

Zytologische und genetische Untersuchungen zu *Viola epipsila*, *V. palustris* und ihrer Hybride *V. ×fennica*

ALISIA SMOLKA, STEFAN RÄTZEL, VEIT HERKLOTZ & CHRISTIANE M. RITZ

Zusammenfassung: Arten der Gattung *Viola* sind aufgrund ihrer großen morphologischen Variationsbreite und komplexer Hybridisierungs- und Polyploidisierungsereignisse oft nicht einfach bestimmbar. Die beiden Arten *V. palustris* und *V. epipsila* und deren Hybride *V. ×fennica* wurden darum mithilfe von Durchflusszytometrie, mikroskopischer Chromosomenzählung und der Sequenzierung eines Plastidenmarkers untersucht, um ihre Verwandtschaftsverhältnisse zu klären und die verschiedenen Zytotypen mit morphologischen Merkmalen zu vergleichen. Die vorherige Bestimmung nach morphologischen Merkmalen konnte in allen Fällen durch die zytologische Analyse bestätigt werden, was die verwendeten Unterscheidungsmerkmale verifiziert. Es wurden Chromosomenzahlen von $2n = 24$ für *V. epipsila*, $2n = 48$ für *V. palustris* und $2n = 36$ für die Hybride *V. ×fennica* ermittelt, was bereits existierende Literaturangaben bestätigt. Plastidsequenzanalysen ergaben *V. epipsila* als mütterlichen Elter für alle *V. ×fennica*-Akzessionen, während *V. palustris* subsp. *pubifolia* mithilfe der hier angewandten Methoden nicht von *V. palustris* zu unterscheiden war. Aufgrund unserer Untersuchungen konnten der Wiederfund von *V. epipsila* und der erste Nachweis von *V. ×fennica* für Brandenburg erbracht werden. Die hier beschriebenen Methoden können zur eindeutigen Unterscheidung der untersuchten Taxa aus der Verwandtschaft von *V. palustris* verwendet werden und somit auch zum gezielten Schutz der in Deutschland extrem seltenen und akut vom Aussterben bedrohten *V. epipsila* sowie der ebenfalls sehr seltenen Hybride beitragen.

Abstract: Cytological and genetic studies on *Viola epipsila*, *V. palustris* and their hybrid *V. ×fennica*. Morphological identification of species of the genus *Viola* is complicated due to their high morphological variability and complex hybridisation and polyploidisation events. *V. palustris*, *V. epipsila* and their hybrid

V. ×fennica were therefore investigated by flow cytometry, microscopic chromosome counting and sequencing of a plastid marker to clarify their relationships and to compare the different cytotypes with morphological characters. The initial morphological determination was confirmed in all cases by chromosome counts of $2n = 24$ for *V. epipsila*, $2n = 48$ for *V. palustris* and $2n = 36$ for the hybrid *V. ×fennica*, confirming already existing literature data. Plastid sequences revealed *V. epipsila* as the maternal parent for all accessions of *V. ×fennica*, while *V. palustris* subsp. *pubifolia* could not be distinguished from *V. palustris* here. Based on our investigations, the recovery of *V. epipsila* and first evidence on the occurrence of *V. ×fennica* in Brandenburg could be confirmed. The methods described here can be used to clearly distinguish the studied taxa and thus support the protection of the extremely rare *V. epipsila* and its also rare hybrid.

Alisia Smolka
Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz,
Am Museum 1, 02826 Görlitz;
smolka.alisia@gmail.com

Stefan Rätzel (SR)
Georg-Friedrich-Händel-Straße 13,
15234 Frankfurt an der Oder;
stefan.raetzel@googlemail.com

Veit Herklotz
Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz
Am Museum 1, 02826 Görlitz;
veit.herklotz@senckenberg.de

Christiane M. Ritz
Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz
Am Museum 1, 02826 Görlitz;
christiane.ritz@senckenberg.de

1. Einleitung

Die Gattung *Viola* umfasst weltweit 525–654 Arten und ist vor allem in gemäßigten Zonen in Europa, Nordafrika, Asien und Amerika beheimatet (BALLARD & al. 1999, MARCUSSEN & al. 2021). Durch Hybridisierung, gekoppelt mit Polyploidie (Allopolyploidie), sind auch in Europa mehrere schwer fassbare Artkomplexe entstanden (MARCUSSEN & BORGEN 2000, VAN DEN HOF 2009, MARCUSSEN & al. 2015). So sind die beiden heimischen Veilchenarten *V. palustris* (Sumpf-Veilchen) und *V. epipsila* (Torf-Veilchen) aus der Sektion *Plagiostigma* GODR. morphologisch schwer voneinander zu trennen und bilden mehr oder weniger intermediäre Hybriden (NYLANDER 1843). Bei beiden Arten handelt es sich um Stauden mit grundständigen Laubblättern, länglich-eiförmigen Nebenblättern, eiförmigen Kelchblättern und verkehrt-eiförmigen, blass lilafarbenen Kronblättern (Abb. 1a & c). *V. epipsila* ist im Vergleich zu *V. palustris* gewöhnlich in allen Teilen \pm größer und hat bei typischer Ausbildung abstehend behaarte Blattunterseiten, Blütenstiele und Kelchblattränder im Gegensatz zur kahlen bzw. selten zerstreut behaarten *V. palustris* (Abb. 1d & f). Außerdem befinden sich die Vorblätter bei ersterer über, bei *V. palustris* hingegen unter der Stängelmittle. *V. epipsila* hat ellipsoidische Früchte mit kegelförmiger Spitze, während die Kapseln von *V. palustris* eiförmig und an der Spitze ausgerandet bis abgerundet sind (Abb. 1g). Die Samen sind bei der erstgenannten Art größer und olivgrün mit schwärzlicher Punktierung, bei zweiterer wirken sie durch flächige Punktierung der ebenfalls grünlichen Oberfläche optisch komplett schwarz und sind etwas kleiner (Abb. 1h & i). Die Hybride beider Arten *V. \times fennica* (Abb. 1b & e) ist hochgradig steril und bildet meist gar keine oder sehr selten partiell ausgebildete Früchte mit tauben Samen (Abb. 1g; RÄTZEL & al. 2018, RÄTZEL 2021). Auch überschneiden sich die Verbreitungsareale beider Arten in Europa, wobei *V. epipsila* weltweit ein sehr großes eurasiatisches, eher nördliches Gesamtareal besetzt und in Deutschland sowie ganz Mitteleuropa wesentlich seltener als die in ihrer Nominatform west- und zentral-europäisch verbreitete *V. palustris* ist (MEUSEL & al. 1978, NETPHYD & BFN 2013). Ferner ist in Deutschland die (weitgehend nur noch historische) Verbreitung von *V. epipsila* für alle

