

**Die rote Tulpe von Grengiols: Verschollene Form  
von *T. grengiolensis* Thommen oder entflohene  
Gartentulpe?**

**Eine genetische Verwandtschaftsanalyse**

S. Glur und C. Glenz

*Unterbreitet an Botanica Helvetica*

## **Abstract**

Am 26. Mai 1945 entdeckte der Botaniker Eduard Thommen in Grenchols (Wallis) die einzige in der Schweiz endemische wildlebende Tulpenart. Er beschrieb zwei Formen; eine gelbe und eine gelb-rote Form, welche er als *Tulipa grengiolensis subsp. omnino-lutea* resp. *subsp. rubro-variegata* bezeichnete. 2004 konnte neben den zwei bekannten Formen, ebenfalls rot blühende Tulpen nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem Gartentulpenklassiker 'Apeldoorn' konnte eine pflanzen-systematische Zuordnung nicht eindeutig durchgeführt werden. Anhand einer genetischen Verwandtschaftsanalyse konnte geklärt werden, dass es sich bei der roten Tulpe von Grenchols um eine verschollene Form von *T. grengiolensis* handelt, nämlich um *T. grengiolensis subsp. rubro-variegata f. rubra*. Gleichzeitig konnten die Untersuchungen Hinweise zur genetischen Reinheit von *T. grengiolensis subsp. omnino-lutea*, sowie zur genetischen Variabilität von *T. grengiolensis* im Allgemeinen liefern. Die Resultate der genetischen Analyse erlauben, die Kenntnisse über die Grenchjer Tulpe zu erweitern und damit den Erhalt dieser endemischen Tulpe in all ihren Formen langfristig zu sichern.

## Einleitung

Am 26. Mai 1945 entdeckte der Botaniker Eduard Thommen in Grenchols (Wallis) die einzige in der Schweiz endemische wildlebende Tulpenart (Thommen, 1946). Er beschrieb zwei Formen; eine gelbe und eine gelb-rote Form, welche er als *Tulipa grengiolensis* subsp. *omnino-lutea* resp. subsp. *rubro-variegata* bezeichnete – beziehend auf die Form und Verbreitung der Tulpe („Grencher Tulpe“).

Die Grencher Tulpe – ein mehrjähriger Geophyt – gehört zum Formenkreis von *Tulipa gesneriana*, welcher v. a. in Frankreich und Italien noch viele weitere, oft ebenfalls in kleinem Gebiet endemische Sippen umfasst (Käsermann und Moser, 1999). In der Schweiz gehören noch *Tulipa didieri*, *Tulipa perrieri*, *Tulipa mauriana* und *Tulipa aximensis* dazu. Bei der *Tulipa grengiolensis* handelt es sich um eine Reliktpopulation einer vor Jahrhunderten eingeführten Art unbekannter Herkunft. *Tulipa didieri* und *Tulipa grengiolensis* wurden der besseren Verständlichkeit wegen als Kleinarten beibehalten obschon sie nach dem Synonymie-Index in *Tulipa gesneriana* eingeschlossen werden (Aeschimann und Heitz, 2005).

Das natürliche Auftreten der *Tulipa grengiolensis* begrenzt sich auf die montane Stufe (990 m ü. M.) und ist eng mit der traditionellen Kulturlandschaft und deren extensiven Bewirtschaftung verbunden (Agten, 1997). Dies bedeutet, sie kommt nur kulturbegleitend vor und ist auf die Begleitflora der Winterroggenäcker und in deren Umgebung auf meist kleine Trocken- und Halbtrockenwiesen beschränkt (Käsermann und Moser, 1999).

