



CRETAPLANT  
A Pilot Network of Plant Micro-Reserves in Western Crete  
Πιλοτικό Δίκτυο 'Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών' στη Δυτική Κρήτη  
(LIFE04NAT\_GR\_000104)



**ΔΡΑΣΗ Α.5 - Καθορισμός της γενετικής ποικιλότητας και της  
πληθυσμιακής δομής φυτικών ειδών προτεραιότητας**  
**ACTION A.5 - Determination of the genetic diversity and population  
structure for each of the 6 targeted species**

**Αναφορά σχετικά  
με την αναγκαιότητα και τη δυνατότητα  
επανεισαγωγής στη φύση  
συγκεκριμένων φυτικών ειδών**

(Ιούνιος 2005 - Δεκέμβριος 2006)

Συντάκτης:

Κώστας Μπούρτζης

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗ ΦΥΣΗ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

**ΔΡΑΣΗ Α.5 - Καθορισμός της γενετικής ποικιλότητας και της πληθυσμιακής δομής φυτικών ειδών προτεραιότητας**

**Βασικά Ευρήματα:**

(α) Δεν ανιχνεύθηκε γενετική ποικιλότητα με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL* και *matK* στα δείγματα των υπό μελέτη ειδών *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Hypericum aciferum*, *Nepeta sphaciotica*, και *Phoenix theophrasti*;

(β) Δεν ανιχνεύθηκε γενετική ποικιλότητα με τη χρήση του γενετικού δείκτη ITS (18S-26S region) δεικτών στα δείγματα των υπό μελέτη ειδών *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Nepeta sphaciotica*, *Hypericum aciferum* και *Phoenix theophrasti* – αντίθετα ανιχνεύθηκε περιορισμένης έκτασης γενετική ποικιλότητα στα δείγματα του είδους *Hypericum aciferum*;

(γ) Δεν ανιχνεύθηκε γενετική ποικιλότητα με τη χρήση ένδεκα μικροδορυφόρων ως γενετικών δεικτών στα δείγματα του είδους *Phoenix theophrasti*;

(δ) Αναπτύξαμε δεκαοκτώ μικροδορυφόρους ως γενετικούς δείκτες για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας στο είδος *Nepeta sphaciotica* - δύο από τους μικροδορυφόρους αποτέλεσαν καλούς γενετικούς δείκτες για την εκτίμηση της ενδοπληθυσμιακής γενετικής ποικιλότητας της *N. sphaciotica* και μας οδήγησαν στη διαπίστωση ενός περιορισμένου σε έκταση γενετικού πολυμορφισμού (δύο αλληλόμορφα για κάθε μικροδορυφορικό τόπο).

**Προτάσεις για κάθε είδος:**

*Androcymbium rechingeri*: Διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL*, *matK* και ITS (18S-26S region). Συνεπώς, απαιτείται η ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών για την πιο ακριβή και ουσιαστική εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και στους τέσσερις πληθυσμούς – υποπληθυσμούς που διαπιστώθηκαν και εκτιμήθηκε το μέγεθός τους στη δράση Α1 του παρόντος έργου. Πολύ σωστά αποφασίστηκε η δημιουργία μικροαποθέματος από το μεγαλύτερο σε μέγεθος πληθυσμό (Ελαφονήσι). Σε κάθε περίπτωση όμως θα πρέπει να γίνει εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας (με μικροδορυφόρους) και του μικροαποθέματος για να διαπιστωθεί αν αντιπροσωπεύεται όλη η γενετική ποικιλότητα που πιθανά απαντά στους πληθυσμούς – υποπληθυσμούς.

*Bupleurum kakiskalae*: Διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL*, *matK* και ITS (18S-26S region). Συνεπώς, απαιτείται η ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών για την πιο ακριβή και ουσιαστική εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας στον μοναδικό υπάρχοντα πληθυσμό στην περιοχή της Κακιάς Σκάλας των Λευκών Ορέων όπου και δημιουργήθηκε και το μικροαπόθεμα.

