

Die neue Identität des Zavelsteiner Krokus als *Crocus neglectus* nach DNA-Untersuchungen

VON MIKE THIV UND ARNO WÖRZ, Stuttgart.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Krokus-Population von Bad Teinach-Zavelstein wurde bisher als *Crocus vernus* oder *C. neapolitanus* geführt. Der Vergleich von DNA-Sequenzen (ITS, *trnL-trnF* IGS) dieser Bestände mit aktuell publizierten Daten legt nahe, dass es sich um *C. neglectus* handelt. Diese These wird durch Chromosomenzahlen und weitere morphologische Merkmale unterstützt. Dies belegt die Vermutung, dass die Zavelsteiner Croci auf Verwilderungen zurückgehen und vermutlich ursprünglich aus dem nördlichen Italien stammen.

Schlüsselwörter: *Crocus*, Iridaceae, Zavelstein, DNA, Morphologie, Chromosomenzahlen.

ABSTRACT

The crocus population found in Bad Teinach-Zavelstein (Baden-Württemberg, SW Germany) has been identified either as *Crocus vernus* or as *C. neapolitanus*. The comparison of DNA sequences (ITS, *trnL-trnF* IGS) of plants from this location with recently published molecular data reveals a determination as *C. neglectus*. This is also supported by morphological data and chromosome counts. These results provide more arguments in favour of an anthropogenic origin of the Zavelstein population, possibly originating from Northern Italy.

Keywords: *Crocus*, Iridaceae, Zavelstein, DNA, morphology, chromosome counts.

EINLEITUNG

Auf landwirtschaftlich genutzten Wiesen rund um Bad Teinach-Zavelstein im Landkreis Calw finden sich deutschlandweit einzigartige Krokus-Bestände (Abb. 1; GRIESE 1998). Zur Blütezeit im zeitigen Frühjahr werden diese von zahlreichen Touristen besucht. Der älteste gesicherte Nachweis dieser Population geht auf einen 1825 von C. MÜLLER gesammelten Herbar-Beleg (STU; Abb. 2) zurück. Der Zavelsteiner Krokus gilt als verwildert (GRIESE 1998). Über dessen Herkunft kursieren diverse Hypothesen, u. a. eine Anpflanzung als Zierpflanze durch Freiherr BENJAMIN BUWINGHAUSEN VON WALLMERODE zu Anfang des 17. Jahrhunderts (Teinachtal – Touristik 2015).

Bereits WURM (1891, 1897) weist jedoch darauf hin, dass die Art vor dem Jahr 1800 nirgends in der Literatur erwähnt wurde, obwohl in mehreren alten Berichten viel über Zavelstein und seine Umgebung erscheint. Er datiert die Verwilderung auf die Jahre 1815–1820.

Die Bestimmung von Croci, zur Familie der Iridaceae gehörend, ist nicht einfach. Frühere Schätzungen gingen von etwa 90 Arten aus, eine Zahl, die inzwischen auf 160 erhöht wurde (HARPKE et al. 2015). Die Frage, um welche Art es sich beim Zavelsteiner Krokus handelt, ist nicht einheitlich beantwortet worden. MARTENS

(1825: 339, hier erstmals in der Literatur erwähnt), SCHÜBLER & MARTENS (1834: 29), SCHÜZ (1858: 55), MARTENS & KEMMLER (1865: 582) und KIRCHNER & EICHLER (1900: 95) geben *Crocus vernus* (L.) Hill, den Frühlings-Krokus, an. In den Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs (GRIESE 1998) und den Verbreitungskarten der Floristischen Kartierung (WÖRZ et al. 2015) wird der Bestand ebenfalls unter dieser Art geführt. Andere Quellen behandeln ihn als *Crocus neapolitanus* (Ker Gawl.) Loisel. (Teinachtal – Touristik 2015) oder *C. albiflorus* subsp. *neapolitanus* (Ker Gawl.) Hegi (MAYER 1929: 90, BERTSCH & BERTSCH 1933: 75). Dieser Name gilt aber als Synonym zu *C. vernus* subsp. *vernus* (MATHEW 1980: 95, 1982: 122) und nach Euro+Med (2015) zu *C. imperati* Ten.

