributable to overgrazing by the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Estuaries and Coasts*. 42: 1524-1540. DOI:10.1007/s12237-019-00587-1
- Govers, LL, W Suykerbuyk, JHT Hoppenreijns, K Giesen, TJ Bouma, MM van Katwijk. 2014. Rhizome starch as indicator for temperate seagrass winter survival. *Ecological Indicators*. 49: 53 – 60. DOI: 10.1016/j.ecolind.2014.10.002
- Holzer, KK, KJ McGlathery. 2016. Cultivation grazing response in seagrass may depend on phosphorus availability. *Marine Biology*. 163: 88. DOI: 10.1007/s00227-016-2855-5
- Kaladharan P, KP Saidkoya, VA Kunhikoya, A Anasukoya. 2013. Turtle herbivory of seagrass ecosystems in the Lakshadweep atolls: concerns and need for conservation measures. *Journal of Marine Biological Association of India*. 55 (1): 25-29. doi: 10.6024/jmbai.2013.55.1.01749-04
- Kelkar N, R Arthur, N Marba, T Alcoverro. 2013. Green turtle herbivory dominates the fate of seagrass primary production in the Lakshadweep islands (Indian Ocean). 485: 235-243. doi: 10.3354/meps10406
- Lacey, EA, L Collado-Vides, JW Fourqurean. 2014. Morphological and physiological responses of seagrasses (Alismatales) to grazers (Testudines: Cheloniidae) and the role of these responses as grazing patch abandonment cues. *Rev. Biol. Trop*: 62 (4): 1535-1548. doi: 10.15517/rbt.v62i4.12844.
- McClenachan L, JB Jackson, M JH Newman. 2006. Conservation implications of historic sea turtle nesting beach loss. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 4(6): 290-296. DOI: 10.1890/1540-9295(2006)4[290:CIOHST]2.0.CO;2
- Martínez-López IG, M van Den Akker, L Walk, MM van Katwijk, T van Der Heide and BI van Tussenbroek. 2019. Nutrient availability induces community shift in seagrass meadows grazed by turtles. *PeerJ*. 7:e7570 DOI 10.7717/peerj.7570
- Maxwell, PS, JS Eklöf, MM van Katwijk, KR O'Brien, M de la Torre-Castro, C Boström, TJ Bouma, D Krause-Jensen, RKF Unsworth, BI van Tussenbroek, T van der Heide. 2016. The fundamental role of ecological feedback mechanism for the adaptive management of seagrass ecosystem- a review. *Biol. Rev.* doi: 10.1111/brv.12294
- Meylan, PA, RF Hardy, JA Gray, AB Meylan. 2022. A half-century of demographic changes in a green turtle (*Chelonia mydas*) foraging aggregation during an era of seagrass decline. *Marine Biology*. 169: 74. DOI: 10.1007/s00227-022-04056-5
- Molina-Hernández, AL, BI Van Tussenbroek. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea-turtles. *Marine Ecology Progress Series*. DOI:10.3354/meps11068
- Moran KL, & KA Bjorndal. 2007. Simulated green turtle grazing affects nutrient composition of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Marine Biology*. 150: 1083–1092. DOI: 10.1007/s00227-006-0427-9
- Rodríguez-Martínez RE, F Ruíz-Rentería, B van Tussenbroek, G Barba-Santos, E Escalante-Mancera, G Jordán-Garza, E Jordán-Dahlgren. 2010. Environmental state and

- tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 58(3): 23-43. DOI: 10.15517/rbt.v58i0.20039
- Scheffer M, J Bascompte, WA Brock, V Brovkin, SR Carpenter, V Dakos, H Held, EH van Nes, M Rietkerk, G Sugihara. 2009. Early-warning signals for critical transitions. *Nature*. 461: 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature08227>
- Scheffer M, JSR Carpenter, TM Lenton, J Bascompte, W Brock, V Dakos, J van de Koppel, IA van de Leemput, SA Levin, EH van Nes, M Pascual, J Vandermeer. 2012. Anticipating critical transitions. *Science*. 338: 344–348. DOI: 10.1126/science.1225244
- Scheffer M, S Barette, SR Carpenter, C Folke, AJ Green, M Holmgren, TP Hughes, S Kosten, IA van de Leemput, DC Nepstad, EH van Nes, ETHM Peeters, B Walker. 2015. Creating a safe operating space for iconic ecosystems. *Science*. 347 (6228): 1317-1319.
- Sim Ooi JL, GA Kendrick, KP Van Niel. 2011. Effects of sediment burial on tropical ruderal seagrasses are moderated by clonal integration. *Continental Shelf Research*. 31:1945-1954. DOI:10.1016/j.csr.2011.09.005
- Soisson LM, Q Han, B Li, MM van Katwijk, T Ysebaert, PMJ Herman, TJ Bouma. 2014. Cover versus recovery: Contrasting responses of two indicators in seagrass beds. *Marine Pollution Bulletin*. 87 (1-2): 2011-219. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.07.057
- Soisson LM, B Li, Q Han, MM van Katwijk, T Ysebaert, PMJ Herman, TJ Bouma. 2016. Understanding seagrass resilience in temperate systems: the importance of timing of the disturbance. *Ecological Indicators*. 66. 190 – 198. DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.01.030
- Valentine, JF, JE Duffy. 2006. The central role of grazing in seagrass ecology. En: Larkum, AWD, RJ Orth, y CM Duarte. (Eds.). *Seagrasses: Biology, ecology and conservation* (pp. 463-501). The Netherlands: Springer.
- Valentine, JF, KL Heck Jr. 2020. Herbivory in seagrass meadows: an Evolving paradigm. *Estuaries and Coasts*. DOI:10.1007/s12237-020-00849-3
- van der Heide, T, EH van Nes, GW Geerling, AJP Smolders, TJ Bouma, and MM van Katwijk. 2007. Positive feedbacks in seagrass ecosystems: Implications for success in conservation and restoration. *Ecosystems*. 10: 1311-1322. DOI: 10.1007/s10021-007-9099-7
- Van Nes, EH, M. Scheffer. 2007. Slow recovery from perturbations as a generic indicator of a nearby catastrophic shift. *Am. Nat.* 169: 738–747. DOI: 10.1086/516845
- van Tussenbroek, BI, MG Barba Santos, JK van Dijk, SNM Sanabria Alcázar and ML Téllez Calderón. 2008. Selective elimination of rooted plants from a tropical seagrass bed in a back-reef lagoon: a hypothesis tested by hurricane Wilma (2005). *Journal of Coastal Research*. 24(1): 278-281. DOI:10.2112/06-0777.1
- van Tussenbroek, BI, J Cortés, R Collin, AC Fonseca, PMH Gayle, HM Guzmán, GE Jácome, R Juman, KH Koltés, HA Oxenford, A Rodríguez-Ramírez, J Samper-Villarreal, SR Smith, JJ Tschirky, E Weil. 2014. Caribbean-wide, long-term study of seagrass beds reveals local variations, shifts in community structure and occasional collapse. *PlosOne*. 9(5): e98377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090600>
- van Tussenbroek, IB y LF González Morales. 2017. Gazing by green sea-turtles does not affect reproductive fitness in *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*. 141: 10-16. DOI: 10.1016/j.aquabot.2017.05.003

- Veraart AJ, EJ Faassen, V Dakos, EH van Nes, M Lürling, M Scheffer. 2012. Recovery rates reflect distance to a tipping point in a living system. *Nature*. 481: 357 -359. DOI: 10.1038/nature10723
- Vonk, JA, MJ Christianen, J Stapel, KR O'Brien. 2015. What lies beneath: why knowledge of belowground biomass dynamics is crucial to effective seagrass management. *Ecological Indicators*, 57, 259-267. DOI: 10.1016/j.ecolind.2015.05.008
- Zieman, JC, RL Iverson & JC Ogden. 1984. Herbivory effects on *Thalassia testudinum* leaf growth and nitrogen content. *Marine Ecology Progress Series*. 15: 151-158. <http://www.jstor.org/stable/24815931>.

## **Capítulo 4: A mutualism between unattached coralline algae and seagrasses prevents overgrazing by sea turtles**

### **ABSTRACT**

Seagrass meadows are threatened biodiversity hotspots that provide essential ecosystem services. Green sea turtles may overgraze meadows, further enhancing seagrass decline. However, we observed an unexpected, remarkable recovery of seagrasses in a previously overgrazed meadow with abundant unattached branched coralline algae, suggesting that turtle grazing had ceased. We hypothesize that this recovery is due to an effective grazing-protection mutualism, in which the spiny coralline algae structures protect the seagrass meadows from overgrazing, while the seagrasses protect the algae from removal by currents and waves. Removing coralline algae from recovered seagrass plots caused turtles to resume grazing, while addition of coralline algae to grazed plots caused cessation of grazing. Coralline algae that were placed on bare sand were quickly displaced by wave action, while those placed in grazed or ungrazed seagrass remained. Our experiments demonstrate a grazing-protection mutualism, which likely explains the witnessed recovery of an overgrazed seagrass meadow. To our knowledge, this is the first account of a plant-plant grazing protection mutualism in an aquatic environment. Our findings show that grazing protection mutualisms can be vital for the maintenance and recovery of ecosystems shaped by habitat-structuring foundation species, and highlight the importance of mutualisms in coastal ecosystems. As seagrasses, sea turtles and coralline algae share habitats along tropical shores worldwide, the mutualism may be a global phenomenon. Overgrazing is expected to increase,

and this mutualism adds a new perspective to the conservation and restoration of these valuable ecosystems.

Keywords: Seagrass, coralline algae, sea turtles, protection mutualism, overgrazing, coastal ecosystems, *Thalassia testudinum*, *Neogoniolithon*, plant-plant mutualism

**Publicado:** Leemans L, Martínez I, van der Heide T, van Katwijk MM, van Tussenbroek BI. 2020. A Mutualism Between Unattached Coralline Algae and Seagrasses Prevents Overgrazing by Sea Turtles. *Ecosystems*. DOI: 10.1007/s10021-020-00492-w.

## INTRODUCTION

Seagrass meadows are essential ecological components of coastal zones due to their high productivity, sediment trapping and stabilization capacity, and provision of habitat or food to fauna, including fish, birds, invertebrates and iconic species such as dugong, manatee, and green turtle (Hemminga and Duarte 2000, Waycott and others 2009). Moreover, in warmer seas, seagrass meadows are often vital intermediate habitats in the coastal mangrove-seagrass-coral system. As such, seagrass meadows serve as nutrient and sediment filter for coral reefs, a second line of coastal defense for mangroves and their hinterland, and a vital hub for many migrating species. Due to this plethora of ecological functions, seagrasses are also of great socio-economic importance, providing important ecosystem services to humanity including flood protection (Orth and others 2006), carbon sequestration (Duarte and others 2005), water purification (Lamb and others 2017), fish production (Beck and others 2001), and biodiversity enhancement (Fourqurean and others 2012)).

Over the last decades, seagrass meadows worldwide have been rapidly declining, often due to the direct impacts of growing human populations in coastal zones such as habitat destruction, pollution, siltation, and eutrophication (Waycott and others 2009). A growing number of studies, however, points at the important role of an intact trophic network in mediating seagrass ecosystem resilience to disturbances. Hughes et al. (2013) highlighted the importance of an intact trophic network by showing how sea otters can mitigate negative effects of nutrient loading by predated on crabs that feed on grazers which control algal epiphytes on seagrasses. Furthermore, an increasing number of studies suggests that successful conservation of green turtle populations (*Chelonia mydas*) in the absence of top-down control by heavily overfished big sharks (Ferretti and others 2010) may result in

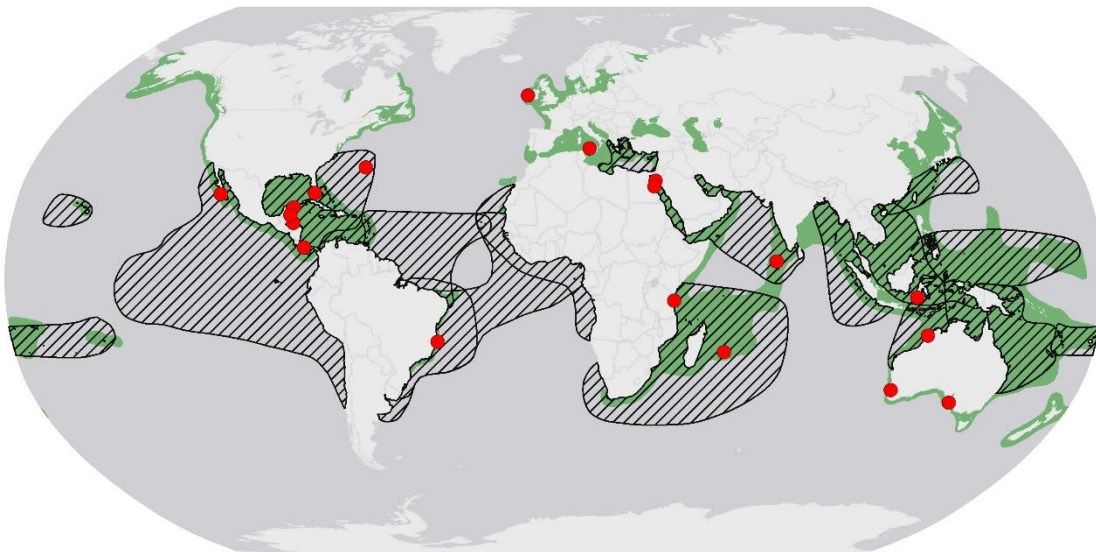
seagrass overgrazing and ultimately ecosystem collapse (Fourqurean and others 2010, Christianen and others 2014, Heithaus and others 2014). Seagrass overgrazing can be expected to increase not just because turtle populations are increasing in size, but also because turtles (as well as dugongs) change their feeding behavior in the absence of predators (Heithaus and others 2012). They move around less and crop the seagrass more intensively, causing greater reductions in canopy height. The lower canopy height greatly reduces sediment accumulation rates and thus carbon storage (Gacia and others 1999). In addition to grazing the leaves more heavily, they can also start to excavate seagrass rhizomes (Christianen and others 2014). Excavation of rhizomes favors fast-growing seagrass species which have lower biomass and also cause less carbon burial (Atwood and others 2015).

Although top-down control of grazers by their predators is perhaps the most commonly reported mechanism controlling grazing pressure in ecosystems, protection mutualism may be another type of interaction that reduces grazing. Mutualisms are important determinants of functioning and community structure of ecosystems (Stachowicz 2001, Bruno and others 2003, Hay and others 2004, Toby Kiers and others 2010). Protection mutualism is a specific type of mutualism in which a mutualist defends its partner against natural enemies. A well-known example of a protection mutualism that reduces grazing is the interaction between *Cecropia* trees and *Azteca* ants in the jungles of Central and South America. The trees provide the ants with nesting space and food packages, and in return the ants protect the trees by trimming competing vines and attacking herbivores (Janzen 1969, Schupp 1986). Although seagrasses engage in mutualistic interactions (van der Heide and others 2012, de Fouw and others 2016), there is currently no account of any documented plant-plant grazing-protection mutualisms in seagrass meadows or in aquatic environments in general.

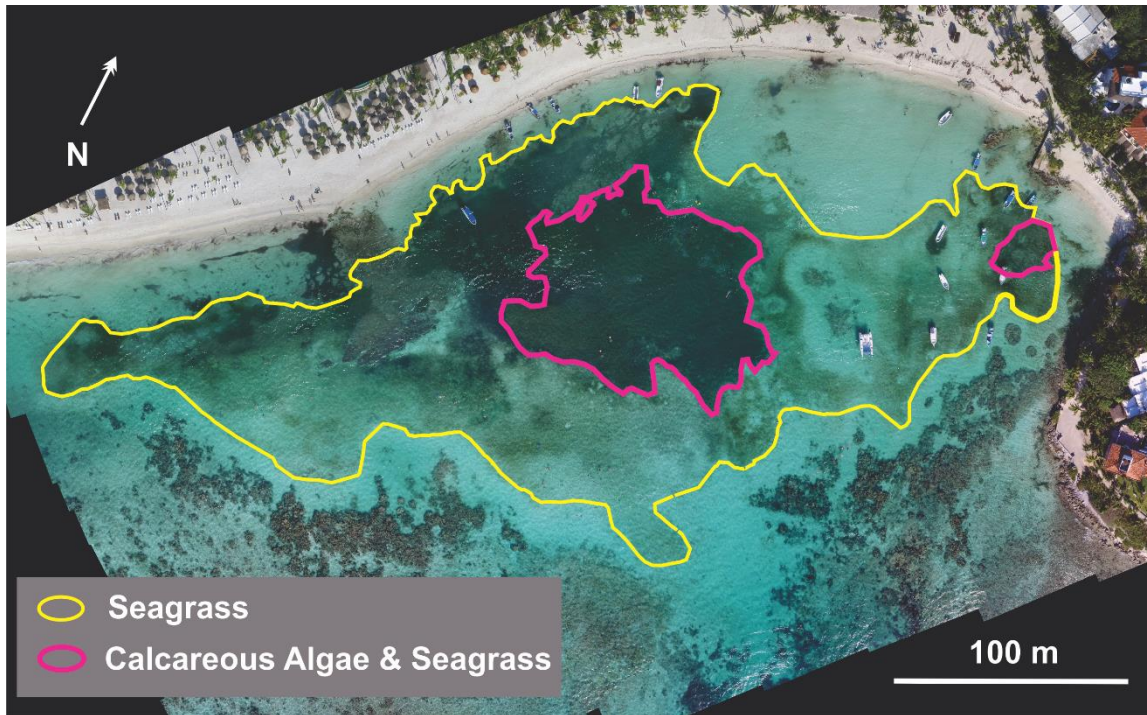


In this study, we investigate whether a grazing-protection mutualism between seagrasses and unattached coralline algae can protect seagrass ecosystems from overgrazing by turtles. This type of coralline algae (belonging to the family Corallinaceae), seagrasses, and turtles have strongly overlapping distribution ranges all over the tropical world (Fig. 1), implying that the interactions among these species groups may have global significance. We first suspected such a mutualistic interaction, when we observed that a strong increase of unattached branched coralline algae in a tropical seagrass meadow was accompanied by changes in seagrass specific composition and morphology typically associated with cessation of turtle grazing (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). Specifically, seagrass patches colonized by coralline algae shifted from dominance by a smaller fast-growing, grazing-resilient species (*Halodule wrightii*) to dominance of the larger, slow-growing climax species *Thalassia testudinum* that disappears when overgrazed (Fig. 2). Therefore, we hypothesize that coralline algae facilitate seagrass by forming a dense layer of unpalatable hard structures that cover the nutrient-rich basal part of the seagrass shoots that turtles prefer to eat (Bjorndal 1980, Zieman JC 1984, Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). We suggest that the seagrasses, in turn, facilitate the coralline algae by protecting them from being swept away by waves or currents, which allows the algae to thrive in areas with relatively high water movement (Steller and Foster 1995, Foster 2001).

To test our hypotheses, we carried out three complementary experiments. To test the first hypothesis that algae facilitate seagrass, we compared (1) grazing in ungrazed plots where we removed algae, and (2) in grazed plots where we placed algae. To test the second hypothesis that seagrass facilitates algae, we carried out a third experiment in which we placed algae in bare, grazed and ungrazed plots in a seagrass meadow, and measured displacement of the algae over time.



*Figure 1.* Distribution of seagrass beds (green), *Chelonia mydas* (striped), and literature accounts of unattached coralline algae associated with seagrass beds (red; table S1). Seagrass data from (Short 2017). *C. mydas* areas are Regional Management Units, which encompass core habitats (Wallace and others 2010). Sources world map: Esri, DeLorme, HERE, MapmyIndia.



