

Genetische Untersuchungen an *Zelkova sicula* Di Pasquale, Garfì & Quezel (Ulmaceae)

Silvia Fineschi¹, Maria Anzidei², Antonella Madaghiele², Daniela Turchini¹ und Giovanni Giuseppe Vendramin²

¹ CNR, Istituto per l'agrosilvicoltura, via Marconi 2, I-05010 Porano-TR, Italien
s.fineschi@ias.tr.cnr.it;

² CNR, Istituto Miglioramento Genetico Piante Forestali, via Atto Vannucci 13, I-50134 Firenze, Italien

Abstract

Genetic studies on *Zelkova sicula* Di Pasquale, Garfì & Quezel (Ulmaceae)

Until 1991 there was only one European species of the genus *Zelkova*. In 1991 a new *Zelkova* species, later named *Zelkova sicula*, was discovered in Sicily. The only population of this species was analysed by means of different DNA markers, from both the nuclear and chloroplast genome. Specimen of other *Zelkova* species, as well as other European genera of the family Ulmaceae (*Ulmus* and *Celtis*) were analysed as outgroups. First results showed no polymorphisms detected by chloroplast markers, whereas nuclear markers (RAPDs) showed low level of polymorphisms within the relic *Zelkova sicula* population. Our preliminary results help in setting priorities for the conservation of this relic species.

Keywords: *Zelkova sicula*, Ulmaceae, RAPDs, chloroplast microsatellites, universal primers, genetic conservation

Genetische Untersuchungen an *Zelkova sicula* Di Pasquale, Garfì & Quezel (Ulmaceae)

Bis vor kurzem war nur eine europäische Baumart der Gattung *Zelkova* bekannt. 1991 entdeckte man auf Sizilien eine neue *Zelkova*-Art, die als *Zelkova sicula* beschrieben wurde. Die einzige rezente Population dieser Baumart wurde mittels verschiedener DNA-Marker sowohl aus dem Zellkern-Genom (RAPD) als auch aus dem Chloroplasten-Genom analysiert, um die genetische Variation innerhalb dieser Baumart zu quantifizieren. Zusätzlich wurden als Referenz einige weitere *Zelkova*-Arten sowie andere Gattungen aus der Familie der Ulmaceae (*Ulmus* und *Celtis*) untersucht. Die Ergebnisse der nukleären Marker zeigen Polymorphismen bei einigen Individuen bei zwei der drei analysierten RAPD Primer. Auf der Ebene des Chloroplasten-Genoms haben wir keine Variation gefunden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern Hinweise für Massnahmen zur Erhaltung dieser Reliktart.

Keywords: *Zelkova sicula*, Ulmaceae, RAPDs, Chloroplasten-Mikrosatelliten, Universelle Primer, Erhaltung genetischer Ressourcen

1 Einleitung

Die Gattung *Zelkova*, Familie Ulmaceae, ist heutzutage hauptsächlich auf dem asiatischen Kontinent verbreitet. In Europa war bis 1992 nur eine Art bekannt, nämlich *Zelkova abelicea* auf der Insel Kreta. 1991 wurde in Sizilien von zwei Diplom-Forstwirten eine neue Baumart entdeckt, die später an der Universität Marseille als *Zelkova sicula* beschrieben wurde (DI PASQUALE *et al.* 1992).

Die Familie Ulmaceae enthält heute 15 Gattungen, drei davon (*Ulmus*, *Celtis* und *Zelkova*) gehören zur europäischen Flora. Innerhalb der Gattung *Zelkova* sind sechs Arten bekannt.

Die Gattung *Zelkova* selbst ist während der Riss-Würm-Eiszeit vor ca. 130'000–115'000 Jahren im nördlichen Mittelmeergebiet ausgestorben. In Mittel- und Süditalien hingegen ist das Vorkommen von *Zelkova* bis vor 30'000 Jahren durch Fossilfunde, die in der Nähe von Rom gemacht wurden, belegt (FOLLIERI *et al.* 1986).

