

Diversität Hessischer Orchideen, ihre künstliche Anzucht, Kultur und Wiederausbringung.

(DivOrch)



Maßnahmenleiter: Dr. Christina M. Müller; AG Spezielle Botanik
Justus-Liebig-Universität Giessen; Heinrich-Buff-Ring 38; D- 35392 Giessen
Email: Christina.M.Mueller@bot1.bio.uni-giessen.de

Beteiligte: Frau Kardelen Çilgin
Frau Julia Metzsch
Laufzeit: 01.10.2022 - 31.12.2025

Abschlussbericht Projekt DivOrch, gefördert vom HLNUG

Zusammenfassung

Die Biodiversität ist durch verschiedene Faktoren wie Landnutzungsänderungen, Habitatfragmentierung und den Klimawandel bedroht. Besonders die hier heimischen Orchideenpopulationen sind auf kleinen, voneinander isolierten Standorten zu finden und weisen seit Jahren einen stetigen Rückgang auf. Neben den klassischen, abiotischen und biotischen Einflussfaktoren stellt die genetische Diversität ein wichtiges Maß zur Bewertung der Populationen dar. Die genetische Diversität unserer heimischen Orchideen zu erfassen ist Ziel dieser Untersuchung. Weiterhin sollen zur Unterstützung der Orchideenpopulationen Anzucht- und Kulturversuche durchgeführt werden und die angezogenen Individuen an ihren Ursprungsort ausgebracht werden. In dieser Arbeit werden die hessischen Populationen von sechs heimischen Orchideenarten *Anacamptis morio*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Herminium monorchis*, *Neotinea ustulata* und *Spiranthes spiralis* mittels der populationsgenetischen Methoden Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) und Start Codon Targeted (SCoT) untersucht. Es zeigte sich, dass der Großteil der genetischen Varianz innerhalb der untersuchten Populationen zu finden ist und bei den meisten Arten eine moderate genetische Differenzierung vorliegt. Die Werte der genetischen Diversität lagen in den Populationen zwischen $H_j = 0,073$ und $H_j = 0,343$. Trotz der Isolation der Populationen voneinander und einem stetigen Rückgang sowohl der Populationen selbst, als auch ihrer Anzahl an Individuen innerhalb der Populationen, liegen die H_j -Werte über den Erwartungen. Eine genetische Abgrenzung zwischen Populationen trat nur teilweise auf, was auf einen genetischen Austausch hindeutet, der wahrscheinlich in der Vergangenheit zu finden ist. Erfolgreiche Keimungen waren bei *A. morio*, *D. majalis*, *C. calceolus* und *S. spiranthes* zu beobachten, bei *H. monorchis* konnten nur wenig Individuen erfolgreich keimen, während bei *N. ustulata* nur ein Protokorm zu beobachten war.

Inhaltsverzeichnis

Abschlussbericht Projekt DivOrch, gefördert vom HLNUG	2
1. Einleitung (Fragestellung und Stand der Forschung)	5
2. Abweichungen gegenüber der Maßnahmenbeschreibung	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Sammlung Pflanzenmaterial:	9
3.2 Populationsgenetische Analyse:	11
3.2.1 Statistische Auswertung zur populationsgenetischen Analyse:	12
3.3 Kulturversuche:	12
3.3.1 Statistische Auswertung zu den Kulturversuchen:	15
4. Ergebnisse	15
4.1 <i>Anacamptis morio</i> :	15
4.1.1 Populationsgenetische Analyse	15
4.1.2. Kulturversuche	17
4.2 <i>Cypripedium calceolus</i> :	17
4.2.1 Populationsgenetische Untersuchung	17
4.2.2 Kulturversuche	18
4.3 <i>Dactylorhiza majalis</i> :	20
4.3.1 Genetische Diversität	20
4.3.2 Populations Struktur und Differenzierung	21
4.3.3 Kulturversuche	23
4.4 <i>Herminium monorchis</i> :	24
4.4.1 Populationsgenetische Untersuchung	24
4.4.2 Kulturversuche	26
4.5 <i>Neotinea ustulata</i> :	27
4.5.1 Populationsgenetische Untersuchung	27
4.5.2 Kulturversuche	28
4.6 <i>Spiranthes spiralis</i> :	30
4.6.1 Populationsgenetische Untersuchung	30
4.6.2 Kulturversuche	32
5. Diskussion und Bewertung der Ergebnisse	34
5.1 Populationsgenetische Analyse	34
5.2 Keimungs- und Anzuchtversuche	38
Fazit	43
Aus dem Projekt entstandene Publikationen	44

<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>45</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>50</u>

1. Einleitung (Fragestellung und Stand der Forschung)

Die verstärkte Landnutzungsänderung der letzten Jahrzehnte, die anhaltende Habitatfragmentierung, sowie die immer größer werdenden Belastungen durch den Klimawandel, stellen für die heimische Artenvielfalt eine immer größere Gefährdung dar. Dies resultiert in einem Rückgang der Biodiversität und kann im schlimmsten Fall das Aussterben von Arten begünstigen. Trotz der Bemühungen des Naturschutzes, hat sich die Gefährdungslage vieler Arten nicht verbessert (HLNUG 2019). Gerade in der heimischen Flora haben viele gefährdete und bedrohte Arten Verluste zu verzeichnen. Auch in Hessen ist ein Rückgang der pflanzlichen Vielfalt spürbar. So heißt es in der hessischen Biodiversitätsstrategie (3.6.2013/ aktualisiert 1.2.2016), dass in den letzten 230 Jahren 140 Pflanzenarten ausgestorben sind. Die Hessische Biodiversitätsstrategie wurde 2013 mit dem Ziel verabschiedet, die biologische Vielfalt zu erhalten. Unter dem Begriff biologische Vielfalt, wurde auf der Konferenz der Vereinten Nationen für Umwelt und Entwicklung, im Übereinkommen zur biologischen Vielfalt (Secretariat of the Convention on Biological Diversity (SCBD) 2010) festgehalten, dass biologische Vielfalt neben der Vielfalt der Arten, auch die Vielfalt der Ökosysteme und die genetische Vielfalt Teile des Begriffs Biodiversität darstellen und dementsprechend zu schützen sind.

So sind Orchideen von einem stillen Aussterben bedroht; mehr als die Hälfte aller auf der Roten Liste der IUCN aufgeführten gefährdeten Pflanzenarten sind Orchideen (IUCN 2026). Dabei gehören Orchideen mit über 27 000 Arten zur zweitgrößten Familie der Angiospermen und bis auf die Arktis und Antarktis sind sie weltweit verbreitet.

Der Schwerpunkt ihres Vorkommens liegt in den Biodiversitätshotspots der Tropen, doch auch in Deutschland sind etwa 60 Orchideenarten heimisch (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005, S. 71). Dass es in Deutschland heimische Orchideen gibt, ist in der breiten Öffentlichkeit nicht präsent. Alle hier vorkommenden Orchideen sind bedroht und durch das Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) streng geschützt. In Hessen stehen sie alle auf der Roten Liste der Farn- und Blütenpflanzen (HLNUG 2019). Aufgrund ihrer Seltenheit finden sich Orchideenvorkommen häufig in kleinen, voneinander isolierten Populationen. Aus populationsgenetischer Sicht kann dies einen Risikofaktor darstellen.

Damit eine Population überleben kann, sind nicht nur die äußeren Einflüsse wie Klima, Boden, Licht, Temperatur und Konkurrenz von Interesse, sondern auch populationsgenetische Faktoren wie die genetische Variabilität (Stange et al. 2021). Die genetische Variabilität ist ein wichtiger Faktor, der Aussagen über den Zustand einer Population, einer Art, in einem bestimmten Gebiet geben kann. Ist eine große genetische Variabilität in einer Population vorhanden, ist diese anpassungsfähiger gegenüber sich ändernden (Umwelt-)Bedingungen und die Wahrscheinlichkeit für das Überleben dieser Population steigt. Eine Population mit einer geringen genetischen Variabilität hat nicht das Potenzial auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren und die Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Population sinkt. Hierbei spielt die Populationsgröße eine wichtige Rolle, ebenso wie der Grad der Isolierung (Ellstrand und Elam 1993; Reed und Frankham 2003). Große Populationen haben durch mehr Individuen eine höhere Überlebenschance als kleine Populationen. Ist in kleinen Populationen dann noch eine geringe genetische Variabilität vorhanden, steigt die Wahrscheinlichkeit für das baldige Verschwinden dieser Populationen. Der Grad der Isolierung hat hierbei oft Einfluss auf die genetische Variabilität. Sind Populationen stark voneinander isoliert sinkt die genetische Variabilität häufig, da ein genetischer Austausch über Isolationsbarrieren hinweg nicht oder nur schwer

möglich ist (Ellstrand und Elam 1993). Dieser notwendige genetische Austausch zwischen Populationen wird als Genfluss bezeichnet.

Neben der Anpassungsfähigkeit ist die genetische Variabilität ein Faktor, der auch in der Fitness der Populationen sichtbar werden kann (Reed und Frankham 2003). So sind genetisch variable Populationen häufig fitter als Populationen, die eine geringe genetische Variabilität aufweisen. Oft sind Individuen solcher Populationen größer und kräftiger, während Populationen von genetisch nicht variablen Populationen kleiner sind. Auch im Fruchtansatz und der Samenanzahl lassen sich häufig Unterschiede zwischen solchen Populationen feststellen. Populationen mit einer engen Verwandtschaft und dementsprechend einer geringen Variabilität, können oft nur wenig fertiles Samenmaterial hervorbringen, aus denen auch nur schwierig vitale Pflanzen heranwachsen können.

Orchideen sind krautige, mehrjährige Pflanzen, die mitunter sehr langlebig sein können. Modellrechnungen an *Cypripedium calceolus* zeigen eine Lebensdauer von 150 bis 300 Jahren (Nicolè et al. 2005), und an *Spiranthes spiralis* eine Lebensdauer von bis zu 50 Jahren (Wells und Synge 1981; Jacquemyn und Hutchings 2010). Weiterhin haben Orchideen einen speziellen Lebenszyklus. Neben den oben genannten Einflussfaktoren schafft auch dieser spezielle Lebenszyklus einen Umstand, der zur Gefährdung dieser Arten beiträgt. Die Blütenmorphologie ist oftmals so gestaltet, dass nur spezielle Insekten als Bestäuber in Frage kommen, da eine Co-Evolution mit diesen existiert. Fehlen diese Bestäuber, können sich die Pflanzen nicht oder nur sehr schlecht vermehren, da eine Selbstbestäubung oft nicht möglich ist oder einen negativen Einfluss auf das Samenmaterial und die Fitness der Pflanzen haben kann (Rasmussen 1995).

Orchideen bilden Kapseln aus, in denen je nach Art mehreren Tausend, bis Millionen Staubfeiner Samen enthalten sind (Barthlott et al. 2014). Des Weiteren brauchen die Samen zum Keimen in der Natur einen Mykorrhizapartner. Orchideensamen haben kein Endosperm, das sie mit Nährstoffen versorgt. Durch eine Symbiose mit einem artspezifischen Pilz, wird dies ausgeglichen, da der Embryo über den Pilz mit den entsprechenden Nährstoffen versorgt wird (Harzli und Özden Kümpe 2025). Keimen Orchideensamen, läuft dies in einem bestimmten Schema ab. Zunächst beginnt der Embryo zu quellen, schwillt an, wodurch die Testa aufgebrochen wird, und bildet das Protokorm. Das Protokormstadium, ist ein den Orchideen eigenes Stadium. Hier nimmt die Zellzahl zu und die ersten Differenzierungen beginnen. So bilden sich in diesem Stadium die ersten Rhizoide aus, ebenso wie das Protomeristem. Das Protokorm vergrößert sich, bis sich das erste grüne Blatt bildet. Allein dieser Vorgang kann bei Orchideen mehrere Jahre dauern. Bis der Keimling zu einer reproduktiven adulten Pflanze herangewachsen ist, muss er zuerst das juvenile Stadium und anschließend das vegetative adulte Stadium durchlaufen werden. Auch dieser Vorgang kann nochmal mehrere Jahre dauern (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005, S. 68), so dauert es bei *S. spiranthis* nach Wells und Synge (1981) bis zu 15 Jahre. Die Zeit, die ein Orchideensamen braucht, um zu einer gesunden und reproduktiven Pflanze heranzuwachsen ist von Art zu Art unterschiedlich und scheint in der Natur länger zu dauern als bei In-Vitro Anzuchten. Unter einer asymbiotischen Anzucht konnte *S. spiralis* bereits nach 5 Jahren zum Blühen gebracht werden (Wells & Kretz 1986 aus Jacquemyn und Hutchings 2010). Wie gut in Kultur angezogene Pflanzen an einem Wildstandort dauerhaft wieder etabliert werden können, hängt von verschiedenen Faktoren ab und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Im Orchideenschutz ist das Unterstützen von Populationen durch im

Gewächshaus angezogene Individuen keine unbekannte Praxis. Bereits im letzten Jahrhundert wurden Versuche zur künstlichen Anzucht von Orchideen durchgeführt (Arditti 1984). In den 1920er Jahren entwickelte Knudson (1922) eine Möglichkeit terrestrische Orchideen in Abwesenheit des für die Keimung benötigten Pilzes zu kultivieren. Die Anforderungen einer erfolgreichen Keimung sind artspezifisch und können innerhalb von Familie, Gattung und von Art zu Art variieren wodurch eine Übertragung nicht immer möglich ist, sodass terrestrische Orchideen als schwierig gelten (Arditti et al. 1981).