Gebiete außerhalb des nord- und nordostdeutschen Jungpleistozäns nach aktueller Datenlage ungesichert (RÄTZEL 2021). Allerdings kam die Art historisch in Südwest-Polen (Schlesien) vor, was mehrfach durch Belege gesichert ist [z. B. Flora von Oberschlesien, Torfwiesen bei Wiegschütz, zwischen *Sphagnum*, April 1898, *M. Wetschky* (B)].

Studien zur Chromosomenzahl und Ploidiestufe zeigen, dass die Arten zytologisch gut differenziert werden können. Die Chromosomenzahl beträgt $2n = 48$ für *V. palustris* und $2n = 24$ für *V. epipsila* (VALENTINE & al. 1968). Interspezifische Hybriden (KUTA 1989a, b, 1991, ŽABICKA & al. 2020) sind entweder mit $2n = 48$ fertil (KUTA 1991a) und aufgrund ihrer überwiegend *V. palustris*-artigen Merkmale als *V. palustris* L. subsp. *pubifolia* beschrieben oder mit $2n = 36$ steril und werden dann als *V. \times fennica* bezeichnet. Aufgrund unterschiedlicher Angaben zu der Chromosomenbasiszahl in der Sektion *Plagiostigma* von $x = 6$ oder $x = 12$ ist allerdings nicht klar, ob die Arten di- und tetraploid oder tetra- und oktoploid sind (KUTA 1989a, MARCUSSEN & BORGEN 2000, NADOT & al. 2000, MARCUSSEN & al. 2015, ŽABICKA & al. 2020).

Viola epipsila ist in Deutschland aktuell extrem selten und akut vom Aussterben bedroht (METZING & al. 2018). Sichere Nachweise nach 1980 gibt es noch in Mecklenburg-Vorpommern (FUKAREK & HENKER 2005), die Art gilt dort aber nunmehr als verschollen, weil mehrere Nachsuchen an den letzten Fundorten keine Bestätigungen mehr erbrachten (A. MOHR & W. WIEHLE, pers. Mitt. an SR; eigene Nachsuchen SR 2011–2014; HAHNE 2020). Die dokumentierten Bestände in Schleswig-Holstein gelten als erloschen, *V. epipsila* ist auf der dortigen Roten Liste als ausgestorben vermerkt (ROHMAN 2021). In Brandenburg gibt es ein einziges Vorkommen bei Hohenstein (s. Tab. 1, RÄTZEL & al. 2018), das sich nun auch in Erhaltungskultur des Botanischen Gartens Potsdam befindet (<http://www.ex-situ-erhaltung.de/pflanzenarten>). *V. palustris* hingegen ist noch in ganz Deutschland zu finden, die Bestände gehen jedoch auch hier zurück (METZING & al. 2018). Durch eine eindeutige Identifikation der Arten bzw. ihrer Hybriden könnten im Ergebnis Lebensräume gezielter geschützt bzw. die Ansprüche der Arten an ihre Standorte genauer untersucht werden.



Abb. 1: Morphologische Merkmale von *Viola epipsila*, *V. x fennica* und *V. palustris*. Chasmogame Blüten und Frühjahrsblätter von *V. epipsila* (a, d), *V. x fennica* (b, e) und *V. palustris* (c, f). Früchte von *V. epipsila*, *V. x fennica* (fehlschlagend) und *V. palustris* (von links nach rechts; g). Samen von *V. epipsila* (h) und *V. palustris* (i). Fotos: Stefan Rätzel. – Morphological characteristics of *V. epipsila*, *V. x fennica* and *V. palustris*. Chasmogamous flowers and earliest leaves of *V. epipsila* (a, d), *V. x fennica* (b, e) and *V. palustris* (c, f). Fruits of *V. epipsila*, *V. x fennica* (failing) and *V. palustris* (from left to right; g). Seeds of *V. epipsila* (h) and *V. palustris* (i).

Ziel unserer Arbeit war es, mehrere Individuen der in Deutschland angegebenen Taxa (BUTTLER & al. 2018) und *V. palustris* subsp. *pubifolia* aus der *Viola-palustris-epipsila*-Artengruppe zytologisch mithilfe von Durchflusszytometrie und Chromosomenzählungen zu charakterisieren, um sie taxonomisch zu bestimmen und die Ergebnisse von Bestimmungen anhand morphologischer und phänologisch-ökologischer Merkmale mit den zytologischen Ergebnissen zu vergleichen. Hierfür haben wir Lebendmaterial aus Nordostdeutschland und Nord-Polen untersucht. Weiterhin sollten potenzielle Hybriden identifiziert oder bestätigt und die Richtung ihrer Kreuzung mithilfe von mütterlich vererbten Plastidensequenzen untersucht werden. Eine weitere Frage war, ob diese Hybriden in selbstständigen Populationen ohne ihre Elternarten bestehen können. Zwar wurde kürzlich eine genetische und zytologische Studie zu diesem Sippenkomplex in Deutschland und Polen publiziert (ŽABICKA & al. 2020), allerdings wurden hier andere Fundorte berücksichtigt und keine Chromosomenzählungen vorgenommen, sodass wir mit unserer Studie weitere Beiträge zum Wissensstand deutscher Populationen liefern möchten.

2. Materialien und Methoden

Pflanzenmaterial

Eine Übersicht über die untersuchten Pflanzen, die in den jeweiligen Populationen im Zeitraum von 2011 bis 2016 aufgesucht und anschließend von SR weiterkultiviert wurden, findet sich in Tab. 1.