Die Baumvegetation Siziliens setzte sich zu dieser Zeit aus einigen heute im Gebiet ebenfalls ausgestorbenen Arten der Gattungen *Liquidambar*, *Parrotia*, *Carya* und *Tsuga* zusammen. Hinzu kamen einige heute noch dort vorkommende Arten z.B. der Gattungen *Olea*, *Quercus*, *Ostrya*, *Carpinus*, *Tilia* und *Acer*. Aufgrund der klimatischen Veränderungen nach den Kaltzeiten ist die Gattung *Zelkova* im Gebiet durch eine Reihe anderer Baumarten verdrängt worden, die unter dem heutigen Mittelmeerklima konkurrenzkräftiger sind. Nur eine einzige Population von *Zelkova sicula* konnte bis heute in einem kleinen Tal in der Nähe von Buccheri (Siracusa) in südöstlichen Sizilien überdauern. Der Standort dieser Population liegt auf ca. 500 m ü.M., als Untergrund findet sich dort vulkanischer Boden (GARFI 1997).

Augenscheinlich ist diese Reliktpopulation von *Zelkova sicula* durch Viehverbiss und Trockenstress gefährdet. Verbiss und Trockenstress aufgrund der extrem heissen Sommer haben zur Folge, dass die Art fast ausschliesslich durch strauchförmige Individuen vertreten ist.

Unser Interesse an dieser Baumart gilt den folgenden Fragestellungen:

- haben alle Individuen dieser einzig existierenden kleinen Population einen klonalen Ursprung?
- wenn nicht, wie hoch ist die genetische Variation innerhalb dieser Baumart?

Die geringe Populationsgrösse von etwa 200 Bäumen und die innerhalb der Familie der Ulmaceae verbreitete Eigenschaft, sich vegetativ durch Wurzelasläufer zu vermehren, lassen vermuten, dass die existierenden Individuen nur durch wenige Genotypen repräsentiert sind. Weiterhin wollten wir die genetische Variation innerhalb der Population quantifizieren. Darüber hinaus gilt unser Interesse dem Vergleich von *Zelkova sicula* mit anderen *Zelkova*-Arten, vor allem mit der zweiten europäischen Art *Zelkova abelicea*. Die hier vorgestellten Ergebnisse befassen sich jedoch nur mit *Zelkova sicula*. Andere Arten und Gattungen der Ulmen-Familie werden nur vergleichend vorgestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für unsere ersten Studien haben wir von 30 Individuen der sizilianischen *Zelkova*-Population Material gesammelt und analysiert (Tab. 1). Ausserdem wurde Herbariummaterial von 4 weiteren *Zelkova*-Arten zum Vergleich in die Untersuchung einbezogen. Pro Art wurden ein bis zwei Individuen untersucht. Zusätzlich wurden von 14 verschiedenen zentralitalienischen *Ulmus minor* Populationen insgesamt 85 Individuen vergleichend untersucht. Zudem wurde auch die Gattung *Celtis* mit *C. australis* mit in die Untersuchung aufgenommen.

Tab. 1. Untersuchte Baumarten, Anzahl Individuen sowie deren Herkunft.
Table 1. Analysed species, individuals per species and their geographic origin.

Baumart	Anzahl der untersuchten Individuen	Ursprung
<i>Zelkova sicula</i>	30	Buccheri (Italien)
<i>Zelkova abelicea</i>	1	Herbarium
<i>Zelkova acuminata</i>	1	Herbarium
<i>Zelkova carpinifolia</i>	2	Herbarium
<i>Zelkova serrata</i>	1	Herbarium
<i>Ulmus parvifolia</i>	1	Bonsai
<i>Ulmus minor</i>	85	Zentralitalien (natürliche Populationen)
<i>Celtis australis</i>	15	Zentralitalien (Gärten)

2.2 Methode

Die genetische Variation wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen genetischen Merkmalen analysiert: Marker aus dem Zellkern-Genom (RAPDs) und Marker aus dem Chloroplasten-Genom. Für diese zweite Klasse von Merkmalen haben wir sowohl sogenannte *universal primer* des Chloroplasten-Genoms als auch Chloroplasten-Mikrosatelliten analysiert.

2.3 Auswahl der genetischen Merkmale

RAPDs

Die hohe Variation, die normalerweise die zufällige Vervielfältigung der DNA zeigt (WILLIAMS *et al.* 1990), kann besser als andere Marker die Variation innerhalb einer Population darstellen. Diese Methode scheint deshalb gut zur Beantwortung der Frage geeignet, ob alle gesamt melten Individuen nur einen Klon (oder wenige Klone) repräsentieren. In einem Vorversuch haben wir 16 Primer (Operon Technologies, Alameda, California) getestet. Von diesen haben wir drei Primer ausgewählt (A3, A7 und B5), die die grösste Variation gezeigt haben.