*Figure 2.* Contours of the seagrass bed in the Northern section of Akumal Bay, and the sections of the bed with a thick layer of the coralline algae *Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp. The reefs are the stony formations fringing the seagrass bed at the seaward side. (drone image from December 2016, verified with ground- truthing)

## MATERIALS AND METHODS

### *Study site*

We conducted our study in Akumal Bay (Mexican Caribbean, 20°23'44.9" N, 87°18'47.9"W), a tropical bay protected by a fringing reef at ~100 - 300 m from the coast (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). Seagrass meadows in the lagoon cover ~4 ha and experience high grazing pressure from a population of resident green turtles that has steadily increased over the last 2 decades (Maldonado Cuevas and others 2006). Until 2008, the slow-growing climax seagrass species *Thalassia testudinum* was dominant at Akumal.

By 2012, however, continuous excessive grazing pressure had caused this species to strongly decline, and become replaced by the more grazing tolerant early seral species *Halodule wrightii* (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). There was serious concern that overgrazing was driving the seagrass ecosystem towards collapse (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). But such a collapse of the seagrass meadow has not occurred, while at the same time abundance of unattached red branched coralline algae (*Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp.) has increased greatly since 2012. *Neogoniolithon* sp. is a non-geniculate (not possessing non-calcified joints) alga while *Amphiroa* sp. is geniculate (possesses uncalcified joints). These algae were very sparse in 2008 (<1% cover); they increased to ~3% cover by 2012 with dense patches in some heavily grazed sections of the seagrass meadow, and covered ~20% of the bay in 2016 (B. I. van Tussenbroek, unpubl. data, Fig. 2).

At the time of this study (Sep.-Nov. 2015), the algal aggregations formed a 3-6.8 cm thick layer. Mean calcified weight was 5581 dry g m<sup>-2</sup>, -with *Neogoniolithon* sp. accounting for ca. 90-95% of coralline algae biomass (Tables S2 and S3 for characterization of the coralline algae in the bay). The algae-covered section of the bay was colonized by *T. testudinum*, forming a dense and high canopy with a high above- and belowground biomass (Table S4), while *Syringodium filiforme* and *H. wrightii* had low biomass in this area. The coralline algae-free section of the bay was dominated by *H. wrightii*; and *T. testudinum* and *S. filiforme* had low biomass.

*Experiment 1 – Do algae facilitate seagrass?*

*Experiment 1.1 – Removal of coralline algae from ungrazed area.* As a first step in testing the hypothesis that unattached branched coralline algae discourage turtles from grazing on seagrasses, we removed algae from the recovered seagrass meadow that was dominated by coralline algae. To this end, we haphazardly established 10 1x1-m plots from which we removed all coralline algae and 10 control plots from which no algae were removed. To attract turtles to our experimental area, we mimicked turtle grazing in 20-cm wide strips around each plot by clipping seagrass to ~3 cm height (per (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014)) and removing algae. Maintenance of the plots consisted of keeping the removal plots free of coralline algae and continued clipping of seagrass shoots in the 20 cm ‘turtle attraction strips’ to ~3 cm height, when necessary.

Prior to the start of the experiment (14-9-2015), we measured general seagrass characteristics in the area. We determined leaf length and sheath length for all seagrass species at 10 haphazardly chosen locations (aprox. 2x2m in size) in the experimental area. For *T. testudinum* we also measured leaf width as an additional indicator. After 43 days, we terminated the experiment and re-measured all above-mentioned variables per plot.

Specifically, we collected 20 shoots of each seagrass species present per location (in the beginning) or plot (at termination of the experiment) by cutting their vertical rhizome below the sediment with a knife. In the laboratory, the lengths of the sheaths and green sections of all the leaves of the collected shoots were measured with a ruler, and leaf widths were measured with a dial caliper (0.02mm precision). The blades were cleaned of epiphytes by scraping with a razor blade and placed in a drying oven at 60°C for at least 24 h until dry. The basal 3 cm of each leaf of *T. testudinum* was preserved for nutrient analysis following

(Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). Five times during the experiment, we visually estimated what percentage of the surface of the plots was newly grazed by turtles, which is clearly visible by the neatly cut-off leaves.

As a procedural control, we tested whether the turtle attraction strips caused an overestimation of grazing pressure within the plots. We compared shoots collected from the experimental site prior to the start of the experiment, with shoots collected from the procedural control plots at the end of the experiment. Next, we compared seagrass meadow characteristics in the removal versus procedural control plots to determine the effect of algae on grazing.

*Experiment 1.2 – Addition of coralline algae to grazed area.* As a second test of the hypothesis that coralline algae deter turtles, we placed a ~5 cm thick layer of algae, originating from the ungrazed seagrass meadow, on the grazed meadow in 10 haphazardly chosen 1x1 m plots. The same measurements were taken as in experiment 1.1, both at the start and at the end of the experiment. Maintenance of the plots consisted of maintaining the algae layer by topping up coralline algae in the plots when algae were displaced by water movement, tourists or animals, or when they were covered with sand by mantis shrimp. The experiment was initiated on 9-9-2015 and lasted for 48 days. The turtles continued to graze the areas around the plots during the experiment. We analyzed our treatment effect by comparing seagrass meadow characteristics before and after the addition treatment.

### *Experiment 2 – Do seagrasses facilitate algae?*

To determine the effect of seagrass vegetation on establishment of unattached coralline algae, we placed thalli of *Neogoniolithon* sp. in ungrazed, turtle-grazed and bare sand patches in a seagrass meadow at Puerto Morelos (20°50'27.2"N, 86°52'26.1"W). Locations were undisturbed by tourists. We established 3 replicate patches per treatment, and in each patch 20 g (wet weight) of algae were placed in a 10x10 cm quadrat. The quadrat was removed, and small sticks were left to indicate the exact position. One week later, the 10x10 cm quadrat was placed back at the exact same location, with an 80x80 cm quadrat around it. To determine algae persistence the algae in both quadrats were collected separately, transported to the laboratory, and weighed. The experiment lasted for 7 days (March 2017).

### STATISTICS

Data were analyzed with R (v. 3.4.1, R Development Core Team, 2017). Unless stated otherwise, mean  $\pm$  standard deviation is used to show the variability of parameters in this study. When N is given for nested data it refers to the number of subjects, not to the total number of measurements (n). When SD is given for nested data it is of subject means. To compare groups with nested and random factors a generalized linear mixed model (hereafter GLMM) was used, followed up by a Tukey 's post-hoc test when there were more than two groups. For comparisons between groups without nested and random factors a Welch two-sample t-test was used when there were two groups, and a one-way ANOVA when there were more than two groups. Count data was subjected to square root transformation before analysis. Other data were modelled untransformed, square root transformed, and log-

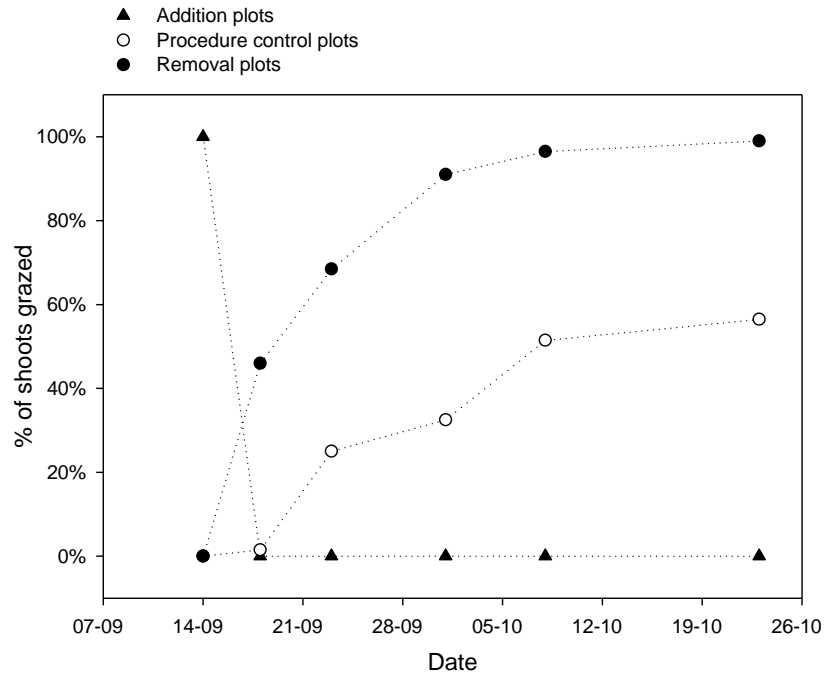
transformed, after which a Shapiro-Wilk test of normality was performed on model residuals and the model with the most normally distributed residuals was chosen. To calculate denominator degrees of freedom (df2) in GLMM, Satterthwaite approximation was used.

## RESULTS

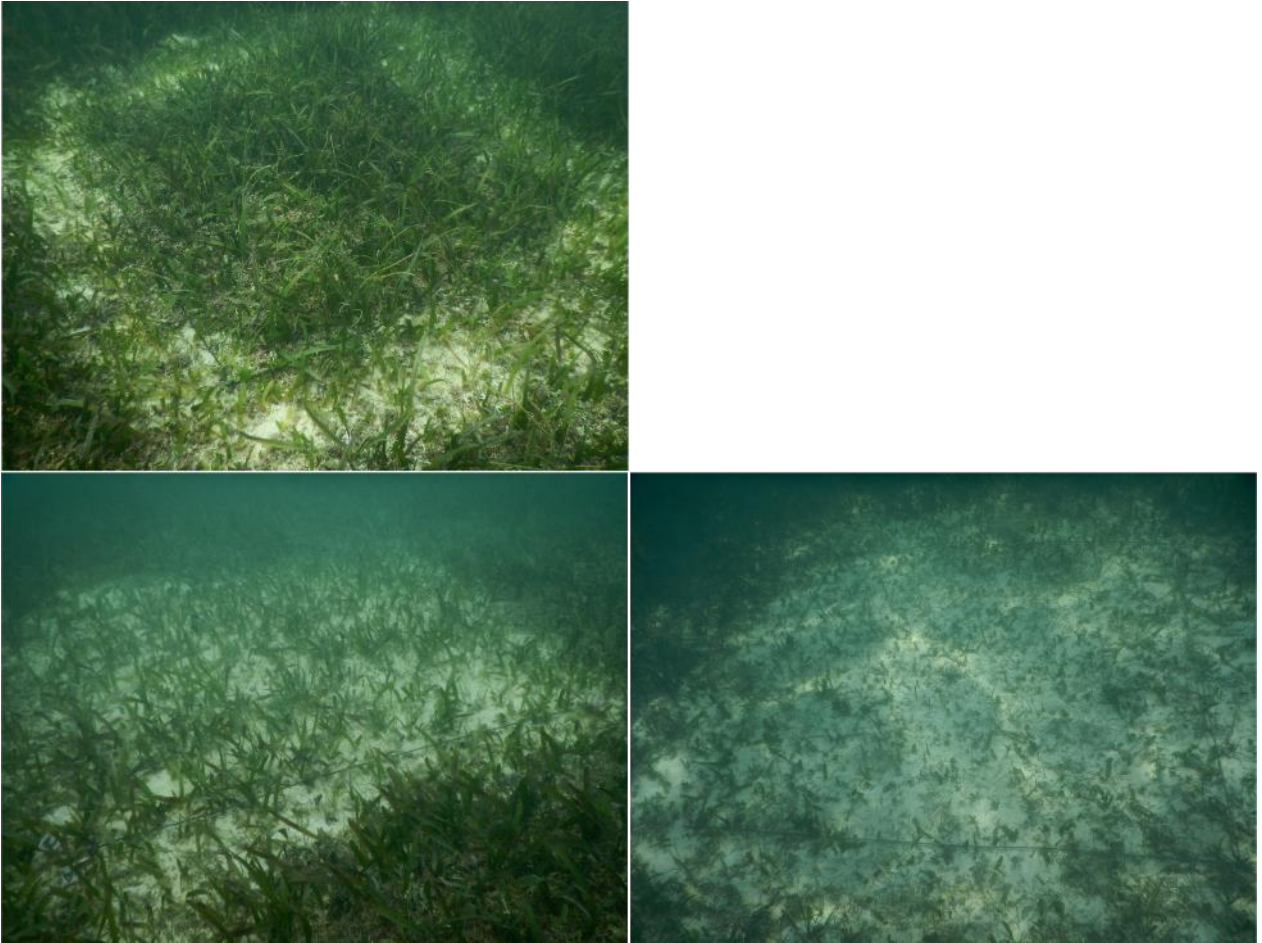
### *Experiment 1 – Do algae facilitate seagrass?*

*Experiment 1.1 – Removal of coralline algae from ungrazed area.* Nine days after the start of the experiment, 7 algae-removal plots already had more than 50% of their seagrass shoots grazed by turtles (turtle grazing is identified by distinct bite marks and pattern). By the end of the experiment after 43 days, this had increased to 10 plots with >95% of all seagrass shoots being grazed (Fig. 3). In contrast, only ~50% of the seagrass shoots in control plots were grazed at the end of the experiment (comparing control with removal:  $p = 0.006$ , Welch t-test). Note that this was significantly higher than the initial proportion of grazed shoots ( $p = 0.001$ , Welch t-test), illustrating the 20 cm wide clipped strips around the control and treatment plots functioned to attract turtles to the site as intended. For photographs of the experiment see Fig. 4.





*Figure 3.* Visual estimation of % of plot surface recently grazed by turtles. Coralline algae were removed from the recovering part of the meadow, where also a procedural control was installed (turtle attraction but no algae removal, part of experiment 1.1), and added in a grazed area (experiment 1.2). Turtle herbivory was indicated by typical bite marks on shortened seagrass leaves. Experiments were initiated on 14-09, grazing was estimated 5 times during the experiment. Values are mean values (n=10 for both treatments). In general, seagrasses in removal plots were grazed to ~3 cm above the sediment, while seagrasses in control plots, if grazed, were almost always only grazed to several cm above the coralline algae layer.



*Figure 4.* Control plot with coralline algae; note that a 20 cm turtle attraction strip was created around the plot by removing the algae and clipping the seagrass (top), algae removal treatment plot early in the experiment (bottom left) and same plot later, after turtles visited (bottom right).

Apart from clear differences in the proportion of grazed leaves, leaf morphology also differed between treatments. In the removal plots, green leaf and sheath lengths of *T. testudinum*, *S. filiforme* and sheath length of *H. wrightii* were significantly shorter than in control plots (Fig. 5), and had similar dimensions as plants in algae-free grazed areas in other parts of the meadow (Table S5). Leaf width of *T. testudinum* was reduced from  $9.7 \pm 1.2$  to  $7.5 \pm 0.8$  mm

in removal plots, while in control plots it was  $9.3 \pm 0.7$ . Note that, similar to the proportion of grazed shoots, the dimensions of the plants illustrate that the attraction strips functioned well; all seagrass parameters were significantly reduced in control plots in the course of the experiment (Table 1).

*Table 1.* Comparison of seagrass characteristics in the algae-covered section of the bay prior to the experiment (t=0) and in procedure control plots (t=1). Welch two sample t-test used.

	<b>Ungrazed (t=0)</b>	<b>area Control (t=1)</b>	<b>plots</b>	<b>p</b>	<b>df</b>	<b>t</b>
<i>Thalassia testudinum</i>						
Leaf length (cm)	11.0 ± 2.4	6.0 ± 1.1		2.20E-16	816.5	15.7
Sheath length (cm)	7.4 ± 1.4	6.1 ± 0.6		2.20E-16	881.7	11.6
Leaf width (mm)	9.7 ± 1.2	9.3 ± 0.7		6.75E-06	901.5	4.53
<i>Halodule wrightii</i>						
Leaf length (cm)	8.2 ± 1.2	6.6 ± 1.9		0.000347	556.3	3.60
Sheath length (cm)	3.6 ± 0.4	2.5 ± 0.4		2.20E-16	557.1	16.9
<i>Syringodium filiforme</i>						
Leaf length (cm)	13.3 ± 3.1	9.1 ± 1.8		3.12E-11	401.6	6.83
Sheath length (cm)	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.3		0.000309	361.3	3.64

Elemental analysis of the basal 3 cm of *T. testudinum* leaves showed significantly higher concentrations of nitrogen (2.87 vs. 2.36 mass %; Welch t-test,  $p = .0016$ ), phosphorus (46.8 vs. 39.8  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p = .012$ ), iron (1.37 vs. 1.08  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p = .032$ ) and other elements in removal plots compared to control plots (see Table S6 for complete results of elemental analysis).

*Experiment 1.2 – Addition of coralline algae to grazed area.* The turtles fully ceased grazing the plots following the addition of coralline algae to the grazed seagrass plots, as we did not record any cut leaves in the plots over the course of the experiment (Fig. 3). Moreover, the addition of algae led to significantly increased leaf and sheath length of all three seagrass species at the end of the experiment after 48 days (Figs 6 - 7). *Thalassia testudinum* leaf width did not change.

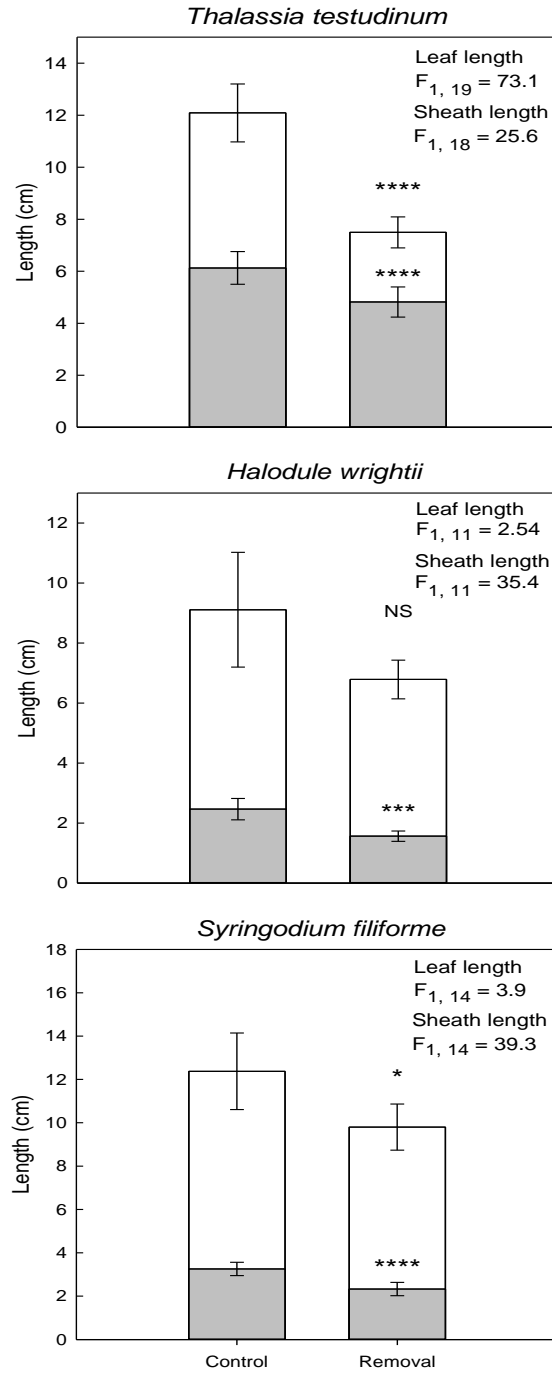


Figure 5. Mean length ( $\pm$ SD) of green leaf sections (white) and sheaths (gray) of seagrass shoots in algae removal plots compared with control plots (experiment 1.1) for all 3 seagrass species. GLMM performed. Asterisks indicate significance level of the difference between treatments (\*<.05, \*\*<.01, \*\*\*<.001, NS = not significant).