Aufgrund verschiedener morphologischer Merkmale, meist Maße diverser Pflanzenteile (z.B. Griffel länger als Staubblätter), ist eine Zuordnung in die Verwandtschaftsgruppe von *Crocus vernus* plausibel. Eine aktuelle Arbeit von HARPKE et al. (2015) hat die Morphologie, Karyologie und molekulare Phylogenie von *Crocus* series *Verni* untersucht. Demnach sind nun zehn Arten akzeptiert: *Crocus etruscus* Parl., *C. heuffelianus* Herb., *C. ilvensis* Peruzzi & Carta, *C. kosaninii* Pulević, *C. longiflorus* Raf., *C. neapolitanus* (Ker Gawl.) Loisel., *C. neglectus* Peruzzi & Carta in HARPKE et al., *C. siculus* Guss., *C. tommasinianus* Herb. und *C. vernus* (L.) Hill. Fünf davon – *C. heuffelianus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. siculus* und *C. vernus* – entsprechen der früheren, weit gefassten Art *C. vernus* im Sinne von MATHEW (1980).

Um die Bestimmung des Zavelsteiner Krokus zu überprüfen, haben die Autoren zwei DNA-Regionen sequenziert und mit vorhandenen Daten verglichen.

MATERIAL UND METHODEN

Auswahl der Taxa und der molekularen Marker

Von der Zavelsteiner Krokus-Population wurden am 14.03.2015 sieben Individuen (THIV 5215, STU) gesammelt und vier von diesen später molekular untersucht. Die Wahl der DNA-Marker richtete sich nach den phylogenetischen *Crocus*-Studien von HARPKE et al. (2013, 2015). Der u. a. dort verwendete „Internal transcribed spacer (ITS)“ der nukleären, ribosomalen DNA und der „*trnL-trnF* intergenic spacer (IGS)“ des Chloroplasten-Genoms wurden auch für die hier durchgeführten Analysen genutzt. Nach Sequenzierung dieser DNA-Bereiche der Zavelsteiner Individuen wurden diese zunächst mit allen in EMBL/Genbank verfügbaren Daten von *Crocus* verglichen und phylogenetisch (*Neighbour Joining*-Baum basierend auf Jukes-Cantor-Distanzen) ausgewertet. In beiden Fällen war eine Zugehörigkeit zur *Crocus vernus*-Verwandtschaft bestätigt worden. Für eine bessere Übersicht wurden die Datensätze so reduziert, dass diese mit den ITS- und *trnL-trnF* IGS-Stammbäumen dieser Gruppe von HARPKE et al. (2015) weitestgehend übereinstimmten.

Laborarbeiten

Die DNA-Isolierung der vier Individuen, die Amplifizierung der ITS- und *trnL-trnF* IGS-Region mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Sequenzierungen sind in KONDRASKOV et al. (2015) beschrieben. Dort finden sich Details zu Einstellungen, Primer etc. Die Zählung der Chromosomen richtete sich nach SAUER & THIV (1995).

Phylogenetische Analysen

Die Grundlagen der verwendeten Methoden können bei KNOOP & MÜLLER (2009) nachgelesen werden. Die ITS- und *trnL-trnF* IGS-Sequenzen wurden mittels Geneious 7.1.7 (KEARSE et al. 2012) editiert und anschließend mit MAFFT (KATOH et al. 2002) aligniert. Die beiden (reduzierten) Datensätze wurden schließlich mittels des Bayesianischen Ansatzes im Programm MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST 2001) analysiert. Als Einstellungen dienten jeweils das Substitution-Modell GTR + Γ mit 4 Γ -Kategorien, 4 Ketten mit 1.100.000 Generationen und einer *Sampling Frequency* von 200 sowie einem *Burn-in* von 100.000. Die *Posterior Probabilities* wurden im Programm Tracer (RAMBAUT & DRUMMOND 2007) nach der *Effective Sampling Size* ($BSS > 200$) geprüft. Die Sequenzen wurden bei EMBL hinterlegt (KT357293-KT357300). Das *Alignment* kann beim Erstautor angefragt werden.

RESULTATE UND DISKUSSION

Verbreitung

Im Zuge der Floristischen Kartierung Baden-Württembergs wurde auch die Verbreitung des Zavelsteiner *Crocus*-Vorkommens neu erfasst. Es verteilt sich über zwei Messtischblatt-Quadranten (7318/1 und 7218/3). Der größte Teil des Bestandes befindet sich in den außerordentlich individuenreichen Flächen des Naturschutzgebietes „Krokus-Wiesen“. Bereits SCHÜZ (1858: 55) und WURM (1891: 139) weisen aber auch auf die Ausbreitung in die benachbarten Markungen Sonnenhardt, Rötenschwamm und Teinach hin. Diese Bestände sind auch derzeit stabil und befinden sich zum Teil außerhalb des Schutzgebietes, z. B. westlich Speßhardt (A. WÖRZ), bei Sonnenhardt oder bei Lützenhardt (M. SCHMID). Eine Einzelbeobachtung von WURM (1892: 262) lässt darauf schließen, dass eine Ausbreitung endozoochor durch Weidevieh erfolgen kann.