Bei der Orchideenanzucht unterscheidet man zwei grundlegende Methoden, zum einen die symbiotische Methode, bei der die Orchideen mit einem Pilz zur Keimung gebracht werden, zum anderen die asymbiotische Methode, bei der die Samen ohne Pilz kultiviert werden. Für beide Methoden ist eine sterile Umgebung essenziell und der Grad sowie die Qualität des Samenmaterials entscheidend. Je nach Art ist ein unterschiedlicher Reifegrad für die künstliche Anzucht von Vorteil. Bei einigen Samen gelingt eine Keimung mit reifem Material, bei anderen Arten ist dies nur bei einer sogenannten Grünaussaat möglich, wenn also das Samenmaterial noch nicht ausgereift ist. Neben dem Reifegrad sind auch die Vorbereitung des Samenmaterials (Dauer und Konzentration der Sterilisation), die Rezepturen für die Nährmedien und die Bedingungen während der Keimung Einflussfaktoren, die entscheidend zum Erfolg beitragen (Rasmussen 1995).

In diesem Projekt ist der populationsgenetische Zustand von sechs hessischen Orchideen untersucht worden (Abb. 1), vier von ihnen haben als Hessen-Art eine besondere Bedeutung für das Land. Die sechs untersuchten Arten sind: *Anacamptis morio* (L.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase (Hessen-Art), *Cypripedium calceolus* L. (FFH Art nach Anhang II und IV), *Dactylorhiza majalis* (Rchb) P. F. Hunt & Summerh (Art des Bundesprogramms Biologische Vielfalt), *Herminium monorchis* (L.) R. Br (Hessen-Art), *Neotinea ustulata* (L.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase (Hessen-Art) und *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. (Hessen-Art). Neben den Untersuchungen zum genetischen Zustand dieser Arten, wurden Versuche zur künstlichen Anzucht und Kultur durchgeführt. Die Wiederausbringung der kultivierten Pflanzen an ihren Naturstandorten ist das Ziel.



Abbildung 1: Die sechs untersuchten Arten in diesem Projekt, A = *Anacamptis morio*, B = *Dactylorhiza majalis*, C = *Cypripedium calceolus*, D = *Herminium monorchis*, E = *Neotinea ustulata*, F = *Spiranthes spiralis*, Fotos: B-E J. Metzsch, A, F C.M. Müller.

2. Abweichungen gegenüber der Maßnahmenbeschreibung

Cypripedium calceolus: Hier gestaltet es sich schwierig die ausgewählten molekularen Methoden (ISSR und SCoT) zeigen keine reproduzierbaren Bandenmuster die zur Auswertung herangezogen werden könnten. Daher wurde auf eine neue Methode zurück gegriffen Double Digest RADseq (dd RADSeq) (Peterson et al. 2012). Die Rohdaten liegen hier vor und werden nun bioinformatisch ausgewertet. Diese Methode wurde nicht aus den Mitteln für dieses Projekt finanziert und beinhaltet auch nicht alle Populationen, die untersucht werden sollten, da die Methode mit dieser Art erprobt werden muss.

Neotinea ustulata: Für die hier vorgesehenen Anzucht und Kulturversuche zu *N. ustulata*, sollte Samenmaterial von einem Standort entnommen werden. Aufgrund wenig Fruchtansatz gestaltete sich die Entnahme als nicht möglich. Beobachtungen der letzten Jahre (unter anderem durch Herr M. Stühler) deuteten auf einen verminderten Fruchtansatz in diesem Gebiet hin. Nach Informationen des Arbeitskreis Heimischer Orchideen (2005, S. 639) beträgt der Fruchtansatz

von *N. ustulata* nur 14%. Eine Verringerung des Fruchtansatzes könnte gravierende Folgen für die Population haben, da durch einen verminderten oder sogar ausbleibenden Fruchtansatz über Jahre, die nächste Generation an *N. ustulata* Individuen ausbliebe und die Population in ihrem jetzigen demographischen und genetischen Zustand stagniere.

In Kooperation mit der Unteren Naturschutzbehörde Gießen/Regierungspräsidium Gießen in Person von Frau Ulrike Brockerhoff/ Fr. Sunna Schwarz, konnten Bestäubungsversuche durchgeführt werden, um Kapsel- und Samenmaterial für Aussaatversuche von *N. ustulata* zu erhalten.

Ringvorlesung: Für den wissenschaftlichen Austausch in die breite Öffentlichkeit sollte ursprünglich eine Ringvorlesung zu dem Thema „Diversität Heimischer Orchideen“ im „Großen Hörsaal“ der Hermann-Hoffmann Akademie, auch bekannt als „Botanischer Hörsaal“ angeboten werden. Aufgrund einer schadhaften Stahlbetonkonstruktion an der Decke, musste der Saal aus Sicherheitsgründen im Wintersemester 2023/2024 gesperrt werden. Sowohl Lehr- als auch öffentliche Veranstaltungen konnten seitdem nicht mehr in dem Gebäude stattfinden. Als Alternative ist eine Orchideen-Ausstellung im Botanischen Garten geplant.

Auspflanzungen: nur teilweise möglich, aufgrund der langen Entwicklung aus Samen zu auspflanzfähigen Pflanzen ist es zeitlich nicht möglich gewesen zu allen vorgeschlagenen Arten Jungpflanzen in diesem engen Zeitraum zu erhalten. Dies lag auch daran das in einigen Jahren es nicht zur Samenreife kam (heiße/trockene Sommer) oder auch auf der Spenderfläche zur Samenreife schon gemäht wurde und ein Sammeln nicht mehr möglich war. Auch war die Keimung der Samen von Jahr zu Jahr sehr unterschiedlich und unsere Kulturbedingungen nicht immer passend das absterbe Ereignisse dazu geführt haben, nur wenige oder gar keine Jungpflanzen zu erzielen.

3. Material und Methoden

3.1 Sammlung Pflanzenmaterial:

Für diese Arbeit wurde Pflanzenmaterial von Naturstandorten genutzt. Mit Hilfe von Fundpunktdaten des Hessischen Landesamts für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) wurde eine Standortliste erstellt und an den entsprechenden Standorten Blattproben und Kapseln, nach den Vorgaben der artenschutzrechtlichen Ausnahmegenehmigungen, entnommen (Genehmigungsbescheid: N2 – 103 s 06 01 08/2021-07; N2 – 103 s 06 01 08/ 2023-01 / ergänzt am 20.02.2026) (Anhang Abb. A1). Das gesammelte Blattmaterial wurde zum Trocknen in Silicagel gebracht. Anschließend wurde eine DNA-Extraktion mit dem NucleoMag Plant Kit (Machery & Nagel) nach Angaben des Herstellers und mit geringfügigen Änderungen, durchgeführt. Die molekulargenetische Studie wurde mit dem Untersuchungsmaterial aus Tabelle 1 (im Anhang detailgenauere Tabelle A1) durchgeführt. Das nicht verwendete Silicamaterial wird dunkel bei Raumtemperatur in der AG-Spezielle Botanik gelagert, die DNA-Extrakte werden bei -80°C gelagert und stehen für künftige Untersuchungen zur Verfügung.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Populationen mit der jeweiligen Anzahl an Individuen der populationsgenetischen Analyse.

Art	Populationen	Individuen (gesamt)	Bemerkung
<i>Anacamptis morio</i>	10	87	
<i>Cypripedium calceolus</i>	30	159	Verwendetes Material hauptsächlich von Herr A. Opitz aus 2013 (Az. IV.2 R.28)
<i>Dactylorhiza majalis</i>	22	281	
<i>Herminium monorchis</i>	2	21	
<i>Neotinea ustulata</i>	6	33	
<i>Spiranthes spiralis</i>	5	54	

Bei der Entnahme der Kapseln wurde mit dem Geo-Naturpark Frau-Holle-Land in Person von Dr. Malte Zirpel sowie dem Regierungspräsidium Gießen in Person von Frau Ulrike Brockerhoff/ Fr. Sunna Schwarz zusammengearbeitet. Das gesammelte Kapsel- und Samenmaterial wurde vollständig für die Aussaatversuche verwendet. Eine Übersicht des Kapselmaterials ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Kapseln von *C. calceolus* wurden ca. 6 Wochen nach erfolgter Bestäubung geerntet, da dies den idealen Zeitpunkt für eine erfolgreiche Grünaussaat darstellt (Wagner und Hansel 1994). Die 2025 geernteten Kapseln wurden in Selbst- und Fremdbestäubte Kapseln unterteilt.

Um Kapselmaterial von *N. ustulata* für Aussaatversuche zu gewinnen, wurde mit Genehmigung der Behörden Bestäubungen der Pflanzen auf einer Teilfläche (Teilfläche 1) des Gebietes Hoffeld bei Eisemroth durchgeführt (Anhang Abb. A2). Hierbei wurden die vorhandenen Individuen in zwei Gruppen, A und B, eingeteilt. Gruppe A bestand aus 5 nebeneinanderstehenden Individuen, Gruppe B aus 1-3 Individuen an fünf Punkten auf der beprobten Fläche. Alle beprobten Individuen standen in einem Abstand von 1,3 - 7 Meter voneinander entfernt. Von beiden Gruppen wurden insgesamt jeweils 20 Pollinien entnommen und auf 20 Blüten der anderen Gruppe per Hand verbracht. Insgesamt wurden 40 Einzelblüten bestäubt. Von der Hauptfläche und Teilfläche 1, konnte Samenmaterial durch natürliche Bestäubung entnommen werden.

Um den idealen Reifezeitpunkt für die Anzuchtversuche herauszufinden, wurden Kapseln von *N. ustulata* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestäubung entnommen und die Samen der verschiedenen Reifestadien auf Nährmedien ausplattiert. Entnommenes Material konnte in das Stadium frühreif, reif eingeteilt werden. Reifes und nahezu reifes Material wurden als reif zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht des beprobten Kapsel- und Samenmaterials von Naturstandorten, K = Anzahl der Kapseln insgesamt, S = Anzahl der Standorte insgesamt, BG = Botanischer Garten.

Sammel-jahr	<i>A. morio</i>	<i>C. calceolus</i>	<i>H. monorchis</i>	<i>N. ustulata</i>	<i>S. spiralis</i>	<i>D. majalis</i>
2023		1K/1S		7K	3K	1K

2024		3K/1S ¹	1 Kapseltra- gender Spross/ 1S		6K/1S	
2025	Samenmate- rial aus BG	16K/3S ²		30K/1S ³	Von 4 Indi- viduen mehrere Kapseln/1S	
Herkunft	BG Gießen (Original Würzburg)	Bühlchen, Simmels- berg, Hofbie- ber	Hofgeismar	Hoffeld bei Eisemroth	Ober- mörten, Or- tenberg	Rödgen

¹Zusammenarbeit mit Geo-Naturpark Frau-Holle-Land

²Zusammenarbeit mit Geo-Naturpark Frau-Holle-Land und Herr U. Barth

³Zusammenarbeit mit Regierungspräsidium Gießen und Herr M. Stühler

3.2 Populationsgenetische Analyse:

Die populationsgenetischen Analysen wurden mit den molekularen Methoden ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) und SCoT (Start Codon Targeted) durchgeführt. Beides sind PCR basierte Methoden, die mittels eines Primers Fragmente der genomischen DNA generieren, auf deren Unterschiede Berechnungen zur genetischen Variabilität ausgeführt werden können.

ISSR arbeitet mit einem Primer, der sich an die repetitiven DNA-Sequenzen anlagert. Es handelt sich um eine ältere Methode, die sich im Hinblick auf Orchideen als zuverlässig erwiesen hat und als kostengünstige Methode die Anforderungen des molekularen Naturschutzes erfüllt. Zudem ist sie robust und kann flexibel an Probleme angepasst werden. Je nach Art und Primer wurde das Protokoll von Dogan et al. (2010) individuell angepasst. Hierbei wurde ein 20 µl Ansatz verwendet, dieser besteht aus 1µl DNA Template (5ng/µl), 2µl 10x Puffer (dream Taq), 2µl dNTP (2mM), 0,4µl Primer (10pmol/µl), 0,3µl Dream Taq (5U/µl) und H₂O. Bei Bedarf wurden Zusätze wie Betain Mono. (5M) und BSA (10ng/µl) oder DMSO (99%) zugefügt.

Abweichungen von diesem Protokoll lagen bei *A. morio* und *C. calceolus* vor. Bei *A. morio* wurde anstelle der Dream Taq Polymerase die Platinum Taq Polymerase verwendet. Hierbei wurden 0,6µl MgCl₂ zu dem Protokoll zugefügt und nur 0,2µl der Platinum Taq Polymerase verwendet. Bei *C. calceolus* wurden zur Austestung der Primer die Konzentrationen der Bestandteile des Mastermixes verändert und zwischen der Dream Taq Polymerase und der Taq Polymerase (recombinant) gewechselt.

SCoT arbeitet ebenfalls nur mit einem Primer. Dieser lagert sich an das Start Codon ATG und den hoch konservierten Bereiche drumherum an (Collard und Mackill 2009). Auch hierbei werden unterschiedlich große Fragmente generiert, auf deren Basis man populationsgenetische Unterschiede detektieren kann. Die Methode konnte ebenfalls erfolgreich an Orchideen durchgeführt werden (Gholami et al. 2021; Tikendra et al. 2021). Je nach Art und Primer wurde das Protokoll individuell angepasst. Verwendet wurde ein 15µl Ansatz mit einem Template von 2µl DNA (5ng/µl), 1,5µl 10x Buffer, 1,5µl dNTP (2mM), 0,4µl Primer (10pmol/µl), 0,3µl Dream Taq (5U/µl) und H₂O. Bei Bedarf wurden Betain Mono. (5M) und BSA (10ng/µl) oder DMSO (99%) zugegeben.