Vergleichend wurde Material von *V. epipsila* und *V. xfenica* aus anderen Herkunftsgebieten durch SR in der Natur und in Herbarien gesichtet [u. a. div. Herkünfte aus N-Europa, dem Baltikum, NW-Russland, aus NE & SW-Polen (B); aus NE-Polen/Region Białowieża, 2011, S. RÄTZEL (Herb. Rätzel); Russland (Ferner Osten)/Region Primorje, Sichote Alin, 2013, W. WIEHLE & S. RÄTZEL, det. S. Rätzel (Herb. Rätzel)], um die Vorbestimmungen nach rein morphologischen Merkmalen breiter abzusichern.

Durchflusszytometrie

Wir bestimmten den DNA-Gehalt mit Durchflusszytometrie unter Verwendung frischer

Laubblätter. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert und die Zellkerne mit TrisMgCl₂-Puffer (PFOSSER & al. 1995, modifiziert mit 10 g/l Polyvinylpyrrolidon und 10 mM Natriummetabisulfit) und RNase A (20 mg/ml) extrahiert. Die Kerne wurden anschließend mit Propidiumiodid-Färbelösung (20 µg/ml in HPLC-grade Wasser) gefärbt. Nach der Färbung wurden die Probensuspensionen wegen der hohen Viskosität zusätzlich mit Watte aus reinen Baumwollfasern filtriert (CIRES & al. 2011). Die Messungen wurden mit dem CyFlow Ploidy Analyser (Partec, Deutschland) durchgeführt, wobei die Fluoreszenz mittels YAG-Laser bei 532 nm mit einem *Gain* von 250–350 V gemessen und für mindestens drei Blätter pro Probe wiederholt wurde. Die Analyse der Rohdaten wurde mit der Software Cyflogic v. 1.2.1 (Cyflo, Finnland) durchgeführt. Der 2C-Genomgehalt wurde anhand der *Peak*-Verhältnisse der Proben gegen drei verschiedene Kalibrierungsstandards mit bekannter Genomgröße geschätzt, *Zea mays* (2C = 2,50 pg, LYSAK & DOLEŽEL 1998) für V_1, V_2, V_6, V_7, V_11, *Glycine max* (2C = 5,43 pg, DOLEŽEL & al. 1994) für V_3 und V_5 und *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg, DOLEŽEL & al. 1992) für V_4 und V_8.

Chromosomenzählungen aus Mitosemetaphasen

Um mitotisch aktives Gewebe für die Chromosomenzählung zu erhalten, wurden die Pflanzen aus der Erde in Wasser überführt und mehrere Tage kultiviert, um neues Wurzelwachstum anzuregen. Die Wurzelspitzen wurden am frühen Morgen geerntet und nach dem Protokoll von MA & al. (1996) sofort in einer Lösung aus 0,1 % Colchicin und 0,001 M 8-Hydroxychinolin bei 25 °C für 4 Stunden inkubiert. Nach der Fixierung des Gewebes für mindestens 24 Stunden bei 4 °C in Ethanol/Essigsäure (3 : 1) wurden die Wurzelspitzen 3× in Wasser, 3× in 1× Citratpuffer (Stammlösung von 10× Citratpuffer: 0,1 M Zitronensäure, 0,1 M Trinatriumcitrat, pH 4,6) gewaschen und anschließend in einer Lösung mit 0,5 % Cellulose und 0,5 % Pektolyase in 1× Citratpuffer für 30 min enzymatisch verdaut. Die verdauten Wurzelspitzen wurden vor der weiteren Verwendung erneut 10 min lang in 1× Citratpuffer gewaschen. Mikroskop-Objektträger wurden durch Quetschpräparation nach SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON (2000) hergestellt. Das Gewebe wurde auf Objektträger übertragen,

Tab. 1: Herkunft der verwendeten *Viola*-Individuen. – Origin of studied *Viola* individuals.

Nummer	Taxon (det. S. Rätzel)	Leg.	Fundort	Standort	Anmerkungen
V_1	<i>V. epipsila</i> *	April 2011, S. Rätzel (Herb. Rätzel, Herb. Ristow)	Deutschland, Brandenburg, Ostbrandenburgische Platte, Westrand der Märkischen Schweiz, Ruhlsdorfer Bruch bei Hohenstein, MTB 3449/24	Erlenbruch, auf liegendem, vermorschtem Holzstamm (Sonderstandort), über schwach zügigem Wasser	zur Sammelzeit äußerst selten u. steril (keine weiteren <i>Viola</i> spp.); LK Bot. Garten Potsdam, LK SR
V_7	<i>V. epipsila</i> *	Mai 2015, L. Mackiewicz, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Polen, Województwo warmińsko-masurskie (Woiwodschaft Ermland-Masuren), Działdowo (bei Burkat)	Mesotrophe, extensiv genutzte Moorwiese	LK SR
V_4	<i>V. xfennica</i> *	Mai 2015, L. Mackiewicz, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Polen, Województwo warmińsko-masurskie (Woiwodschaft Ermland-Masuren), Działdowo (bei Burkat)	Fahrspur eines Waldweges im Niedermoorgebiet	habituell <i>V. palustris</i> ähnlich; LK SR
V_6	<i>V. xfennica</i> *	April 2012, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Deutschland, Mecklenburg-Vorpommern Parchim-Meyenburger Sandflächen, Slater Moor, MTB 2537/33	Artenreicher Erlenbruch mit vereinzelt Ruderalisierungszeigern, „zügiges“ Wasser	morphologisch intermediär zwischen den Elternarten, aber am Fundort reiche Bestände ohne die Eltern; LK SR
V_11	<i>V. xfennica</i> *	Mai 2016, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Deutschland, Brandenburg, Ostbrandenburgische Platte, Gumnitz, MTB 3450/43	mesotropher Erlen-Birkenbruch, kaum gestört, auf liegendem, mulmig-vermorschtem Holz, an Baumbasen, auf Bulten, über zügigem Wasser	habituell <i>V. palustris</i> genähert; im Gebiet mit <i>V. palustris</i> , mehrfach, aber selten; LK SR
V_3	<i>V. palustris</i>	April & Juli 2016, S. Rätzel (GLM-51084, Herb. Rätzel)	Deutschland, Sachsen, Oberlausitzer Heide- und Seengebiet, FFH-Gebiet „Doras Ruh“, MTB 4651/42	saures <i>Sphagnum-Phragmites</i> -Moor, wenig gestört zentrale Schlenkenränder und Bulte in Randpartien	Pflanze kahl, besonders kräftige Pflanzen
V_5	<i>V. palustris</i> *	April 2016, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Deutschland, Sachsen, Oberlausitzer Heide- und Seengebiet; Niesky W, MTB 4654/44	„saure“, mesotrophe, extensiv genutzte Moorwiesen, mit <i>Juncus acutiflorus</i> , <i>Dactylorhiza fuchsii</i> , <i>Taraxacum nordstedtii</i> , <i>Sphagnum</i> sp. u. a., zentrale Schlenkenränder und Bulte in Randpartien	Pflanze kahl
V_8	<i>V. palustris</i> *	Juli 2011, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Deutschland, Brandenburg, Ostbrandenburgisches Heide- und Seengebiet, Mölln-See (Lieberoser Heide), MTB 4051/13	mesotrophe Schwingmoordecken, mit <i>Juncus subnodulosus</i> , <i>Sphagnum teres</i> , <i>Hamatocaulis vernicosus</i> u. a. in gutem Erhaltungszustand, an Bulten im W-Teil	Pflanze kahl, auch in Kultur auffällig kleinwüchsig bleibend; LK SR
V_2	<i>V. palustris</i> subsp. <i>pubifolia</i> * ¹	Sept. 2012, S. Rätzel (Herb. Rätzel)	Deutschland, Brandenburg, Ostbrandenburgisches Heide- und Seengebiet, Schlaubegebiet und Lieberoser Heide, Dämmchen-Moor; MTB 3752/34	Erlenbruchrand, mit zügigem Wasser, wenig gestört Bulte und basal an Erlen	Pflanze ± behaart, zerstreut, unweit auch die kahle (typische) Form; LK SR