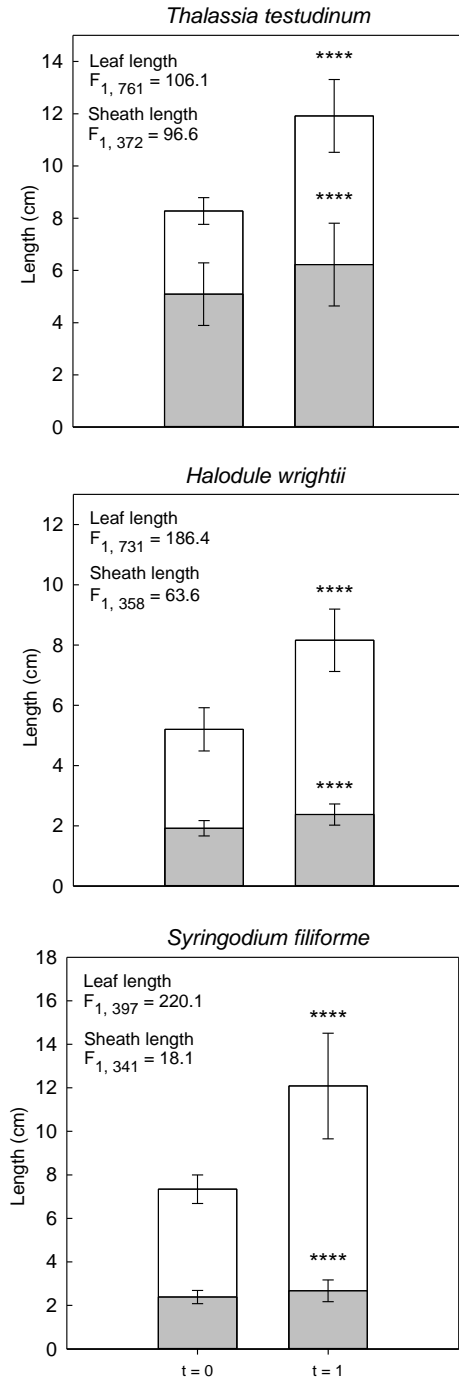


Figure 6. Mean length ( $\pm$ SD) of green leaf sections (white) and sheaths (gray) of seagrass shoots in algae addition experiment (experiment 1.2) at t=0 and 48 days after addition of algae. GLMM performed. Asterisks indicate significance level of the difference ( $* < .05$ ,  $** < .01$ ,  $*** < .001$ , NS = not significant).

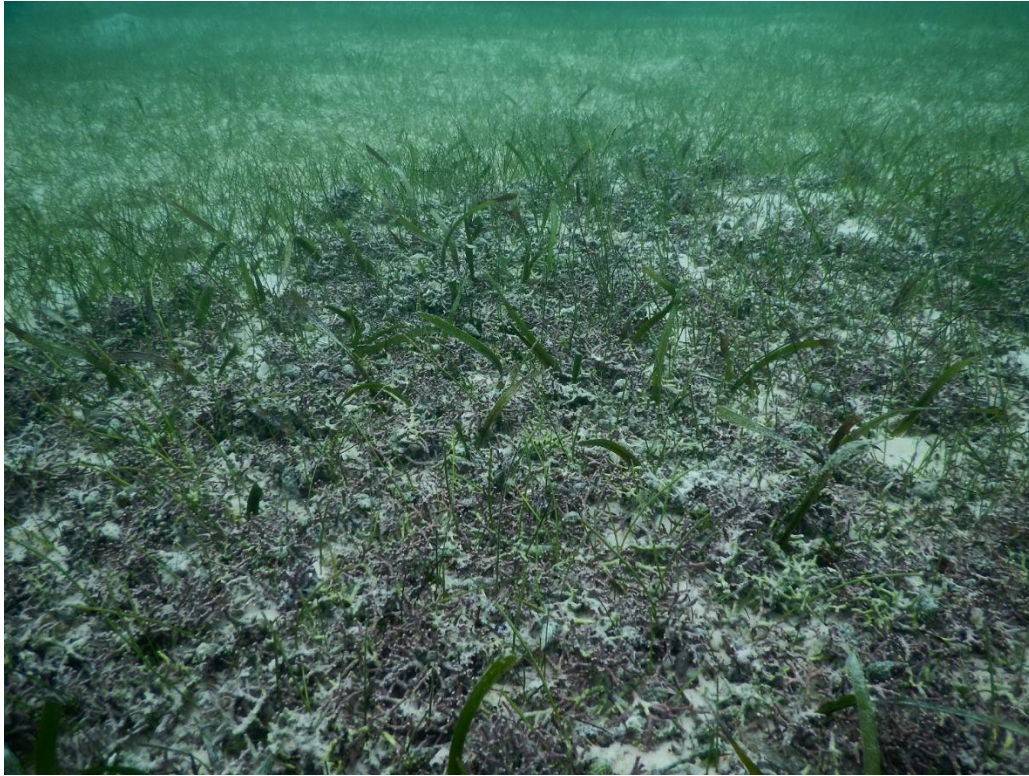


Figure 7. Algae addition plot at the end of the experiment showing the recovery of the seagrass.

#### *Experiment 2 - Do seagrasses facilitate algae?*

Seagrass vegetation had a significant effect on retention of *Neogoniolithon sp.* in the 10x10 cm quadrats where we originally added the algae (GLMM:  $F_{2,6} = 11.0$ ,  $P = .01$ ), and in the surrounding 80x80 cm quadrats to which the algae dispersed ( $F_{2,6} = 17.6$ ,  $P = .003$ ). One week after placing ~20 g of *Neogoniolithon sp.* in 10x10 cm quadrants in different locations, none were still in place in the bare areas, while  $27.6\% \pm 12.8$  and  $67.3\% \pm 5.3\%$  were still present at the grazed and ungrazed sites, respectively (Fig. 8). Post-hoc comparisons revealed that the difference between ungrazed and grazed sites was significant, as was the difference between ungrazed and bare sites. When the search was extended to an 80x80 cm quadrant around the initial 10x10 plots, we still did not retrieve any algae from the bare areas, while

55.2%  $\pm$  8.81 and 72.1%  $\pm$  3.94 was retrieved from the grazed and ungrazed sites, respectively. Here, post-hoc comparisons showed that the difference between bare and grazed sites was significant, as was the difference between bare and ungrazed sites (Fig. 8).

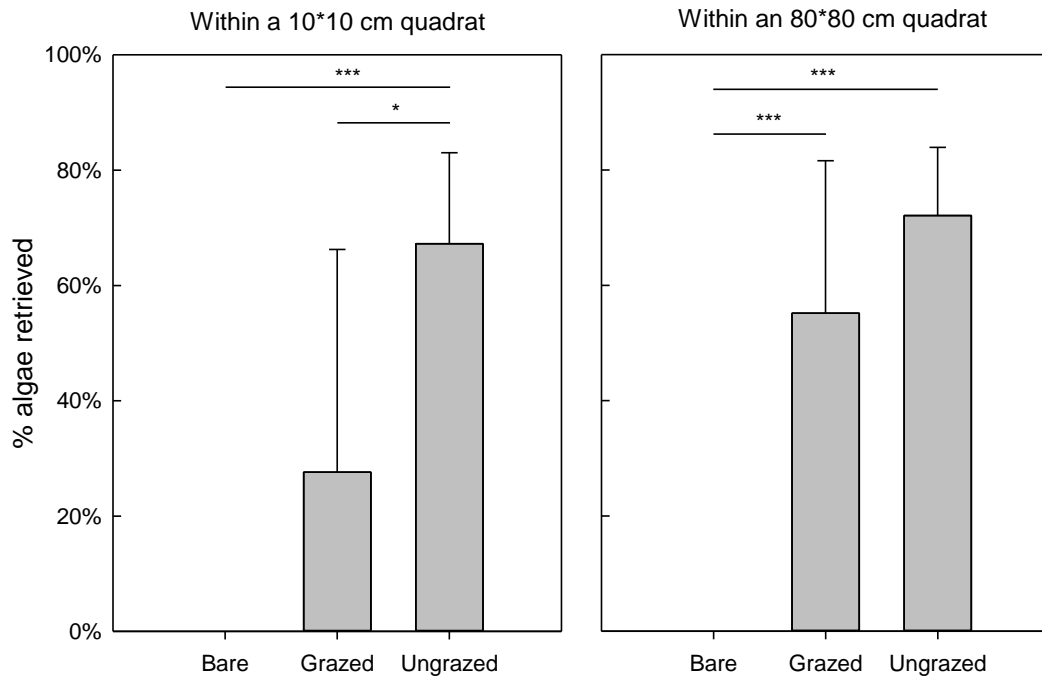


Figure 8. Mean retrieval % ( $\pm$  SD) of *Neogoniolithon* sp. after one week in the near vicinity (within 10x10 cm, left) or wider vicinity (within 80x80 cm, right), in three vegetation types after 1 week. Lines over bars indicate which groups significantly differ (GLMM, Tukey's HSD test). Asterisks indicate significance level of the difference between treatments (\* $<$ .05, \*\* $<$ .01, \*\*\* $<$ .001).

## DISCUSSION

Recent studies suggest that an intact trophic network is often vital for the conservation of seagrass ecosystems and the recovery of degraded meadows (Ferretti and others 2010, Fourqurean and others 2010, Hughes and others 2013, Christianen and others 2014, Heithaus and others 2014). While top-down control of grazers by their predators is a well-known



mechanism controlling grazing pressure in coastal ecosystems such as salt marshes and seagrass meadows, studies from terrestrial systems demonstrate that protection mutualisms can also reduce grazing pressure (Janzen 1969, Schupp 1986). Here, we experimentally demonstrate that unattached coralline algae mediate the recovery of overgrazed seagrass meadows by deterring grazing green turtles, while seagrasses facilitate the algae by stabilizing the unattached coralline algae on the soft-sediment seabed. There are very few examples of plant-plant mutualistic interactions (Tirado and others 2015), and plant-plant mutualisms involving grazing protection have only been reported from terrestrial systems (Tirado and others 2015, Queijeiro-Bolaños and others 2017). Our study shows that aquatic plant-plant grazing protection mutualisms exist and in fact can be vital for the maintenance and recovery of ecosystems shaped by habitat-structuring foundation species.

#### *How algae facilitate seagrass*

High numbers of turtle bite marks combined with changes in seagrass shoot morphology, clearly show that removal of unattached coralline algae from an ungrazed seagrass meadow induced turtle grazing, while addition of algae to a grazed meadow dramatically reduced turtle grazing. These results support our hypothesis that recovery of the seagrass meadow at Akumal is at least in part due to protection offered by the algae. The most likely mechanism underlying the repelling effect of coralline algae on turtles is that the spikey 3D-structure of the algae may directly hamper grazing by turtles. The algae obstruct the turtles, and in addition may physically harm the eyes of the turtles as they try to reach the preferred lower basal parts (~3cm) of the shoots (Zieman JC 1984, Molina Hernández and van Tussenbroek 2014).

The effects of changed grazing pressure from turtles as a result of the treatments differed per seagrass species. We found that while leaves of *T. testudinum* were intensively grazed upon when we removed the coralline algae, as evidenced from the 55% reduction in leaf average length, leaf length reductions of *S. filiforme* were smaller, and non-significant for *H. wrightii*. This implies that, in accordance with earlier findings, *T. testudinum* was preferentially grazed by the turtles (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). Addition of coralline algae to the grazed seagrass meadow halted the formation of new grazing scars and almost doubled the average leaf length of *T. testudinum* within 45 days, suggesting that the turtles completely ceased grazing.

#### *How seagrasses facilitate algae*

Our third experiment demonstrates that unattached coralline algae can only thrive within the seagrass meadows in our study area. In fact, the algae disappeared from bare areas within 7 days, suggesting that currents and waves, possibly in interaction with unstable sediments, caused the algae to wash away. In contrast, algae remained rather stable in sparse, formerly grazed seagrass patches and even more so in dense, ungrazed parts of the meadow. This can be explained by the capacity of seagrasses to attenuate currents and waves, and stabilize sediments (van der Heide and others 2007, Christianen and others 2013, Maxwell and others 2017). High densities of unattached coralline algae typically occur in areas with sufficient light for growth, and moderate water movement that prevents burial by sediment while remaining low enough to prevent the algae from being flushed away or destroyed (Foster 2001). Our study provides experimental evidence that, by reducing physical stress, seagrasses

allow unattached coralline algae to thrive in environments that would otherwise not be suitable.

Our findings raise the question why unattached coralline algae are not more abundant in seagrass meadows. While there are reports of coralline algae in seagrass meadows (Fig. 1), most observations suggest that they tend to occur around the edges of the meadow or in depressions, and individuals inside the meadow are often scarce and scattered (Bosellini and Ginsburg 1971, Bosence 1985, Piller and Rasser 1996, Basso and others 2008, Freile and Devore 2016). In our study system, the algae were previously found in *T. testudinum* meadows, but only between sparse vegetation (Vásquez-Elizondo and Enríquez 2016), or growing in small patches in denser meadows (Ruiz-Zárte and others 2000). The formation of a dense mat of unattached coralline algae in Akumal only started after turtles grazed the entire seagrass meadow in the bay instead of just patches (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). The grazing may have facilitated algae growth due to increased light availability, while the meadow still provided ample protection from hydrodynamics. As the rapid colonization by the algae in turn facilitated seagrass growth, it is possible that the seagrass-algae interaction may over time gradually shift from mutualism to competition as the growing seagrass canopy will inevitably increase shading of the algae. The mutualism then only exists in the intermediate grazing range, which would explain the absence of large algae densities in dense seagrass meadows. Such shifts in the nature of species interactions have been commonly reported from other systems (Bronstein 1994) – facilitation can shift to antagonism or vice versa when environmental conditions change.

## *Implications*

Although the mutualistic seagrass-algae interaction allows for rapid recovery of the overgrazed seagrass meadows in Akumal, an important potential downside may be that a continued expansion of the coralline algae may eventually exclude turtles in large parts of the bay. If this would indeed happen, the remaining seagrass area may become too small to sustain the turtle population as it is currently estimated to be at or near carrying capacity (Molina Hernández and van Tussenbroek 2014). If turtles do not or cannot relocate their feeding grounds, they may be forced to start grazing the algae-covered parts of the meadow. If they do so in the same manner as we observed in the procedural control plots of the removal experiment, i.e. grazing while leaving the lower 3 cm of the leaves intact, algae may still prevent or slow down overgrazing. The photosynthetic tissue preserved by this less intensive form of grazing may reduce or even prevent depletion of belowground carbohydrate reserves. However, another scenario could be that under continued high grazing pressure the mutualism breaks down, depending on whether the turtles prefer to relocate or, possibly by necessity, choose to deal with the nuisance of the algae.

Ecosystem-based conservation and restoration approaches in coastal ecosystems are increasingly advocated, as many studies from coral reefs, salt marshes, and seagrasses emphasize the importance of an intact ecological interaction network for ecosystem functioning (Angelini and others 2015, van der Zee and others 2016, Derksen-Hooijberg and others 2018). Our current work highlights that apart from an intact trophic network in which top-predators control seagrass grazers (Hughes and others 2013, Christianen and others 2014, Heithaus and others 2014), recovery of mutualistic interactions can help preserve and recover tropical seagrass meadows. This notion is important because seagrasses are rapidly declining

and restoration is often unsuccessful. Although promising, we emphasize that introducing species as a biological control measure must always be done with great caution and after careful risk assessment (Howarth 2000). However, unattached coralline algae have a global distribution with much overlap with that of seagrasses and turtles. In fact, Fig. 1 is in that sense by no means an exhaustive account, as these algae are widespread and new growth sites continue to be discovered (Riosmena-Rodríguez and others 2016). This implies that algae can probably be locally sourced in many areas and used with little risk of introducing exotic species. We therefore conclude that seeding coralline algae with the aim of protecting or recovering threatened seagrass meadows deserves further attention, as it has potential to be a cheap and effective protection measure in tropical seagrass meadows around the world.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Maria Guadalupe Barba Santos, Nancy Estefany Burgos Veneroso, and Veronica Monroy Velázquez for supporting this study in the field or laboratory, Rens Cronau and Ward Kleuskens for performing Experiment 2, the Cooperativa Piratas de Akumal S.C. de R.L. for their logistic support in Akumal, Edgar Escalante-Mancera & Miguel-Angel Gómez from Servicio Académico de Monitoreo Meteorológico y Oceanográfico (ICML Puerto Morelos) for providing the drone image from Fig. 2, and Sebastian Krosse and Paul Van Der Ven of General Instrumentation of the Radboud University for conducting the chemical analyses. This study is part of Isis G. Martínez PhD project at the postgraduate program Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (PCMyL) of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) with a CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) fellowship.

## AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT

Brigitta I. van Tussenbroek conceived the idea for the experiments; Luuk Leemans and Brigitta I. van Tussenbroek designed the methodology; Marieke M. van Katwijk, Luuk Leemans, Isis Martínez and Brigitta I. van Tussenbroek collected the data; Tjisse van der Heide, Luuk Leemans, and Brigitta I. van Tussenbroek analysed the data; Luuk Leemans led the writing of the manuscript; Tjisse van der Heide, Marieke M. van Katwijk, and Brigitta I. van Tussenbroek supervised the writing of the manuscript. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

## BIBLIOGRAPHY

- Angelini, C., T. van der Heide, J. N. Griffin, J. P. Morton, M. Derksen-Hooijberg, L. P. M. Lamers, A. J. P. Smolders, and B. R. Silliman. 2015. Foundation species overlap enhances biodiversity and multifunctionality from the patch to landscape scale in southeastern United States salt marshes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.
- Atwood, T. B., R. M. Connolly, E. G. Ritchie, C. E. Lovelock, M. R. Heithaus, G. C. Hays, J. W. Fourqurean, and P. I. Macreadie. 2015. Predators help protect carbon stocks in blue carbon ecosystems. *Nature Climate Change* 5:1038.
- Basso, D., M. P. Bernasconi, E. Robba, and S. Marozzo. 2008. Environmental Evolution of the Marsala Sound, Sicily, during the Last 6000 Years. *Journal of Coastal Research* 241:177-197.
- Beck, M. W., K. L. Heck, K. W. Able, D. L. Childers, D. B. Eggleston, B. M. Gillanders, B. Halpern, C. G. Hays, K. Hoshino, T. J. Minello, R. J. Orth, P. F. Sheridan, and M. P. Weinstein. 2001. The Identification, Conservation, and Management of Estuarine and Marine Nurseries for Fish and Invertebrates. *BioScience* 51:633-641.
- Bjorndal, K. A. 1980. Nutrition and grazing behavior of the green turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology* 56:147-154.
- Bosellini, A., and R. N. Ginsburg. 1971. Form and Internal Structure of Recent Algal Nodules (Rhodolites) from Bermuda. *The Journal of Geology* 79:669-682.
- Bosence, D. W. J. 1985. The morphology and ecology of a mound-building coralline alga (*Neogoniolithon strictum*) from the Florida Keys. *Palaeontology* 28:189-206.

- Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 9:214-217.
- Bruno, J. F., J. J. Stachowicz, and M. D. Bertness. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution* 18:119-125.
- Christianen, M. J., P. M. Herman, T. J. Bouma, L. P. Lamers, M. M. van Katwijk, T. van der Heide, P. J. Mumby, B. R. Silliman, S. L. Engelhard, M. van de Kerk, W. Kiswara, and J. van de Koppel. 2014. Habitat collapse due to overgrazing threatens turtle conservation in marine protected areas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281.
- Christianen, M. J., J. van Belzen, P. M. Herman, M. M. van Katwijk, L. P. Lamers, P. J. van Leent, and T. J. Bouma. 2013. Low-canopy seagrass beds still provide important coastal protection services. *PLOS ONE* 8:e62413.
- de Fouw, J., L. L. Govers, J. van de Koppel, J. van Belzen, W. Dorigo, M. A. Sidi Cheikh, M. J. Christianen, K. J. van der Reijden, M. van der Geest, T. Piersma, A. J. Smolders, H. Olf, L. P. Lamers, J. A. van Gils, and T. van der Heide. 2016. Drought, Mutualism Breakdown, and Landscape-Scale Degradation of Seagrass Beds. *Current Biology* 26:1051-1056.
- Derksen-Hooijberg, M., C. Angelini, L. P. M. Lamers, A. Borst, A. Smolders, J. R. H. Hoogveld, H. de Paoli, J. van de Koppel, B. R. Silliman, and T. van der Heide. 2018. Mutualistic interactions amplify saltmarsh restoration success. *Journal of Applied Ecology* 55:405-414.
- Duarte, C. M., J. J. Middelburg, and N. Caraco. 2005. Major role of marine vegetation on the oceanic carbon cycle. *Biogeosciences* 2:1-8.
- Ferretti, F., B. Worm, G. L. Britten, M. R. Heithaus, and H. K. Lotze. 2010. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters* 13:1055-1071.
- Foster, M. S. 2001. Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37:659-667.
- Fourqurean, J. W., C. M. Duarte, H. Kennedy, N. Marbà, M. Holmer, M. A. Mateo, E. T. Apostolaki, G. A. Kendrick, D. Krause-Jensen, K. J. McGlathery, and O. Serrano. 2012. Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nature Geoscience* 5:505.
- Fourqurean, J. W., S. Manuel, K. A. Coates, W. J. Kenworthy, and S. R. Smith. 2010. Effects of excluding sea turtle herbivores from a seagrass bed: Overgrazing may have led to loss of seagrass meadows in Bermuda. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 419:223-232.
- Freile, D., and M. Devore. 2016. Mixed genera shallow water rhodoliths from Roatán, Honduras. Pages 141-153 *in* Proceedings of the 16th Symposium on the Geology of the Bahamas and other Carbonate Regions. Gerace Research Centre, San Salvador, Bahamas.
- Gacia, E., T. C. Granata, and C. M. Duarte. 1999. An approach to measurement of particle flux and sediment retention within seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Aquatic Botany* 65:255-268.
- Hay, M. E., J. D. Parker, D. E. Burkepile, C. C. Caudill, A. E. Wilson, Z. P. Hallinan, and A. D. Chequer. 2004. Mutualisms and Aquatic Community Structure: The Enemy of My Enemy Is My Friend. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35:175-197.

- Heithaus, M., A. J. Wirsing, and L. Dill. 2012. The ecological importance of intact top-predator populations: A synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Marine and Freshwater Research* 63:1039-1050.
- Heithaus, M. R., T. Alcoverro, R. Arthur, D. A. Burkholder, K. A. Coates, M. J. A. Christianen, N. Kelkar, S. A. Manuel, A. J. Wirsing, W. J. Kenworthy, and J. W. Fourqurean. 2014. Seagrasses in the age of sea turtle conservation and shark overfishing. *Frontiers in Marine Science* 1.
- Hemminga, M. A., and C. M. Duarte. 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Howarth, F. G. 2000. Non-target Effects of Biological Control Agents. Pages 369-403 in G. Gurr and S. Wratten, editors. *Biological Control: Measures of Success*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Hughes, B. B., R. Eby, E. Van Dyke, M. T. Tinker, C. I. Marks, K. S. Johnson, and K. Wasson. 2013. Recovery of a top predator mediates negative eutrophic effects on seagrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:15313-15318.
- Janzen, D. H. 1969. Allelopathy by Myrmecophytes: The Ant *Azteca* as an Allelopathic Agent of *Cecropia*. *Ecology* 50:147-153.
- Lamb, J. B., J. A. van de Water, D. G. Bourne, C. Altier, M. Y. Hein, E. A. Fiorenza, N. Abu, J. Jompa, and C. D. Harvell. 2017. Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates. *Science* 355:731-733.
- Maldonado Cuevas, M., A. Lorences-Camargo, and P. Sánchez-Navarro. 2006. Estudio técnico justificativo para el establecimiento del área de refugio para la protección de tortugas marinas de la bahías de Akumal., Akumal, Mexico.
- Maxwell, P. S., J. S. Eklf, M. M. van Katwijk, K. R. O'Brien, M. de la Torre-Castro, C. Boström, T. J. Bouma, D. Krause-Jensen, R. K. Unsworth, and B. I. van Tussenbroek. 2017. The fundamental role of ecological feedback mechanisms for the adaptive management of seagrass ecosystems-a review. *Biological Reviews* 92:1521-1538.
- Molina Hernández, A. L., and B. I. van Tussenbroek. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea turtles. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 517:143-157.
- Orth, R. J., T. J. B. Carruthers, W. C. Dennison, C. M. Duarte, J. W. Fourqurean, K. L. Heck, A. R. Hughes, G. A. Kendrick, W. J. Kenworthy, S. Olyarnik, F. T. Short, M. Waycott, and S. L. Williams. 2006. A Global Crisis for Seagrass Ecosystems. *BioScience* 56:987-996.
- Piller, W. E., and M. Rasser. 1996. Rhodolith formation induced by reef erosion in the Red Sea, Egypt. *Coral Reefs* 15:191-198.
- Queijeiro-Bolaños, M. E., E. J. González, C. Martorell, and Z. Cano-Santana. 2017. Competition and facilitation determine dwarf mistletoe infection dynamics. *JOURNAL OF ECOLOGY* 105:775-785.
- Riosmena-Rodríguez, R., W. Nelson, and J. Aguirre. 2016. *Rhodolith/Maërl Beds : a global perspective*. Springer, Switzerland.
- Ruiz-Zárate, M. A., J. Espinoza-Avalos, J. P. Carricart-Ganivet, and D. Fragoso. 2000. Relationships between *Manicina areolata* (Cnidaria: Scleractinia), *Thalassia testudinum* (Anthophyta) and *Neogoniolithon* sp. (Rhodophyta). *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 206:135-146.



- Schupp, E. W. 1986. Azteca protection of *Cecropia*: ant occupation benefits juvenile trees. *Oecologia* 70:379-385.
- Short, F. T. 2017. Global distribution of seagrasses (version 5.0). Fourth update to the data layer used in Green and Short (2003). Cambridge (UK): UN Environment World Conservation Monitoring Centre.
- Stachowicz, J. J. 2001. Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities. *BioScience* 51:235-246.
- Steller, D. L., and M. S. Foster. 1995. Environmental factors influencing distribution and morphology of rhodoliths in Bahía Concepción, B.C.S., México. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 194:201-212.
- Tirado, R., K. A. Bråthen, and F. I. Pugnaire. 2015. Mutual positive effects between shrubs in an arid ecosystem. *Scientific reports* 5:14710.
- Toby Kiers, E., T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno, and J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology letters* 13:1459-1474.
- van der Heide, T., L. L. Govers, J. de Fouw, H. Olf, M. van der Geest, M. M. van Katwijk, T. Piersma, J. van de Koppel, B. R. Silliman, A. J. Smolders, and J. A. van Gils. 2012. A three-stage symbiosis forms the foundation of seagrass ecosystems. *Science* 336:1432-1434.
- van der Heide, T., E. H. van Nes, G. W. Geerling, A. J. P. Smolders, T. J. Bouma, and M. van Katwijk. 2007. Positive feedbacks in seagrass ecosystems : Implications for success in conservation and restoration. *Ecosystems* 10:1311-1322.
- van der Zee, E. M., C. Angelini, L. L. Govers, M. J. Christianen, A. H. Altieri, K. J. van der Reijden, B. R. Silliman, J. van de Koppel, M. van der Geest, J. A. van Gils, H. W. van der Veer, T. Piersma, P. C. de Ruiter, H. Olf, and T. van der Heide. 2016. How habitat-modifying organisms structure the food web of two coastal ecosystems. *Proceedings. Biological sciences* 283:1-9.
- Vásquez-Elizondo, R. M., and S. Enríquez. 2016. Coralline algal physiology is more adversely affected by elevated temperature than reduced pH. *Scientific Reports* 6:19030.
- Wallace, B. P., A. D. DiMatteo, B. J. Hurley, E. M. Finkbeiner, A. B. Bolten, M. Y. Chaloupka, B. J. Hutchinson, F. A. Abreu-Grobois, D. Amoroch, K. A. Bjorndal, J. Bourjea, B. W. Bowen, R. B. Duenas, P. Casale, B. C. Choudhury, A. Costa, P. H. Dutton, A. Fallabrino, A. Girard, M. Girondot, M. H. Godfrey, M. Hamann, M. Lopez-Mendilaharsu, M. A. Marcovaldi, J. A. Mortimer, J. A. Musick, R. Nel, N. J. Pilcher, J. A. Seminoff, S. Troeng, B. Witherington, and R. B. Mast. 2010. Regional management units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PLOS ONE* 5:e15465.
- Waycott, M., C. M. Duarte, T. J. Carruthers, R. J. Orth, W. C. Dennison, S. Olyarnik, A. Calladine, J. W. Fourqurean, K. L. Heck, Jr., A. R. Hughes, G. A. Kendrick, W. J. Kenworthy, F. T. Short, and S. L. Williams. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106:12377-12381.
- Zieman JC, I. R., Ogden JC. 1984. Herbivory effects on *Thalassia testudinum* leaf growth and nitrogen content. *Marine Ecology Progress Series* 15:151–158.

## **Capítulo 5: Coralline algal population explosion in an overgrazed seagrass meadow: Conditional outcomes of intraspecific and interspecific interactions**

### ABSTRACT

Interactions such as mutualism and facilitation are common in ecosystems established by foundation species, however, their outcomes vary and show conditionality. In a Mexican Caribbean Bay, a seagrass-coralline algae (rhodoliths) mutualism protects the seagrass *Thalassia testudinum* from green turtle overgrazing. We postulate that the state of the seagrass meadow in this bay depends on the strengths of the interactions among seagrasses, green turtles, and coralline algae. Spatio-temporal changes through satellite imagery showed rhodolith bed developed rapidly from 2009 (undetected) to 2016 (bed of 6934 m<sup>2</sup>). Typically, such rapid expansion of the rhodoliths does not occur in seagrass meadows. An in situ growth experiment of coralline algae showed that a combination of reduction in light and wave movement (usual in dense seagrass meadows) significantly reduced growth rates. In the rhodolith beds, the growth rates of the coralline algae *Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp. were high at 9.5 mm and 15.5 mm per growth tip y<sup>-1</sup> respectively. In a second experiment, we found lower mortality in coralline algae within a rhodolith bed compared to algae placed outside the bed, likely explained by the reduced resuspension that we found in a third experiment, and this positive feedback may explain the high population increase in the

rhodoliths, once established when the turtles grazed down the seagrass canopy. Therefore, the grazing-protection mutualism between seagrasses and coralline algae is thus conditional and came into existence under a co-occurrence of intensive grazing pressure and rapid population growth of coralline algae facilitated by positive feedback from increased growth and reduced sediment resuspension by the dense rhodolith bed.

Keywords: *Thalassia*, turtle herbivory, *Neogoniolithon*, rhodolith, sedimentation, light reduction, mutualism, positive feedback

#### Manuscript Highlights

1. Coralline algae population increased explosively over few years.
2. Reduction in light and wave movement decreased coralline algae growth rate.
3. Coralline algae aggregations reduced sediment resuspension favoring their survival.
4. When coexisting, turtle-seagrass-rhodolith interactions show conditional outcomes.

**Publicado:** Martínez-López I. G., L. Leemans, M. M. van Katwijk, S. V. Ávila-Mosqueda, B. I. van Tussenbroek. 2024. Coralline algal population explosion in an overgrazed seagrass meadow: Conditional outcomes of intraspecific and interspecific interactions. *Ecosystems*. <https://doi.org/10.1007/s10021-024-00909-w>

## INTRODUCTION

The outcomes of mutualistic interactions were traditionally considered fixed; however, the review by Bronstein (1994) was amongst the first to point out that the outcomes of potentially beneficial (and other types of) interactions are often not deterministic but context-dependent (i.e., conditional outcomes). In plant communities, positive interactions such as mutualism and facilitation may act simultaneously with competitive interactions, and the overall effect of one plant species on another will depend on the relative strengths of the interactions in a given state of the environment (Callaway 1997). For example, Baraza and others (2007) found that spatial distribution of palatable and unpalatable plants influenced the foraging behavior of herbivores, which changed the probabilities of plant damage; the outcome was dependent on 1) plants palatability, 2) plants neighborhood, that is, presence/absence of unpalatable protective spiny plants and 3) difference in herbivore abundance (pressure). In addition, positive interactions will be influenced by the ability of plant species to modify their own environment, which is especially important for foundation species. Through such mechanisms of positive feedback, foundation species alter the environment facilitating not only their own existence but also that of other species (for example, Maxwell and others 2017). At the same time, the habitat-modifying ability of such plants will depend on their own biological and physical state in a given condition (Stachowicz 2001). This may lead to conditional positive feedback, as for example occurs in salt marshes, where the species *Spartina anglica* modifies the environment through the enhancement of sediment accretion under specific abiotic conditions of hydrodynamics and topography, eventually allowing the formation of “sediment-accumulating dome-shaped tussocks” (van de Koppel and others 2012).

Recently, Leemans and others (2020) found a mutualistic interaction among seagrasses, loose-lying red calcareous algae (also known as coralline algae or rhodoliths), and green sea turtles in a Caribbean Bay. In this bay, the seagrass *Thalassia testudinum* was protected from overgrazing by the green turtles in dense rhodolith beds. The seagrass shoots, even those grazed short, reduced the removal of the coralline algae by waves or currents, thus creating the physical conditions for their accumulation, thereby allowing for the coexistence of both rhodolith beds and grazed seagrass meadows. In the beginning of rhodolith accumulation, the turtles were deterred completely, and they changed their feeding ground elsewhere in the bay; at a later stage when *T. testudinum* shoots grew well above the rhodolith bed, the turtles returned, but they left a higher canopy ( $> \sim 8\text{cm}$ , instead of  $\sim 3\text{cm}$ ), which allowed for persistence of *T. testudinum* in the rhodolith bed, even under conditions of moderate turtle grazing. This mutualistic interaction is of relevance for seagrass and sea turtle management, as it may serve as a conservation measure to non-invasively persuade the green turtles to graze elsewhere, thereby protecting or restoring seagrass meadows overgrazed by green turtles (Leemans and others 2020).

Seagrasses are marine angiosperms that are the foundation species of vast meadows under the sea which host biodiverse communities and provide numerous ecosystem services (Nordlund and others 2016; Orth and others 2020). As it occurs with other foundation species, seagrasses alter their local environment through positive feedback mechanisms that promote their own survival and growth (Van der Heide and others 2011; Nyström and others 2012; Maxwell and others 2017). Seagrass canopy relieves hydrodynamic stress by attenuating currents and waves, which also improves light conditions by reducing suspended sediment and stabilizing the substrate (Van der Heide and others 2011; Adams and others 2016). In this way, seagrasses not only facilitate their growth and persistence, but also the

occurrence or proliferation of countless other species intolerant to disturbed conditions (Stachowicz 2001; van der Heide and others 2011). Competitive interactions also shape the seagrass community (Williams 1987; Fourqurean and others 1995), including those between seagrasses and calcareous algae such as competition for space, light, or nutrients (Williams 1990; Davis and Fourqurean 2001).

Unattached red calcareous (coralline) algae are foundation species of ecosystems made up by accumulations of living and dead thalli, called rhodolith or “maerl” beds; once having established a dense bed, the rhodoliths exercise a mayor influence on the structure and processes of the community. They produce enormous quantities of calcium carbonate and increase biodiversity by providing a habitat for a diverse community (Riosmena-Rodriguez and others 2017). To proliferate into beds, the coralline algae require a combination of sufficient light, nutrients, and water movement (Steller and Foster 1995; Wilson and others 2004). Particularly, water movement is a key factor in determining rhodolith coverage and biomass; too fast current velocity and individual thalli may be moved away from suitable zones, but too slow and coralline algae may be smothered by silt (Harvey and others 2017; Melbourne and others 2018). Rhodolith coverage (> 60 %, living and dead) has been associated with sites with lower current velocities (< 0.30 m s<sup>-1</sup>; Dutertre and others 2015), while higher living rhodolith biomass (14.56 ± 1.61 dry kg m<sup>-2</sup>) has been reported under conditions of lower sedimentation rates (0.05 cm yr<sup>-1</sup>; Qui-Minet and others 2018).

The state and persistence of vegetative foundation species, such as seagrasses (e.g., Valentine and Heck 1999) are often mediated by grazers. Green sea turtles (*Chelonia mydas*) are important megaherbivores in tropical and subtropical seagrass meadows (e.g., Heithaus and others 2014; Christianen and others 2021). The green turtle is a species of large sea turtles, common throughout tropical and subtropical seas around the world. Green turtles may live

up to 80 years, migrate long distances between hatching beaches and feeding grounds, and have high fidelity to their grazing ground (Esteban and others 2020). In the Caribbean, green turtles preferentially graze on *T. testudinum*, and if grazing intensity is low to moderate, they use a rotational (or cultivation) grazing strategy (Molina and van Tussenbroek 2014). But when the turtles become too abundant, they change their feeding strategy, resulting in overgrazing and even consuming entire plants including rhizomes, eventually leading to the collapse of the seagrass meadow (Christianen and others 2021). Under such a regime of overgrazing, Leemans and others (2020) demonstrated that in a dense rhodolith bed, the spiny structures of coralline algae induced avoidance behavior of the green turtles, thereby protecting the seagrass meadows from collapse (that is disappearing entirely).

Here we address how the state of the system (conditional outcome) described by Leemans and others (2020) depends on the strengths of the antagonistic, mutualistic and facilitative interactions among the seagrasses, green turtles and coralline algae in this tropical marine system. We question how the dense rhodolith bed came into existence, and how it could expand so fast, initiating the mutualism between the coralline algae and seagrasses that prevented the collapse of the seagrass meadow. We hypothesized that (1) the canopy of ungrazed seagrasses inhibits or reduces growth of the rhodoliths and geniculate coralline algae, and (2) a positive feedback explained the population explosion of the coralline algae, specifically, we hypothesized that the dense rhodolith bed may prevent sediment resuspension.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study Site*

The study site was the north of Akumal Bay (20°23'44.9" N, 87°18'47.9" W). It is a tropical small embayment protected by a fringing reef at ~100 - 300 m from the coast. Akumal Bay is a popular tourist destination, particularly for snorkeling and turtle watching. Tourist demand and the consequent growth of coastal infrastructure have contributed to increase nutrient input by contaminated groundwater, and thus the eutrophication of the system (Mutchler and others 2007; Baker and others 2010; Gil and others 2015; Hernández-Terrones and others 2015). In this bay, tidal regime is microtidal, semi-diurnal, with a mean tidal range of ~0.14 m, and spring and neap tidal ranges of 0.3 and 0.08 m, respectively. Significant wave height in the reef-protected bay is ~0.2 m ( $\pm$  ~0.03 m), and varies little between summer and winter (Osorio-Cano and others 2019). The seagrass meadow in the lagoon covers ~ 4-5 ha in total and consist of *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, *Syringodium filiforme* with intermixed macroalgae typified by calcareous Chlorophytes and Rhodophytes, at 1.5 to 2.5 m depth (Lacey and others 2014; Molina-Hernández and van Tussenbroek 2014; Table 1). Seagrass meadows in Akumal Bay have been intensively grazed by a population of resident and visiting green turtles at least since 2007 (SEMARNAT 2015); shifting from a rotational grazing to a random grazing strategy (Molina-Hernández and van Tussenbroek 2014). Continuous grazing pressure by a (mainly) juvenile partially resident population of > 100 green turtles (Labrada-Martagón and others 2017) on the slow-growing climax seagrass *T. testudinum* caused a sharp decline of this species in 2012, causing it to become replaced then by the more grazing tolerant fast-growing species *H. wrightii* (Molina-Hernández and van Tussenbroek 2014). Under the continuity of these circumstances, a possible collapse of the seagrass system was expected, as has been reported for seagrass meadows under turtle



overgrazing pressure (Christianen and others 2014); however, since 2014, *T. testudinum* recovered unexpectedly, increasing in biomass, shoot density and leaf size, simultaneously with a notorious increase of red coralline algae (*Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp.) forming a dense rhodolith bed.