Alle Wildtulpen aus dem Aggregat von *Tulipa gesneriana* sind gefährdet bis vom Aussterben bedroht. In der Schweiz ist die *Tulipa grengiolensis* auf der Roten Liste und vollständig geschützt (Moser *et al.*, 2002). Die Gefährdung der *Tulipa grengiolensis* ist hauptsächlich auf den Wandel in der landwirtschaftlichen Bewirtschaftungsweise (andere Getreidesorten, veränderter Bewirtschaftungsplan, Intensivierung der Bewirtschaftung) zurückzuführen. Auf eine damals extensive Bewirtschaftung der Flächen mit Begleitflora folgten eine intensive Bewirtschaftung und der Verlust der kleinparzellierten, traditionellen Kulturlandschaft. Eine Bestandesaufnahme im Jahre 1988 zeigte auf, dass einige der natürlichen Standorte und deren *Tulipa grengiolensis* Populationen bereits verschwunden waren. Um den Erhalt der gelben und rotgestreiften Form der *Tulipa grengiolensis* zu sichern, sind seit 1993 durch Pro Natura, zusammen mit Tulpenzunft und Gemeinde Grenchols, gezielte Schutzmassnahmen getroffen worden u.a. die Reaktivierung des Wintergetreideanbaus. Die Populationen haben sich seither leicht erholt. Über die letzten 11 Jahre betrachtet, konnten jährlich durchschnittlich 1160 gelbblühende Tulpen und 93 gelb-rotblühende Tulpen gezählt werden.

2004 konnte nebst den zwei bekannten Formen, ebenfalls rot blühende Tulpen nachgewiesen werden (5-6 Individuen pro Jahr). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem Gartentulpenklassiker 'Apeldoorn' konnte eine pflanzensystematische Zuordnung auf der Grundlage phänologischer Merkmale nicht eindeutig durchgeführt werden.

In diesem Artikel wird anhand einer genetischen Verwandtschaftsanalyse geklärt, ob es sich bei der roten Tulpe von Grenchols um eine verschollene Form von *T. grengiolensis* oder einer entflohenen Gartentulpe handelt. Gleichzeitig sollen die Untersuchungen Hinweise zur genetischen Reinheit von *T. grengiolensis subsp. omnino-lutea*, sowie zur genetischen Variabilität von *T. grengiolensis* im Allgemeinen liefern. Die Resultate der genetischen Analyse erlauben, die Kenntnisse über die Grencher Tulpe zu erweitern, das Schutzkonzept weiter zu entwickeln und damit den Erhalt dieser endemischen Tulpe in all ihren Formen langfristig zu sichern.

## Versuchsplanung

Um eine genügend breite Abstützung der Daten zu erhalten, wurde folgender Versuchsaufbau geplant: 15 Individuen von *rubro-variegata*, 2 mutmasslich hybride Individuen, 7 Individuen der neuen rein roten Form (*rubra*; Abb.1), 3 Individuen der ähnlichen *T. rhodopea*, 15 Individuen *omnino-lutea* sowie 3 Individuen des 'Apeldoorn'-Cultivars sollten genetisch analysiert und auf ihren Verwandtschaftsgrad hin untersucht werden.

Total war die Analyse von 45 Samples (Proben / Individuen) geplant. Die einzelnen Individuenzahlen richteten sich einerseits nach Verfügbarkeit (Hybriden, *T. rhodopea*, rein rote Form), andererseits nach gewünschter statistischer Breite. Die Verteilung resp. die Herkunft der beprobten Individuen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Zur Analyse der genetischen Variabilität von *T. grengiolensis* wurden von *rubro-variegata* und von *omnino-lutea* je 15 Samples untersucht. Wegen zu schlechter qualitativer Ergebnisse mussten jedoch zwei Samples nachträglich (sprich bei der Analyse) ausgeschlossen werden. Es wurde also letztendlich mit 43 Samples gearbeitet.

Das Blattmaterial wurde im Jahr 2005 in Grenchols, im Botanischen Garten Bern und in einem Privatgarten in Jegenstorf gesammelt. Die Blätter wurden in grünem Zustand gesammelt und sofort mit Silica-Gel getrocknet und gekühlt gelagert.