Im Anhang Tabelle A2 und A3 sind die Arten mit den verwendeten Primern aufgeführt. Nach der Beendigung der PCR wurden 16µl des Aliquods mit 4µl SYBR® Gold (Invitrogen™) gemischt und auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 4µl des GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas- Life Science) verwendet. Die Gele liefen bei 70V für

120 – 150 min. Mittels einer Geldokumentationsstation (E-Box ©2026 Vilber) wurden die Fragmente sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.1 Statistische Auswertung zur populationsgenetischen Analyse:

Die Fragmentmuster wurden manuell in eine 0/1-Matrix übertragen, wobei 0 für die Abwesenheit eines Merkmales kodiert und 1 für die Anwesenheit eines Merkmales steht. Die Matrix wurde in Microsoft Excel erstellt und diente zur statistischen Analyse mit AFLPSurv, Version 1.0 (Vekemans 2002), um die genetische Diversität (H_j) nach (Lynch und Milligan 1994) zu berechnen, sowie die polymorphen Loci zu berechnen. GenALEX 6.51 (Peakall und Smouse 2012) wurde genutzt, um die Hauptkoordinatenanalyse (PCoA Principal Coordinates Analysis), den Mantel Test und die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) zu berechnen. Die genetische Struktur wurde mittels einer Clustering-Methode ausgewertet, um die wahrscheinlichste Anzahl von Clustern zu ermitteln. Dazu wurde der in der Software STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al. 2000) implementierte Bayes'sche Clustering-Ansatz angewendet. Zur Erkennung genetischer Cluster wurden Standardeinstellungen mit 100.000 Markov-Ketten-Monte-Carlo-Iterationen (MCMC) verwendet, mit einer Burn-in-Phase beginnend bei 10.000 und 10 Wiederholungen pro Durchlauf für jede gewählte Clusteranzahl (d. h. K = wurde entsprechend der Anzahl der beprobten Populationen je Art gewählt). Um die wahrscheinlichste K-Modus-Verteilung zu bestimmen, wurde delta K (Evanno et al. 2005) unter Verwendung von StructureSelector (Li und Liu 2018) definiert. Um den wahrscheinlichsten Cluster-Zugehörigkeitskoeffizienten in 10 Durchläufen von STRUCTURE und StructureSelector zu überprüfen, verwendeten wir CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson und Rosenberg 2007). Die entsprechenden Grafiken wurden mit DISTRUCT (Rosenberg 2004) erstellt.

3.3 Kulturversuche:

Die Kulturversuche beginnen mit der Aussaat des Samen- / Kapselmaterials. Für die Orchideenaussaaten wurde die asymbiotische Methode gewählt. Diese wurde bei Erdorchideen bereits erfolgreich durchgeführt (Malmgren und Vogler 2019). Des Weiteren ist sie im Vergleich zu symbiotischen Aussaaten mit weniger Arbeitsaufwand verbunden (Malmgren und Vogler 2019; Rasmussen 1990). Je nach Reifegrad der Samen werden unterschiedliche Verfahren zum Ausbringen angewendet. Wichtig bei beiden Verfahren ist eine sterile Arbeitsweise.

Befinden sich die Samen noch in der Kapsel wird eine sogenannte Grünaussaat durchgeführt, wobei die Kapsel zur Sterilisation in 96% unvergälltem Ethanol getaucht und abgeflammt wird. Der Vorgang wird insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wird die Kapsel vier Minuten in 2,5% NaClO desinfiziert und danach kurz in 0,1% NaClO gespült. Die verschlossenen Kapseln werden geöffnet und die Samen auf dem Aussaatmedium ausgestrichen.

Für die Methode der Samenaussaat wird reifes Samenmaterial verwendet. Je nach Art werden die Samen mit einer spezifischen Konzentration NaClO behandelt. Die Dauer dieser Bleichung kann von Art zu Art variieren (Rasmussen 1995). Die Bleichzeiten der hier behandelten Arten werden in Tabelle 3 zusammengefasst und kamen durch optische Begutachtung im laufenden Prozess zustande. Die desinfizierten Samen werden anschließend ebenfalls auf das Nährmedium ausgebracht. Die Bestandteile des Nährmediums sind in Tabelle 4 aufgeführt. Verwendet wird das Protokoll nach Malmgren und Vogler (2019), mit angepassten Veränderungen.

Tabelle 3: Übersicht der Bleichzeiten und NaClO Konzentrationen im Falle einer Samenaussaat.

	<i>A. morio</i>	<i>C. calceolus</i>	<i>D. majalis</i>	<i>H. monorchis</i>	<i>N. ustulata</i>	<i>S. spiralis</i>
NaClO [%] Lösung und dazu- gehörige Bleichzeit	1%	Grünaussaat	1% nach 37min spü- len	Grünaussaat	1% nach 12min spülen	0,5% nach 7min spü- len
				0,5% nach 20min und 47min frisch, nach 50min spülen		
				1% nach 22min und 60min frisch, nach 105min spülen	1% nach 20min spülen	0,5% nach 10min spülen
					1% nach 25min spülen	0,5% nach 20min spülen

Tabelle 4: Zusammenstellung der Nährmedien für Aussaat und Kultur mit destilliertem Wasser nach Malmgren und Vogler (2019)

	Aussaatmedium für 1600ml	Kulturmedium für 2000ml
Calciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,12g	0,15g
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	0,12g	0,15g
Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})$	0,12g	0,15g
Inositol	0,64g	80g
Sucrose	16g	20g
Micro Fe	80µl	100µl
Vitamin B-Komplex Stammlösung rot	1600µl	200µl
Vitamin B-Komplex Stammlösung gelb	1600µl	2ml
Spurenelemente (0,5g/25ml)	160µl	2ml
Aminosäurenlösung	8,64ml	10,8ml
Ananassaft (pH6)	32ml	
Kokosnuss-Wasser (direkt aus Frucht)	32ml	
Kartoffel-Extrakt (bei Bedarf)	24ml	
Agar-Agar	8g	9,75g
Aktivkohle	0,8g	2g
pH-Wert		5,8

Die ausgebrachten Samen werden entsprechend der aktuellen Temperatur im Dunkeln gelagert und regelmäßig auf eine beginnende Keimung überprüft. Über das Jahr entspricht dies im Sommer der Raumtemperatur bei ca. 21°C, im Herbst 16°C im Klimaschrank und im Winter 5°C in der Kühlung.

Befinden sich die Samen in einem ausreichend großen Protokormstadium werden diese Individuen bis zu dreimal auf ein neues Kulturmedium (Tab. 4) umgelegt. Die Orchideen werden in diesem Stadium einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und die Temperatur den

jahreszeitlichen Schwankungen angenähert. Sind die Orchideen groß genug, werden sie in Substrat bestehend aus je einem Drittel Seramis, Erde und Vermiculit getopft. Je nach Art kann das Substrat zu diesem Zeitpunkt mit einem artspezifischen Pilz angeimpft werden.

Um die Erfolgsrate der gekeimten Samen zu erfassen, wurden die Samen 2025 auf Aussaatmedium in Petrischalen ausgestrichen und ein definiertes Raster als Zählhilfe unter den Platten angebracht. Die Gesamtzahl der Samen und die Anzahl der optisch unterentwickelten Samen wurde durch Auszählen ermittelt. Eine Erfassung optisch unterentwickelter und optisch normaler Samen ist wichtig, um eine Vergleichbarkeit der Erfolgsraten zu gewährleisten.

Die Petrischalen wurden alle sieben bis zehn Tage unter der Stereolupe (Wiloskop/hund Wetzlar) begutachtet und die Entwicklungsstadien der Samen dokumentiert. In den Jahren zuvor wurden die Samen in Schraubgläser ausgesät, die keine Möglichkeit einer genauen Ermittlung der Erfolgsrate boten.

Zur Ermittlung, welche Bedingungen bei welcher Art zur Keimung beitragen, wurden bei der Protokormratenbestimmung unterschiedliche Aussaatmedien und Aussaatbedingungen untersucht und in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der Versuche zur Protokormratenerfassung 2025 an den Arten *Anacamptis morio*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Neotinea ustulata* und *Spiranthes spiralis*, P = Platte.

Art	Versuch	Anzahl der Platten
<i>A. morio</i>	Vergleich der Keimung unter Licht (natürlicher Tag/Nacht Rhythmus am Fenster) und Dunkelheit (kontinuierlich) mit Standardmedium	1 P. hell, 1 P. dunkel
<i>C. calceolus</i>	Vergleich zwischen Kapseln durch Selbst- und Fremdbestäubung mit Kartoffelmedium	6 P. selbst, 12 P. best.
<i>D. majalis</i>	Erfolgsrate der Keimung auf Standardmedium	3 P.
<i>N. ustulata</i>	Vergleich zwischen unterschiedlichen Reifegraden auf Standardmedium, eine Platte wurde ins Licht gestellt	5 P. frühreif, 16 P reif
<i>S. spiralis</i>	Vergleich der Keimung zwischen Standardmedium und Kartoffelmedium	6 P. Kartoffelmedium, 6 P. Standardmedium

Da die 6 Stadien der Keimung (Anghelescu et al. 2023; Nabieva 2021; Bektas et al. 2013; Dulić et al. 2019) optisch nicht eindeutig differenziert werden können, wurden nur die Stadien „Quellung“ und „Protokorm“ festgehalten. Als quellende Samen wurden Samen aufgenommen, die eindeutig größer als der normale ausgereifte Samen waren. Als optisch unterentwickelte Samen wurden solche Samen aufgenommen, dessen Optik nicht mit dem typischen Aussehen/Phänotyp eines ausgereiften Samens übereinstimmten, obwohl der Samen ausgereift sein müsste. Das Stadium „Protokorm“ wurde aufgenommen, wenn der gequollene Samen Rhizoide ausgebildet hat, bei Arten, die keine Rhizoide ausbilden, wie *C. calceolus*, wurde das Stadium aufgenommen, sobald das Protokorm mit bloßem Auge erkennbar war.

3.3.1 Statistische Auswertung zu den Kulturversuchen:

Um den Erfolg der Anzuchtversuche zu erfassen, wurde die Protokormrate in % erfasst. Hierbei wurde in die Protokormrate der gesamten Samenanzahl und der Protokormrate der optisch normalen Samen differenziert. Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der optisch normalen Samen ebenfalls berechnet und die errechneten Keimraten miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 *Anacamptis morio*:

Insgesamt wurden 18 ISSR Primer und 20 SCoT Primer getestet und diejenigen mit den besten Ergebnissen für die populationsgenetische Untersuchung verwendet. Für die ISSR Analyse ergaben sich 9 informative Primer (Anhang Tab. A2) mit 231 Merkmalen (Loki) und für die SCoT Analyse 7 Primer (Anhang Tab. A3) mit 175 Merkmalen bei 89 untersuchten Individuen. Insgesamt wurden 10 Populationen untersucht.

4.1.1 Populationsgenetische Analyse

Die Ergebnisse der AFLPSurv Berechnung zeigen bei der ISSR einen prozentualen Anteil polymorpher Loki von 44,6% bei Population EI bis 88,3% bei Population Wei. Die Werte der genetischen Diversität (H_j) reichen von 0,21 der Population HK bis 0,28 bei der Population EI und weisen einen Mittelwert von 0,25 auf (Tab. 6). Die Werte der SCoT Analyse zeigen einen prozentualen Anteil polymorpher Loki zwischen 54,9%, ebenfalls bei Population EI, und 100% bei Population WR. Die Werte der genetischen Diversität H_j liegen im Mittel bei 0,31 und damit höher als bei der ISSR Analyse. Den niedrigsten Wert weist Population JS mit 0,29 auf und den höchsten Wert Population BK mit 0,33 (Tab. 6).

Tabelle 6: ISSR und SCoT Ergebnisse der genetischen Diversität der Populationen von *Anacamptis morio*, erstellt mit AFLPSurv (Vekemans 2002) nach Lynch und Milligan (1994); Pop. = Population, n = Anzahl der Individuen pro Population, #loc. = Gesamtzahl der untersuchten Loci, PLP(%) = prozentualer Anteil polymorpher Loci, H_j = erwartete Heterozygosität (Nei's Gen Diversität), S.E.(H_j) = Standardfehler von H_j .

Pop.	ISSR					SCoT				
	n	#loc.	PLP	H_j	S.E.(H_j)	n	#loc.	PLP	H_j	S.E.(H_j)
WH	15	231	66,7	0,24	0,011	15	175	88,6	0,30	0,011
JS	15	231	60,2	0,22	0,011	15	175	91,4	0,29	0,011
Wei	15	231	88,3	0,26	0,009	15	175	94,4	0,32	0,009
Säge	5	231	60,2	0,25	0,012	5	175	76,6	0,33	0,012
HK	14	231	60,2	0,21	0,011	14	175	90,3	0,30	0,011
BK	13	231	76,6	0,25	0,011	13	175	92,6	0,33	0,011
EI	2	231	44,6	0,28	0,014	2	175	54,9	0,32	0,015
BG	3	231	49,4	0,25	0,013	3	175	58,9	0,30	0,015
WR	3	231	48,5	0,25	0,013	3	175	100,0	0,29	0,012

Mittel				0,25					0,31	
--------	--	--	--	------	--	--	--	--	------	--

Die Ergebnisse der molekularen Varianzanalyse (AMOVA) ergeben, dass in beiden Markern ein Großteil der genetischen Varianz, der hessischen Vorkommen von *A. morio*, innerhalb der Populationen auftritt (ISSR: 86%, SCoT: 92% Anhang Abb. A3 A/B). Bei der ISSR sind 14% auf die Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen, bei der SCoT-Analyse 8%. Dies ergibt einen PhiPT-Wert mit ISSR Marker von 0.139 ($p = 0,001$) und bei SCoT von 0,075 ($p = 0,001$). Beide Werte deuten nach Wright (1984) auf eine moderate genetische Differenzierung hin.