#### *Expansion of the rhodolith bed*

Spatio-temporal changes of the rhodolith bed were determined through analysis of a total of six satellite images from Planet Platform, Rapid Eye constellation. The satellite data from June 2009, February 2010, February 2012, February 2014, January 2015 and October 2016 consisted of 16-bit radiometric resolution with 5 bands: red (630 - 685 nm), green (520 - 590 nm), blue (440 - 510 nm), red edge (690- 730 nm), and near infrared (760 - 850 nm); with a spatial resolution of 5x5 m. SNAP software from the European Space Agency (ESA) was used for preprocessing, which consisted of masking the area of interest, sun glint correction, and water column correction using the depth invariant index (DII). A supervised classification was performed in ENVI 5.3 software using red, green, blue and DII bands and the maximum likelihood algorithm (MLC). The cover of the benthic vegetation used to train the supervised classification was from three line transects set up in the area of interest in January 2016 (Banaszak and others 2016). By autonomous diving, 250 m long transects were placed at a direction of ~ 140-180° to the coastline, with 100 and 200 m between transects, and each start and end point of the transects was georeferenced by GPS. Tape measures were placed over the bottom to mark the transects, and video and photographic recordings of the benthic vegetation were made.

*Experiment 1: Do abundant seagrasses inhibit the growth of coralline algae?*

Samples of *Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp. were collected from the rhodolith bed and placed in large flat plastic trays filled with fresh seawater with a concentration of 20 mg/L Alizarin Red-S and containing an air pump. Alizarin Red-S is incorporated in the calcareous skeleton of the algae when they photosynthesize during the day. After one day almost all the pigment had been absorbed by the algae and the procedure was repeated. On the third day, the stained algae were placed in small areas (15 x 15cm) in the rhodolith bed, where the coralline algae were previously removed, and where seagrasses were absent or in low abundance (up to 3 foliar shoots of *S. filiforme* or *H. wrightii*). To mimic seagrass effects, stained algae were placed in groups of 8 (4 medium-sized individuals of each species), and each group was covered by 1 of 3 types of open-bottom acrylic boxes (15 x 15 x 15 cm) anchored to the sediment (Figure 1). Boxes had slits and holes in the sides, designed to annihilate water movement by waves and currents, but still allowing for gas exchange with surrounding water. The first type of box was transparent, reducing total average water flow by 85% (WR; Supporting material), the second was opaque (white acrylic), partly blocking sunlight in addition to reducing water movement (WR+LR). Light reduction boxes attenuated photosynthetically active radiation (PAR, 400-700 nm) by 60% (measured with an Odyssey Photosynthetic Active Radiation Logger), which was within the light reduction range by *Thalassia testudinum* canopies in the region reported by Enríquez and Pantoja-Reyes (2005). Finally, the control treatment (C) consisted of open and transparent boxes (15 x 15 x 6 cm height). Each treatment had 15 replicates; thus, in total 45 boxes were placed haphazardly in the field. Experiment maintenance consisted of cleaning the tops of boxes of the first and second treatment approximately every 4 days with a soft sponge to remove fouling epibiota.

The algae were positioned in the field in August 2015 and collected 69 days later in November 2015, after which they were placed in a 7.5% sodium hypochlorite (Clorox) solution for 120 minutes, that bleached the algae and revealed the Alizarin Red-S-stained calcareous skeleton (Figure 1d). After bleaching, the thalli were washed 3 times with water to remove all hypochlorite and dried. All algae from the same box were fragmented by hand and mixed, and 120 branches per species were selected haphazardly to measure the length of the new grown section (length growth tip in mm) of the ramification (obvious as a white section above the stained part) with a dial caliper (precision 0.02 mm). The new growth from 11 dyed *Neogoliolithon sp.* individuals of the control treatment was separated from the old tissue with sharp pliers, and both old and new tissue were weighed to determine relative growth rate (RGR), for *Amphiroa sp.* samples RGR was not calculated because separating new from old growth was not possible.

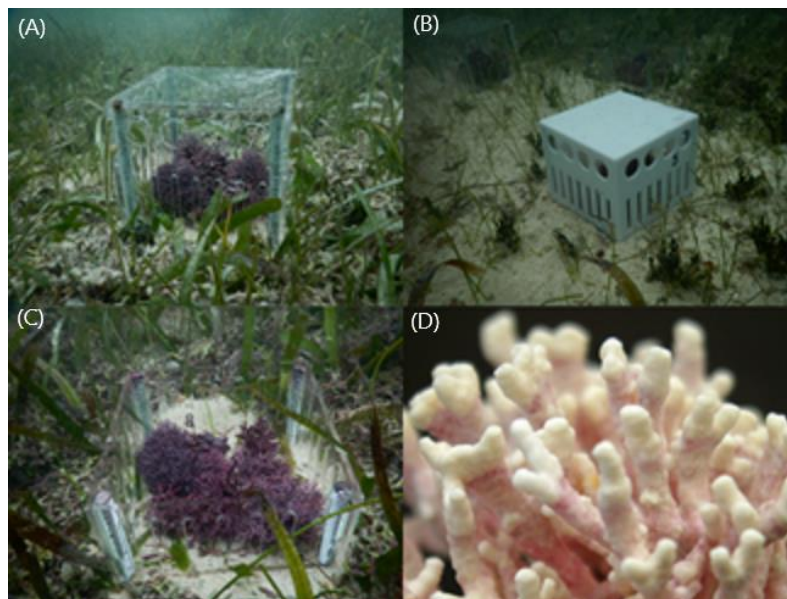


Figure 1. Coralline algae growth experiment. (A) reduction of wave movement WR, (B) reduction of wave movement and sunlight WR+LR, and (C) control, (D) *Neogoliolithon sp.* stained with Alizarin Red-S, after 10 weeks of growth; white tips are newly formed sections.

*Experiment 2: Do coralline algae benefit from dense aggregations?*

To test whether coralline algae in dense aggregations have lower mortality as compared to areas with few coralline algae, so to establish whether positive feedback may occur, we collected coralline algae (*Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp.) from the rhodolith bed using six 15x15 cm quadrats. The samples were divided in two equal parts and placed in numbered bags. One half of these samples was placed in 15x15 cm boxes (as those in control treatment of experiment 1) and positioned within the rhodolith bed, while the second half was placed in 15x15 cm boxes in a nearby area without coralline algae (sparsely covered by grazed *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii*). The specimens in equal halves of the samples were assumed to have the same proportional dead to live tissue. The algae were retrieved after 15 days and placed in numbered ziploc bags for transport. In the laboratory, samples were separated in three morphospecies: (1) compact hemispherical clumps *Neogoniolithon* sp. without branches, (2) branching *Neogoniolithon* sp., and (3) branching geniculate *Amphiroa* sp. The proportion of white tissue (dead) respect to all tissue (live pink +dead white tissue) was determined visually on the hemispherical clumps *Neogoniolithon* sp., branching *Neogoniolithon* sp. and branching geniculate *Amphiroa* sp. were broken, and branch sections were separated in white (dead) or pink (alive). All samples were dried for 48 h in a drying oven at 60 C°. Dry weights and the proportion of live tissue per each morphospecies were determined.

### *Experiment 3: Mechanism of positive feedbacks in rhodolith beds: reduced sediment resuspension*

To test whether dense and bed forming aggregations of coralline algae reduce resuspension as compared to small patches ( $1\text{m}^2$ ) of coralline algae in sparsely grazed *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii*, we established twenty  $1\times 1$  m plots in two different conditions in September 2015. The first condition consisted in ten plots haphazardly established within the sparse and grazed seagrass section and outside the rhodolith bed. Within the  $1\times 1$  plots, coralline algae of both species (~95% *Neogoniolithon* sp. and ~5% *Amphiroa* sp.) were placed manually until reaching a ~5 cm thick layer of algae; which was the average thickness of the rhodolith bed. For the second condition, which served as control, the remaining ten plots were placed within the well-developed rhodolith bed (3-6.8 cm thick layer), and where *T. testudinum* was also grazed (see Leemans and others 2020 for further details). Within each plot, two 5 ml Eppendorf tubes (sediment traps; Johnson and others 2019) were placed on small stakes considering the upper level of the tubes to be ~ 7 cm above the sea floor. After 14 days, Eppendorf tubes were retrieved in order to determine sediment dry weight within them. Laboratory processing consisted of placing Eppendorf tubes in a drying oven to determine their dry weight with sediment, to later remove the sediment and repeat the procedure to determine the weight of the Eppendorf tubes.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed with R (v. 3.6, R Development Core Team 2017) and Statistica (8.0 StatSoft Power Solutions, Inc.). Mean  $\pm$  standard deviation (SD) was used to show the variability of parameters in this study. For experiment 1, when N is given for nested data, it refers to the number of boxes per treatment not to the total number of tip length measurements (n). When SD is given for nested data, it is of subject means. To compare treatments with

nested and random factors a generalized linear mixed model (hereafter GLMM) was used, followed by a pairwise comparisons. A GLM two-way ANOVA was used for experiment 2 to test differences in the proportion of live tissue per coralline algal morphotype (*Neogoniolithon* sp. in its hemispherical clumps or branched type, and *Amphiroa* sp.), and per condition (inside a rhodolith bed or outside). For data of experiment 3, a two-sample t-test was performed to determined differences in sediment dry weight in sediment traps (Eppendorf tubes) inside a rhodolith bed or outside the coralline algae aggregation. The data for each plot (gr of dry sediment per tube) were pooled to obtain one datum per plot. Assumptions of normality were tested through Shapiro-Wilk normality test, and Levene test was performed to test equal variance. Probable outliers were identified with Dixon's Q-test (CL=95%) and removed due to suspected procedural errors. Two C, one WR and four WR+LR replicates were excluded for *Neogoniolithon* sp. GLMM analysis; and three C, one WR and four WR+LR boxes were excluded for *Amphiroa* sp. GLMM analysis. Length growth (mm) data were log transformed (experiment 1), and a BoxCox transformation was performed to sediment dry weight (gr) because of differences in variance between groups (experiment 3).

## RESULTS

### *Expansion of the rhodolith bed*

Satellite imagery and in situ verification of the benthic cover discerned three classes classified as: 1. rhodolith bed, consisting of a dense (usually 100%) cover of coralline algae (*Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp.) with or without sparse seagrasses; 2. seagrass meadow, usually consisting of sparse mixed vegetation dominated by *Halodule wrightii* and

in low densities *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme*; and 3. sand areas with < 30% vegetation cover (Figure 2).

In 2009, no rhodolith bed was detected by satellite imagery. In 2011, the abundance of the coralline algae increased and a small (~900 m<sup>2</sup>) rhodolith patch was visible in the center of the bay surrounded by a heavily grazed seagrass meadow, as was identified during field surveys (see also Molina-Hernandez and van Tussenbroek 2014). The rhodolith bed increased rapidly in size to 2367 m<sup>2</sup> in 2014 (Figure 3), and to 6025 m<sup>2</sup> in 2015. The population growth rate leveled off from 2015 until 2016 when it covered an area of 6934 m<sup>2</sup> (Figure 3).



Figure 2. Benthic cover classes: (A) Rhodolith bed; here with foliar shoots of the seagrass *Thalassia testudinum*; (B) seagrass meadow; here with dominance of *Halodule wrightii* and low densities of *T. testudinum* and *Syringodium filiforme*; and (C) sand areas with <30% of vegetation cover.

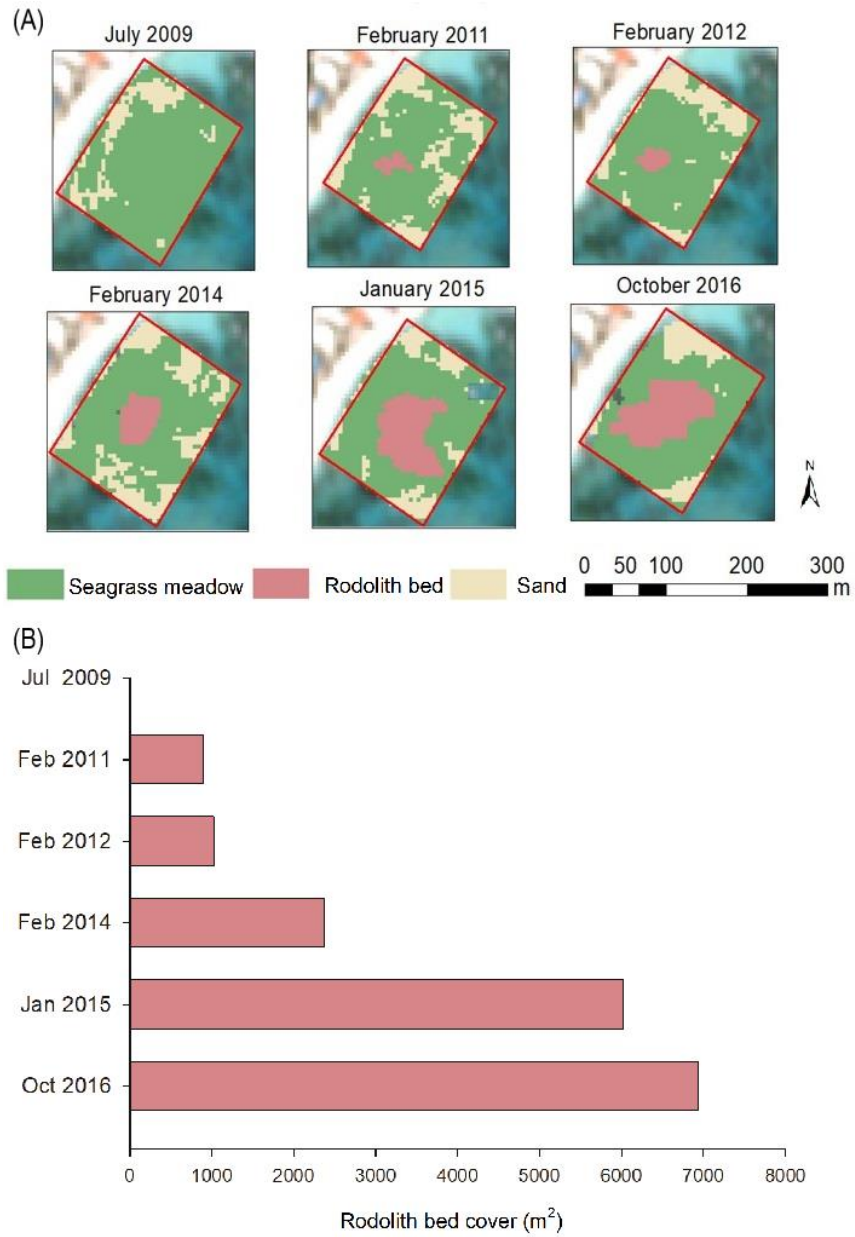


Figure 3. Development of rhodolith bed, detected by satellite imagery over 7-year period in the North section of Akumal Bay. (A) Image series of benthic classes (see Results) (B) Cover of the satellite detected rhodolith bed from 2009 to 2016.



*Experiment 1: Do abundant seagrasses inhibit the growth of coralline algae?*

The applied treatments (combination of reduction in light and wave movement) had a significant effect on growth for both *Neogoniolithon* sp. (GLMM:  $F_{(2,35)} = 8.9$ ,  $p < 0.001$ ), and *Amphiroa* sp. ( $F_{(2,34)} = 29.2$ ,  $p < 0.001$ ). Light reduction affected growth tissue more than wave reduction (Figure 4). While wave reduction (WR treatment) only slowed down *Amphiroa* sp. growth (13%), additional light reduction (WR+LR treatment) slowed down the growth of both *Amphiroa* sp. (41%) and *Neogoniolithon* sp. (27%). Mean increase in tip length during the study period was approx.  $1.80 \pm 0.13$  (mean  $\pm$  SD) mm for *Neogoniolithon* sp. and  $2.92 \pm 0.14$  mm for *Amphiroa* sp, corresponding with  $9.52$  and  $15.45$  mm tip  $y^{-1}$  for *Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp., respectively. In the control treatment (C), the dominant *Neogoniolithon* sp. increased  $10.3\% \pm 5.5$  from its live initial biomass (pink photosynthesizing sections of the thalli) in 10 weeks.

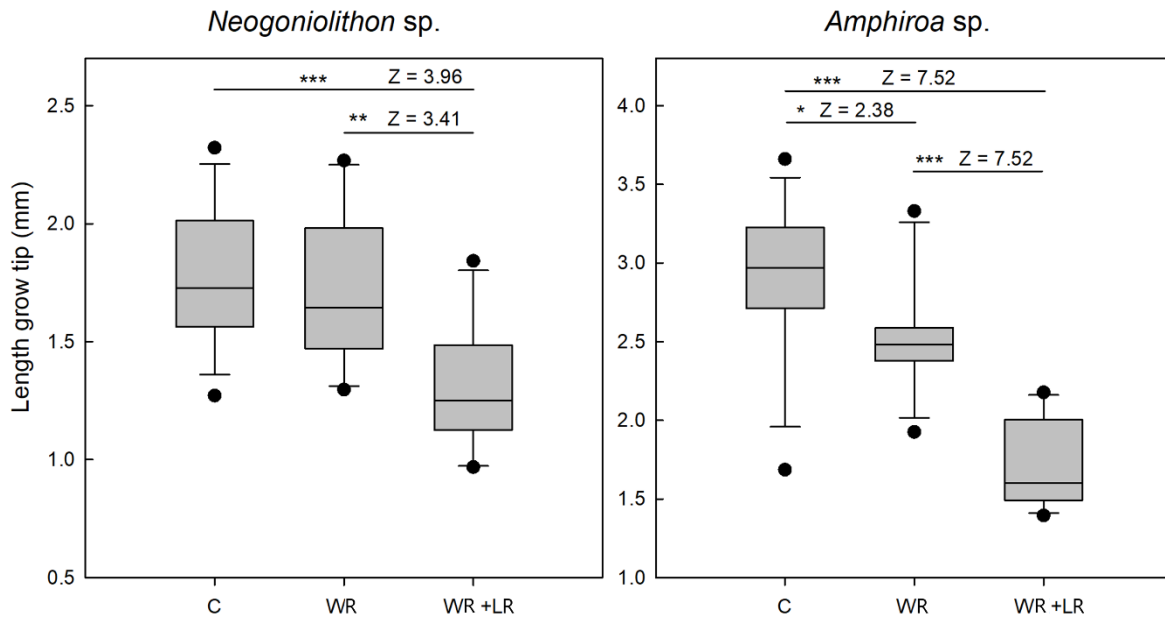


Figure 4. Box plot (Tukey style) of mean length growth in the tips of *Neogoniolithon sp.* and *Amphiroa sp.* after treatment (C = control, WR = Wave Reduction, WR+LR = Wave and Light Reduction). Mean  $\pm$  standard deviation (SD). Lines over bars indicate which groups significantly differ (Tukey's HSD test). Asterisks indicate significance level of the difference between treatments (\* $<.05$ , \*\* $<.01$ , \*\*\* $<.001$ ).