Chloroplasten Mikrosatelliten

Chloroplasten Mikrosatelliten, die bei Koniferen hoch variabel sind (POWELL *et al.* 1995; VENDRAMIN *et al.* 1996; MORGANTE *et al.* 1997; VENDRAMIN und ZIEGENHAGEN 1997; BUCCI *et al.* 1998; ECHT *et al.* 1998; VENDRAMIN *et al.* 1998), sind bei den Laubbaum-Arten noch kaum untersucht. Die Erfahrung mit Koniferen lässt vermuten, dass auch bei Laubbäumen eine hohe Variation bei repetitiven DNA-Sequenzen zu erwarten ist. In dieser Studie wurden drei Mikrosatelliten-Regionen amplifiziert; jede Region ist durch ein einziges Nukleotid (A/T) repräsentiert.

Universal Primers (TABERLET *et al.* 1991; DEMESURE *et al.* 1995; DUMOLIN-LAPEGUE *et al.* 1997)

Mit diesen Markern kann man Polymorphismen innerhalb bekannter, nicht kodierender Sequenzen des Organellen-Genoms analysieren. Sie wurden hier angewandt, um mögliche Mutationen nachzuweisen. Die Primerpaare aus den kodierenden Regionen des Chloroplasten-Genoms wurden für die Amplifikation von nicht-kodierenden Sequenzen benutzt. Die amplifizierten Fragmente wurden danach mit Restriktionsenzymen verdaut.

Die beiden ersten Merkmale wurden bei allen drei Gattungen (*Zelkova*, *Ulmus* und *Celtis*) analysiert. Die *universal primers* hingegen wurden als Vorversuch bisher nur für *Zelkova sicula* analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse von Untersuchungen an *Zelkova sicula*

Unsere erste Fragestellung war, ob die *Z. sicula*-Population einen klonalen Ursprung hat. Ergebnisse der nukleären Marker zeigen Polymorphismen bei einigen Individuen in zwei (A 3 und B5) der drei analysierten RAPD Primer. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, dass nicht alle Individuen einen gemeinsamen klonalen Ursprung haben.

Die Chloroplasten Mikrosatelliten zeigten dagegen ebenso wie die Chloroplasten *universal primers* keine Polymorphismen.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich unsere zweite Frage beantworten. Die Polymorphismen, die auf der Ebene des nukleären Genoms auftreten, sind ein Hinweis dafür, dass ein gewisser Grad an genetischer Variation innerhalb der Baumart erhalten geblieben ist. Die genetische Variation innerhalb der untersuchten Population ist jedoch vergleichsweise gering, was sich durch die geringe Populationsgröße und die geringe Anzahl an untersuchten Individuen erklären lässt.

Auf der Ebene des Chloroplasten-Genoms haben wir keine Variation gefunden. Das ist nicht überraschend, da aufgrund des uniparentalen Vererbungsmodus der Organellen, die bei Laubbaum-Arten in der Regel maternal vererbt werden, ein «Flaschenhals-Effekt» eine noch grössere Auswirkung hat.

3.2 Ergebnisse anderer *Zelkova*-Arten und weiterer untersuchter Gattungen

RAPDs zeigen Polymorphismen zwischen den *Zelkova*-Arten und zwischen allen drei Gattungen der Familie Ulmaceae. Auch innerhalb der Arten ist genetische Variation nachweisbar, besonders im Fall der Gattung *Ulmus*. Die höhere innerartliche Variation lässt sich hier allerdings auch mit der grösseren Stichprobe in Zusammenhang bringen.

Auch auf der Ebene des Organellen-Genoms wurden Polymorphismen zwischen den Gattungen und innerhalb der Arten (*Ulmus* und *Celtis*) mit cp-Mikrosatelliten entdeckt. Für die verschiedenen Arten wurden Längenpolymorphismen der Mikrosatelliten nachgewiesen (Tab. 2).

Tab. 2. Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse.
Table 2. Results of the microsatellite-analysis.