## **Genetische Analyse- und Auswertungsmethodik**

### ***AFLP-Fingerprinting (Amplified Fragment Length Polymorphism)***

Für die AFLP-Analyse wurde das Labor der Gruppe um Prof. P. Küpfer der Universität Neuenburg (Ebolab) zur Verfügung gestellt. Erst wurden die getrockneten Blätter mit einer Schüttel-Mühle (Mixer Mill MM 300, Qiagen) pulverisiert, dann wurde die DNA-Extraktion mit dem DNeasy™ Plant Mini Kit von Qiagen durchgeführt (Qiagen 2000). Die nachfolgenden Arbeitsschritte (Schneiden, Präparation der Adapter, Ligation der Adapter, präselektive und selektive PCR) erfolgten gemäss dem Standardprotokoll für AFLP des Ebolab der Universität Neuenburg. Der Run der Samples erfolgte mit GeneScan™ auf einem ABI 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Die erste graphische Aufarbeitung erfolgte automatisiert mit ABI GeneScan™ Analysis Software, und diente dann als Basis für die manuelle Übertragung in eine Präsenz- / Absenz-Matrix.

### ***Auswertung der AFLP-Rohdaten***

In den Rohdaten der 43 Samples wurden manuell die Fragment-Grenzen definiert und dann jedes Sample für die 747 definierten Fragmente auf Anwesenheit, bzw. Abwesenheit eines Peaks hin geprüft und entsprechend in die Präsenz- / Absenz-Matrix übertragen. Die Matrix an und für sich wurde mithilfe der Software NDE (Page 2004) erstellt und im Nexus-Dateiformat gespeichert.

Die Matrix wurde mit RestDist aus dem Phylip 3.66 Software-Paket (Felsenstein 2004) statistisch ausgewertet. Hierzu wurden die Daten erst 10000 Mal 'gebootstrapped', dann für jeden Bootstrap ein Ähnlichkeitsbaum (neighbour-joining), und schlussendlich aus diesen 10000 Bäumen ein Konsensus-Baum (extending 50% majority rule) errechnet (Abb. 2).

Bei der Interpretation des Konsens-Ähnlichkeitsbaums müssen zwei Aspekte mitberücksichtigt werden: (a) es handelt sich um einen ungewurzelten Baum d.h. das Ausgangs-Individuum ist nicht wirklich als Ursprung aller Samples anzuschauen, sondern wurde zufällig vom Programm als Outgroup-Individuum gewählt und (b) die Astgabeln können an ihrer Ansatzstelle rotiert werden d.h. die Position der Astgabel richtet sich nicht nach den Verwandtschaftsgraden aus.

## Resultate und Diskussion

Beim Konsens-Ähnlichkeitsbaum wurde das Individuum „rubro-variegata Garten Alex 1“ als Ausgangsindividuum gewählt. Das Individuum „rubro-variegata Garten Alex 1“ ist jedoch, wie zuvor gesehen, nicht als Ursprung aller Samples anzuschauen.

Der Ähnlichkeitsbaum in Abb. 2 zeigt auf, dass:

- *omnino-lutea* sehr gut zusammen gruppiert. Einzig die auch schon morphologisch etwas suspekta „*omnino-lutea* Bahnhof“ liegt ein wenig entfernt. Allerdings fallen auch die extrem tiefen Bootstrap-Werte auf. Dies bedeutet, die exakte Anordnung birgt eine gewisse Unsicherheit. Die tiefen Werte deuten auch darauf hin, dass sich die Individuen nur in wenigen gemeinsamen Merkmalen vom Rest unterscheiden. Eine Strukturierung innerhalb der *omnino-lutea* ist also schwierig, was wiederum auf einen kleinen Genpool von *T. grengiolensis subsp. omnino-lutea* hinweist.
- die 'Apeldoorn'-Cultivaren sehr gut zu einer einzigen Astgabel zusammen fallen. Allerdings sind drei Individuen der *omnino-lutea* erstaunlich ähnlich wie sie. Dies kann dahingehend gedeutet werden, dass die Population von *omnino-lutea* genetisch nicht mehr ganz rein geblieben ist; eine Hybridisierung der Arten also möglich ist, und tatsächlich hin und wieder auch vorkommt. Die Tatsache, dass nur sehr wenige Samenkapseln produziert werden (pers. Beob.) zeigt aber auf, dass die Hybridisierung ein eher seltenes Ereignis ist.
- die rein rote Form, hier *rubra* genannt, extrem gut mit *rubro-variegata* gruppiert. Es ist anhand dieser Analyse nicht möglich die beiden Formen auseinander zu differenzieren. Der Form *rubra* ist daher höchstens der taxonomische Rang einer Forma zuzuordnen. Der Name *T. grengiolensis subsp. rubro-variegata f. rubra* wird also provisorisch empfohlen. Es ist zu beachten, dass auch der Rang als Unterart von *rubro-variegata* noch nicht offiziell publiziert ist d.h. sie gilt bis heute noch als Forma.
- auch bei *rubra* fällt die Nähe der einzelnen Individuen zu einander auf, was zusammen mit den tiefen Bootstrap-Werten als Hinweis für eine sehr geringe genetische Variabilität gilt.
- die mutmasslichen Hybriden liegen keineswegs intermediär zwischen *omnino-lutea* und *rubro-variegata*, sondern eindeutig innerhalb der Letzteren. Eine mögliche Erklärung läge darin, dass es sich dabei um Albinos handelt d.h. das rote

Anthocyanin-Farbpigment fehlt in den Blütenblättern, weshalb sie nur die gelbe Grundpigmentierung aufweisen – was bei Tulpen gemäss Hall (1940) durchaus verbreitet ist; die Staubblätter aber sind dunkel, wie bei *rubro-variegata* üblich. Diese These kann aber mit den durchgeführten Analysen nicht überprüft werden.

- *T. rhodopea* gruppiert viel weniger gut mit *rubra* als die morphologische Ähnlichkeit hätte vermuten lassen. Trotz der niedrigen Bootstrap-Werte überrascht jedoch die Nähe zu *omnino-lutea*. Es ist möglich, dass *T. grengiolensis* tatsächlich näher verwandt mit *T. rhodopea* (korrekt *T. hungarica* subsp. *rhodopea*) ist. Die andere Unterart von *T. hungarica* (*T. hungarica* subsp. *hungarica*) ist auch gelb blühend, jedoch unterscheiden sich die Blütenblätter in ihrer Form doch erheblich.

## Schlussfolgerung

Die Form *rubra* kann aufgrund der gemachten Untersuchungen zu *T. grengiolensis* gerechnet werden – es ist keine entflohene Gartentulpe. Allerdings kann nicht wie gedacht eine dritte Unterart vorgeschlagen werden, zu nahe verwandt ist sie mit der subsp. *rubro-variegata*. Als provisorischer Name wird *T. grengiolensis* subsp. *rubro-variegata* f. *rubra* vorgeschlagen.

Die gelbe Form *omnino-lutea* scheint genetisch nicht mehr ganz rein geblieben zu sein, ein Teil der Samples liegt deutlich mit 'Apeldoorn'-Cultivaren zusammen.

Generell ist die genetische Variabilität von *T. grengiolensis* klein. Dies bedeutet, dass die Art anfällig auf sich verändernde Standortverhältnisse reagieren könnte – die Tulpenpopulation ist wenig anpassungsfähig. Dieses Problem ist bei vielen Arten mit kleiner oder zerstückelter Verbreitung bekannt. Dass die genetische Variabilität bzw. der Genpool nicht grösser ist, musste aber in Anbetracht der weitgehend vegetativen Vermehrung und der einst kleinen Restpopulation fast befürchtet werden.