Die PCoA visualisiert die genetischen Distanzen zwischen den Individuen im mehrdimensionalen Raum. Hierbei erklärt Achse 1 der ISSR Analyse 7,90% der Variabilität, Achse 2 4,97% und Achse 3 4,31%. Zusammen erklären die Achsen 17,18%. Die Populationen zeigen Tendenzen einer Clusterbildung, überlappen sich allerdings teilweise. Mit Ausnahmen einzelner Individuen clusterten die Population HK und BK zusammen, ebenso wie die Populationen WH und JS und die Populationen Wei, Säge und EI, sodass sich tendenziell drei Cluster erkennen lassen. Bei der SCoT Analyse werden durch die PCoA insgesamt 13,83% der genetischen Variation erklärt, Achse 1 erklärt hierbei 5,09%, Achse 2 4,48% und Achse 3 4,26%. Eine Tendenz zur Clusterbildung ist, im Gegensatz zur ISSR Analyse, schwer zu identifizieren. Die meisten Populationen überlappen einander. Nur die zusammen lagernden Populationen Säge und WR überschneiden sich in dieser Darstellung nicht mit den sich überlappenden Populationen WH, JS und BG (Abb. 2).

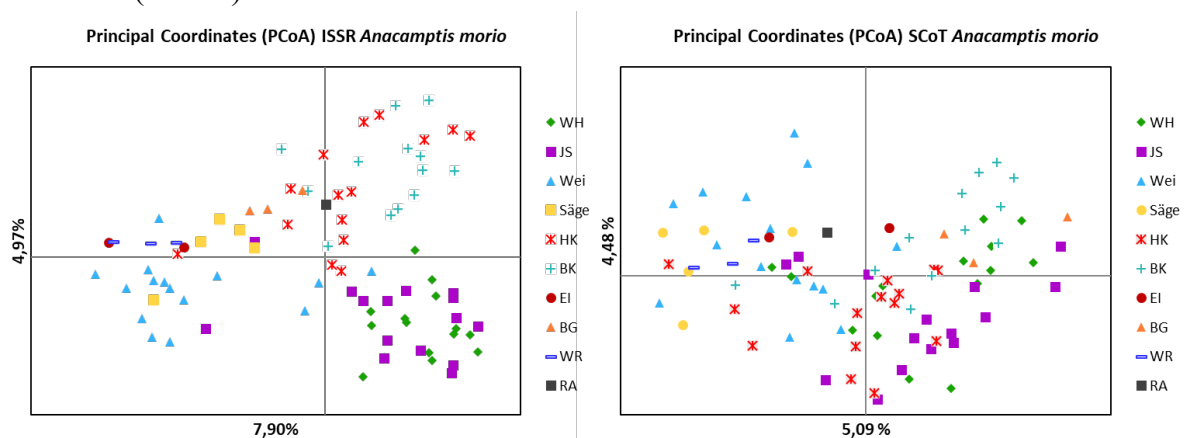


Abbildung 2: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) der ISSR- und SCoT- Analyse von *Anacamptis morio* (Achse 1 vs Achse 2), die untersuchten Populationen sind unterschiedlich gekennzeichnet, Achse 1 der ISSR erklärt 7,90% und Achse 2 4,97% der genetischen Distanzen, Achse 1 bei der SCoT Analyse erklärt 5,09% und Achse 2 4,48%, die Grafiken wurden mit dem Programm GenAlex (Peakall und Smouse 2012) erstellt.

Die STRUCTURE-Analyse ergab bei der ISSR-Analyse $K = 2$ und bei der SCoT-Analyse $K = 3$ nach der ΔK -Methode (Evanno et al. 2005). Die Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse der PCoA, wonach die Populationen nicht eindeutig durch genetische Cluster getrennt werden können (Anhang Abb. A4 A).

Der Manteltest von *A. morio*, zeigt sowohl mit ISSR-, als auch mit SCoT- Marker keine Korrelation zwischen der genetischen und der geografischen Distanz (ISSR: $R_{xy} = 0,174$; $p =$

0,010; SCoT: $R_{xy} = 0,037$, $p = 0,16$). Das Bestimmtheitsmaß der beiden Analysen liegt nahe null (ISSR: $R^2 = 0,030$; SCoT: $R^2 = 0,001$).

4.1.2. Kulturversuche

Das Samenmaterial von *A. morio*, stammte aus dem Botanischen Garten Gießen. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 7 festgehalten. Insgesamt wurden auf den Platten 916 und 707 Samen ausgestrichen. Die Anzahl optisch unterentwickelter Samen lag bei 689 und 40. Dadurch ergab sich ein Anteil normaler Samen von 24,78% bei der Platte, die einem jahreszeitlichen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt wurde und 94,34% bei der Platte, die kontinuierlich im Dunkeln gelagert wurde. Die Protokormrate der gesamten Samen lag bei Platte hell bei 6,99% und bei Platte dunkel bei 7,92%, während die Protokormrate der optisch normalen Samen bei der im Licht stehenden Platte bei 28,19% dreimal höher war als bei der im Dunkeln stehenden Platte. Hier betrug die Protokormrate 8,40%.

Bei der Platte im Licht konnten sich im Untersuchungszeitraum bereits zwei grüne Sprosse entwickeln. In der Tabelle 7 sind diese zu den Protokormen gerechnet worden.

Tabelle 7: Übersicht der ermittelten Samenzahlen und Protokormraten von *Anacamptis morio* 2025, UEW = unterentwickelte Samen, W = Anzahl der untersuchten Wochen, P = Anzahl der Protokorme, q = Anzahl der gequollenen Samen, S = Samen, A = Aussaatdatum.

Platte	Samen gesamt	UEW	Anzahl normale Samen	Anteil normale Samen [%]	W	P	q	P_rate [%] ge- samt S	P_rate [%] nor- mal S
hell A: 16.07.2025	916	689	227	24,78	15	64	2	6,99	28,19
dunkel A: 16.07.2025	707	40	667	94,34	15	56	5	7,92	8,40

4.2 *Cypripedium calceolus*:

4.2.1 Populationsgenetische Untersuchung

Die Laborarbeiten zu *C. calceolus* erwiesen sich als langwierig. Während den Arbeiten zu ISSR schienen die Ergebnisse einiger Primer nicht reproduzierbar zu sein (Abb. 3 und 4). Verfahren und Primer, die in Vorversuchen funktioniert hatten, waren bei Wiederholung erfolglos, auch führten Abwandlungen des Mastermixes zu mitunter starken Änderungen des Bandenmusters. Variation der Zyklenzahl konnte extreme Abweichungen der Bandenanzahl liefern. Dies warf die Frage auf, inwiefern eine durchgeführte Analyse aussagekräftige Ergebnisse liefert.

Um zuverlässige Primer für die genetische Analyse zu etablieren, wurden daher 4 Ansätze der selben Proben (8 Proben, bestehend aus sechs Individuen von *C. calceolus*, einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle), gleichzeitig mit gleicher Behandlung durchgeführt. Die Produkte der Ansätze wurden nebeneinander auf frisches Agarosegele aufgetragen. Von sechs mit dieser Methode getesteten Primern, konnten bei vier Primern gesamte Ausfälle von Ansätzen oder deutlich voneinander abweichende Banden detektiert werden. Ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Primerkonzentrationen (0,4µl und 2µl) bei den Primern UBC841 und UBC811

und minimalen Abweichungen in der Temperatur, ergaben bei Weiderholung an unterschiedlichen Stellen Bandenmuster.

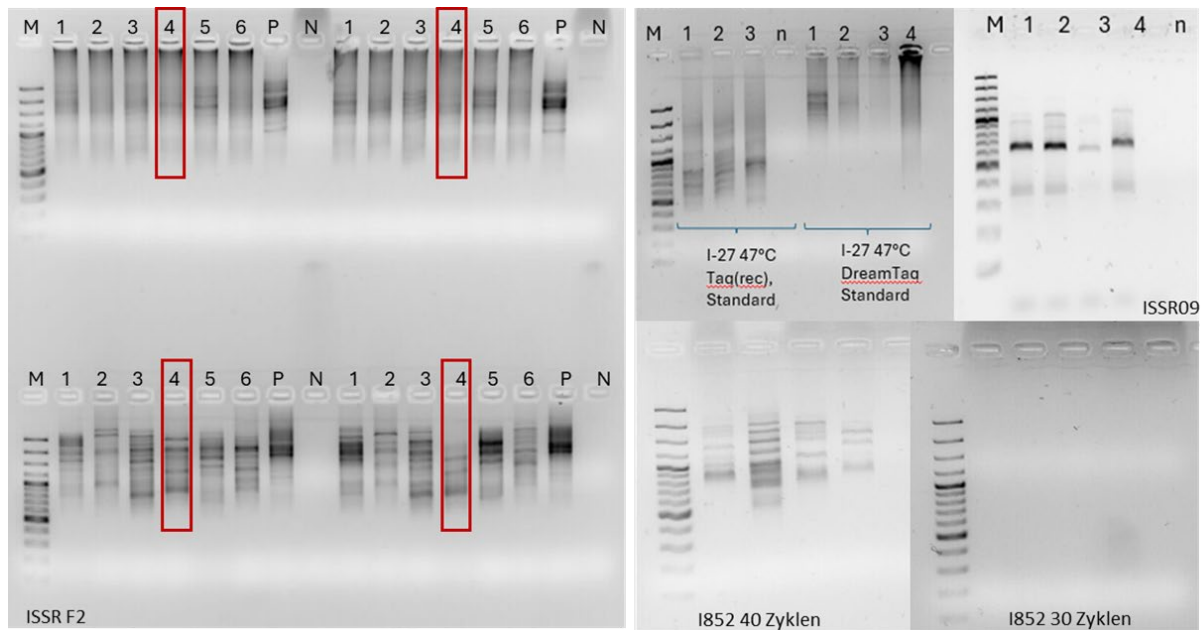


Abbildung 3: Gelbilder von *Cypripedium calceolus* mit Diskrepanzen unterschiedlicher Primer.

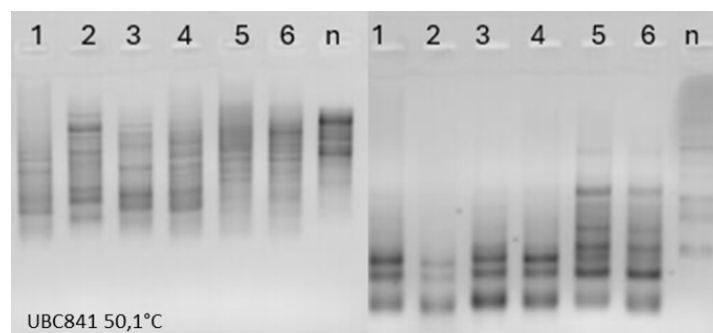


Abbildung 4: Zwei Gelbilder von *Cypripedium calceolus*, beide mit dem Primer UBC841 bei 50,1°C. Deutlich wird, dass die Ergebnisse nicht identisch sind.

Auch die Identifikation von SCoT Primern erwies sich als schwieriger als bei den anderen Arten und konnten nicht reproduziert werden aus vorangegangenen Studien (Opitz et al. 2018). So konnten noch keine aussagekräftigen Analysen an der Art durchgeführt werden.

4.2.2 Kulturversuche

Insgesamt wurden von *C. calceolus* im Bearbeitungszeitraum von 2023 bis 2025 20 Kapseln entnommen (Tab. 2) und auf Aussaatmedien ausgebracht. Zwischen 2023 und 2024 wurden die Samen per Grünsaat auf ein Kartoffelmedium in Schraubgläser ausgesät und die Keimrate geschätzt. Hier konnte festgestellt werden, dass ein Großteil der Samen gekeimt war. Schätzungen zufolge lag die Keimrate in den Aussaatgläsern bei etwa 90%. Die Protokolle wurden in das Kulturmedium überführt, die ersten Individuen konnten im Mai/Juni in Substrat getopft

werden. Anfang 2025 weitere Kästen in Waldboden getopft und die Individuen aus dem letzten Jahr ebenfalls in diese Erde überführt. Insgesamt wurden etwa 124 Individuen eingetopft, wobei die Jungpflanzen im Juni 2025 eingegangen sind.

Die 16 Kapseln aus dem Jahr 2025 wurden in KW26, KW27 und KW30 geerntet und ein Teil zur genaueren Erfassung auf Petrischalen ausgestrichen. Der andere Teil des Samenmaterials wurde in Gläser ausgebracht. Selbst- und fremdbestäubte Kapseln wurden dokumentiert. Die Samen der Aussaat vom 26.06.2025 waren sehr undifferenziert, weiß, breiig und ließen sich auf dem Nährmedium nicht gut ausstreichen. Die Samen in den Kapseln vom 08.07.2025 waren ebenfalls zum Großteil weiß, nur vereinzelte Samen wiesen eine bräunliche Testa auf, ebenso wie die Samen vom 11.07.2025. Die Samen Simmelsberg Schneise der Aussaat vom 23.07.2025 wiesen eine dunkle Testa und einen hellen Embryo auf und ließen sich gut auf dem Nährmedium ausstreichen, während der Großteil der Samen Simmelsberg Wald vom 23.07.2025 kaum entwickelt war. Das Samenmaterial reichte insgesamt für 22 Platten, von denen fünf Kontaminationen aufwiesen und vorzeitig entsorgt werden mussten. 17 Platten konnten in die Untersuchung einfließen (Tab. 8).

Auf den Platten wurden zwischen 356 und 2500 Samen ausgebracht. Unterentwickelte Samen im Sinne der Beschreibung aus Kapitel 3.3, konnten nicht eindeutig identifiziert werden, sodass der Anteil optisch normaler Samen bei 100% liegt. Die Untersuchung wurde über einen Zeitraum von 11 bis maximal 14 Wochen durchgeführt. Die Schwankungen des Untersuchungszeitraums kommen aufgrund der unterschiedlichen Erntezeiträume zustande. Die Anzahl der Protokorme schwankt zwischen 26 (Platte 2 Meißner best. A: 11.07.2025) und 292 (Platte 1 Meißner selbst A: 11.07.2025). Die Protokormrate liegt zwischen 1,08% (Platte 1.1 Bühlchen selbst A: 26.06.2025) und 37,36% (Platte 1 Meißner selbst A: 08.07.2025). Da keine unterentwickelten Samen identifiziert werden konnten, entspricht die Protokormrate der gesamten Samenanzahl der Protokormrate der optisch normalen Samen (Tab. 8).