In ganz Baden-Württemberg gibt es Nachweise von *Crocus vernus*, bei denen es sich überwiegend um Nahverwilderungen oder Bestände in Parks und Friedhöfen handelt. Im Vergleich zu den Beständen um Zavelstein sind es meist kleinere Populationen, und eine vergleichbare Ausbreitung im Wirtschaftsgrünland ist bisher nicht bekannt. Um welche Taxa es sich dabei genau handelt, bedarf der Überprüfung, insbesondere im Hinblick auf die neue Arbeit von HARPKE et al. (2015).

DNA-Analysen

Sowohl die Analyse der nukleären DNA (ITS; Abb. 3) als auch der Chloroplasten-DNA (*trnL-trnF* IGS; Abb. 4) ergab eine Einordnung des Zavelsteiner Krokus in die *Crocus vernus*-Gruppe.

Die ITS-Sequenzen der vier Individuen aus Zavelstein unterscheiden sich prinzipiell nicht. Vier Nukleotid-Stellen sind jedoch polymorph. So ist z. B. an Position 315 für drei der untersuchten Individuen nur klar, dass es sich um ein Pyrimidin handelt, also entweder Cytosin oder Thymin. Dadurch, dass ITS in vielen Kopien in der Zelle vorkommt, ist es auch möglich, dass beide Varianten im Zellkern vorhanden sind. Das vierte Individuum zeigte an dieser Stelle eine Thymin-Nukleobase. Im ITS-Stammbaum gruppieren alle vier Individuen mit *Crocus heuffelianus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. siculus* und *C. vernus*, und damit zur Serie *Verni*. Die genauen Beziehungen zwischen diesen Arten sind aufgrund geringer DNA-Variation nicht aufgelöst.

Die *trnL-trnF* IGS-Sequenzen der vier Individuen aus Zavelstein sind identisch. Sie fallen in eine Klade mit *Crocus neapolitanus*, *C. siculus*, *C. kosaninii*, *C. ilvensis*, *C. etruscus*, *C. vernus* und *C. neglectus*. Die *trnL-trnF* IGS-Sequenzen der Zavelsteiner Croci stimmen zu 100% mit denen von *C. neglectus* überein.

Die molekularen Untersuchungen legen nahe, dass es sich bei dem Zavelsteiner Krokus entweder um *Crocus neglectus* oder einen Hybriden innerhalb der Serie *Verni* handelt. Für *Crocus neglectus* selbst wurde ein hybridogener Ursprung angenommen. Er ist als allotetraploid interpretiert worden. Als Kreuzungspartner postulieren HARPKE et al. (2015) *Crocus ilvensis* und *C. vernus* oder *C. neapolitanus*, alle mit einer Chromosomenzahl von $2n = 8$. Für eine hybridogene Entstehung des Zavelsteiner Krokus können möglicherweise die polymorphen ITS-Sequenzen herangezogen werden, welche Kopien verschiedener Eltern tragen könnten. Die völlige Übereinstimmung des Chloroplasten-Markers mit *Crocus neglectus* spricht für die Zugehörigkeit der Zavelsteiner Population zu dieser Art.

Crocus neglectus

Der Übersehene Krokus, *Crocus neglectus* Peruzzi & Carta in HARPKE et al., ist eine 2015 (2014 online) beschriebene Art aus der Serie *Verni*, die aus dem nördlichen Italien (Ligurien, Toskana, Emilia-Romagna) stammt, möglicherweise aber auch im Elsass, in Österreich und der Tschechischen Republik vorkommt (HARPKE et al. 2015). Er ist ein Frühjahrsblüher mit meist violetten Tepalen ohne Streifen, einfarbigem Schlund und Griffel, der länger als die Antheren ist (HARPKE et al. 2015). Morphologisch unterscheidet sich der Übersehene Krokus durch relativ dicke Knollenfasern und tief eingeschnittene Narben-Teillappen. Die Chromosomenzahl liegt bei $2n = 16$. Diese Merkmale treffen weitestgehend auf die Zavelsteiner Pflanzen zu, jedoch zeigen diese eine höhere Variation in vielen dieser Charakteristika als *C. neglectus*. Für den Zavelsteiner Krokus konnte ebenfalls eine Chromosomenzahl von $2n = 16$ bestätigt werden. Somit sprechen einige Argumente für dessen Zuordnung zum Übersehenen Krokus. Dies möchten die

Autoren dennoch als vorläufig betrachten, da die Taxonomie der Gruppe noch nicht endgültig geklärt ist.