* Pflanzenmaterial aus Weiterkultur. LK = Lebendkultur, Stand Dezember 2021). – *cultivated plant material. LK = living culture, as of December 2021)

¹ Dieses Exemplar kann morphologisch zu *V. palustris* subsp. *pubifolia* gestellt werden – ein infraspezifisches Taxon, das allerdings in der deutschen Standardliste nicht geführt wird (BUTTLER & al. 2018).

in einem Tropfen 60-%iger Essigsäure zerkleinert und gequetscht, bevor die Objektträger für 20 s in flüssigen Stickstoff getaucht wurden und das Deckglas entfernt wurde. Die Objektträger wurden dann kurz in Ethanol/Essigsäure (3 : 1) und Ethanol/Methanol (1 : 1) getaucht, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Wir verwendeten DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) zur Chromosomenfärbung und untersuchten die Präparate mit einem Nikon ECLIPSE Ci Mikroskop, das mit einer Nikon DS-Qi2 Kamera (Nikon, Deutschland) ausgestattet war. Die Bilder der Mitosemetaphasen wurden mit NIS-Elements BR (v 4.50, Nikon, Deutschland) aufgenommen und Farbe, Kontrast und Helligkeit in GIMP v. 2.10.24 optimiert.

Sequenzierung der Plastiden-DNA (cpDNA)

Die genomische DNA wurde aus mit Silicagel getrockneten Blättern und Stängeln mit der ATMAB-Methode nach DUMOLIN & al. (1995) extrahiert. Die Amplifikation des Plastidenmarkers *trnL-trnF* intergenic spacer erfolgte in 20 µl Reaktionslösung, die aus 2,5 µl Reaktionspuffer S (Peqlab, Deutschland), 0,25 mM dNTPs, 3,125 mM MgCl₂, 1 µl Dimethylsulfoxid, 0,5 U *Taq*-Polymerase (Peqlab), je 10 mM des Vorwärts- (*trnL-c*) und Rückwärtsprimers (*trnF-f*) (TABERLET & al. 1991) und ~50 ng Proben-DNA bestand. Die PCR-Zyklen waren 94 °C für 300 s, 35 Zyklen von 94 °C für 60 s, 51 °C für 60 s, 72 °C für 120 s; und 72 °C für 180 s. Die Sequenzierung der PCR-Produkte

wurde nach der Sanger-Kettenabbruchmethode in einem ABI3730 Sequenzierautomaten (Life Technology, Deutschland) am Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrum in Frankfurt/Main durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit dem BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 (HALL 1999) analysiert, wobei vier weitere Sequenzen zum Vergleich aus der NCBI GenBank entnommen wurden (Akzessionen: JF767184, JF767185, JF767186 und JF767187). Ein TCS-Netzwerk (Haplotypennetzwerk) (CLEMENT & al. 2000) wurde mit Hilfe von PopART (LEIGH & BRYANT 2015) erstellt.

3. Ergebnisse

Genomgröße und Chromosomenzahlen

Die gemessene Genomgröße von *V. epipsila* reichte von 2,65 bis 2,72 pg. Die Werte für *V. palustris* (einschließlich *V. palustris* subsp. *pubifolia*) reichten von 4,19 bis 4,49 pg, die Werte der Hybriden lagen zwischen beiden Elternarten mit 3,25 bis 3,47 pg (Tab. 2).

In acht von neun Pflanzen konnten Chromosomen gezählt werden. Individuen von *V. epipsila* enthielten 24 Chromosomen, für *V. palustris* inkl. subsp. *pubifolia* wurden 48 Chromosomen gezählt und die Individuen der hybridogenen *V. xfennica* hatten mitotische Metaphasen mit 36 Chromosomen (Abb. 2). Die entsprechende Ploidiestufe wurde aus dem Verhältnis der

Tab. 2: Genomgröße (2C), Ploidiestufe und Anzahl der Chromosomen der untersuchten Proben. – Genome size (2C), ploidy level and number of chromosomes of studied samples. STABW = Standardabweichung/standard deviation.