Im Vergleich zwischen den selbstbestäubten und den fremdbestäubten Samen vom 26.06.2025 zeigten sich Unterschiede in der Protokormrate. Bei den selbstbestäubten Individuen liegt die Protokormrate zwischen 1,08% und 2,17%, während sie bei den fremdbestäubten Individuen mit 6,07% und 10,43 % höher ist. Die selbstbestäubten Individuen vom 08.07.2025 zeigen eine Protokormrate von 37,36% und 33%. Bei den Aussaaten vom 11.07.2025 zeigen die selbstbestäubten Individuen mit einer Protokormrate von 17,41% und 9,81% eine höhere Erfolgsrate im Vergleich zu den fremdbestäubten Individuen mit 1,80% und 3,98%. Die Protokormraten der fremdbestäubten Individuen von Simmelsberg (A: 23.07.2025) liegen darunter (Tab. 8).

Vergleicht man die Gesamtzahl der selbst- und fremdbestäubten Individuen, wurden bei den selbstbestäubten 6838 Samen untersucht und eine Protokormrate von 9,68% ergibt, die der fremdbestäubten Individuen lag mit 3,65% bei 11.552 Samen darunter.

Tabelle 8: Übersicht der ermittelten Samenzahlen und Protokormraten von *Cypripedium calceolus* 2025, UEW = unterentwickelte Samen, W = Anzahl der untersuchten Wochen, P = Anzahl der Protokorme, q = Anzahl der gequollenen Samen, S = Samen, A = Aussaatdatum, Sch = Schneise.

Platte	Samen ge- samt	UEW	Anzahl normale Samen	Anteil normale Samen [%]	W	P	q	P_rate [%] ge- samt S	P_rate [%] normal S
1.2 Bühlchen selbst A: 26.06.2025	1427	0	1427	100	14	31	13	2,17	2,17
1.1 Bühlchen selbst A:26.06.2025	2505	0	2505	100	14	27	8	1,08	1,08
2.1 Bühlchen best. A: 26.06.2025	1247	0	1247	100	14	130	58	10,43	10,43
2.2 Bühlchen best. A: 26.06.2025	1416	0	1416	100	14	86	23	6,07	6,07
4.2 Simmelsberg best. A: 26.06.2025	1359	0	1359	100	14	16	9	1,18	1,18
1 Meißner selbst A: 08.07.2025	356	0	356	100	11	133	22	37,36	37,36
2 Meißner selbst. A: 08.07.2025	400	0	400	100	11	132	2	33,00	33,00
1 Meißner best. A: 11.07.2025	1356	0	1356	100	11	54	0	3,98	3,98
2 Meißner best. A: 11.07.2025	1447	0	1447	100	11	26	23	1,80	1,80
1 Meißner selbst A: 11.07.2025	1671	0	1671	100	11	292	133	17,47	17,47
2 Meißner selbst A: 11.07.2025	479	0	479	100	11	47	0	9,81	9,81
Simmelsberg Sch. 1a A: 23.07.2025	1275	0	1275	100		21	44	1,65	1,65
Simmelsberg Sch. 1b A: 23.07.2025	732	0	732	100		15	47	2,05	2,05
Simmelsberg Sch. 2a A: 23.07.2025	1329	0	1329	100		44	52	3,31	3,31
Simmelsberg Wald 4a A: 23.07.2025	1391	0	1391	100		30	17	2,16	2,16
Gesamt selbst.	6838	0	6838	100		662	178	9,68	9,68
Gesamt best.	11.552	0	11.552	100		422	273	3,65	3,65

4.3 *Dactylorhiza majalis*:

Für *D. majalis* wurden 18 ISSR Primer getestet von denen acht auswertbare Banden produzierten (Anhang Tab. A2) und für die weiteren Analysen verwendet wurden und 132 Merkmale (Loci) zeigten. Für SCoT wurden 16 Primer getestet von diesen wurden sechs als gut auswertbar erachtet mit 101 Merkmalen und weiter verwendet (Anhang Tab. A3). Insgesamt wurden für beide Analysen je 281 Individuen molekulargenetisch untersucht.

4.3.1 Genetische Diversität

Wie die Ergebnisse der AFLPsurv-Berechnung zeigten, die auf ISSR- und SCoT-Markern basieren (Tab. 9), wies die EB-Population in beiden Datensätzen den höchsten Polymorphismusgrad auf, nämlich 89,4 % bei ISSR und 87 % bei SCoT. Umgekehrt wies die PF-I-Population den geringsten Polymorphismusgrad auf, mit 48,5 % im ISSR-Datensatz und 51 % im SCoT-Datensatz.

Hinsichtlich der genetischen Diversität (H_j) wies die EB-Population in beiden Datensätzen den niedrigsten Wert auf (ISSR: $H_j = 0,264$; SCoT: $H_j = 0,186$). Die höchste genetische Diversität

wurde in der FA-Population im ISSR-Datensatz beobachtet ($H_j = 0,343$), während im SCoT-Datensatz die PF I-Population den höchsten Wert aufwies ($H_j = 0,302$).

Tabelle 9: ISSR und SCoT Ergebnisse der genetischen Diversität der Populationen von *Dactylorhiza majalis*, erstellt mit AFLPsurv (Vekemans 2002) nach Lynch und Milligan (1994); Pop. = Population, n = Anzahl der Individuen pro Population, #loc. = Gesamtzahl der untersuchten Loci, PLP(%) = prozentualer Anteil polymorpher Loci, H_j = erwartete Heterozygotität (Nei's Gen Diversität), S.E.(H_j) = Standardfehler von H_j .

		ISSR (#loc.=132)				SCoT (#loc.=101)			
Pop.	n	#loc.	PLP(%)	H_j	S.E.(H_j)	#loc.	PLP(%)	H_j	S.E.(H_j)
EB	15	118	89.4	0.264	0.012	87	86.1	0.186	0.010
FA	15	94	71.2	0.343	0.012	69	68.3	0.254	0.017
EK	15	95	87.9	0.270	0.015	74	73.3	0.267	0.016
LD	15	116	87.9	0.303	0.014	73	72.3	0.254	0.017
UR	15	98	74.2	0.285	0.016	70	69.3	0.259	0.018
BG1	15	98	74.2	0.278	0.015	76	75.2	0.263	0.017
HL	15	102	77.3	0.294	0.015	63	62.4	0.252	0.018
HR	15	97	73.5	0.285	0.015	68	67.3	0.258	0.017
Va	15	93	70.5	0.279	0.016	66	65.3	0.254	0.018
WR	15	98	74.2	0.287	0.016	68	67.3	0.249	0.017
BR	15	102	77.3	0.294	0.015	69	68.3	0.258	0.017
GK	15	101	76.5	0.305	0.015	71	70.3	0.260	0.017
SH	15	97	73.5	0.290	0.015	70	69.3	0.255	0.017
RW	15	92	69.7	0.286	0.016	73	72.3	0.265	0.017
Wei	15	100	75.8	0.291	0.015	73	72.3	0.259	0.016
_I									
Wei	5	86	65.2	0.283	0.017	64	63.4	0.273	0.019
_II									
PF II	15	91	68.9	0.278	0.016	70	69.3	0.251	0.017
PF I	2	64	48.5	0.265	0.018	51	50.5	0.302	0.021
GO	10	97	73.5	0.275	0.016	74	73.3	0.239	0.018
Rö	9	95	72.0	0.271	0.016	77	76.2	0.257	0.017

4.3.2 Populations Struktur und Differenzierung

Eine auf ISSR- und SCoT-Markern basierende molekulare Varianzanalyse (AMOVA) ergab, dass der Großteil der genetischen Variation in den Populationen von *D. majalis* innerhalb der Populationen auftrat (Anhang A3 C/D). Anhand von ISSR-Markern (Anhang A3 C) wurde festgestellt, dass 92 % der gesamten genetischen Varianz innerhalb der Populationen auftraten,

während die restlichen 8 % auf Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen waren. In ähnlicher Weise zeigten SCoT-Marker (Anhang A3 D), dass 96 % der genetischen Varianz innerhalb der Populationen auftraten, während nur 4 % zwischen den Populationen auftraten.

Auf regionaler Ebene wurde für keines der beiden Markersysteme eine genetische Varianz festgestellt (0 %). Die Populationen wurden in fünf geografische Regionen gruppiert: Es wurden folgende Regionen identifiziert: Norden (WR, HL, LD, UR), Osten (GO, Wei_I, Wei_II, BR, BG1), Süden (EB, FA, RW), Westen (Va, EK, SH) und Mitte (Rö, GK1, HR, PF I, PF II). Der PhiPT-Wert für die ISSR-Daten betrug 0,079 ($p = 0,001$) moderate genetische Differenzierung nach Wright (1984), während der PhiPT-Wert für die SCOT-Daten bei 0,044 ($p = 0,001$) lag und eine geringe genetische Differenzierung nach Wright (1984) vorliegt.

PCoA: Für den ISSR-Datensatz (Abbildung 5A) erklärte Achse 1 6,76 % der gesamten genetischen Variation, Achse 2 5,67 % und Achse 3 4,26 %. Im SCoT-Datensatz (Abbildung 5B) erklärte Achse 1 6,69 % der genetischen Variation, Achse 2 5,00 % und Achse 3 4,51 %.

In beiden Markersystemen wiesen die Individuen im Allgemeinen eine mosaikartige genetische Struktur auf, ohne erkennbare Clusterbildung nach Population. Individuen aus der EB-Population zeigten jedoch eine Tendenz, sich von den anderen Populationen zu unterscheiden, wodurch sie in der ISSR-Analyse einen eigenständigen Cluster und in der SCoT-Analyse eine teilweise abgegrenzte Gruppierung bildeten.

Als Ergebnis der STRUCTURE-Analyse wurde die wahrscheinlichste Anzahl genetischer Cluster für *D. majalis* gemäß der ΔK -Methode (Evanno et al. 2005) auf $K = 2$ (sowohl für ISSR als auch für SCoT) bestimmt (Anhang Abb. A 4 B). Die Mehrheit der Individuen wies eine Kombination aus ähnlichen und gemischten genetischen Ursprüngen auf, was auf eine Vermischung hindeuten kann. Die EB-Population bildete jedoch sowohl in den SCoT- als auch in den ISSR-Analysen einen separaten Cluster und unterschied sich damit von anderen Populationen. Es wurde ein Mantel-Test durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz unter den *D. majalis* -Populationen zu untersuchen. Für den ISSR-Datensatz ergab der Mantel-Test keine statistisch signifikante Korrelation ($R = -0,004$; $R^2 = 2 \times 10^{-5}$; $p = 0,420$). In ähnlicher Weise zeigte auch der SCoT-Datensatz keine signifikante Korrelation zwischen genetischen und geografischen Entfernungen ($R = 0,007$; $R^2 = 5 \times 10^{-5}$; $p = 0,300$).

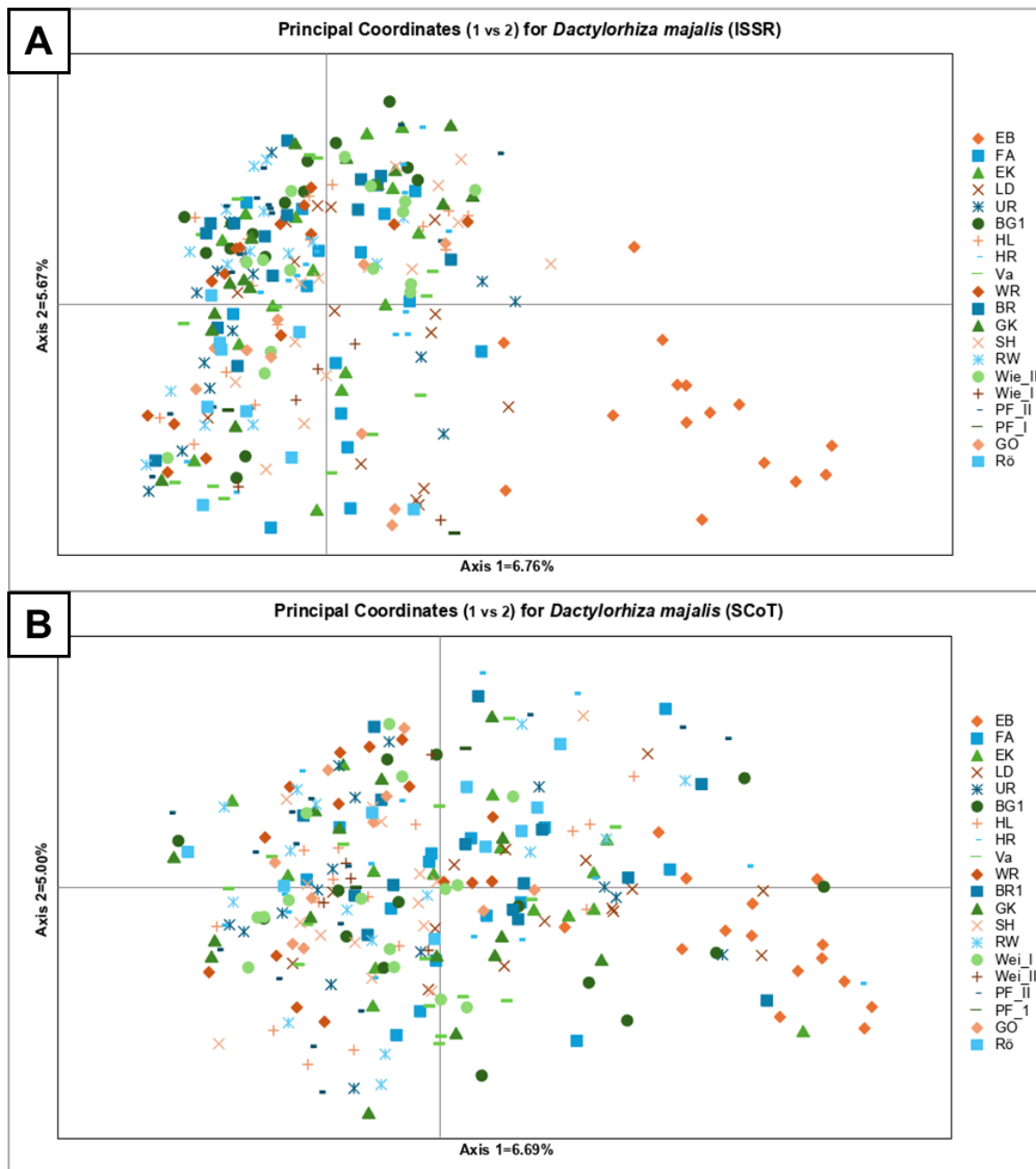


Abbildung 5: Genetische Differenzierung zwischen Populationen von *Dactylorhiza majalis*, dargestellt mittels einer Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) auf der Grundlage von A: ISSR-Markern, B: SCoT-Markern, wobei Achse 1 gegen Achse 2 aufgetragen ist. Die farbigen Symbole veranschaulichen die Beziehung zwischen den untersuchten Variablen und den untersuchten Populationen. Die Abkürzungen für die Populationen entsprechen denen im Anhang Tabelle A 1.