*Hypericum aciferum*: Διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL* και *matK* ενώ παρατηρήθηκε περιορισμένη γενετική ποικιλότητα με το δείκτη ITS (18S-26S region). Συνεπώς, απαιτείται η ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών για την πιο ακριβή και ουσιαστική εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και στους δύο πληθυσμούς που διαπιστώθηκαν και εκτιμήθηκε το μέγεθός τους στη δράση A1 του παρόντος έργου. Πολύ σωστά αποφασίστηκε η δημιουργία μικροαποθέματος από το μεγαλύτερο σε μέγεθος πληθυσμό. Σε κάθε περίπτωση όμως θα πρέπει να γίνει εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας (με μικροδορυφόρους) και του μικροαποθέματος για να διαπιστωθεί αν αντιπροσωπεύεται όλη η γενετική ποικιλότητα που πιθανά απαντά στους δύο πληθυσμούς.

*Nepeta sphaciotica*: Διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL*, *matK* και ITS (18S-26S region). Στη συνέχεια αναπτύξαμε δεκαοκτώ μικροδορυφόρους ως γενετικούς δείκτες για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας στο είδος *Nepeta sphaciotica* - δύο από τους μικροδορυφόρους αποτέλεσαν καλούς γενετικούς δείκτες για την εκτίμηση της ενδοπληθυσμιακής γενετικής ποικιλότητας της *N. sphaciotica* και μας οδήγησαν στη διαπίστωση ενός περιορισμένου σε έκταση γενετικού πολυμορφισμού (δύο αλληλόμορφα για κάθε μικροδορυφορικό τόπο). Συνεπώς, απαιτείται η ανάπτυξη περισσότερων μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών για την πιο ακριβή και ουσιαστική εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας του μοναδικού πληθυσμού που απαντά στην κορυφή Σβουριχτή των Λευκών Ορέων όπου και δημιουργήθηκε και το μικροαπόθεμα.

*Phoenix theophrasti*: Διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση των γενετικών δεικτών *rbcL*, *matK* και ITS (18S-26S region). Επίσης, διαπιστώθηκε απουσία γενετικής ποικιλότητας με τη χρήση ένδεκα μικροδορυφορικών δεικτών. Συνεπώς, απαιτείται άμεσα η ανάπτυξη περισσότερων μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών για την πιο ακριβή και ουσιαστική εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας όλων των πληθυσμών που απαντούν στο νησί. Σε κάθε περίπτωση όμως θα πρέπει να γίνει εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και του μικροαποθέματος (Άσπρη Λίμνη) για να διαπιστωθεί αν αντιπροσωπεύεται όλη η γενετική ποικιλότητα που απαντά στους πληθυσμούς του νησιού. Το μέγεθος του πληθυσμού που συνιστά το μικροαπόθεμα είναι εξαιρετικά μικρό (μόλις 39 άτομα) και θα πρέπει άμεσα να εμπλουτιστεί με άτομα από τις γειτονικές περιοχές ευελπιστώντας ότι ο εμπλουτισμός αυτός θα αποδειχθεί ευεργετικός τόσο στο πληθυσμιακό όσο στο επίπεδο της γενετικής ποικιλότητας. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως, ότι η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας όλων των πληθυσμών του νησιού αποτελεί άμεση προτεραιότητα ώστε αφενός να διαπιστωθεί με ακρίβεια η παρούσα γενετική ποικιλότητα του είδους στην Κρήτη και αφετέρου να εκτιμηθεί αν οι εμπλουτισμοί, οι μετακινήσεις καθώς και οι τεχνητές επικοινωνίες, που στην παρούσα φάση κρίνονται ως αναγκαίες ενέργειες, είναι και επιστημονικά ορθό να πραγματοποιηθούν και αν ναι, με ποιο τρόπο θα υλοποιηθούν.