Nummer	Art	2C DNA-Gehalt (pg ± STABW)	Anzahl der gezählten Chromosomen	Abgeleitete Ploidiestufe	Status
V_1	<i>V. epipsila</i>	2,65 ± 0,13	24	4x	Elter
V_7	<i>V. epipsila</i>	2,72 ± 0,11	24	4x	Elter
V_4	<i>V. xfennica</i>	3,29 ± 0,07	36	6x	♀ <i>V. epipsila</i> × ♂ <i>V. palustris</i>
V_6	<i>V. xfennica</i>	3,47 ± 0,06	–	6x	♀ <i>V. epipsila</i> × ♂ <i>V. palustris</i>
V_11	<i>V. xfennica</i>	3,25 ± 0,04	36	6x	♀ <i>V. epipsila</i> × ♂ <i>V. palustris</i>
V_3	<i>V. palustris</i>	4,49 ± 0,18	48	8x	Elter
V_5	<i>V. palustris</i>	4,38 ± 0,09	48	8x	Elter
V_8	<i>V. palustris</i>	4,19 ± 0,19	48	8x	Elter
V_2	<i>V. palustris</i> subsp. <i>pubifolia</i>	4,33 ± 0,10	48	8x	Elter

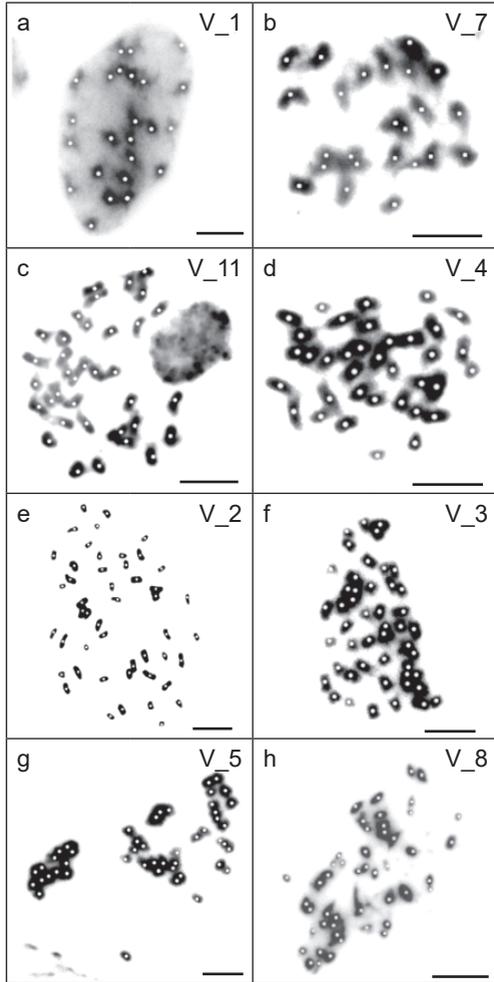


Abb. 2: Mitotische Metaphasen von *Viola* spp., gefärbt mit DAPI. a, b *V. epipsila* ($2n = 4x = 24$); c, d *V. x fennica* ($2n = 6x = 36$); e *V. palustris* subsp. *pubifolia* ($2n = 8x = 48$) und f–h *V. palustris* ($2n = 8x = 48$). Chromosomen sind mit weißen Punkten markiert. Maßstab: $10\ \mu\text{m}$. Fotos: A. Smolka – Mitotic metaphases of *Viola* spp. stained with DAPI. a, b *V. epipsila* ($2n = 4x = 24$); c, d *V. x fennica* ($2n = 6x = 36$); e *V. palustris* subsp. *pubifolia* ($2n = 8x = 48$) and f–h *V. palustris* ($2n = 8x = 48$). Chromosomes are marked with white dots. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

Genomgrößen zwischen Art und Literaturdaten und eigenen Chromosomenzählungen abgeleitet, basierend auf einer Chromosomenbasiszahl von $x = 6$. So ermittelten wir einen Ploidiegrad von $2n = 4x = 24$ für *V. epipsila*, $2n = 6x = 36$ für *V. x fennica* und $2n = 8x = 48$ für *V. palustris*.

Sequenzen der Plastiden-DNA

Aus den Sequenzen der Proben und GenBankdaten wurde ein 848 bp langes Alignment erstellt. Die hier erstellten Sequenzen sind unter den Akzessionsnummern BankIt2528335 MS_V1_cf OL802910 – BankIt2528335 MS_V11_cf OL802917 in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegt. Die Sequenz des *trnL-trnF intergenic spacers* war für alle Exemplare von *V. epipsila*, einschließlich der drei Sequenzen von *V. epipsila* aus der GenBank, und der Hybride *V. x fennica* identisch, während sich die Sequenzen von *V. palustris* und *V. palustris* subsp. *pubifolia* von den übrigen Proben durch Substitutionen in 5 Positionen unterschieden (Tab. 3). Auch das Haplotypennetzwerk verdeutlicht, dass *V. epipsila* und *V. x fennica* sich einen Chloroplastenhaplotypen teilen, der sich von *V. palustris* unterscheidet (Abb. 3). *V. epipsila* wurde daher als mütterlicher Elter für alle Hybridproben bestimmt.

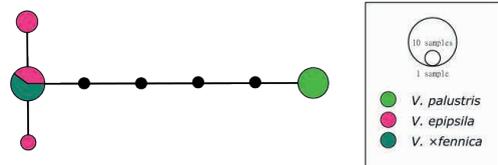


Abb. 3: Haplotypennetzwerk basierend auf dem Alignment des *trnL-trnF intergenic spacer* von 12 Sequenzen. Farbige Kreise entsprechen beobachteten Haplotypen, kleine schwarze Kreise hypothetischen Haplotypen in einzelnen Mutationsschritten. – Haplotype network based on the alignment of the *trnL-trnF intergenic spacer* of 12 sequences. Coloured circles correspond to observed haplotypes, small black circles to hypothetical haplotypes in single mutation steps.

Tab. 3: Variable Positionen im 848 bp langen Alignment des *trnL-trnF intergenic spacer*. Relevante Positionen für die Unterscheidung der Taxa sind fett formatiert. – Variable positions in the 848 bp alignment of the *trnL-trnF intergenic spacer*. Relevant positions for differentiation of taxa in bold.