Die hier getroffene Bestimmung als *Crocus neglectus* untermauert die These, dass die Zavelsteiner Bestände keine autochthonen, sondern anthropogene, durch Verwilderung entstandene Populationen sind. Die Art ist hier eingebürgert, da sie sich über mehrere Generationen seit mindestens etwa 200 Jahren selbstständig fortpflanzt und ausbreitet. Die Herkunft liegt demnach im toskanisch-ligurischen Bereich Italiens. Zum Zeitpunkt der Verwilderung kann aus diesen Daten keine Aussage erschlossen werden.

DANKSAGUNG

Wir möchten uns bei CHRISTINA SCHÜSSLER (Stuttgart) für die Laborarbeit, sowie bei CORNELIA KRAUSE und PAULINA KONDRASKOV (Stuttgart) für die Unterstützung bei der Datenauswertung bedanken. Herrn DR. CHRISTOPH ALY (Regierungspräsidium Karlsruhe) danken wir für die Sammelgenehmigung im Naturschutzgebiet.

LITERATUR

- BERTSCH, K. & F. BERTSCH (1933): Flora von Württemberg und Hohenzollern; 311 S. – München (J.F. Lehmanns Verlag).
- Euro+Med (2015): Euro+Med PlantBase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. – <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [letzter Zugriff: 04.08.2015].
- GRIESE, J. (1998): Iridaceae. – In: SEBALD, O., SEYBOLD, S., PHILIPPI, G. & A. WÖRZ (Hrsg.): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs, Vol. 7: 187–204; 595 S. – Stuttgart (Ulmer-Verlag).
- HARPKE, D., CARTA, A., TOMOVIĆ, G., RANĐELOVIĆ, V., RANĐELOVIĆ, N., BLATTNER, F.R. & L. PERUZZI (2015): Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series *Verni* (Iridaceae). – Plant Systematics and Evolution, 301: 309–325.
- HARPKE, D., MENG, S., RUTTEN, T., KERNDORFF, H. & F.R. BLATTNER (2013): Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: Ancient hybridization and chromosome number evolution. – Molecular Phylogenetics and Evolution, 66: 617–627.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST (2001): MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. – Bioinformatics, 17: 754–755.
- KATO, K., MISAWA, K., KUMA, K. & T. MIYATA (2002): MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. – Nucleic Acids Research, 30: 3059–3066.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P. & A. DRUMMOND (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – Bioinformatics, 28: 1647–1649.
- KIRCHNER, O. & J. EICHLER (1900): Exkursionsflora für Württemberg und Hohenzollern; 440 S. – Stuttgart (Ulmer-Verlag).
- KNOOP, V. & K. MÜLLER (2009): Gene und Stammbäume: ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. 2. Aufl.; 386 S. – Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag).