**Abstract:**

During the 20<sup>th</sup> century, the widespread decline of many animal and plant species has led to large-scale reintroduction or other alternative management plans. In many of these cases, genetic issues have been neglected. However, genetic variability is important for population persistence. Based on the above, it is evident that molecular markers can facilitate the comprehensive management of threatened populations, and should be combined with other classical (e.g. demographic) approaches. In addition, genetic variability is often correlated with individual fitness and population persistence. Thus, it is important that we, as wildlife managers, account for the genetic diversity and population structure for each of the targeted priority species since it will represent valuable information for the development of an effective management and conservation plan.

**Report:**

The conservation of biodiversity (microorganisms, plants and animals and the ecosystems that they form) ultimately depends upon the conservation of genetic diversity within species. Conservation genetics is thus likely to play a vital role in developing a strategy for the short and long-term preservation of biodiversity. During the last two decades the role of genetics in conservation biology, and in ecology in general, has been greatly emphasized (Pertoldia and Topping, 2004). Also the loss of genetic diversity in species populations is a concern because reduced polymorphism also reduces the evolutionary potential (Lynch, 1996). Therefore, DNA analyses are increasingly used to estimate the extent and organization of genetic diversity in populations and the intelligent use of their genetic resources (Luikart and England, 1999). It is well known that molecular techniques serve as suitable surrogates for estimating genetic diversity and population genetic structures (Pritchard *et al.*, 2000). However, knowledge of the loss of variability that has actually taken place is often hampered by lack of information on the genetic composition of populations. A large body of techniques has thus been developed to investigate the genetic diversity based on species population structure (Cockerham and Weir, 1993; Slatkin, 1995; Pritchard *et al.*, 2000).

In addition, the widespread decline of many animal and plant species during the 20<sup>th</sup> century, has led to large-scale reintroduction plans. In many of these translocations, genetic issues have been neglected. However, numerous recent studies have shown that genetic variability is important for population persistence, especially in species that have become fragmented, bottlenecked or that have rapidly lost genetic variability. Small population size leads to genetic drift, inbreeding and the loss of genetic variability and evolutionary potential. The number, origin and genetic diversity of populations are central points to consider when assessing impacts of translocations on genetic diversity and population

persistence. With the increasing number of threatened species, it is important to investigate the effects of translocations upon genetic diversity (Frankham 1995; Allendorf and Ryman 2002).

Based on the above, it is evident that molecular markers can facilitate the comprehensive management and/or reintroduction of threatened populations, and should be combined with other classical (e.g. demographic) approaches. In addition, genetic variability is often correlated with individual fitness (size, reproductive success, survival) and population persistence. Thus, it is important that we, as wildlife managers, account for genetic factors in our management strategies. However, many other factors might interact with the success of a management and/or reintroduction programme. Therefore, ecological factors and species biology should be considered in combination with genetic factors for a successful management and/or reintroduction programme.

The present project took an integrated approach by combining ecology, biology and genetics to develop a successful management and conservation plan for Cretan targeted priority plant species. We actually evaluated the use of genetic markers for studying the genetic diversity of *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Nepeta sphaciotica*, *Hypericum aciferum* and *Phoenix theophrasti* which are endemic (the latter subendemic) to the island of Crete, Greece. Their limited population size and a number of threats make them critically endangered, and in need of active conservation. Moreover, these plants are of Community priority according to the Directive 92/43/EEC. We used genetic markers *rbcL* and *matK* genes of *cpDNA*, internal transcribed spacers of ITS *nrDNA* as well as microsatellite loci to undertake genetic surveys. The goal was to investigate the genetic diversity within each species and to provide genetic data for the conservation programme LIFE-Nature 2004: *A Pilot Network of Plant Micro-Reserves in Western Crete (Chania Prefecture)*.