Mikrosatelliten	CCMP2	CCMP4	CCMP7
Baumarten	Länge der Mikrosatelliten-Varianten (bp)		
<i>Zelkova sicula</i>	211	122	128
<i>Zelkova abelicea</i>	210	122	128
<i>Zelkova acuminata</i>	210	123	127
<i>Zelkova carpinifolia</i>	210	124	128
<i>Zelkova serrata</i>	210	124	128
<i>Ulmus parvifolia</i>	210	122	128
<i>Ulmus minor</i>	212, 213, 214, 215	122, 123	129, 130
<i>Celtis australis</i>	260	114, 118	128, 129, 130

4 Diskussion

Erste Ergebnisse von Untersuchungen an *Zelkova* haben bewiesen, dass die einzige *Z. sicula* Population keinen vollständig klonalen Ursprung hat, dass diese überlebende Population ein gewisses Niveau von genetischer Variation beibehalten hat und dass Mikrosatelliten-Sequenzen im Chloroplasten-Genom vorhanden zu sein scheinen, wie aus dem beobachteten Unterschied von einem Basenpaar zwischen verschiedenen *Zelkova*-Arten hervorgeht.

Erste Ergebnisse an den anderen Arten zeigen ein hohes Niveau von Polymorphismen für *Ulmus* und die Präsenz von Chloroplasten-Mikrosatelliten in allen drei Gattungen der Ulmen-Familie. Polymorphismen, die für *Ulmus* und *Celtis* entdeckt wurden, legen die Anwesenheit von Mikrosatelliten nahe, obwohl eine definitive Antwort hierzu nur von den Sequenzen gegeben werden kann. Um unsere Hypothese zu bestätigen, planen wir daher, die polymorphen Fragmente zu sequenzieren. Der Nachweis von amplifizierten Fragmenten des Chloroplasten-Genoms in *Zelkova* ist ein Hinweis für die Anwesenheit dieser Mikrosatelliten-Sequenzen auch in dieser Gattung, obwohl kein Polymorphismus entdeckt wurde.

Unsere ersten Ergebnisse weisen auf die Bedeutung weiterer genetischer Untersuchungen, um Programme für die Erhaltung dieser seltenen und gefährdeten Baumart auszuarbeiten.

Dank

Wir danken Ágnes Májor, Eötvös Loránd Universität, Budapest (Ungarn) für ihre wertvolle Hilfe im Labor, während sie als Gastprofessorin in Porano war. Giuseppe Garfi, Universität Palermo (Italien) hat uns mit der Problemstellung bei *Zelkova* bekannt gemacht und hat Silvia Fineschi auf die Fläche in Buccheri begleitet sowie bei der Sammlung des Materials geholfen.

5 Literatur

- BUCCI, G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.; VENDRAMIN, G.G., 1998: Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis* – complex pine species using chloroplast SSR markers. *Mol. Ecol.* 7: 1633–1643.
- DI PASQUALE, G.; GARFI, G.; QUÉZEL, P., 1992: Sur la présence d'un *Zelkova* nouveau en Sicile sud-orientale (Ulmaceae). *Bioscosme Mésogéen* 8–9: 401–409.
- GARFI, G., 1997: On the flowering of *Zelkova sicula* (Ulmaceae): additional description and comments. *Plant Biosystems* 131: 137–142.
- DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J., 1995: A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4: 129–131.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S.; PEMONGE, M.-H.; PETIT, R.J., 1997: An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6: 393–397.
- ECHT, C.S.; DE Verno, L.L.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G.G., 1998: Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Mol. Ecol.* 7: 307–317.
- FOLLIERI, M.; MAGRI, D.; SADORI, L., 1986: Late Pleistocene *Zelkova* extinction in Central Italy. *New Phytol.* 103: 269–273.
- MORGANTE, M.; FELICE, N.; VENDRAMIN, G.G., 1997: A analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: KARP, A.; ISAAC, P.G.; INGRAM, D.S. (Hrsg.) *Molecular tools for screening biodiversity – plants and animals*. London, Chapman and Hall. 407–412.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; McDEVITT, R.; VENDRAMIN, G.G.; RAFALSKI, J.A., 1995: Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7759–7763.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J., 1991: Universal primers for the amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105–1109.
- VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L.; ROSSI, P.; MORGANTE, M., 1996: A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol. Ecol.* 5: 111–114.
- VENDRAMIN, G.G.; ZIEGENHAGEN, B., 1997: Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome* 40: 857–864.
- VENDRAMIN, G.G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.; BUCCI, G., 1998: Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theor. Appl. Genet.* 97: 456–463.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6531–6535.