- KONDRASKOV, P., SCHÜTZ, N., SCHÜSSLER, C., DE SEQUEIRA, M.M., GUERRA, A.S., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., JAÉN-MOLINA, R., MARRERO-RODRÍGUEZ, Á., KOCH, M.A., LINDER, P., KOVAR-EDER, J. & M. THIV (2015): Biogeography of Mediterranean Hotspot Biodiversity: Re-Evaluating the 'Tertiary Relict' Hypothesis of Macaronesian Laurel Forests. – PLoS one, 10. DOI:10.1371/journal.pone.0132091.
- MARTENS, G. VON (1825): V. Ueber Württembergs Flora. – Correspondenzblatt des Württembergischen Landwirtschaftlichen Vereins, 7: 333–341.
- MARTENS, G. VON & C.A. KEMMLER (1865): Flora von Württemberg und Hohenzollern; 844 S. – Tübingen (Osiander).
- MATHEW, B.F. (1980): 7. *Crocus*. – In: TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M. & D.A. WEBB (Hrsg.): Flora Europaea, Vol. 5: 92–99; 452 S. – Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney (Cambridge University Press).
- MATHEW, B.F. (1982): The Crocus. A Revision of the Genus *Crocus* (Iridaceae); 127 S., 79 Taf. – London (B.T. Batsford).
- MAYER, A. (1929): Exkursionsflora der Universität Tübingen; 519 S. – Tübingen (A. Weil).
- RAMBAUT, A. & A.J. DRUMMOND (2007): Tracer v1.4 – <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- SAUER, W. & M. THIV (1995): Die Gattung *Pulmonaria* (Boraginaceae) in Baden-Württemberg. – Jahreshefte Gesellschaft Naturkunde Württemberg, 151: 281–344.
- SCHÜBLER, G. & G. VON MARTENS (1834): Flora von Württemberg; 695 S. – Tübingen (Osiander).
- SCHÜZ, G.E.C.C. (1858): Flora des Nördlichen Schwarzwaldes; 64 S. – Calw (Oelschläger).
- Teinachtal – Touristik (2015): <http://www.teinachtal.de/de/aktiv/wandertouren/krokusweg/> [letzter Zugriff: 25.07.2015].
- WÖRZ, A., HÖLZER, A. & M. THIV (2015): Aktuelle Verbreitungskarten der Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. – <http://www.flora.naturkundemuseum-bw.de>.
- WURM, W. (1891): Zur Geschichte und Naturgeschichte des *Crocus vernus* um Zavelstein. – Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg, 47: 135–140.
- WURM, W. (1892): Nachtrag zur Geschichte und Naturgeschichte des *Crocus vernus* um Zavelstein. – Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg, 48: 262.
- WURM, W. (1894): Geschichte und Naturgeschichte des Zavelsteiner Crocusflores. – Aus dem Schwarzwald, 2 (7): 75–78.

Anschrift der Autoren:

DR. MIKE THIV
 DR. ARNO WÖRZ
 Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart
 Rosenstein 1
 D-70191 Stuttgart
 Email: mike.thiv@smns-bw.de
 Email: arno.woerz@smns-bw.de



Abb. 1a, b: Zavelsteiner Krokus (Fotos: M. THIV, SMNS).



Abb. 2: Ältester Herbarbeleg des Zavelsteiner Krokus (STU) (Foto: C. DALITZ, SMNS).