*Experiment 2: Do coralline algae benefit from dense aggregations?*

Coralline algae inside the rhodolith bed had significantly lower tissue mortality than the algae placed outside the rhodolith bed (GLM two-way ANOVA  $F_{(1,30)} = 23.8$   $p < 0.001$ ). Differences between morphospecies and the interaction of treatment and morphospecies were not significant (Table 2); however, *Amphiroa sp.* had higher proportion of live tissue than *Neogoniolithon sp.* in both conditions (Figure 5).

Table 1. Results of GLM two-way ANOVA on the proportion of live tissue of coralline morphospecies (compact hemispherical clumps *Neogoniolithon* sp. without branches, branching *Neogoniolithon* sp., and branching geniculate *Amphiroa* sp.) inside or outside the rhodolith bed (Treatment).

Effect	df	SS	MS	F	p
Treatment	1	0.29167	0.29167	23.789	<b>0.000033</b>
Coralline morphospecies	2	0.07298	0.03649	2.976	0.066199
Treatment*coralline morphospecies	2	0.00902	0.00451	0.368	0.695242
Error	30	0.36782	0.01226		

Note: Significantly different at alpha = 0.05 (in bold type).

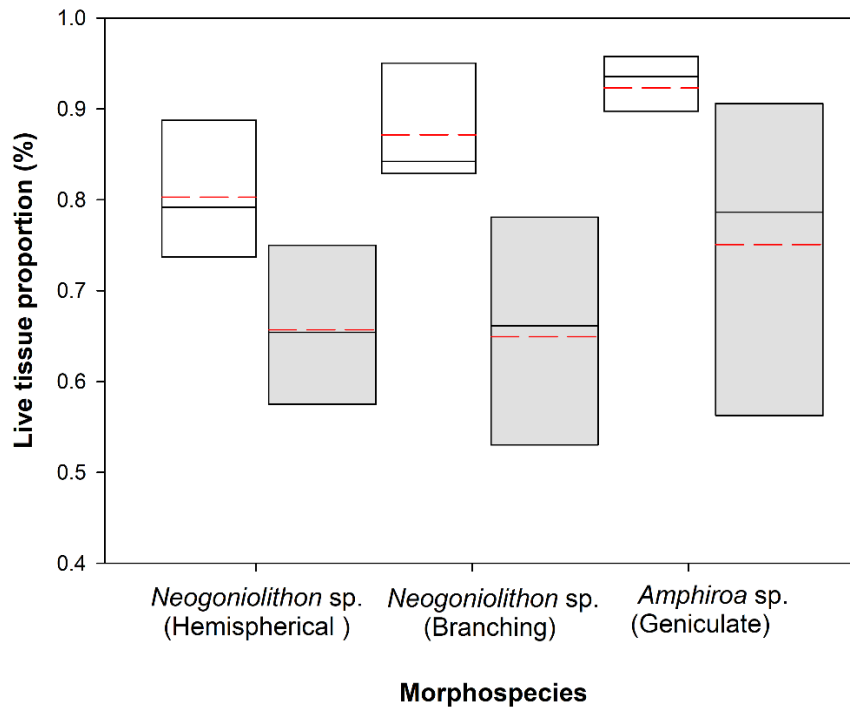


Figure 5. Box plots of live tissue proportion (%) in the three coralline algae morphotypes inside (white boxes) and outside (gray boxes) the rhodolith bed. Red dashed lines denote mean values, and black solid lines represent median values.

*Experiment 3: Mechanism of positive feedbacks in rhodolith beds: reduced resuspension?*

After 14 days of the experiment, significant differences ( $t_{16} = -7.0$   $p < 0.001$ ) were found between the sediment accumulated in the Eppendorf tubes of the two conditions. The tubes placed in the plots within the sparse and grazed seagrass meadow (and where the coralline algae were deposited manually), had significantly more sediment (mean  $\pm$  SD =  $0.2091 \pm 0.1017$  dry g), in comparison with the sediment accumulated in the tubes placed in the plots where the rhodolith bed was naturally present (mean  $\pm$  SD =  $0.05 \pm 0.02$  dry g).

## DISCUSSION

### *Population explosion of coralline algae*

The grazing-protection mutualism between seagrasses and coralline algae in the study area came into existence under a co-occurrence of increasing grazing pressure and rapid areal expansion of the rhodolith bed. The rapid increase of the coralline algae was likely forced by a combined effect of the improved light climate after grazing of the canopy by the green turtles, and a positive feedback leading to a decrease in sediment resuspension and lower mortality of the coralline algae once they reached a critical density. In 2009, when turtle grazing on the seagrass was still moderate, the coralline algae were sparse, and individual thalli occurred mostly scattered at the edges of the seagrass meadow, forming no detectable rhodolith bed. From 2010-2011 until 2015, the coralline algae formed a dense aggregation of 6025 m<sup>2</sup> with a 3.0-6.8 cm thick layer (with average calcified biomass of 5.6 dry kg m<sup>-2</sup>, 95% accounted for by *Neogoniolithon* sp.; Leemans and others 2020). In this rhodolith bed, the dominant species, *Neogoniolithon* sp., increased 10.3% ( $\pm$  5.5%) with respect of its live initial biomass (pink photosynthesizing sections of the thalli) in 10 weeks, which corresponds with a Relative Growth Rate (RGR) of 0.14 (% d<sup>-1</sup>), implying that the algae doubled their size in 495d (~ 1 y and 4 months), as the old calcareous skeletons remained mostly intact. This RGR explains the rate of size increase of the rhodolith bed (0.14 % d<sup>-1</sup> from 2011 until 2015, when the size increased from 900 to 6025 m<sup>2</sup> in 4 y). This increase in rhodolith bed size corresponds with an annual production of 3512 g CaCO<sub>3</sub> m<sup>-2</sup>, as 94.3% of the biomass is calcium carbonate (Vázquez-Elizondo and Enriquez, 2017), which is more than four times the annual production of 815 g CaCO<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> y<sup>-1</sup> for another important calcifying algae in tropical reef systems, *Halimeda incrassata*, in a Caribbean seagrass meadow found by Van Tussenbroek and Van Dijk (2007). The expansion of the rhodolith bed leveled off in 2016

(Per. Obs.), as in certain places near the edges of the rhodolith bed the absence of grazing appeared to result in *T. testudinum* achieving densities sufficiently high to shade the coralline algae, inhibiting further expansion. Alternatively, intermittent green turtle grazing on *T. testudinum* and consequential shading of the coralline algae may result in a stable coralline algal turnover, stabilizing the size of the rhodolith bed.

The mean growth rates of the coralline algae in this study at 9.5 (*Neogoniolithon* sp.) and 15.5 (*Amphiroa* sp.) mm tip  $y^{-1}$  are in the high range, compared with rhodoliths elsewhere. Steller and others (2007) reported a growth rate (mean  $\pm$ SD) of  $5.02 \pm 1.16$  mm tip  $y^{-1}$  for *Lithophyllum margaritae* (summer season) in the south of the Gulf of California; while Caragnano and others (2016) reported growth rates ranging from 8.74 mm  $y^{-1}$  for *Lithophyllum kotschyianum*, 13.92 mm  $y^{-1}$  for *Porolithon onkodes*, and 9.25 mm  $y^{-1}$  for *Neogoniolithon* sp in the Red Sea. The high growth rates values in this study may be attributed to the shallow depth (2-3 m), as often rhodoliths are found at greater depths  $>5$  m where light may be limiting growth (Foster and others 2001).

High nutrient input in Akumal bay may also help to explain the fast growth of the coralline algae, although increasing eutrophication is not a suspected cause of the timing of the observed coralline algae population increase, as nutrient levels in Akumal have been high for at least 15 years (Mutchler and others 2007; Baker and others 2010; Hernández-Terrones and others 2015). In addition, in typically oligotrophic systems, eutrophication initially results in an increase of foliar biomass of the seagrasses, and thereby potentially shading the coralline algae (Cortés and others 2019).

*Neogoniolithon* sp. and *Amphiroa* sp. in the Mexican Caribbean were reported with relatively high minimum photosynthetic requirements, but these species are equipped with optical attributes, such as a thick light-scattering  $CaCO_3$  skeleton (*Neogoniolithon* sp.) or delicate

highly ramified thalli (*Amphiroa* sp.), which aid in effective absorption of light. In our study, *Neogoniolithon* sp. was affected by reduction in light and wave (WR+LR), which caused 27% growth reduction when compared with only wave reduction (WR) and control treatment (C); *Amphiroa* sp. was affected by wave reduction (13% decrease in growth compared to control) and combined wave and light reduction decreased growth by 41%. The levels of light reduction in this study were in the same order of magnitude as the light reduction by seagrass canopies; thus, shading by seagrass canopy likely reduces the growth rates of the coralline algae. Reductions in growth rate may prevent the formation of dense coralline algal aggregations; however, seagrasses are also beneficial to coralline algae (see also Harvey and others 2017) as their canopies relieve hydrodynamic stress by attenuating currents and waves (van der Heide and others 2011), and their rhizomes improve sediment stabilization even when the meadows are under intensive grazing (high turtle density) or a rotational grazing regime (Christianen and others 2013; Johnson and others 2019), which favors coralline algae that are highly susceptible to sedimentation (Riosmena-Rodríguez and others 2017). Also, seagrasses, either grazed or not, prevent coralline algae from being flushed away (Leemans and others 2020). We expected an effect of wave movement reduction on the algae, as Riosmena-Rodríguez and others (2017) reported that occasional rotation of the thalli is necessary to prevent sedimentation and to allow light to reach all surfaces of the thalli, although excessively strong water motion may break thalli preventing rhodoliths from forming (Case Marrak 1997). In the rhodolith bed, *Neogoniolithon* sp. was not affected by reduction of wave movement (WR) alone, and *Amphiroa* sp. only slightly; possibly because sedimentation rates were already lower in the rhodolith bed.

Positive (“amplifying”) and negative (usually “stabilizing”) feedbacks are an integral part of natural systems and may involve biological, physical and chemical processes (Nyström and

others 2012; Kéfi and others 2016). Positive feedback mechanisms often emerge in cases in which organisms significantly modify their environment, thereby facilitating their own optimal development. Such mechanisms typically cause a complex, nonlinear response of ecosystems to changes in their environment (van der Heide and others 2011). Through positive feedbacks, many foundation species like reef-forming corals, giant kelps, seagrasses and bed-forming coralline algae can make an originally stressful or almost inhospitable habitat more suitable not only for them, but also for other species (Kéfi and others 2016). We demonstrated that even 1 m<sup>2</sup> plots with a  $\geq 5$  cm thick layer of coralline algae had higher sediment resuspension rates than those inside the rhodolith bed, it is likely that larger sized beds are needed to sustain this positive feedback through reduction of sediment load on the coralline algae. During field inspections, we observed that the coralline algae at the edges of the 1x1 m<sup>2</sup> plots in the sparse seagrass bed were gradually buried by the surrounding fine sediments, which is known to induce mortality of coralline algae (Melbourne and others 2018). We found that coralline algae within the rhodolith bed had significantly lower mortality than those placed manually in the sparse seagrass meadow, supporting our hypothesis that through self-facilitation, coralline algae improved seabed stabilization, thereby reducing resuspension and creating a self-sustaining positive feedback with consequential population explosion.

#### *Conditional outcomes*

Bronstein (1994) predicted that mutualistic interactions are likely more dynamic if the relationships: 1) are facultative, 2) involve a third species, and 3) are density-dependent. All three conditions were present in our studied system. The mutualistic interaction between turtle grass *Thalassia testudinum* and coralline algae, in which the coralline algae protect the



seagrass from grazing and the seagrass allows for aggregation of the algae through prevention of excessive sediment resuspension or being removed by waves, is facultative; both the turtle grass and coralline algae occur without the other in a wide range of biotic and abiotic conditions.

The third species involved is the green turtle *Chelonia mydas*; and the mutualism between the turtle grass and coralline algae occurs only when a dense seagrass canopy is cropped continuously by the turtles as a result of an increase in turtle density. When the density of the turtles in Akumal Bay increased to such a level that they resorted to prolonged grazing, then the canopy was reduced for sufficient time allowing for a significant increase of the coralline algae density. At this level, turtle monitoring efforts in Akumal Bay reported between ~70 to ~90 different turtles during a sensing period of various months (in unpublished reports by park managers, NGOs, etc.), and Labrada-Martagón and others (2017) captured (and recaptured) 166 turtles over a period of 10 y in the bay. And once the coralline algae had formed a dense rhodolith bed, the protection from turtle grazing became effective (Leemans and others 2020).

When coexisting, turtle grass, coralline algae, and sea turtles are connected through multiple interactive mechanisms (Figure 6). From our results we postulate that incidentally present coralline algae start to expand when grazing of the seagrass canopy leads to a better light climate (this study). This leads to vigorous expansion of the rhodolith bed, likely due to a combination of self-facilitation (positive feedback resulting from reduced resuspension, this study) and facilitation by seagrass to not be flushed away by water movement (Leemans and others 2020). But the grazing protection may eventually lead to seagrass recovery and thus shading by the canopy; in other words, this interaction may become progressively more antagonistic for the coralline algae. Such interactive feedbacks may present boom and bust

situations (van der Heide and others 2007; Kéfi and others 2016); but the seagrasses do not entirely inhibit the growth of the coralline algae, and the turtles continued to crop the upper parts of the foliar shoots that emerged from the rhodolith bed (Leemans and others 2020), which may aid in maintaining the coralline-seagrass-turtle coexistence.

### *Concluding paragraph*

Akumal Bay is quite unique (Mexican Caribbean), as in that the seagrass meadow only ~4.5ha large hectares, sustains a relatively large persistent (mainly juvenile) turtle population, and has been registered eutrophication at least since 2008 (Baker and others 2010). Most seagrass meadows in the Mexican Caribbean are more extensive (e.g., Guimaraes and others 2021), where the turtles adopt a rotational grazing regime (Molina Hernandez and van Tussenbroek 2014; Martinez Lopez and others 2019). Seagrasses and coralline algae coexist in many places without the formation of a rhodolith bed; likely a unique combination of factors is necessary for such a formation to come into existence. Usually, environments that allow for fast coralline algae growth in seagrass meadows, such as low sedimentation, sufficient light and moderate nutrient availability, also favor dense seagrass canopies. Only the presence of a third agent such as sea turtles, exerting excessive grazing pressure, may allow for coralline algal proliferation in such a system. In the last decades, green turtle densities have been increasing and their increasing impacts on seagrass meadows worldwide is becoming more notorious (Christianen and others 2021); therefore, we expect that systems with coralline algal explosions, such as that seen to occur in Akumal, may become more common in the near future.

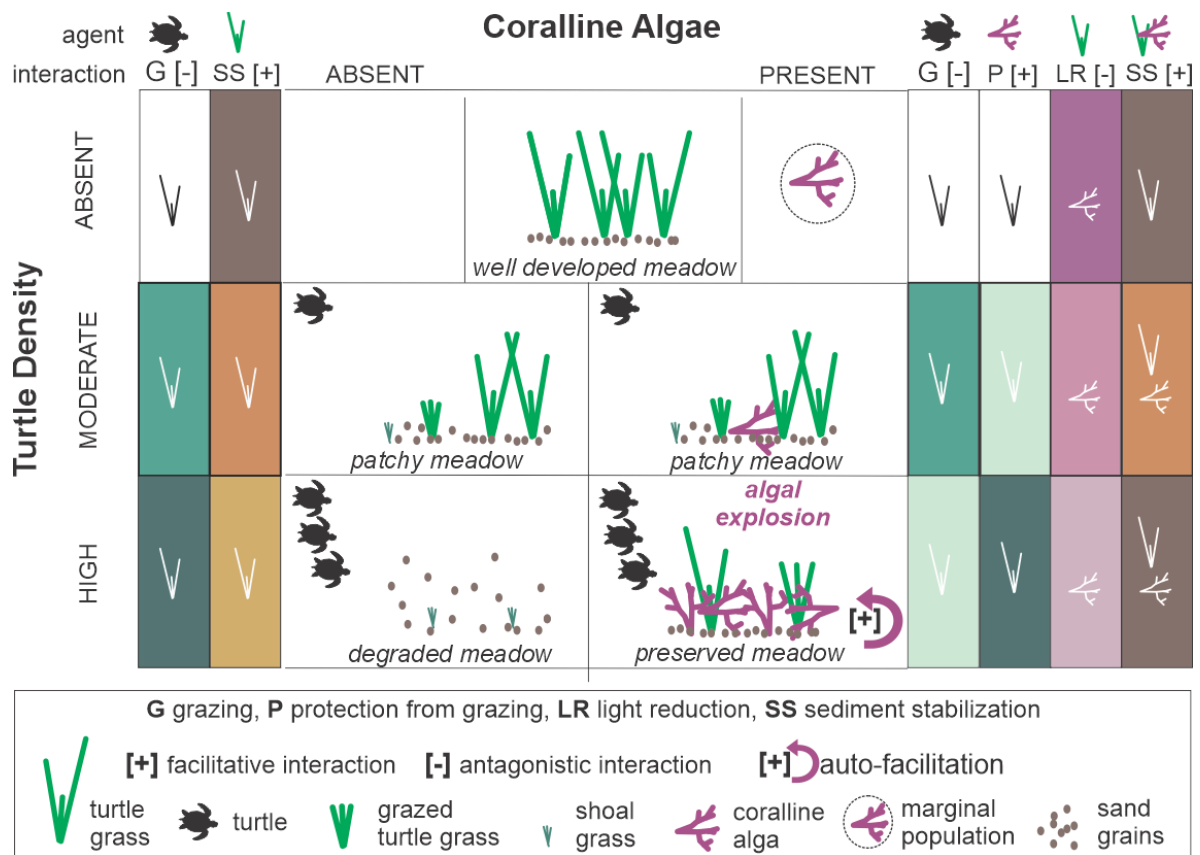


Figure. 6. Conditional outcomes of the state of the seagrass meadow, with or without coralline algae, with different green turtle densities. Darker colors of the lateral columns indicate stronger interactions; the symbols in the cells of the column indicate the component affected by the interactive process. When turtle densities are low or moderate, the state of the seagrass meadow is the same with or without coralline algae. When turtle density is high and coralline algae are absent, the seagrasses are overgrazed, and the system degrades or collapses. When the coralline algae are present, continuous cropping will decrease shading by the seagrass canopy, allowing for faster algal growth, resulting in a coralline algal population explosion due to positive feedback through reduction of sediment resuspension, which results in a mutualistic steady state in which coralline algae protect the seagrasses from overgrazing by turtles, although moderate grazing by turtles may continue.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Maria Guadalupe Barba Santos for supporting this study in the field and laboratory.

We are grateful to Edgar Escalante Mancera and Miguel Ángel Gómez Reali who helped with the calculation of water movement reduction of the acrylic boxes used in Experiment 1.