4.3.3 Kulturversuche

Das Samenmaterial von *D. majalis*, stammte aus Rödgen. Die Gesamtanzahl der Samen reicht von 689 Samen bis 1347 Samen und die Zahl optisch unterentwickelter Samen von 136 bis 182 (Tab. 10). Daraus ergibt sich ein Anteil an normalen Samen von jeweils über 80%. Die Protokormrate der gesamten Samen reicht von 4,35% (Platte 1 A: 27.03.2025) bis 5,94% (Platte 2 A: 27.03.2025), die der optisch normalen Samen von 5,42% (Platte 1 A: 27.03.2025) bis 7,39% (Platte 2 A: 27.03.2025).

In der Summe ergibt sich eine Gesamtanzahl der Samen von 2793 und eine Anzahl von 466 optisch unterentwickelte Samen. Die durchschnittliche Protokormrate der gesamten Samen liegt bei 5,4% und die der optisch normalen Samen bei 6,49% (Tab. 10).

Tabelle 10: Übersicht der ermittelten Samenzahlen und Protokormraten von *D. majalis* 2025, UEW = unterentwickelte Samen, W = Anzahl der untersuchten Wochen, P = Anzahl der Protokorme, q = Anzahl der gequollenen Samen, S = Samen, A = Aussaatdatum.

Platte	Samen gesamt	UEW	Anzahl normale Samen	Anteil normale Samen [%]	W	P	q	P_rate [%] ge- samt S	P_rate [%] nor- mal S
1 A: 27.03.2025	689	136	553	80,26	14	30	0	4,35	5,42
2 A: 27.03.2025	757	148	609	80,45	14	45	0	5,94	7,39
3 A: 27.03.2025	1347	182	1165	86,49	14	76	0	5,64	6,52
Gesamt	2793	466	2327	83,31	14	151	0	5,40	6,49

4.4 *Herminium monorchis*:

Insgesamt wurden 8 verschiedene Primer für die ISSR-Analyse und 17 verschiedene Primer für die SCoT-Analyse untersucht. Bei der ISSR-Analyse lieferten 8 der untersuchten Primer zufriedenstellende Ergebnisse, und in den nachfolgenden Analysen verwendet (Anhang Tab. A 2). Bei der SCoT-Analyse zeigten 15 der untersuchten Primer eine erfolgreiche Amplifikation. Es wurden die sieben am besten geeigneten Primer für die Analysen ausgewählt. Insgesamt wurden 179 auswertbare Banden in der ISSR-Analyse und 132 auswertbare Banden in der SCoT-Analyse bei 21 Individuen erhalten (Anhang Tab. A 3).

4.4.1 Populationsgenetische Untersuchung

Die Abschätzung der genetischen Vielfalt und der Polymorphie innerhalb der *H. monorchis*-Populationen, erfolgte mithilfe der AFLPsurv-Analyse. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, wurden für ISSR- und SCoT-Marker Unterschiede im Polymorphismusgrad zwischen den Populationen festgestellt. Im ISSR-Datensatz wies die Hg-Population die höchste Polymorphismusrate (91,6 %) auf, während die Hh-Population die niedrigste (81,6 %) aufwies. Im Gegensatz dazu wurde im SCoT-Datensatz der höchste Polymorphismusgrad in der Hh-Population (100 %) festgestellt, während der niedrigste Wert in der Hg-Population (96,2 %) beobachtet wurde.

Die Untersuchung der Werte für die genetische Diversität (H_j) ergab, dass die Hg-Population in beiden Datensätzen die geringste genetische Diversität aufwies (ISSR: $H_j = 0,343$; SCoT: $H_j = 0,357$). Umgekehrt wies die Hh-Population die höchste genetische Diversität auf (ISSR: $H_j = 0,344$; SCoT: $H_j = 0,369$). Eine auf ISSR- und SCoT-Markern basierende AMOVA ergab, dass der Großteil der genetischen Variation in den Populationen von *H. monorchis* innerhalb der Populationen auftrat (Anhang A3 E/F).

PCoA: Für den ISSR-Datensatz (Abb. 6 A) erklärte Achse 1 15,19 % der genetischen Variation, Achse 2 10,07 % und Achse 3 8,44 %. Im SCoT-Datensatz (Abb. 6 B) machte Achse 1 21,16 % der genetischen Variation aus, Achse 2 11,44 % und Achse 3 8,80 %. Eine vorläufige visuelle Analyse der Diagramme deutete auf eine interne Strukturierung in beiden Populationen (Hh

und Hg) hin, wobei die Individuen eine Tendenz zeigten, sich innerhalb ihrer jeweiligen Populationen zu gruppieren. In der Hg-Population wiesen nur zwei Individuen eine teilweise Abweichung auf.

Tabelle 11: ISSR und SCoT Ergebnisse der genetischen Diversität der Populationen von *Herminium monorchis*, erstellt mit AFLPsurv (Vekemans 2002) nach Lynch und Milligan (1994); Pop. = Population, n = Anzahl der Individuen pro Population, #loc. = Gesamtzahl der untersuchten Loci, PLP(%) = prozentualer Anteil polymorpher Loci, H_j = erwartete Heterozygotität (Nei's Gen Diversität), S.E.(H_j) = Standardfehler von H_j.

		ISSR (#loc.=179)				SCoT (#loc.=132)			
Pop.	n	#loc.	PLP(%)	H _j	S.E.(H _j)	#loc.	PLP(%)	H _j	S.E.(H _j)
Hh	6	146	81.6	0.344	0.012	132	100	0.369	0.013
Hg	15	164	91.6	0.343	0.012	127	96.2	0.357	0.014

Als Ergebnis der STRUCTURE-Analyse wurde die wahrscheinlichste Anzahl genetischer Cluster für *H. monorchis* gemäß der ΔK -Methode auf $K = 3$ (sowohl für ISSR als auch für SCoT) bestimmt (Evanno et al. 2005) (Anhang Abb. A 4 C). Während die Mehrheit der Individuen in der Hg-Population überwiegend durch einen einzigen genetischen Cluster gekennzeichnet ist, ist es bemerkenswert, dass zwischen den beiden Individuen, bei denen die blaue Färbung besonders intensiv ist, ein gewisses Maß an Variation besteht (Anhang Abb. A 4 C). Im Gegensatz dazu wies die Hh-Population im Vergleich zur Hg-Population ein komplexeres Muster der genetischen Herkunft auf. Die Gesamtergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass diese Populationen nicht vollständig voneinander getrennt sind.

Es wurden Mantel-Tests durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz unter den *H. monorchis*-Populationen zu untersuchen. Für den ISSR-Datensatz ergab der Mantel-Test einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,531$ ($R^2 = 0,2817$; $p = 0,010$) eine schwache Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz. In ähnlicher Weise zeigte auch der SCoT-Datensatz einen schwachen, aber signifikanten Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz ($R = 0,397$; $R^2 = 0,1577$; $p = 0,010$).

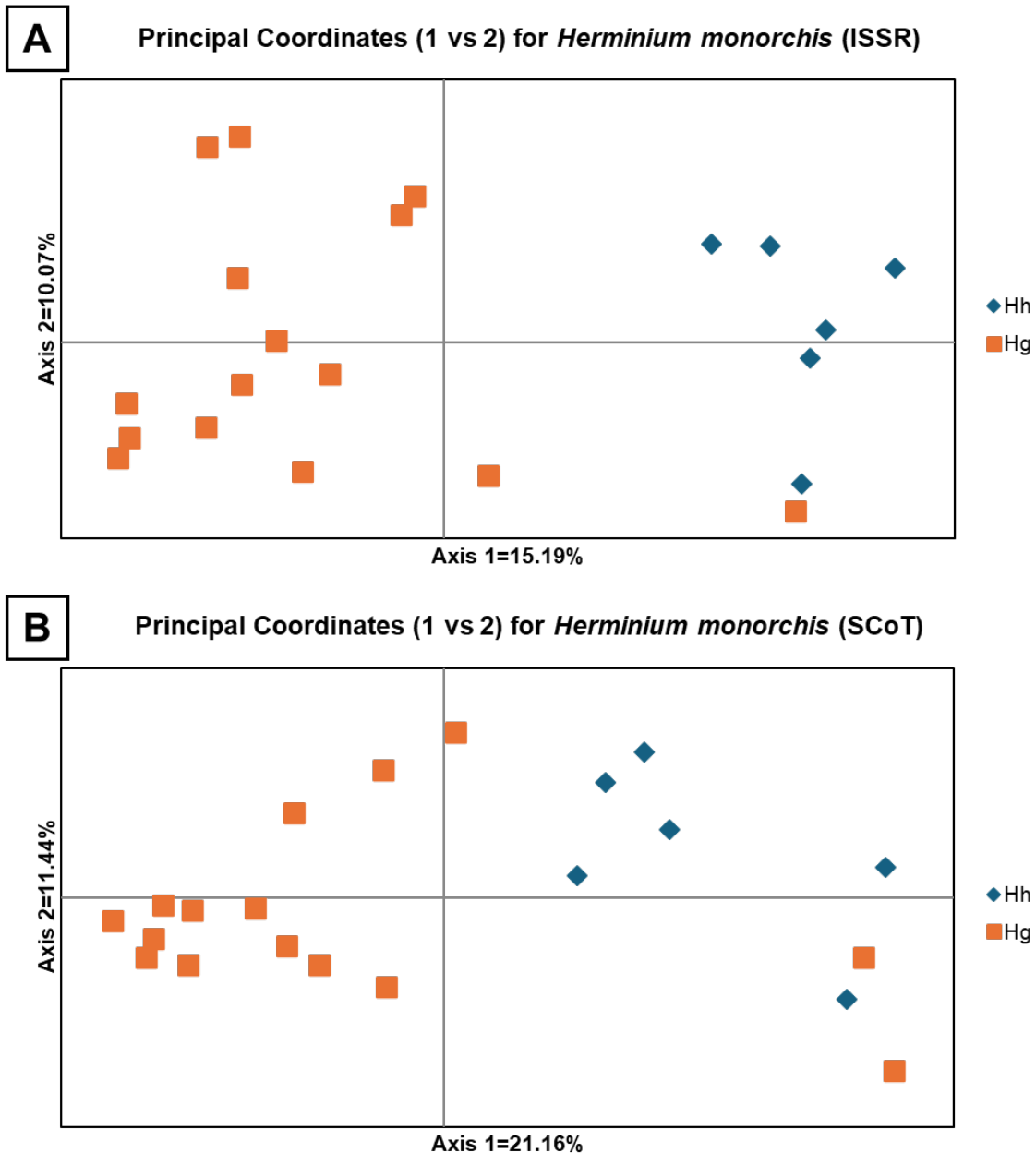


Abbildung 6: Genetische Differenzierung zwischen Populationen von *Herminium monorchis*, dargestellt mittels einer Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) auf der Grundlage von A: ISSR-Markern, B: SCoT-Markern, wobei Achse 1 gegen Achse 2 aufgetragen ist. Die farbigen Symbole veranschaulichen die Beziehung zwischen den untersuchten Variablen und den untersuchten Populationen. Die Abkürzungen für die Populationen entsprechen denen im Anhang Tabelle A 1.

4.4.2 Kulturversuche

Für die Kulturversuche von *H. monochis* konnten im Jahr 2024 ein kapseltragender Spross von einem Standort entnommen werden. Insgesamt konnten 12 Gläser aus dem Samenmaterial gewonnen werden, von denen bereits 4 Gläser zu Beginn keimten.

Die Behandlung der gewonnenen Samen erfolgte wie bei den erfolgreich durchgeführten Vorversuchen. Im Gegensatz zu diesen, konnten nur wenige Samen zur Keimung kommen. Insgesamt gingen aus dem kapseltragenden Spross nur 42 Protokorme hervor.

4.5 *Neotinea ustulata*:

Für *N. ustulata* wurden insgesamt 25 ISSR Primer und neun SCoT Primer getestet. Von diesen lieferten sieben ISSR Primer (Anhang Tab. A 2) mit 193 Merkmalen und sieben SCoT Primer (Anhang Tab. A 3) mit 182 Merkmalen gute Ergebnisse, sodass sie für die nachfolgenden populationsgenetischen Analysen weiter verwendet wurden. Insgesamt wurden 33 Individuen aus 6 Populationen untersucht.