Akzessionsnummer aus GenBank	Probennummer	Art	variable Positionen im Alignment									
			8	14	77	78	152	552	557	563	708	834
OL802910	V_1	<i>V. epipsila</i>	-	T	A	A	G	T	A	C	G	G
OL802915	V_7	<i>V. epipsila</i>	A	T	A	A	G	T	A	C	G	C
JF767184.1	-	<i>V. epipsila</i> subsp. <i>epipsila</i>	A	T	A	A	G	T	A	C	G	G
JF767185.1	-	<i>V. epipsila</i> subsp. <i>repens</i>	A	T	-	-	G	T	A	C	T	G
JF767186.1	-	<i>V. epipsila</i> subsp. <i>repens</i>	A	T	-	-	G	T	A	C	T	G
OL802913	V_4	<i>V. xfennica</i>	A	T	A	A	G	T	A	C	G	G
OL802914	V_6	<i>V. xfennica</i>	-	T	A	A	G	T	A	C	G	G
OL802917	V_11	<i>V. xfennica</i>	-	T	A	A	G	T	A	C	G	G
OL802912	V_3	<i>V. palustris</i>	A	G	-	-	T	G	C	G	G	G
OL802916	V_8	<i>V. palustris</i>	A	G	-	-	T	G	C	G	G	G
JF767187.1	-	<i>V. palustris</i>	A	G	-	-	T	G	C	G	G	G
OL802911	V_2	<i>V. palustris</i> subsp. <i>pubifolia</i>	-	G	-	-	T	G	C	G	G	G

4. Diskussion

Die Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen stimmen mit den bisher in der Literatur beschriebenen Chromosomenzahlen und Genomgrößen überein (VALENTINE & al. 1968, GAMS 1975, KUTA 1989a, ŽABICKA & al. 2020) und korrespondieren mit den morphologisch basierten Bestimmungsergebnissen. Insgesamt wurden zwei Individuen von *V. epipsila* ($2n = 24$), drei Individuen der Hybride *V. xfennica* ($2n = 36$) und vier Individuen von *V. palustris* ($2n = 48$) identifiziert. *V. epipsila* ist der mütterliche Elter aller drei Hybriden, was auch den Ergebnissen von ŽABICKA & al. (2020) entspricht. Dieses Resultat stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Hybridisierungsrichtung oftmals von der Häufigkeit der Elterarten bestimmt wird, sodass die seltenere Elternart oft den mütterlichen Elter bildet (BURGESS & al. 2005, KELLNER & al. 2012). *V. epipsila* ist die bei weitem seltenere Art (METZING & al. 2018) und zur kurzen, überlappenden Blütezeit der chasmogamen Blüten (ŽABICKA & al. 2020) sind daher Pollen von *V. palustris* deutlich häufiger. Weiterhin scheint die intermediäre Hybride *V. xfennica* durchaus konkurrenzfähig zu sein, so kommt die Art auch ohne ihre Elternarten vor (Beobachtung SR) und vermehrt

sich an solchen Standorten vegetativ, da sie in der Regel keine fertilen Samen bildet (ŽABICKA & al. 2020). Nach Untersuchungen von SR ist es sogar stets der Fall, dass die Früchte taub sind (meist unterdrückte Fruchtbildung, sehr selten vereinzelt, meist unvollständige Fruchtbildung mit fehlenden oder tauben Samen; Abb. 1g). Teilweise können solche Populationen erhebliche Größen erreichen, was auf lange Besiedlungsdauer schließen lässt (Beobachtung in Mecklenburg-Vorpommern SR). Die vermeintlich leicht stattfindende Hybridisierung kann, neben dem Rückgang von passenden Habitaten, auch ein Grund für den Rückgang von *V. epipsila* in gemeinsamen Vorkommen beider Arten sein, da Hybriden in Deutschland aktuell sehr wahrscheinlich durch ihre starke vegetative Vermehrungsfähigkeit konkurrenzfähiger sind. Komplette Introgression von *V. palustris* in *V. epipsila* kann aber weitgehend ausgeschlossen werden, da beide Arten nach mehrjährigen Untersuchungen in Kultur und an Wildstandorten (SR, unveröffentlicht) im Vegetationsverlauf die 3–10-fache Menge fertiler Samen aus kleistogamen Blüten gegenüber Samen aus chasmogamen Blüten bilden und folglich bei der überwiegenden Masse der produzierten Samen eine hybridogene Entstehung sicher auszuschließen ist. Zudem

neigen die Pflanzen unter suboptimalen Bedingungen eher dazu, auf die Bildung chasmogamer Blüten im Frühjahr zu verzichten, statt im späteren Jahresverlauf auf die Produktion kleistogamer Blüten. Die viel größere Seltenheit und das weitgehende Aussterben von *V. epipsila* in Deutschland und weiten Teilen Mitteleuropas muss in abweichenden groß- und mikrostandörtlichen Ansprüchen begründet sein; sicher forciert durch menschliche Habitatzerstörung.

Unsere Chromosomenzählungen für *V. xfennica* deuten auf F1-Hybriden hin, hingegen konnten ŽABICKA & al. (2020) anhand von genetischen Untersuchungen neben einer Vielzahl von F1-Hybriden auch einige, wenige Rückkreuzungen in beide Richtungen ermitteln. Basierend auf den Ergebnissen unserer Chromosomenzählungen können wir Rückkreuzungen reduzierter oder nicht-reduzierter Gameten mit *V. palustris* ausschließen (erwartete $2n = 42, 60$), jedoch könnten nicht-reduzierte Gameten von *V. xfennica* mit *V. epipsila* zurückkreuzen (erwartete $2n = 48$), die wir zytologisch nicht von *V. palustris* unterscheiden können. Unsicher bleibt, wie oft solche Gameten von *V. xfennica* gebildet werden können, da die Hybriden nach ŽABICKA & al. (2020) steril sind. So bleibt auch der Hybridstatus für *V. palustris* subsp. *pubifolia* (V_2), von KUTA (1991a) aufgrund der gemeinhin stark ausgeprägten Behaarung ebenfalls als Hybride postuliert, aus unserer Sicht ungesichert. Die Sequenzen der Plastiden-DNA und die Chromosomenzahl entsprechen *V. palustris*: Die Pflanze könnte entweder eine morphologisch abweichende, \pm stark behaarte Form von *V. palustris* darstellen (so – ranglos – interpretiert in RÄTZEL 2021) oder aber eine Hybride unter Beteiligung nicht-reduzierter Pollen von *V. epipsila* sein. Letztere müsste Kern-DNA mit *V. epipsila*-typischen Segmenten enthalten. Zumindest legen die mehrfach beobachteten, jahr- und/oder jahreszeitweise teils enormen Schwankungen der Behaarungsbildung innerhalb von Populationen, teils – in Kultur gesichert – sogar an einem Individuum (SR), nahe, die Behaarung diagnostisch nicht überzubewerten und auch bei *V. palustris* eine \pm intensive Haarbildung in die Variabilität der Art einzubeziehen. Ebenso kann *V. epipsila* – wie selten beobachtet – auch (fast) kahl auftreten. Dennoch bleibt auch die genetische Unterscheidung von komplexen Hybriden beider Arten schwierig, da wahrscheinlich