Diese Erkenntnisse sind sowohl durch die Sample- als auch die Fragmentzahl gut abgesichert. Die generell tiefen Bootstrap-Werte zeigen aber auch klar, dass hier sehr ähnliche und demnach auch sehr nahe verwandte Tulpen verglichen wurden. Wir nähern uns hier sicherlich nach und nach der Auflösungsgrenze dieser Methode. Natürlich könnte man noch weitere Primerkombinationen in den PCR-Zyklen der AFLP-Analyse verwenden, und damit die Datenmenge weiter anheben, um eine noch bessere Auftrennung und Absicherung zu erhalten.

Selbstverständlich gibt es auch bei der durchgeführten Analyse einige Probleme und potentielle Fehlerquellen. So ist etwa nicht ganz auszuschliessen, dass die DNA in der Zeit zwischen dem Pflücken der Blätter und der Analyse im Labor trotz der ergriffenen Konservierungsmassnahmen zum Teil beschädigt wurde. Die Wahl der verwendeten Primer basierte zwar auf den Erfahrungen aus früheren analogen Analysen an Tulpen, dennoch bleibt es eine subjektiv-willkürliche Komponente. Die Fragmentgrenzen waren auch nicht immer klar ersichtlich und wurden nach bestem Gewissen, aber manchmal halt eben doch etwas willkürlich gesetzt.

Durch die grosse Datenmenge wird aber Einfluss der möglicherweise gemachten Fehler klein gehalten.

Für das Schutzkonzept ergeben sich durch diese Erkenntnisse folgende Massnahmen:

Als erstes muss *T. grengiolensis subsp. rubro-variegata f. rubra* in das Konzept eingegliedert werden. Das bedeutet, dass nun drei verschiedene Formen von *T. grengiolensis* geschützt, unterstützt und vermehrt werden sollen. Aufgrund der kleinen Restpopulation und der dargelegten Resultate wird ein 2-phasiges Vorgehen vorgeschlagen: In einer ersten Phase wird *T. grengiolensis subsp. rubro-variegata f. rubra* geographisch separiert, vegetativ vermehrt und ein solider Grundstock aufgebaut werden und erst dann sollen alle Formen von *T. grengiolensis* zusammen in die Äcker von Grengiols ausgepflanzt werden. Das Fernziel ist aber ganz klar eine gesunde gemischte Population.

Für die zukünftige Forschung an und zu *Tulipa grengiolensis* bleiben noch immer einige offene Fragen. So ist die Herkunft dieser speziellen Tulpe noch immer nicht geklärt, auch wenn *Tulipa hungarica ssp. rhodopea* eine vielversprechende Spur zu sein scheint. Es wäre diesbezüglich sicherlich interessant einen genetischen Vergleich mit *Tulipa hungarica s. str.* – der gelbblühenden Unterart - zu machen. Und auch in der Türkei gibt es einige Arten die man nicht ausser Acht lassen sollte (zum Beispiel: *T. gumusanica*). Generell ist der regionale Fokus für solche Herkunftsuntersuchungen auf Bulgarien, Nordgriechenland und die Türkei zu legen.

Und auch die These mit den Albinos könnte man noch zu beweisen versuchen. Allerdings müsste man wohl erst das entsprechende Gen identifizieren, um dann die beiden Farbvarianten mittels DNA-Sequenzierung des entsprechenden Abschnitts auf etwaige Unterschiede zu überprüfen.



## Danksagung

Ein besonderer Dank geht an den Kanton Wallis, den Fonds Landschaft Schweiz (FLS) und die Gemeinde Grenchols, die das Projekt finanziell unterstützt haben, sowie an das Ebolab der Universität Neuchâtel, deren Labor uns für die Analysen zur Verfügung gestellt wurde.