4.5.1 Populationsgenetische Untersuchung

Die Ergebnisse der AFLPsurv Analyse zeigen bei den ISSR Markern einen prozentualen Anteil polymorpher Loci von 46,1% bei Population HB und 93,3% bei Population EF. Die Werte der genetischen Diversität (H_j) liegen im Durchschnitt bei 0,28. Den niedrigsten Wert weist hierbei Population BB mit 0,27 auf, den höchsten Wert, wie bei den polymorphen Loci, ebenfalls Population EF mit 0,30. Die Werte der SCoT Analyse zeigen einen ähnlichen prozentualen Anteil polymorpher Loci, wie bei der ISSR Analyse und liegen zwischen 55,5% bei Population HB und 96,7% bei EF. Im Durchschnitt liegen die Werte der genetischen Diversität (H_j) mit 0,32 höher als bei der ISSR Analyse. Der niedrigste Wert ist bei Population BB mit 0,30 zu finden, der höchste Wert mit 0,33 bei Population HB (Tab. 12).

Tabelle 12: ISSR und SCoT Ergebnisse der genetischen Diversität der Populationen von *Neotinea ustulata*, erstellt mit AFLPsurv (Vekemans 2002) nach (Lynch und Milligan 1994) Pop. = Population, n = Anzahl der Individuen pro Population, #loc. = Gesamtzahl der untersuchten Loci, PLP(%) = prozentualer Anteil polymorpher Loci, H_j = erwartete Heterozygotität (Nei's Gen Diversität), S.E.(H_j) = Standardfehler von H_j .

Pop.	ISSR					SCoT				
	n	#loc.	PLP	H_j	S.E.(H_j)	n	#loc.	PLP	H_j	S.E.(H_j)
HE	11	193	82,9	0,28	0,012	11	182	89,0	0,33	0,011
EF	15	193	93,3	0,30	0,011	15	182	96,7	0,33	0,010
BB	3	193	52,3	0,27	0,015	3	182	58,8	0,30	0,015
HB	2	193	46,1	0,28	0,015	2	182	55,5	0,33	0,015
Mittel				0,28					0,32	

Die AMOVA zeigt, dass mit 91 % bei den ISSR Markern der Großteil der genetischen Varianz innerhalb der Populationen von *N. ustulata* liegt, während 9 % der Variation auf Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen sind (Anhang Abb. A 3 G). Auch bei der SCoT-Analyse liegt der Großteil der genetischen Varianz mit 87 % innerhalb der Populationen, 13 % der genetischen Unterschiede können zwischen den Populationen detektiert werden (Anhang Abb. A 3 H). Die Daten ergeben nach Wright (1984) eine moderate genetische Differenzierung (ISSR: $\Phi_{IPT} = 0,088$; $p = 0,001$ und SCoT: $\Phi_{IPT} = 0,131$; $p = 0,001$).

Die PCoA erklärt bei den ISSR Markern 21,31% der genetischen Variation, anhand von drei Achsen. Hiervon entfallen 8,20% auf Achse 1, 6,87% auf Achse 2 und 6,24% auf Achse 3. Es zeigt sich in der Konfiguration Achse 1 vs. Achse 2 keine offensichtliche Clusterung, allerdings lässt sich erkennen, dass die Populationen EF und HE, die in der Darstellung relativ nah neben

einander lagen, nicht überlagern. Tendenziell grenzt sich Population HE von den anderen Populationen ab. Die Populationen HB und BB sind ebenfalls getrennt von einander, befinden sich aber innerhalb des Clusters von Population EF. Die SCoT-Analyse erklärt anhand der ersten drei Achsen 25,76% der genetischen Variation, wobei 11,82% durch Achse 1 erklärt werden, 7,85% durch Achse 2 und 6,09% durch Achse 3. Eindeutig voneinander abgrenzbare Cluster lassen sich in der Darstellung nicht erkennen, eine homogene Durchmischung der Populationen lässt sich jedoch auch nicht erkennen. Ähnlich wie in der ISSR Analyse, zeigen die Populationen RA und BB keine Berührungspunkte mit Population HE, die ähnlich wie in der ISSR-Analyse teilweise abgegrenzt ist. Weiterhin befinden sich Population OS im Bereich der Population HE (Abb. 7).

Die STRUCTURE Analyse zeigt in beiden Markersystemen die wahrscheinlichste Anzahl genetischer Cluster für $K = 2$ nach der ΔK -Methode (Evanno et al. 2005) und unterstützt die Ergebnisse der PCoA. Es ist zu erkennen, dass sich Population HE genetisch von den anderen Populationen unterscheidet (Anhang Abb. A 4 D).

Bei dem durchgeführten Manteltest ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der genetischen und der geografischen Distanz (ISSR: $R_{xy} = 0,237$; $p = 0,01$ und SCoT: $R_{xy} = 0,138$; $p = 0,07$).

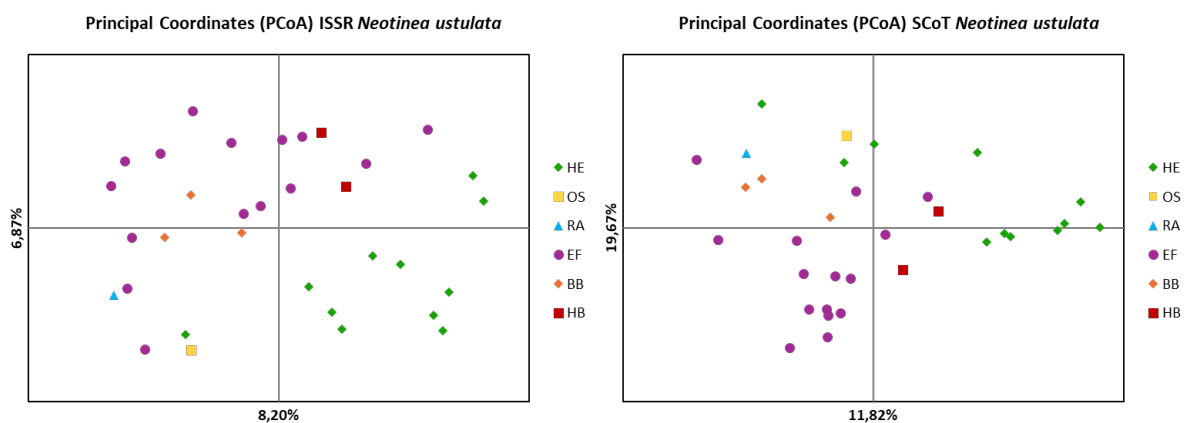


Abbildung 7: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) der ISSR- und SCoT- Analyse von *Neotinea ustulata* (Achse 1 vs Achse 2), die untersuchten Populationen sind unterschiedlich gekennzeichnet, Achse 1 der ISSR erklärt 8,20% und Achse 2 6,87% der genetischen Distanzen, Achse 1 bei der SCoT Analyse erklärt 11,82% und Achse 2 7,85%, die Grafiken wurden mit dem Programm GenAlex (Peakall und Smouse 2012) erstellt.

4.5.2 Kulturversuche

Bei der Ernte 2023 und Anzucht in Gläsern ergaben konnte 30 Protokorme umgelegt werden, von denen nur wenige in Substrat getopft werden konnten.

Für die Kulturversuche im Sammeljahr 2025 wurden Individuen auf einer Teilfläche (erste Teilfläche) des Untersuchungsgebiets per Hand bestäubt. Untersuchungsgruppe A ist bereits kurz nach der Bestäubung kollabiert, sodass von ihnen kein Kapselmateriale zur Verfügung stand. Gruppe B konnte erfolgreich bestäubt werden, hier konnten sich Kapseln entwickeln, von denen einige für die Untersuchung verwendet werden konnten.

Im Untersuchungsgebiet konnte beobachtet werden, dass die Pflanzen auf der Hauptfläche verhältnismäßig klein waren, sowie eine kurze Infloreszenz aufwiesen, während auf Teilfläche 2 sehr große und kräftige Pflanzen standen. Bei den regelmäßigen Begehungen konnten an den

Pflanzen auf Haupt- und Teilfläche 1 Hitzeschäden festgestellt werden. Zum Untersuchungszeitraum war das Wetter sehr trocken und warm. Es ließ sich beobachten, dass die Infloreszenz der 34 cm hohen Pflanzen auf Teilfläche 2 nur Kapselentwicklungen im oberen Bereich mit den jüngeren Blüten aufwies und nicht im unteren Bereich mit den älteren. Die Kapseln dieser Pflanzen sind das Produkt natürlicher Bestäubung.

Die Gesamtzahl der ausgebrachten Samen auf den Platten liegt zwischen 2356 (Platte 34 cm Pflanze B2b A: 08.07.2025) und 378 (Platte 2B A: 08.07.2025). Die Anzahl der optisch normalen Samen schwankt zwischen den Reifegraden der Samen. Im frühreifen Samenstadium konnte keine Differenzierung zwischen optisch normalen Samen und optisch unterentwickelten Samen feststellen, der Anteil normaler Samen lag daher bei 100%. Die Samen waren klein, weiß, klebten stark zusammen und hatten noch keine eindeutige Testa ausgebildet.

Bei dem halbreifen und reifen Samenmaterial konnten optisch unterentwickelte Samen identifiziert werden. Der Anteil optisch normaler Samen lag hier zwischen 4,26% bei Platte X1 A: 08.07.2025, der Pflanze von der Hauptfläche (natürliche Bestäubung), und 84,59% bei Platte 2.2 A: 10.07.2025. Es zeigt sich, dass der Anteil der optisch normalen Samen des halbreifen und reifen Samenmaterials bei den 34 cm Pflanzen auf der zweiten Teilfläche höher ist als auf der ersten Teilfläche mit unseren Bestäubungen.

Die Protokormrate der untersuchten Platten liegt bei 0%. Nur Platte 34cm Pflanze B2a2 A: 08.07.2025, weist eine Protokormrate von 0,12% bei der Gesamtzahl der Samen auf und von 0,15% bei den optisch normalen Samen. Es hat sich bei dieser Platte 1 Protokorm entwickelt (Tab. 13).

Tabelle 13: Übersicht der ermittelten Samenzahlen und Protokormraten von *Neotiniea ustulata* 2025, UEW = unterentwickelte Samen, W = Anzahl der untersuchten Wochen, P = Anzahl der Protokorme, q = Anzahl der gequollenen Samen, S = Samen, A = Aussaatdatum.

Platte	Samen ge- samt	UEW	Anzahl normale Samen	Anteil normale Samen [%]	W	P	q	P_rate [%] ge- samt S	P_rate [%] nor- mal S
1B2 A: 24.06.2025	1039	0	1039	100,00	21	0	0	0,00	0,00
1B1 A: 24.06.2025	1024	11	1013	98,93	21	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze1 A: 24.06.2025	917	1	916	99,89	21	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze2 A: 24.06.2025	897	0	897	100,00	21	0	0	0,00	0,00
3B A: 24.06.2025	1102	336	766	69,51	21	0	1	0,00	0,00
X1 A: 08.07.2025	680	651	29	4,26	22	0	0	0,00	0,00
2B A: 08.07.2025	378	325	53	14,02	17	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze A1 A: 08.07.2025	1756	763	993	56,55	19	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze A2 A: 08.07.2025	731	420	311	42,54	22	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze B1 A: 08.07.2025	757	212	545	71,99	22	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze B1.2 A: 08.07.2025	697	285	412	59,11	22	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze B2a1 A: 08.07.2025	792	167	625	78,91	22	0	0	0,00	0,00
34cm Pflanze B2a2 A: 08.07.2025	829	155	674	81,30	22	1	0	0,12	0,15
34cm Pflanze B2b A: 08.07.2025	2356	505	1851	78,57	17	0	0	0,00	0,00

4B1 A: 08.07.2025	1144	745	399	34,88	22	0	0	0,00	0,00
4B2 A: 08.07.2025	920	794	126	13,70	22	0	0	0,00	0,00
1 A: 10.07.2025	648	245	403	62,19	22	0	0	0,00	0,00
2.1 A: 10.07.2025	1770	311	1459	82,43	22	0	0	0,00	0,00
2.2 A: 10.07.2025	1525	235	1290	84,59	19	0	0	0,00	0,00

4.6 *Spiranthes spiralis*:

Insgesamt wurden 8 verschiedene Primer für ISSR und 17 verschiedene Primer für SCoT untersucht. In der ISSR-Analyse lieferten 8 der untersuchten Primer zufriedenstellende Ergebnisse und wurden in den nachfolgenden Analysen verwendet (Anhang Tab. A 2). Bei der SCoT-Analyse zeigten 15 der untersuchten Primer eine erfolgreiche Amplifikation. Dennoch wurden die sechs am besten geeigneten Primer für die Verwendung in den Analysen ausgewählt. Insgesamt wurden 88 auswertbare Banden in der ISSR-Analyse und 91 auswertbare Banden in der SCoT-Analyse bei 54 Individuen erhalten (Anhang Tab. A 3).

Den Ergebnissen von AFLPsurv zufolge (Tab. 14) wies die OB-M-Population in beiden Datensätzen den höchsten Polymorphismusgrad auf (87,5 % für ISSR und 68,1 % für SCoT), während die MS-Population die niedrigsten Werte aufwies (50 % für ISSR und 6,6 % für SCoT). Hinsichtlich der genetischen Diversität (H_j) wies die MS-Population sowohl für ISSR ($H_j=0,226$) als auch für SCoT ($H_j=0,073$) die niedrigsten Werte auf. Die höchste genetische Diversität wurde in der OB-M-Population für ISSR ($H_j = 0,284$) beobachtet, während der höchste Wert bei der OB-M-Population für SCoT ($H_j = 0,239$) auftrat.

Tabelle 14: ISSR und SCoT Ergebnisse der genetischen Diversität der Populationen von *Spiranthes spiralis*, erstellt mit AFLPsurv (Vekemans 2002) nach (Lynch und Milligan 1994) Pop. = Population, n = Anzahl der Individuen pro Population, #loc. = Gesamtzahl der untersuchten Loci, PLP(%) = prozentualer Anteil polymorpher Loci, H_j = erwartete Heterozygotität (Nei's Gen Diversität), S.E.(H_j) = Standardfehler von H_j .