auch *V. palustris* selbst eine polyploide Hybride unter Beteiligung von *V. epipsila* darstellt (KUTA 1989a, b). Die Untersuchung weiterer, auch in Deutschland nachgewiesener, derzeit systematisch niedrigrangig eingestufte und generell wenig bekannter Taxa, wie die vor allem durch relative Großblütigkeit chasmogamer Blüten auffällige *V. palustris* „f. *major* MURBECK“ (z. B. Oberlausitz (Sachsen), sumpfige Wiese südl. Wuischke, leg. 5.5.1952, W. Hempel 829 (Herb. B, sub *Viola palustris*), musste in Ermangelung von geeignetem Lebendmaterial zurückgestellt werden.

Während ŽABICKA & al. (2020) nur Individuen von *V. palustris* und *V. xfennica* in Deutschland nachweisen konnten, stellt der Nachweis von *V. epipsila*-Exemplaren in Brandenburg (V_1, Tab. 1) offenbar den einzigen rezenten Nachweis in Deutschland dar und ist gleichzeitig der Wiederfund in RISTOW & al. (2006) der in Brandenburg als ausgestorben geführten Art. Dem Erhalt des Vorkommens in Erhaltungskultur und möglichst auch am Naturstandort kommt demnach eine singuläre Rolle bei der Erhaltung der Art in Deutschland zu.

Da die beiden Arten *V. palustris* und *V. epipsila* sowie die F1-Hybride zytologisch eindeutig erkannt werden können, dienen zytologische und genetische Untersuchungsmethoden als sinnvolle Ergänzung zur morphologischen Bestimmung, da manche Individuen oder Populationen durch die hohe innerartliche Variabilität und die zusätzlich besonders starke, morphologische Plastizität der Hybride im Gelände oft nicht sicher identifizierbar sind (RÄTZEL & al. 2018, ŽABICKA & al. 2020, RÄTZEL 2021) und nicht immer eine relativ aufwendige Kultivierung möglich ist. Eine wissenschaftlich fundierte Differenzierung und Bestimmung ist aber wichtig, um gezielt Lebensräume und bedrohte Bestände zu schützen und damit Beiträge zur Sicherung von Artenvielfalt und Biodiversität auch in Deutschland leisten zu können.

5. Danksagung

Wir danken Frau K. Sliwinski (Golm bei Potsdam) für die Unterstützung und Begleitung auf mehreren Exkursionen in Deutschland und Polen, Frau K. Meier (Frankfurt a. d. Oder) sowie den Herren V. Otte (Görlitz) und W. Wiehle (Warren/Müritz) für gemeinsame, teils aufwendige

Planungen und Durchführungen von Exkursionen in Polen und im Fernen Osten (Russland), Herrn L. Mackiewicz (Berlin) für vielfältige Unterstützung *Viola* in Polen betreffend und den Herren W. Wiehle und A. Mohr (Neubrandenburg) für zahlreiche Hinweise zu Vorkommen in Mecklenburg-Vorpommern. Der Belegschaft des „Botanical Garden-Institute Vladivostok of the Far Eastern Branch, Russian Academy of Science“, besonders den Herren P. V. Krestov und V. A. Bakalin sowie Frau N. V. Labetskaya, sei für Hilfe bei einer Fernost-Exkursion und den herzlichen Empfang vor Ort ebenso freundlich gedankt. Herr A. Herrmann (LfU/Potsdam) erteilte diverse Sammel- und Sondergenehmigungen. Das Landesamt für Umwelt Brandenburg (LfU) unterstützt die Erhaltungskultur von *V. epipsila* im Botanischen Garten der Universität Potsdam. Unser Dank gilt ebenso Frau M. Schwager, Frau B. Schlitt sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrums (SBIK-F) für technische Unterstützung. Wir danken Herrn Th. Neumann und M. Gostomski vom Augustum-Annen-Gymnasium in Görlitz für die Betreuung der Besonderen Lernleistung im Fach Biologie.

6. Literatur

- BALLARD, H. E., SYTSMA, K. J. & KOWAL, R. R. 1999: Shrinking the violets: phylogenetic relationships of infrageneric groups in *Viola* (*Violaceae*) based on internal transcribed spacer DNA sequences. – *Syst. Bot.* 23: 439–458.
- BURGESS, K. S., MORGAN, M., DEVERNO, L. & HUSBAND, B. C. 2005: Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. – *Molec. Ecol.* 14: 3471–3483.
- BUTTLER, K. P., MAY, R. & METZING, D. 2018: Liste der Gefäßpflanzen Deutschlands. Florensynopse und Synonyme. – *BfN-Skripten* 519.
- CIRES, E., CUESTA, C., FERNÁNDEZ CASADO, M. A., NAVA, H. S., VAZQUEZ, V. M. & FERNÁNDEZ PRIETO, J. A. 2011: Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from species with extremely mucilaginous compounds: an example in the genus *Viola* L. (*Violaceae*). – *An. Jard. Bot. Madr.* 68: 139–154.
- CLEMENT, M., POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 2000: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – *Molec. Ecol.* 9: 1657–1659.
- DOLEŽEL, J., DOLEŽELOVÁ, M. & NOVÁK, F. J. 1994: Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). – *Biol. Pl.* 36: 351–357.
- , SGORBATI, S. & LUCRETTI, S. 1992: Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants – *Physiol. Pl. (Copenhagen)* 85: 625–631.
- DUMOLIN, S., DEMESURE, B. & PETIT, R. J. 1995: Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. – *Theor. Appl. Genet.* 91: 1253–1256.
- FUKAREK, F. & HENKER, H. 2006: Flora von Mecklenburg-Vorpommern. – Jena: Weissdorn.
- GAMS, H. 1975: *Viola* L. – p. 586–668. In HEGI, G., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* 5(1). – München: Hanser.
- HAHNE, K. 2020: Kurzbericht zu einer Exkursion zur Nachsuche von *Viola epipsila* LEDEB. am Paschensee (Landkreis Ludwigslust-Parchim) im Frühjahr 2019. – *Bot. Rundb. Mecklenburg-Vorpommern* 57: 80–82.
- HALL, T. 1999: BioEdit: an user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- KELLNER, A., RITZ, C. M. & WISSEMANN, V. 2012: Hybridization with invasive *Rosa rugosa* threatens the genetic integrity of native *Rosa mollis*. – *Bot. J. Linn. Soc.* 170: 472–484.
- KUTA, E. 1989a: Biosystematic studies on the genus *Viola* L. section *Plagiostigma* GODR. 1. karyological analysis of *Viola epipsila* LEDEB., *Viola palustris* L. and their hybrids from Poland. – *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 31: 29–44.
- 1989b: Biosystematic studies on the genus *Viola* L. section *Plagiostigma* GODR. 2. embryological analysis of *Viola epipsila* LEDEB., *Viola palustris* L. and their hybrids from Poland. – *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 31: 45–62.
- 1991: *Viola epipsila* LEDEB., a vanishing species in Poland. – *Ber. Geobot. Inst. Eidgenöss. Tech. Hochsch., Stift. Rübel* 106: 257–265.