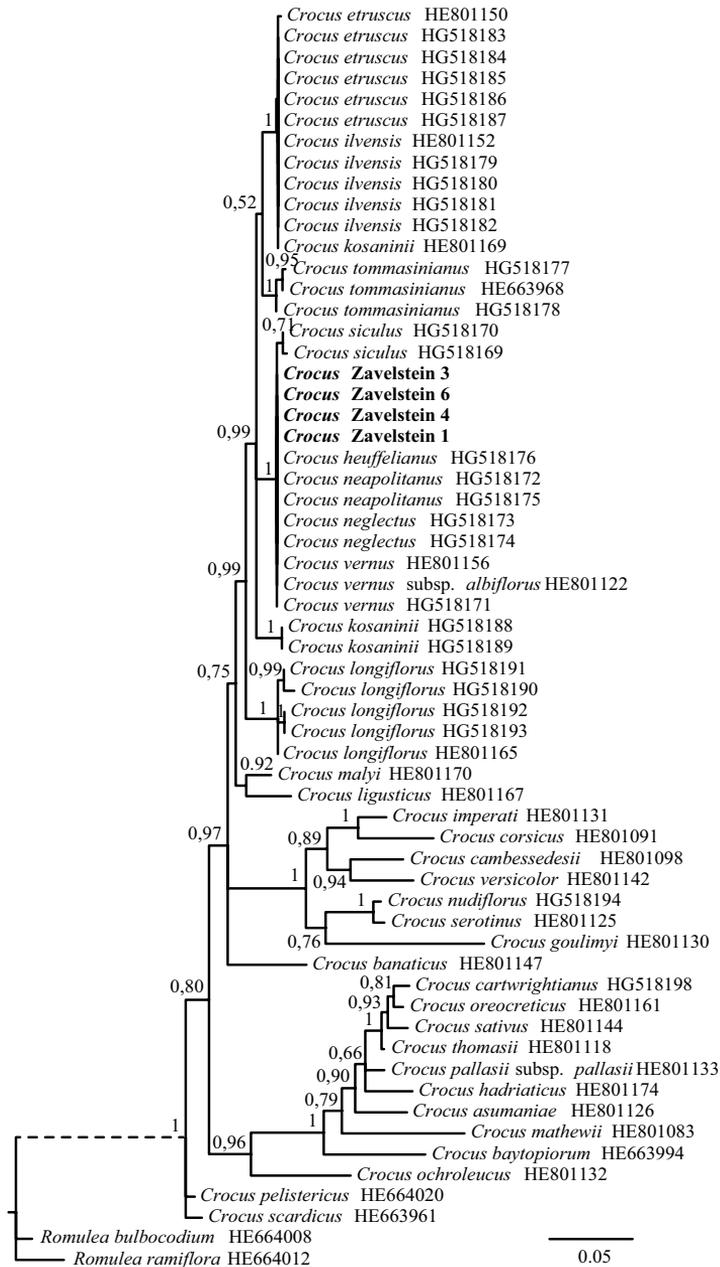


Abb. 3: Stammbaum ausgewählter *Crocus*-Arten basierend auf der Bayesianischen Analyse mit ITS-Sequenzen. Zahlen an den Knoten beziehen sich auf *Posterior Probability*-Werte (Unterstützung der Klade); die gestrichelte Linie ist verkürzt. EMBL-Nr. nach Artnamen.

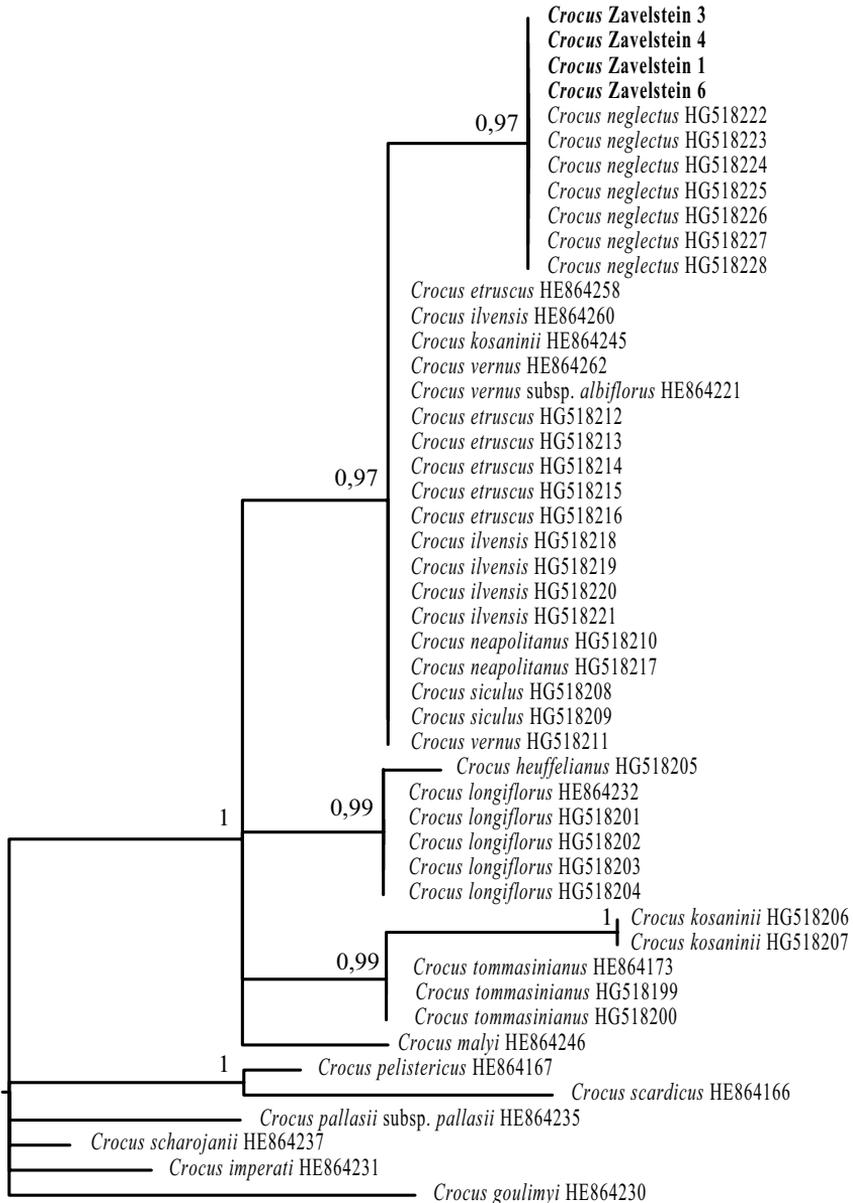


Abb. 4: Stammbaum ausgewählter *Crocus*-Arten basierend auf der Bayesianischen Analyse mit *trnL-trnF* IGS-Sequenzen (Legende siehe Abb. 3).