Isis Gabriela Martínez López received PhD fellowship support from The Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), the part of the work was financed by SEMARNAT (PROCER/CCER/DRPYYCM/02/2016). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## BIBLIOGRAPHY

- Adams Mp, Hovey RK, Bruce LC, Ghisalberti M, Lowe RJ, Gruber RK, Ruíz-Montoya L, Maxwell PS, Callaghan DP, Kendrick GA, O'Brien KR. 2016. Feedback between sediment and light for seagrass: Where is it important? *Limnology and Oceanography*. 61:1937–1955. <https://doi.org/10.1002/lno.10319>
- Baker DM, Jordán-Dahlgren E, Maldonado MA, Harvell CD. 2010. Sea fan corals provide a stable isotope baseline for assessing sewage pollution in the Mexican Caribbean. *Limnology and Oceanography*. 55:2139–2149. DOI: 10.4319/lno.2010.55.5.2139.
- Banaszak AT, BI van Tussenbroek, AC Claudia Padilla Sosa. 2016. Determinación del estado de conservación y caracterización de los ecosistemas en los dos principales polígonos de observación y nado con tortuga en el refugio para la protección de especies-bahía Akumal. Informe final de Programa de Conservación de especies en Riesgo (PROCER), ejercicio fiscal 2016. Financiado por SEMARNAT (PROCER/CCER/DRPYYCM/02/2016)
- Baraza E, Zamora R, Hódar JA, Gómez JM. 2007. Plant–Herbivore Interaction: Beyond a Binary Vision. 10.1201/9781420007626-16.
- Bronstein JL. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*. 9(6): 214-217. DOI: 10.1016/0169-5347(94)90246-1
- Callaway RM. 1997. Positive interactions in plant communities and the individualistic-continuum concept. *Oecologia*. 112:143–149. DOI: 10.1007/s004420050293.
- Caragnano A., D Basso, G Rodondi. 2016. Growth rates and ecology of coralline rhodoliths from the Ras Ghamila back reef lagoon, Red Sea. *Marine Ecology*. 37:(4): 713-726. DOI: 10.1111/maec.12371
- Case Marrak E. 1997. The relationship between water motion and rhodolith movement in the Southwestern Gulf of California, Mexico. Moss Landing Marine Laboratories.

- Christianen MJA, Herman PMJ, Bouma TJ, Lamers LPM, van Katwijk MM, van der Heide T, Mumby PJ, Silliman BR, Engelhard S, van de Kerk M, Kiswara W, van de Koppel J. 2014. Habitat collapse due to overgrazing threatens turtle conservation in marine protected areas. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 20132890 DOI:10.1098/rspb.2013.2890
- Christianen MJA, van Katwijk MM, van Tussenbroek BI, Pagès JF, Ballorain K, Kelkar N, Arthur R, Alcoverro T. 2021. A successful view of seagrass meadows in the wake of successful green turtle conservation. *Nature Ecology & Evolution*. 5: 553–555. DOI: 10.1038/s41559-021-01433-z
- Cortés J, Oxenford HA, van Tussenbroek BI, Jordán-Dahlgren E, Cróquer A, Bastidas C, Ogden JC. 2019. The CARICOMP Network of Caribbean Marine Laboratories (1985-2007): - History, Key Findings, and Lessons Learned. *Frontiers in Marine Science*. 5:519. DOI: 10.3389/fmars.2018.00519
- Davis BC and Fourqurean JW. 2001. Competition between the tropical alga *Halimeda incrassata* and the seagrass, *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*. 71: 2017-232. DOI: 10.1016/S0304-3770(01)00179-6
- Dutertre M, Grall J, Ehrhold A, Hamon D. 2015. Environmental factors affecting maerl bed structure in Brittany (France). *European Journal of Phycology*. 50 (4): 371-383. DOI: 10.1080/09670262.2015.1063698
- Enríquez S, Pantoja-Reyes NI. 2005. Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia* 145:235–243. DOI: 10.1007/s00442-005-0111-7.
- Esteban N, Mortimer JA, Stokes HJ, Laloë JO, Unsworth RKF, Hays GC. 2020. A global review of green turtle diet: sea surface temperature as a potential driver of omnivory levels. *Marine Biology*. 167-183. DOI: 10.1007/s00227-020-03786-8
- Foster MS. 2001. Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology*. 37: 659-667. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.00195.x
- Fourqurean JW, Powell GVN, Kenworthy WJ, Zieman JC. 1995. The effects of long-term manipulation of nutrient supply on competition between the seagrass *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii* in Florida Bay. *Oikos*. 72(2): 349-358. DOI: 10.2307/3546120
- Gil MA, Renfro B, Figueroa-Zavala B, Penié I, Dunton KH. 2015. Rapid tourism growth and declining coral reefs in Akumal, Mexico. *Marine Biology*. 162:2225–2233. DOI: 10.1007/s00227-015-2748-z.
- Guimaraes M, Zúñiga-Ríos A, Cruz-Ramírez CJ, Chávez V, Odériz I, van Tussenbroek BI, Silva R. 2021. The conservational state of coastal ecosystems on the Mexican Caribbean coast: environmental guidelines for their management. *Sustainability* 13(5):2738. <https://doi.org/10.3390/su13052738>.
- Harvey AS, Harvey RM, Merton E. 2017. The distribution, significance and vulnerability of Australian rhodolith beds: A review. *Marine and Freshwater Research*. 68:411–428. DOI: 10.1071/MF15434.
- Heithaus MR, Alcoverro T, Arthur R, Buckholder DA, Coates KA, Christianen MJA, Kelkar N, Manuel SA, Wirsing AJ, Kenworthy WJ, Fourqurean JW. 2014. Seagrasses in the age of sea turtle conservation and shark overfishing. *Frontiers in Marine Science*. 1. DOI: 10.3389/fmars.2014.00028
- Hernández-Terrones LM, Null KA, Ortega-Camacho D, Paytan A. 2015. Water quality assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem. *Continental Shelf Research*. 102:62–72. DOI: 10.1016/j.csr.2015.04.015.

- Johnson RA, Gulick AG, Bolten AB, Bjorndal KA. 2019. Rates of sediment resuspension and erosion following green turtle grazing in a shallow Caribbean *Thalassia testudinum* meadow. *Ecosystems* 22:1787–1802. <https://doi.org/10.1007/s10021-019-00372-y>.
- Kéfi S, Holmgren M, Scheffer M. 2016. When can positive interactions cause alternative stable states in ecosystems? *Functional Ecology*. 30:88–97. DOI: 10.1111/1365-2435.12601.
- Labrada-Martagón V, Tenería FAM, Herrera-Pavón R, Negrete-Philippe A. 2017. Somatic growth rates of immature green turtles *Chelonia mydas* inhabiting the foraging ground Akumal Bay in the Mexican Caribbean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 487:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.11.015>.
- Lacey EA, Collado-Vides L, Fourqurean JW. 2014. Morphological and physiological responses of seagrasses (Alismatales) to grazers (Testudines: Cheloniidae) and the role of these responses as grazing patch abandonment cues. *Revista de Biología Tropical* 62:1535. DOI: 10.15517/rbt.v62i4.12844.
- Leemans L, Martínez I, van der Heide T, van Katwijk MM, van Tussenbroek BI. 2020. A Mutualism Between Unattached Coralline Algae and Seagrasses Prevents Overgrazing by Sea Turtles. *Ecosystems*. DOI: 10.1007/s10021-020-00492-w.
- Martínez-López IG, van Den Akker M, Walk L, van Katwijk MM, van der Heide T, van Tussenbroek BI. 2019. Nutrient availability induces community shifts in seagrass meadows grazed by turtles. *PeerJ*. 7:e7570. <https://doi.org/10.7717/peerj.7570>
- Maxwell PS, Eklöf JS, van Katwijk MM, O'Brien KR, de la Torre-Castro M, Boström C, Bouma TJ, Krause-Jensen D, Unsworth RKF, van Tussenbroek BI, van der Heide T. 2017. The fundamental role of ecological feedback mechanism for the adaptive management of seagrass ecosystem- a review. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 92 (3): 1521-1538. DOI: 10.1111/brv.12294.
- Melbourne LA, Denny MW, Harniman RL, Rayfield EJ, Schmidt DN. 2018. The importance of wave exposure on the structural integrity of rhodoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 503:109–119. DOI: 10.1016/j.jembe.2017.11.007.
- Molina-Hernández ALM, van Tussenbroek BI. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea turtles. *Marine Ecology Progress Series*. 517:143–157. DOI: 10.3354/meps11068.
- Mutchler T, Dunton KH, Townsend-Small A, Fredriksen S, Rasser MK. 2007. Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 74:449–457. DOI: 10.1016/j.ecss.2007.04.005.
- Nordlund LM, Koch EW, Barbier EB, Creed JC. 2016. Seagrass ecosystem services and their variability across genera and geographic regions. *PLoS ONE*. 11(10): e0163091. DOI: 10.1371/journal.pone.0163091
- Nyström M, Norström AV., Blenckner T, de la Torre-Castro M, Eklöf JS, Folke C, Österblom H, Steneck RS, Thyresson M, Troell M. 2012. Confronting Feedbacks of Degraded Marine Ecosystems. *Ecosystems*. 15:695–710. DOI: 10.1007/s10021-012-9530-6.
- Orth RJ, Lefcheck JS, McGlathery KS, Aokl L, Luckenbach MW, Moore KA, Oreska, MPJ, Snyder R., Wilcox DJ, Lusk B. 2020. *Science Advances*. 6(41): 1-10. DOI: 10.1126/sciadv.abc6434
- Osorio-Cano JD, Alcérreca-Huerta JC, Mariño-Tapia I, Osorio AF, Acevedo-Ramírez C, Enriquez C, Costa M, Pereira P, Mendoza E, Escudero M, Astorga-Moar A, López-

- González J, Appendini CM, Silva R, Oumeraci H. 2019. Effects of roughness loss on reef hydrodynamics and coastal protection: approaches in Latin America. *Estuaries and Coasts* 42:1742–1760. <https://doi.org/10.1007/s12237-019-00584-4>.
- Qui-Minet ZN, Delaunay C, Grall J, Six C, Cariou T, Bohner O, Legrand E, Davoult D, Martin S. 2018. The role of local environmental changes on maerl and its associated non-calcareous epiphytic flora in the Bay of Brest. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 208: 140-152. DOI: 10.1016/j.ecss.2018.04.032
- Riosmena-Rodriguez R, Nelson W, Aguirre J. 2017. *Rhodolith/Maërl Beds: A Global Perspective*. USA: Springer US. DOI: 10.1007/978-3-319-29315-8\_11.
- SEMARNAT. 2015. Estudio técnico justificativo para declarar Área de refugio para protegertortuga verde, tortuga carey y tortuga caguama; cuatro especies de corales, tres especies de mangle; tres especies de pastos marinos, todos ubicados en el área marina conocida como Bahía de Akumal, Quintana Roo. México.
- Stachowicz JJ. 2001. Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities. *BioScience*. 51:235. DOI: 10.1641/0006-3568(2001)051[0235:mfatso]2.0.co;2.
- Steller D, Hernández-Ayón J, Riosmena-Rodríguez R y Cabello-Pasini A. 2007. Effect of temperature on photosynthesis, growth and calcification rates of the free-living coralline alga *Lithophyllum margaritae*. *Ciencias Marinas*. 33(4): 441-456. DOI: 10.7773/cm.v33i4.1255.
- Steller DL, Foster MS. 1995. Environmental factors influencing distribution and morphology of rhodoliths in Bahía Concepción, B.C.S, México. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 194:201–212. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00086-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00086-0)
- Valentine JF, Heck KL Jr. 1999. Seagrass herbivory: evidence for the continued grazing of marine grasses. *Marine Ecology Progress Series*. 176: 291-302. <https://www.jstor.org/stable/24831891>
- van der Heide T, van Nes EH, Geerling GW, Smolders AJP, Bouma TJ, van Katwijk MM. 2007. Positive feedbacks in seagrass ecosystems: implications for success in conservation and restoration. *Ecosystems*. 10:1311–1322. <https://doi.org/10.1007/s10021-007-9099-7>
- van der Heide T, van Nes EH, van Katwijk MM, Olf H, Smolders AJP. 2011. Positive feedbacks in seagrass ecosystems - Evidence from large-scale empirical data. *PLoS ONE*. 6:1–7. DOI: 10.1371/journal.pone.0016504.
- van der Koppel J, Bouma TJ, Herman PM. 2012. The influence of local- and landscape-scale processes on spatial self organization in estuarine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*. 2015: 962-967. DOI:10.1242/jeb.060467
- van Tussenbroek BI, Van Dijk JK. 2007. Spatial and temporal variability in biomass and production of psammophytic *Halimeda incrassata* (Bryopsidales, Chlorophyta) in a Caribbean reef lagoon. *Journal of Phycology*. 43(1): 69-77. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2006.00307.x
- Vásquez-Elizondo RM, Enríquez S. 2017. Light Absorption in Coralline Algae (Rhodophyta): A Morphological and Functional Approach to Understanding Species Distribution in a Coral Reef Lagoon. *Frontiers in Marine Science*. 4:1–17. DOI: 10.3389/fmars.2017.00297.
- Williams SL. 1987. Competition between the seagrass *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme* in a Caribbean lagoon. *Marine Ecology Progress Series*. 35: 91-98. <http://www.jstor.org/stable/24825013>

- Williams SL. 1990. Experimental studies of Caribbean seagrass bed development. *Ecological Monographs*. 60(4): 449-469. DOI: 10.2307/1943015
- Wilson S, Blake C, Berges JA, Maggs CA. 2004. Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation. *Biological Conservation*. 120:283–293. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.03.001>



### Supporting information

Test to determine wave movement reduction by acrylic boxes (15 x 15 x 15 cm) of WR treatment in Experiment 1.

The test measured the angle of inclination of a small buoy attached to a lead with a cord placed in an approximate laminar flow generated with a submersible water pump with a flow rate of 20.6 L/min (EVANS, AQUA30W). The inclination of the buoy was measured under two conditions: outside (Figure 1) and inside the acrylic box (Figure2). Inclination angles were measure with a protractor, and were used to calculate a proxy of reduction of water movement, expressed as % reduction of the flow.

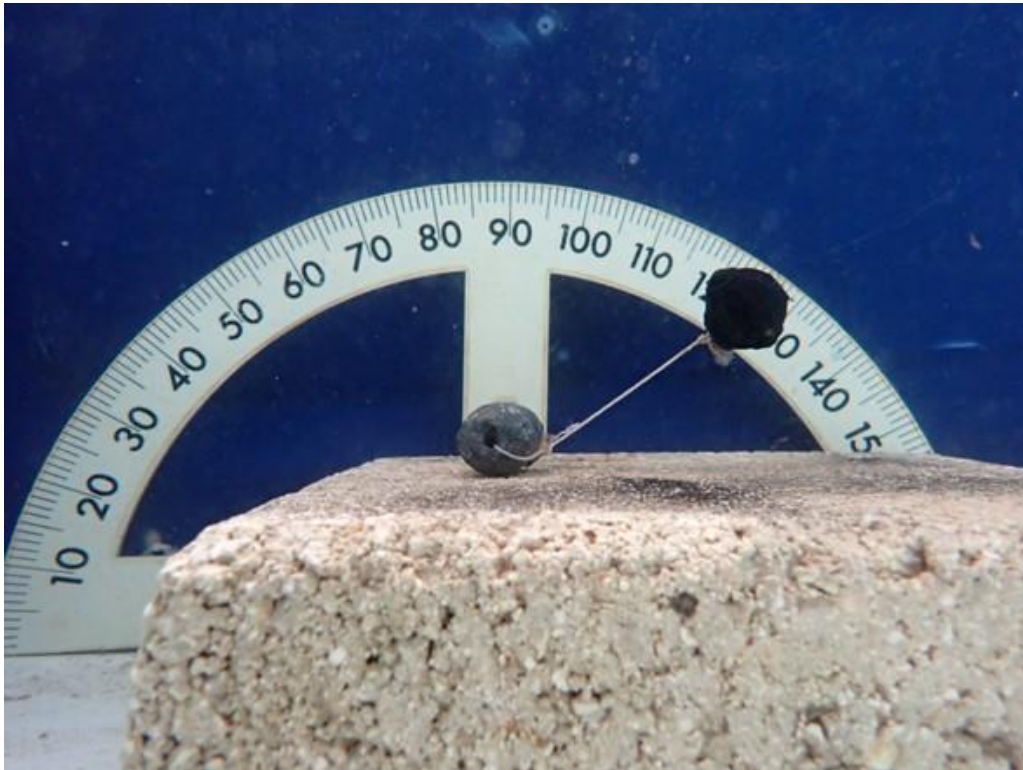


Figure 1. The approximate laminar flow inclined the buoy at a constant angle of 35°.

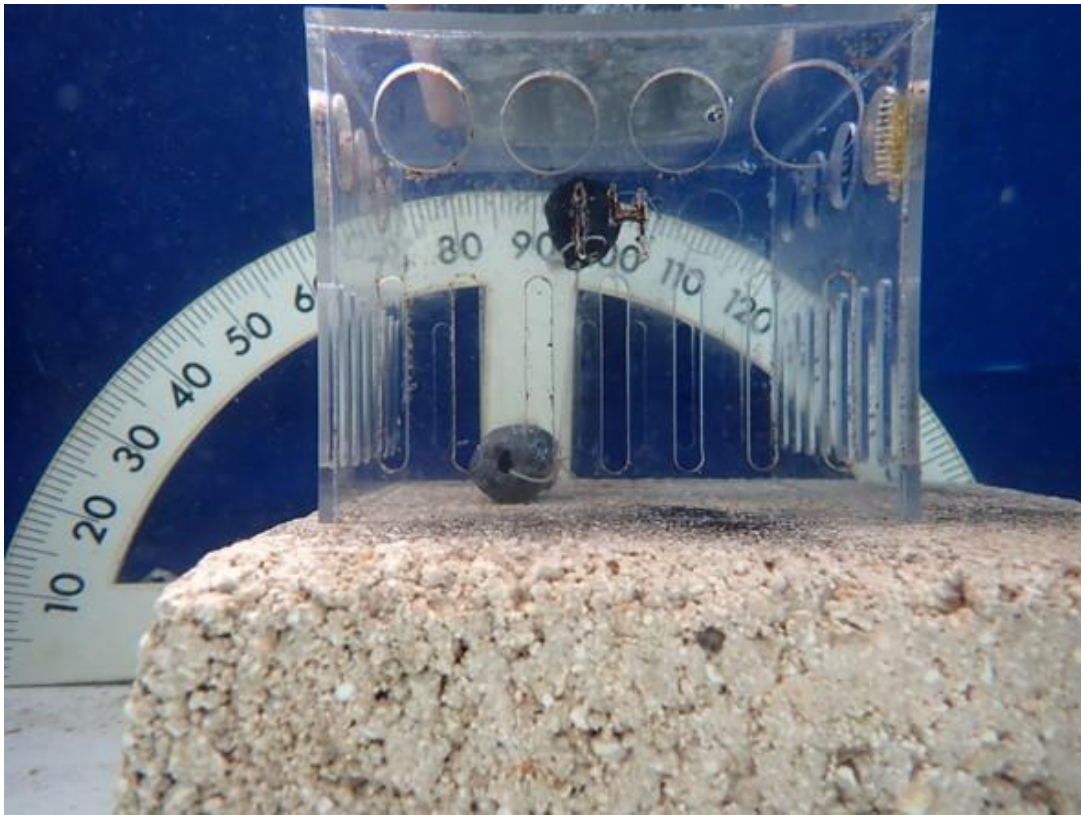


Figure 2. The buoy inside the acrylic box had an inclination of  $5^\circ$ ; thus, the box reduced the flow by  $\sim 85\%$ . Small turbulences were noted, notorious by the small erratic movements of the buoy (in all directions, but predominantly aligning with an angle of  $5^\circ$  in the direction of the average flow).