- LEIGH, J. W. & BRYANT, D. M. 2015: POPART: full-feature software for haplotype network construction. – *Methods Ecol. Evol.* 16: 1110–1116.
- LYSAK, M. A. & DOLEZEL, J. 1998: Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). – *Caryologia* 51: 123–132.
- MA, Y., ISLAM-FARIDI, N., CRANE, C. F., STELLY, D. M., PRICE, H. J. & BYRNE, D. H. 1996: A new procedure to prepare slides of metaphase chromosomes of roses. – *Hortscience* 31: 855–856.
- MARCUSSEN, T., BALLARD, H. E., DANIELKA, J., NICOLA, M. V., WATSON, J. M. & FLORES, A. R. 2021: Preliminary checklist of accepted *Viola* species (in total 654). Version November 2021. – Work paper.
- & BORGES, L. 2000: Allozymic variation and relationships within *Viola* subsection *Viola* (*Violaceae*). – *Pl. Syst. Evol.* 223: 29–57.
- , HEIER, L., BRYSTING, A. K., OXELMAN, B. & JAKOBSEN, K. S. 2015: From gene trees to a dated allopolyploid network: insights from the angiosperm genus *Viola* (*Violaceae*). – *Syst. Biol.* 64: 84–101.
- METZING, D., GARVE, E., MATZKE-HAJEK, G., ADLER, J., BLEEKER, W., BREUNIG, T., CASPARI, S., DUNKEL, F. G., FRITSCH, R., GOTTSCHLICH, G., GREGOR, T., HAND, R., HAUCK, M., KORSCH, H., MEIEROTT, L., MEYER, N., RENKER, C., ROMAHN, K., SCHULZ, D., TÄUBER, T., UHLEMANN, I., WELK, E., VAN DE WEYER, K., WÖRZ, A., ZAHLHEIMER, W., ZEHM, A. & ZIMMERMANN, F. 2018: Rote Liste und Gesamtartenliste der Farn- und Blütenpflanzen (*Tracheophyta*) Deutschlands. – *Naturschutz Biol. Vielfalt* 70(7): 13–358.
- MEUSEL, H., JÄGER, E., RAUSCHERT, S. & WEINERT, E. (ed.) 1978. *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora 2*. – Jena: G. Fischer.
- NADOT, S., BALLARD, H. E., CREACH, J. B. & DAJOZ, I. 2000: The evolution of pollen heteromorphism in *Viola*: A phylogenetic approach. – *Pl. Syst. Evol.* 223: 155–171.
- NETPHYD & BFN (ed.) 2013: *Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands*. – Münster: Landwirtschaftsverlag.
- NYLANDER, F. 1843: *Spicilegium plantarum Fennicarum I.* – Helsingforsiae: Frenckelliana.
- PFOSSER, M., AMON, A., LELLEY, T. & HEBERLE-BORS, E. 1995: Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. – *Cytometry Part B* 21: 387–393.
- RÄTZEL, S., RISTOW, M. & KUMMER, V. (ed.) 2018: *Neuigkeiten zu den Farn- und Samenpflanzen von Berlin und Brandenburg I*. *Verh. Bot. Ver. Berlin Brandenburg* 150: 119–237.
- 2021: *Viola* L. p. 466–475. In MÜLLER, F., RITZ, C. M., WELK, E. & WESCHE, K. (ed.) *Rothmaler Exkursionsflora von Deutschland*. – Heidelberg: Springer Spektrum.
- RISTOW, M., HERRMANN, A., ILLIG, H., KLEMM, G., KUMMER, V., KLÄGE, H.-C., MACHATZI, B., RÄTZEL, S., SCHWARZ, R. & ZIMMERMANN, F. 2006: Rote Liste der etablierten Gefäßpflanzen Brandenburgs. – *Natursch. Landschaftspf. Brandenburg* 15: 70–80.
- ROHMAN, K. 2021: Die Farn- und Blütenpflanzen Schleswig-Holsteins. Rote Liste. – Flintbek: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein.
- SCHWARZACHER, T. & HESLOP-HARRISON, P. 2000: *Practical in situ hybridization*. – Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991: Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Pl. Molec. Biol.* 17: 1105–1109.
- VALENTINE, D. H., MERXMÜLLER, H. & SCHMIDT, A. 1968: *Viola* L. – p. 270–282. In: TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., MOORE, D. M., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M. & WEBB, D. A. (ed.) *Flora Europaea 2*. – Cambridge, University.
- VAN DEN HOF, K. 2009: Polyploidy in *Viola* L. – *Gorteria* 33: 149–155.
- ŽABICKA, J., MIGDALEK, G., SŁOMKA, A., SLIWINSKA, E., MACKIEWICZ, L., KECZYŃSKI, A. & KUTA, E. 2020: Interspecific hybridization and introgression influence biodiversity – based on genetic diversity of Central European *Viola epipsila*-*V. palustris* complex. – *Diversity* 12: 321 [23 p.].