## Literaturverzeichnis

- Aeschimann, D. und C. Heitz, 2005. CRSF, Index synonymique de la Flore de Suisse et territoires limitrophes (ISFS), Documenta Floristicae Helvetiae N° 2, CRSF.
- Agten, A. (1997): Die Grencher Tulpe – *Tulipa grencholensis*. Info-Nature Vierteljahresbull. Walliser Bund Natursch. 52: 4-15.
- Agten N. 2001. ‚Grencher Tulpe‘, in: NGO „Traditionelle Nutztiere und Kulturpflanzen im Oberwallis“, Mengis Druck und Verlag, Visp.
- Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Glur, S. (2005). Genetic Differentiation of the "Neo Tulipae" group revealed by AFLP. Laboratory for Evolutionary Botany. Neuchâtel, University of Neuchâtel.
- Hall, A. D. (1940). The Genus Tulipa. The Royal Horticultural Society, London.
- Käsermann, C. und D. M. Moser (1999): Merkblätter Artenschutz: Blütenpflanzen und Farne, Stand: Oktober 1999 / Fiches pratiques pour la conservation: Plantes à fleurs et fougères, état pour octobre 1999 - Vollzug Umwelt / L'environnement pratique; BUWAL / OFEFP, Bern, 340p.
- Moser, D., A. Gyax, B. Bäumler, N. Wyler und R. Palese (2002): Rote Liste der gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. Hrsg. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern; Zentrum des Datenverbundnetzes der Schweizer Flora, Chambésy; Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Chambésy. BUWAL-Reihe «Vollzug Umwelt». 118 S.
- Page, R. D. M. (2004). NEXUS Data Editor for Windows (NDE), Ver. 0.5.0. Distributed by the author. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, UK.
- Thommen, E. (1946). "Neues Tulpenvorkommen im Wallis: *Tulipa grencholensis* E. Th." Bull. Murith. Soc. Valais. Sci. Nat. 63: 63-68.

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Standorte / Herkunft der einzelnen Sampels mit Koordinatenangaben der Individuen von *Tulipa grengiolensis*.

<b>Form</b>	<b>Bezeichnung/Standort</b>	<b>GPS-Koordinaten</b>
<i>T. greng. rubro-variegata</i>	Müllhalde Tafter Biel Ze Hyschere Kalberweid talwärts Acker Kalberweid	650.203/136.100 650.875/136.129 650.009/135.555 649.200/135.186 650.641/135.942 650.667/135.937
<i>T. greng. (Hybrid)</i>	Acker Kalbermatten Garten A. Agten (Fiesch)	Keine Angaben
<i>T. greng. rubra</i>	Garten A. Agten (Fiesch)	Keine Angaben
<i>T. greng. omnino-lutea</i>	Grenziols Bahnhof Kalberweid (bei Holzstapel) Kalberweid talwärts (bei Iris germ.) Kalberweid Hügel Acker Kalberweid	650.212 /136.142 650.537/135.910 650.571/135.897 650.625/135.920 650.666/135.904
<i>T. rhodopea</i>	Mt. Gamila (Griechenland) Nestos-Schlucht (Griechenland)	Keine Angaben
'Apeldoorn'	Garten Jegenstorf	Keine Angaben

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Photoaufnahme der *T. grengiolensis subsp. rubro-variegata f. rubra*.

Abb. 2: Konsens-Ähnlichkeitsbaum (Extended 50% majority rule consensus tree (out of 10000 bootstrapped neighbour-joining trees). Die Bootstrap-Werte sind in % angegeben. Gerechnet wurde der Baum mit RestDist aus Phylip (Felsenstein, 2004). Die Farben des Baumes bedeuten folgendes (gelb: *omnino-lutea*; orange: *rubro-variegata*; rot: *rubra* (rein rot); grün: *rhodopea*; blau: 'Apeldoorn'; türkis: Hybriden? / Albinos ?).