## Conclusiones generales

### *Recuperación de las praderas de pastos marinos bajo herbivoría por tortugas verdes*

Las praderas de pastos marinos son ecosistemas de gran importancia que proporcionan numerosos servicios ecosistémicos, incluyendo zonas de crianza y alimentación para una amplia variedad de vida marina. Las tortugas verdes, como principal megaherbívoro de pastos marinos, pueden tener impactos significativos en estos ecosistemas. El tipo de alimentación de las tortugas por “*rotational grazing*” afecta la productividad de los pastos marinos y las características de su dosel, pero también puede aumentar la diversidad de especies y la heterogeneidad del paisaje. Las comunidades de pastos marinos pueden tardar meses o años en recuperarse después de una perturbación natural por herbivoría de tortugas, dependiendo del tipo de estrategia de alimentación, duración, intensidad, especies que forman parte de la comunidad, y si existen otros disturbios adicionales. Este estudio proporciona información sobre los procesos naturales de recuperación a largo plazo en parcelas que han sido sometidas a herbivoría por “*rotational grazing*” y algunos de sus efectos sobre la composición de la comunidad de pastos marinos bajo diferentes niveles de intensidad de herbivoría (tiempo de simulación de herbivoría) y en parcelas abandonadas por las tortugas que están en proceso de recuperación. Se encontró que la biomasa de *Thalassia testudinum* disminuyó al incrementar la intensidad de herbivoría, y al mismo tiempo hubo un incremento de las especies pioneras de crecimiento rápido como *S. filiforme* y las algas rizofíticas. Cuando las tortugas se alimentan selectivamente de *T. testudinum* por “*rotational grazing*”, ejercen una influencia sobre la disponibilidad de nutrientes al reducir la abundancia de esta especie. Las mayores concentraciones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el sedimento fueron detectadas en los tratamientos con mayor intensidad de herbivoría, y la menor abundancia de

*T. testudinum* que es una especie altamente competitiva en la captación de nutrientes en el sedimento, lo que permite la liberación de estos recursos para especies de crecimiento más rápido que toman ventaja de los recursos disponibles.

Una vez que las tortugas abandonan las parcelas de ramoneo creadas por este tipo de alimentación, inicia el proceso de recuperación de estas parcelas. Considerando las condiciones de zonas aledañas sin efecto de herbivoría y en condiciones bien desarrolladas, se realizó un monitoreo a largo plazo del desarrollo de estas parcelas hacia su recuperación. Utilizar condiciones de referencia (pre-herbivoría), permite una mejor comprensión de los procesos de recuperación de las praderas de pastos marinos después de los efectos de la herbivoría de tortugas. Sin embargo, a pesar del aumento continuo de literatura sobre los efectos de la herbivoría de tortugas, aún son escasos los estudios que incluyen este tipo de características. La mayoría de los estudios presentes, como los antes mencionados, no extienden la evaluación más allá de 13 meses, lo que llama al cuestionamiento sobre qué sucede con la recuperación de los pastos marinos hasta las condiciones de pre-herbivoría.

El estudio encontró que después de tres años de utilizar jaulas de exclusión en parcelas abandonadas por las tortugas, la cobertura de pastos y algas rizofíticas mostró signos de recuperación sin llegar a ser igual que las zonas sin herbivoría como referencia. Las praderas abandonadas recuperaron la estructura y productividad del pasto de *T. testudinum* a nivel de pradera, pero aún mantuvieron haces más pequeños. Sin embargo, con el aumento de las poblaciones de tortugas verdes y las actuales amenazas a los ecosistemas de pastos marinos, se esperan mayores densidades de tortugas verdes, lo que lleva a praderas más extensas bajo herbivoría intensiva o persistente que podrían eventualmente llevar a una transición de la pradera de pastos marinos a un estado alternativo en el ensamblaje y composición de especies de pastos. En este estudio, se encontró un patrón claro donde a niveles más bajos de

intensidad de herbívora mostraron mayores tasas de recuperación de haces de *T. testudinum* en comparación con el nivel de intensidad de herbivoría más alto, que representa una herbivoría persistente o intensiva en lugares donde sus densidades son altas y dejan de alimentarse por “*rotational grazing*”. Las tasas de recuperación de *T. testudinum* para el nivel de intensidad más alto y después del efecto de una perturbación por entierro, mostraron claramente la pobre recuperación de haces y la pérdida de casi toda la biomasa de *T. testudinum*. Lo anterior puede considerarse como un colapso de la pradera, mientras que las parcelas abandonadas por las tortugas, después de ser abandonadas, quedan cercanas a superar el umbral a partir del cual cualquier disturbio podría causar un cambio de estado en el sistema. Lo anterior implica que las tortugas verdes pueden ser importantes agentes de cambio en los ecosistemas de pastos marinos. La recuperación de praderas marinas después de los disturbios puede variar según la intensidad de la herbívora. Por lo tanto, las estrategias de conservación deben tener en cuenta las interacciones entre el ramoneo de las tortugas y las praderas de pastos marinos, incluidas las implicaciones de los cambios en la comunidad de estos ecosistemas debido al ramoneo de las tortugas. Es necesario seguir estudiando estas interacciones para establecer mejores estrategias de conservación y garantizar la resiliencia de los ecosistemas de pastos marinos frente a las crecientes presiones de herbívoras por tortugas verdes y otras amenazas para estos importantes ecosistemas.

#### *Interacción entre algas coralinas de vida libre y praderas de pastos marinos.*

La interacción entre algas coralinas de vida libre (rodolitos) y las praderas de pastos marinos ha sido demostrada experimentalmente con beneficios para ambas partes. Las algas coralinas disuaden a las tortugas verdes del ramoneo en sitios donde están presentes, facilitando la recuperación de las praderas de pastos ramoneadas por periodos de tiempo prolongados,

mientras que los pastos estabilizan las algas en el lecho marino y evitan que sean desplazadas por las corrientes. Este es un ejemplo único de interacción mutualista en ecosistemas de pastos marinos, que ha resultado vital para el mantenimiento y recuperación de praderas de pastos marinos en donde ambas especies coexisten. Sin embargo, este tipo de interacciones suelen ser dependientes de las condiciones existentes en un momento dado, por lo que la interacción entre pastos marinos y rodolitos podría dejar de ser mutualista y volverse más antagonista. La continua expansión de los rodolitos podría eventualmente excluir a las tortugas en gran parte de la bahía, y el área restante de pastos podría ser demasiado pequeña para sostener la población de tortugas. Si las tortugas no pueden o no quieren reubicar sus áreas de alimentación, pueden verse obligadas a comenzar a pastorear las partes de la pradera cubiertas de algas. El mutualismo podría romperse bajo una alta presión de ramoneo, dependiendo la respuesta de las tortugas ante diferentes escenarios.

La formación de camas de algas coralinas de vida libre (rodolitos) es una combinación única de factores, y generalmente los ambientes que permiten un rápido crecimiento de algas coralinas en praderas de pastos también favorecen altas densidades de pastos marinos. El mutualismo entre pastos y rodolitos frente al ramoneo de tortugas verdes en la zona de estudio surgió bajo la coocurrencia de un aumento de la presión de herbivoría y un rápido crecimiento poblacional de las algas coralinas. El crecimiento poblacional de las algas coralinas y formación de la cama de rodolitos, probablemente fue promovido por un efecto combinado de mejores condiciones de luz después del ramoneo del dosel de *T. testudinum* por las tortugas verdes y una retroalimentación positiva “*positive feedback*” que llevó a una disminución en la resuspensión de sedimentos y una menor mortalidad de las algas coralinas una vez que alcanzaron una densidad crítica. En los últimos años, las densidades de tortugas verdes han estado aumentando y su impacto en las praderas de pastos marinos en todo el

mundo está siendo más notorio. Podemos esperar que los sistemas con explosión de algas coralinas, como las observadas en Akumal, se vuelvan más comunes en un futuro cercano en donde estas especies coexistan. En la zona de estudio, las algas coralinas formaron una densa agregación de 6025 m<sup>2</sup> con una capa de 3.0-6.8 cm de espesor, y la especie dominante, *Neogoniolithon* sp., aumentó un 10,3% con respecto a su biomasa inicial en vivo en 10 semanas, lo que corresponde a una Tasa de Crecimiento Relativo (RGR) de 0.0014 (% d-1). Esto implica que las algas duplicaron su tamaño en 495 días, ya que los antiguos esqueletos calcáreos permanecieron en su mayoría intactos. Comprender los factores únicos que contribuyen a la formación de las camas de rodolitos puede ayudar a considerarlas como una herramienta a futuro en la gestión y conservación de las praderas de pastos marinos y sus ecosistemas asociados ante el continuo aumento de tortugas verdes a nivel global.

## LITERATURA CITADA

- Arthur R, N Kelkar, T Alcoverro, MD Madhusudan. 2013. Complex ecological pathways underlie perceptions of conflict between green turtles and fishers in the Lakshadweep Islands. *Biological Conservation*. 167: 25- 34. DOI: 10.1016/j.biocon.2013.07.014
- Ballorain, K. 2010. Ecologie trophique de la tortue verte *Chelonia mydas* dans les herbiers marins et algueraies du sud-ouest de l'océan Indien. Ph Thesis. Université de la Réunion. 286 pp.
- Bjorndal KA. 1980. Nutrition and Grazing Behavior of the Green Turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*. 56: 147- 154. DOI:10.1007/BF00397131
- Bjorndal KA. 1997. Foraging Ecology and Nutrition of Sea Turtles. En: Lutz PL, JA Musick (Eds.) *The Biology of Sea Turtles Volume I*. (pp.259-273). CRC Press.
- Bos AR, TJ Bouma, GLJ de Kort, MM van Katwijk. 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 74: 344-348. DOI:10.1016/j.ecss.2007.04.006
- Carr JA, P D'Odorico, KJ McGlathery, PL Wiberg. 2012. Modeling the effects of climate change on eelgrass stability and resilience: future scenarios and leading indicators of collapse. *Marine Ecology Progress Series*. 448: 289-301. DOI: 10.3354/meps09556
- Carruthers TJB, BI van Tussenbroek, WC Dennison. 2005. Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 64: 191-199. DOI:10.1016/j.ecss.2005.01.015
- Christianen MJ, LL Govers, TJ Bouma, W Kiswara, JGM Roelofs, LPM Lamers, MM van Katwijk. 2011. Marine megaherbivore grazing may increase seagrass tolerance to high nutrient loads. *Journal of Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01900.x
- Christianen MJ, PMJ Herman, TJ Bouma, LPM Lamers, MM van Katwijk, T van der Heide, PJ Mumby, BR Silliman, SL Engelhard, M van de Kerk, W Kiswara, J van de Koppel. 2014. Habitat collapse due to overgrazing threatens turtle conservation in marine protected areas. *Proceedings of The Royal Society B*. 281, 20132890. DOI: 10.1098/rspb.2013.2890
- Christianen MJA, MM van Katwijk, BI van Tussenbroek, JF Pagès, K Ballorain, N Kelkar, R Arthur, T Alcoverro. A dynamic view of seagrass meadows in the wake of successful green turtle conservation. 2021. *Nature Ecology and Evolution*. DOI: 10.1038/s41559-021-01433-z
- Christianen, MJA, FO Smulders, JA Vonk, LE Becking, TJ Bouma, SM Engel, RK James, MI Nava, JC Smit, JP van der Zee, PJ Palsbøll, ES Bakker. 2022. Seagrass ecosystem multifunctionality under the rise of a flagship marine megaherbivore. *Global Change Biology*. 2015-230. DOI: 10.1111/gcb.16464
- de Boer, WF. 2007. Seagrass-sediment interactions, positive feedbacks and critical thresholds for occurrence: a review. *Hydrobiologia*. 591: 5-24. DOI:10.1007/s10750-007-0780-9
- den Hartog C y J Kuo. 2006. Taxonomy and Biogeography of Seagrasses. En: Larkum, A. W. D., Orth, R. J., & C. M. Duarte (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 1-23). The Netherlands: Springer.



- Deyanova D, M Gullström, LD Luimo, M Dahl, MI Hamisi, SP Mtolera, MM Björk. 2017. Contribution of the seagrass plants to CO<sub>2</sub> capture in a tropical seagrass meadow under experimental disturbance. *PLoS ONE* 12(7): e0181386. DOI: 10.1371/journal.pone.0181386
- Dunic JC, CJ Brown, RM Connolly, MP Turschwell, IM Côté. Long-term declines and recovery of meadow area across the world's seagrass bioregions. 2021. *Global Change Biology*. 27: 4096-4109. DOI: 10.1111/gcb.15684
- Elliot, M, D Burdon, KL Hemingway, SE Apitz. 2007. Estuarine, coastal and marine ecosystem restoration: Confusing management and science. A revision of concepts. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 74: 349-366.
- Fourqurean, JW, S Manuel, KA Coates, WJ Kenworthy, SR Smith. 2010. Effects of excluding sea turtle herbivores from a seagrass bed: Overgrazing may have led to loss of seagrass meadows in Bermuda. *Marine Ecology Progress Series*. 419: 223-232. DOI:10.3354/meps08853
- Grave, TM, T Binzer. 2004. Which factors regulate seagrass growth and distribution? En: Borum J, C Duarte, D Krause-Jensen, TM Greve. *European seagrasses: an introduction to monitoring and management* (pp. 19-23). The M&MS project.
- Heithaus MR, FA Wirsing, LM Dill, JW Fourqurean, D Burkholder, J Thomson, L Bejder. 2007. State-dependent risk taking by green sea turtles mediates top-down effects of tiger shark intimidation in a marine ecosystem. *Journal of Animal Ecology*. 76: 837-844. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2007.01260.x
- Hemminga MA, CM Duarte. 2000. *Seagrasses Ecology: An Introduction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kaladharan P, KP Saidkoya, VA Kunhikoya, A Anasukoya. 2013. Turtle herbivory of seagrass ecosystems in the Lakshadweep atolls: concerns and need for conservation measures. *Journal Marine Biological Association*. 55(1): 25-29. DOI: 10.6024/jmbai.2013.55.1.01749-04
- Kelkar N, R Arthur, N Marba, T Alcoverro. 2013. Green turtle herbivory dominates the fate of seagrass primary production in the Lakshadweep islands (Indian Ocean). 485: 235-243. DOI: 10.3354/meps10406
- Lal A, R Arthur, N Marbà, AWT Lill, T Alcoverro. 2010. Implications of conserving an ecosystem modifier: Increasing green turtle (*Chelonia mydas*) densities substantially alters seagrass meadows. *Biological Conservation*. 143 (11): 2730-2738. DOI: 10.1016/j.biocon.2010.07.020
- Lobel PS, JC Ogden. 1981. Foraging by the herbivorous parrotfish *Sparisoma radians*. *Marine Biology*. 64: 173-183.
- McGlathery KJ, K Sundäck, IC Anderson. 2007. Eutrophication in shallow coastal bays and lagoons: the role of plants in the coastal filter. *Marine Ecology Progress Series*. 348; 1-18. DOI: 10.3354/meps07132
- Martínez-López IG, M van Den Akker, L Walk, MM van Katwijk, T van Der Heide and BI van Tussenbroek. 2019. Nutrient availability induces community shift in seagrass meadows grazed by turtles. *PeerJ*. 7:e7570 DOI 10.7717/peerj.7570
- Molina-Hernández AL, BI van Tussenbroek. 2014. Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by Green sea-turtles. *Marine Ecology Progress Series*. DOI: 10.3354/meps11068

- Moran KL, KA Bjorndal. 2005. Simulated green turtle grazing affects structure and productivity of seagrass pastures. *Marine Ecology Progress Series*. 305: 235-247. DOI:10.3354/meps305235
- Orth R.J, TJB Carruthers, WC Dennison, CM Duarte, JW Fourqurean, KL Heck AR Hughes, GA Kendrick, KW Kenworthy, S Olyarnik, FT Short, M Waycott, SL Williams. 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience*. 56(12): 987-996. DOI: 10.1641/0006-3568(2006)56[987:AGCFSE]2.0.CO;2
- Preen, A. 1995. Impacts of dugong foraging on seagrass habitats: observational and experimental evidence for cultivation grazing. *Marine Ecology Progress Series*. 124: 201-213.
- Samper-Villareal J, J Moya-Ramírez, J Cortés. 2022. Megaherbivore exclusion led to more complex seagrass canopies and increased biomass and sediment C<sub>org</sub> pools in a tropical meadow. *Frontiers in Marine Science*. 9:945783. DOI:10.3389/fmars.2022.945783
- Scott, AL, York PH, Rasheed MA. 2020. Green turtle (*Chelonia mydas*) grazing plot formation creates structural changes in a multi-species Great Barrier Reef seagrass meadow. *Marine Environmental Research*. 162. 105183. DOI: 10.1016/j.marenvres.2020.105183
- Smulders FOH, OR O'Shea, MJA Christianen. 2021. Animal-borne video reveals atypical behaviour in provisioned green turtles: A global perspective of widespread tourist activity. *Global Ecology and Conservation*. 25: e01417. DOI:10.1016/j.gecco.2020.e01417
- Tett P, RJ Gowen, SJ Painting, M Elliott, R Forster, DK Mills, E Bresnan, E Capuzzo, TF Fernandes, J Foden, RJ Geider, LC Gilpin, M Huxham, AL Mc Quatters-Gollop, SJ Malcolm, S Saux-Picart, T Platt, MF Racault, S Sathvendraanath, J van der Molen, M Wilkinson. 2013. Framework for understanding marine ecosystem health. *Marine Ecology Progress Series*. 494: 1-27. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps10539>
- Valentine JF, E Duffy. 2006. The Central Role of Grazing in Seagrasses Ecology. En: Larkum, A. W. D., Orth, R. J., & C. M. Duarte (Eds.), *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 463-501). The Netherlands: Springer.
- van der Heide T, EH van Nes, GW Geerling, AJP Smolders, TJ Bouma, MM van Katwijk. 2007. Positive feedbacks in seagrass ecosystems: Implications for success in conservation and restoration. *Ecosystems*. 10: 1311-1322. DOI: 10.1007/s10021-007-9099-7
- van Katwijk MM, AR Bos, DCR Hermus, W Suykerbuyk. 2010. Sediment modification by seagrass beds: Muddification and sandification induced by plant cover and environmental conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 89:175-181. DOI:10.1016/j.ecss.2010.06.008
- van Nes EH, M Scheffer. 2007. Slow recovery from perturbations as a generic indicator of a nearby catastrophic shift. *The American Naturalist*. 169 (6): 738-747. DOI: 10.1086/516845. Epub 2007 Apr 17.
- van Tussenbroek BI, J Cortés, R Collin, AC Fonseca, PMH Gayle, HM Guzman, GE Jácome, R Juman, KH Koltes, HA Oxenford, A Rodríguez-Ramírez, J Samper-Villarreal, SR Smith, JJ Tschirky, E Weil. 2014. Caribbean-wide, long-term study of seagrass beds reveals local variations, shifts in community structure and occasional collapse. *PlosOne* March 3rd 2014.

- Walker B, CS Holling, SR Carpenter, A Kinzig. 2004. Resilience, adaptability and transformability in social-ecological systems. *Ecology and Society*. 9(2):5. [online] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss2/art5>
- Waycott M, C Collier, K McMahon, P Ralph, LJ McKenzie, J Udy, A Grech. 2007. Vulnerability of seagrasses in the Great Barrier Reef to climate change. En: J. E. Johnson & P. A. Marshall (Eds.). *Climate Change and the Great Barrier Reef*. Great Barrier Marine Park Authority and Australian Greenhouse Office. Australia. (194-235 pp.). <http://hdl.handle.net/11017/541>