The main conclusions of our study are summarized as follows: (a) we found no genetic diversity in the samples of *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Nepeta sphaciotica*, *Hypericum aciferum* and *Phoenix theophrasti* by using the chloroplastic genetic markers *rbcL* and *matK*; (b) we found no genetic diversity in the samples of *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Nepeta sphaciotica*, *Hypericum aciferum* and *Phoenix theophrasti* by using the nuclear genetic marker ITS (18S-26S region) with the exception of *Hypericum aciferum*; (c) we found no genetic diversity in the samples of *Phoenix theophrasti* by using eleven microsatellite loci of nuclear origin; however, we were able to use three of the microsatellite markers to detect genetic variation between the *Phoenix theophrasti* and *Phoenix dactylifera* samples, two very closely related species; (d) we developed microsatellite markers for *N. sphaciotica* and we used eighteen of them to study the genetic diversity of Cretan populations; we did find genetic diversity in the samples of *N. sphaciotica* and in addition, we managed to detect genetic variation between the *N. sphaciotica* and *N. troodi* samples, two very closely related species.

The above data results clearly indicate that there is probably very limited genetic variation in all species studied. This conclusion is based in the fact that the neither the *cpDNA* genes nor the nuclear ITS marker (with the exception of *Hypericum aciferum*) provided any evidence of genetic polymorphism in the samples tested. The use of eleven microsatellite markers provided again no evidence of genetic polymorphism (size polymorphism of PCR products) in *Phoenix theophrasti*. On the contrary, the use of microsatellite markers did provide evidence of genetic variation in the samples of *N. sphaciotica*: our results suggest the presence of at least two alleles in two distinct microsatellite markers. These data are encouraging and strongly suggest that additional microsatellite loci-based surveys must be performed using larger number of individuals in order to more precisely evaluate the genetic diversity of this species. In addition, it is concluded that the genetic diversity of all species included in this study can only be estimated using microsatellite analysis. The reason is that their overall genetic polymorphism is very limited and can not be determined by conventional *cpDNA* and/or nuclear genetic markers. It is clear that useful genetic markers, if any, can only be the microsatellite markers.

Giving account to our results we make a preliminary suggestion that *Androcymbium rechingeri*, *Bupleurum kakiskalae*, *Nepeta sphaciotica*, *Hypericum aciferum* and *Phoenix theophrasti* be used as flagship species—a symbol of conservation and awareness and also the survival of Crete's flora (Hughes *et al.*, 2003). The genetic results presented in this study indicate that the limited genetic variation within the species is likely to be the result of low-level environmental adaptations of these plant species and thus emphasized the importance that the lack of molecular divergence have upon them (Merila and Crnokrak, 2001; Simonsen, Pertoldi *et al.*, 2003). The genetic analysis we undertook also suggests the need of further genetic surveys based on microsatellite loci for each of the plant species, which will be most useful for conservation biology studies.

Conducting molecular biological analyses and population genetic studies will be helpful for achieving further understanding the evolution of these species. Nevertheless for the protection of individual species and natural habitats Plant-Micro reserves<sup>1</sup> must be established in order to compare the conservation significance between endangered plant species in such areas and facilitate the decision making for their management (Boteva *et al.*, 2004). The study of these endemic taxa is now more than ever judged to be so important and urgent in a conservational context in Crete.

---

<sup>1</sup> Plant Micro-Reserve are small land plots (up to 20 ha) of peak value in terms plant species richness endemism or rarity, given over to long term monitoring and conservation of plant species and vegetation types (Laguna *et al.*, 2004).

## References

- Allendorf FW, Ryman N (2002) The role of genetics in population viability analysis (eds Beissinger SR, McCullough DR). University of Chicago Press, Chicago.
- Boteva D., Griffiths G. and Dimopoulos P. (2004). Evaluation and mapping of the conservation significance of habitats using GIS: an example from Crete, Greece. *Journal for Nature Conservation*, 12: 237-250.
- Cockerham C. C. and Weir B. S. (1993). Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution*, 47: 855–863.
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327.
- Lynch M. (1996). A quantitative genetic perspective on conservation issues. In J. C. Avise, and J. L. Hamrick (Eds.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (pp. 457–501). New York: Chapman and Hall.
- Pertoldia C. and Topping C. (2004). The use of agent-based modelling of genetics in conservation genetics studies. *Journal for Nature Conservation*, 12: 111-120.
- Pritchard J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. J. (2000). Inferences of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Luikart G., and England, P. R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 253–256.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457–462.