Pop.	n	ISSR (#loc.=88)				SCoT (#loc.=91)			
		#loc.	PLP(%)	H_j	S.E.(H_j)	#loc.	PLP(%)	H_j	S.E.(H_j)
O	4	61	69.3	0.284	0.018	7	7.7	0.083	0.013
OB-M	24	77	87.5	0.269	0.015	62	68.1	0.239	0.018
NL	12	73	83.0	0.273	0.016	57	62.6	0.207	0.019
DFA	11	70	79.5	0.233	0.017	31	34.1	0.139	0.016
MS	3	50	56.8	0.226	0.019	6	6.6	0.073	0.011

4.6.1 Populationsgenetische Untersuchung

Eine auf ISSR- und SCoT-Markern basierende AMOVA ergab, dass der Großteil der genetischen Variation in den *S. spiralis*-Populationen innerhalb der Populationen auftrat (Anhang Abb. A 3 I/J). Die ISSR-Marker zeigten, dass 93 % der gesamten genetischen Variation innerhalb der Populationen auftraten, während 7 % auf Unterschiede zwischen den Populationen

zurückzuführen waren. Bei den SCoT-Markern hingegen liegen 100 % der genetischen Varianz innerhalb der Populationen zu finden waren, während 0 % der Gesamtvariation zwischen den Populationen auftraten.

Die Regionen wurden in vier Zonen unterteilt (Nord: DFA; Ost: MS; Süd: O, OB-M; West: NL). Der PhiPT-Wert für die ISSR-Daten betrug 0,066 ($p = 0,001$) (moderate genetische Differenzierung nach Wright (1978)), während der PhiPT-Wert für die SCoT-Daten bei 0,004 lag ($p = 0,359$, nicht signifikant) (geringe genetische Differenzierung nach Wright (1978)).

Zur Bewertung der genetischen Ähnlichkeit zwischen Individuen von *S. spiralis* wurde eine PCoA auf der Grundlage von ISSR- und SCOT-Markern durchgeführt (Abb. 8 A/B). Im ISSR-Datensatz erklärte Achse 1 14,10 % der genetischen Variation, gefolgt von Achse 2 mit 8,00 % und Achse 3 mit 7,42 %. Im SCoT-Datensatz erklärte Achse 1 36,97 % der Variation, während Achse 2 und Achse 3 jeweils 11,70 % und 7,77 % erklärten. In beiden Analysen wies die Mehrheit der Individuen eine mosaikartige Struktur ohne erkennbare Clusterbildungsmuster auf; bei Individuen aus der MS-Population wurde jedoch eine Clusterbildung (ISSR) oder eine teilweise Clusterbildung (SCoT) beobachtet.

Als Ergebnis der STRUCTURE-Analyse wurde die wahrscheinlichste Anzahl genetischer Cluster für *S. spiralis* gemäß der ΔK -Methode (Evanno et al. 2005) auf $K = 2$ (sowohl für ISSR als auch für SCoT) bestimmt (Anhang Abb. A4 E). Im Allgemeinen werden die meisten Individuen jedoch von dem als „orange“ bezeichneten genetischen Cluster dominiert. Dennoch lässt sich eine genetische Vermischung zwischen den Populationen beobachten. Es ist offensichtlich, dass es keine vollständig isolierten genetischen Cluster gibt.

Es wurden Mantel-Tests durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz unter den *S. spiralis*-Populationen zu untersuchen. Die Ergebnisse des Mantel-Tests auf der Grundlage von ISSR- ($p = 0,140$) und SCoT-Markern zeigten keine statistisch signifikante Korrelation zwischen genetischen und geografischen Entfernungen. Für beide Datensätze war der Korrelationskoeffizient gering ($R = -0,063$; $R^2 = 0,0039$), mit nicht signifikanten p -Werten ($p = 0,140$ für ISSR und $p = 0,180$ für SCoT), was auf das Fehlen einer Isolation durch Entfernung zwischen den untersuchten Populationen hindeutet.

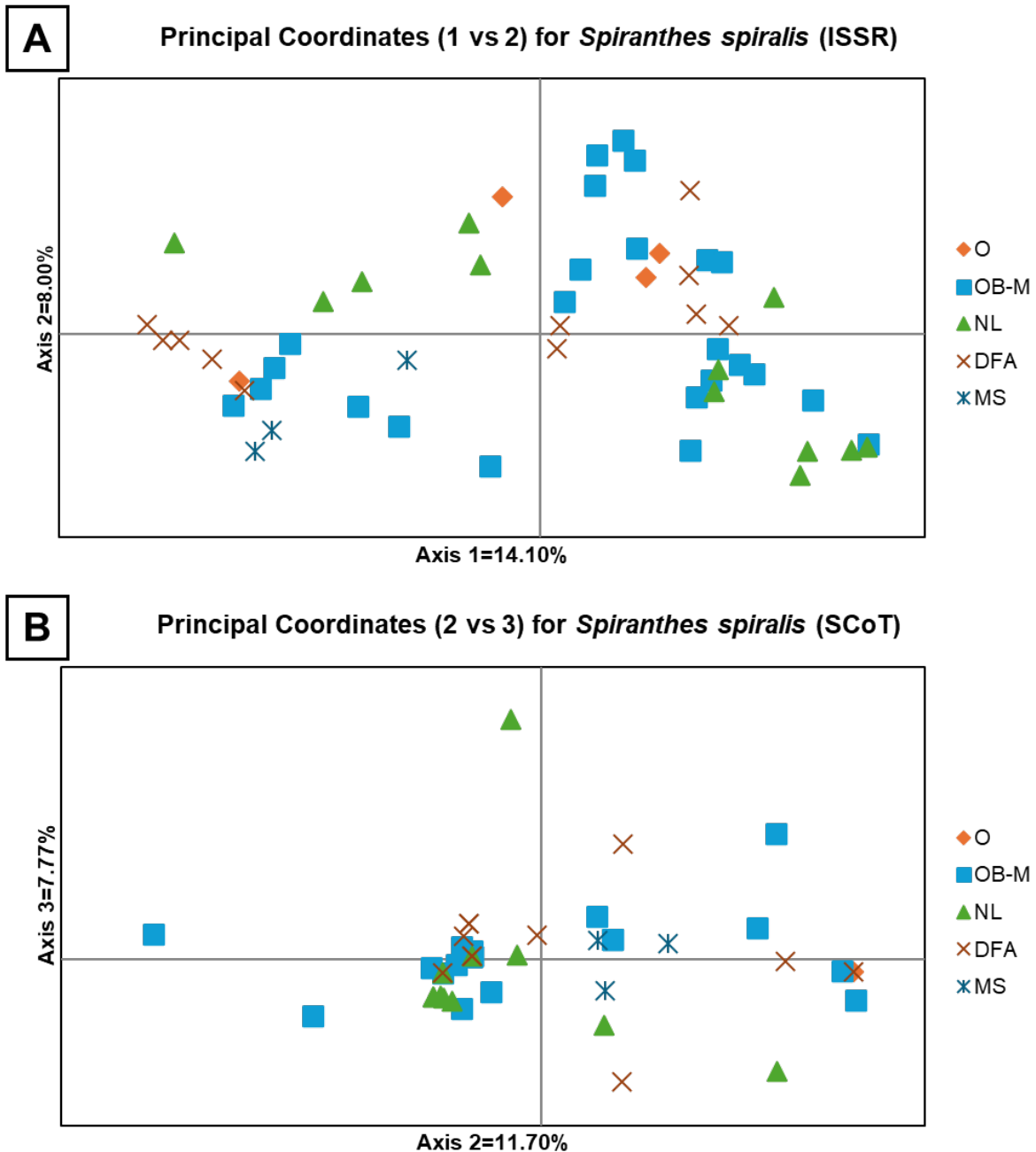


Abbildung 8: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) der ISSR- und SCoT- Analyse von *Spiranthes spiralis* (Achse 1 vs Achse 2), die untersuchten Populationen sind unterschiedlich gekennzeichnet, Achse 1 der ISSR erklärt 14,10 % und Achse 2 8% der genetischen Distanzen, Achse 1 bei der SCoT Analyse erklärt 11,70 % und Achse 2 7,77%, die Grafiken wurden mit dem Programm GenAlex (Peakall und Smouse 2012) erstellt.

4.6.2 Kulturversuche

Samenmaterial der Jahre 2023 bis 2024 wurde gesammelt und auf Standardaussaatmedium in Anzuchtgläsern ausgebracht. Da das Samenmaterial witterungsbedingt recht feucht war, wurde es bei Zimmertemperatur getrocknet. Hierbei konnten nur wenige Samen erfolgreich zur Keimung gebracht werden, da die Gläser häufig Kontaminationen aufwiesen.

Für die Protokormratenbestimmung, wurden die Samen auf Standard-Nährmedium und Kartoffelmedium ausgebracht. Insgesamt konnten 12 Platten aus dem Samenmaterial gewonnen werden, von denen sechs im Laufe der Untersuchung durch Pilze und Bakterien verkeimten und vorzeitig entsorgt werden mussten. Von den sieben untersuchten Platten, enthielten vier Platten einen Nährboden mit Kartoffelextrakt und drei Platten den Standard Nährboden.

Die Gesamtanzahl der ausplattierten Samen reicht von 683 bis 1540, die der optisch unterentwickelten Samen von 63 bis 966. Der Anteil optisch normaler Samen liegt zwischen 28,70% und 94,93%. Die Protokormrate der gesamten Samen reicht von 1,42% (Platte 4St A: 30.09.2025) bis 56,44% (Platte 2aSt A: 30.09.2025). Die Platten mit der niedrigsten und der höchsten Protokormrate enthalten beide Standard Medium. Die Protokormrate der normalen Samen liegt zwischen 4,05% (Platte 4St A: 30.09.2025) und 59,83% (Platte 2aK A: 30.09.2025). Hierbei enthält die Platte mit dem niedrigsten Wert Standard Nährmedium, die mit der höchsten Protokormrate das Nährmedium mit Kartoffel.

In der Summe sind auf dem Kartoffelmedium 4113 Samen ausgebracht worden, von denen 1961 Samen optisch unterentwickelt sind (Tab. 15). Die Protokormrate der gesamten Samen liegt bei 23,65%, die der optisch normalen Samen bei 45,21%. Von den insgesamt 3578 Samen auf dem Standard-Nährboden sind 1389 Samen unterentwickelt. Die Protokormrate der gesamten Samen liegt bei 25,04% und die der normalen Samen bei 40,93%.

Tabelle 15: Übersicht der ermittelten Samenzahlen und Protokormraten von *Spiranthes spiralis* 2025, UEW = unterentwickelte Samen, W = Anzahl der untersuchten Wochen, P = Anzahl der Protokorme, q = Anzahl der gequollenen Samen, S = Samen, A = Aussaatdatum, St = Standard-Medium, K = Kartoffelmedium.

Platte	Samen gesamt	UEW	Anzahl normale Samen	Anteil nor- male Sa- men [%]	W	P	q	P_rate [%] ge- samt S	P_rate [%] normal S
3K A: 30.09.2025	961	408	553	57,54	15	246	129	25,60	44,48
4K A: 30.09.2025	683	487	196	28,70	15	77	30	11,27	39,29
4aK A: 30.09.2025	1540	966	574	37,27	15	154	51	10,00	26,83
2aK A: 30.09.2025	929	100	829	89,24	15	496	249	53,39	59,83
4St A: 30.09.2025	917	596	321	35,00	15	13	73	1,42	4,05
2aSt A: 30.09.2025	1242	63	1179	94,93	15	701	321	56,44	59,46
4aSt A: 30.09.2025	1419	730	689	48,55	15	182	81	12,83	26,42
Platten K	4113	1961	2152	52,32	15	973	459	23,65	45,21
Platten St	3578	1389	2189	61,18	15	896	475	25,04	40,93

Legt man eine durchschnittliche Samenanzahl pro Kapsel von 800 fest (Machon et al. 2003), ergibt sich eine Gesamtzahl von ca. 11200 Samen aus den beprobten Kapseln, von denen 68,67% für diesen Versuch verwendet wurden. Mit in der Summe 1869 angezogenen Protokormen, liegt die Protokormrate des gesamten entnommenen Samenmaterials bei 16,69%.

5. Diskussion und Bewertung der Ergebnisse

5.1 Populationsgenetische Analyse

Anacamptis morio

Die Berechnungen zur genetischen Diversität ergeben bei der ISSR-Analyse einen durchschnittlichen Wert von $H_j = 0,25$ und bei SCoT von $H_j = 0,31$.

Die Daten der AMOVA zeigen in beiden molekularen Methoden eine moderate genetische Differenzierung, wobei der Großteil der genetischen Variabilität innerhalb der Populationen zu finden ist. Auch die PCoA zeigt in beiden Markersystemen keine deutlich voneinander getrennten Cluster, sondern mitunter Überschneidungen und geringe genetische Distanzen zwischen den Individuen der unterschiedlichen Populationen. Ein Zusammenhang zwischen der genetischen und geografischen Distanz ist nicht detektiert worden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich die Vermutung, dass aufgrund der kleinen und isolierten Vorkommen von *A. morio* eine geringe genetische Diversität und eine genetische Isolation der Populationen aus Hessen vorliegt, nicht bestätigen. Trotz der Stichprobenschwankung zwischen den Populationen von zwei beprobten Individuen bei der Population EI und 15 beprobten Individuen bei den Populationen WH, JS und Wei zeigen sich keine auffälligen Schwankungen der Werte innerhalb der Beiden Methoden.

Vergleicht man die Werte der genetischen Diversität mit Studien innerhalb Deutschlands, ist bei beiden Markern eine höhere genetische Diversität zu finden als bei den Populationen aus Sachsen-Anhalt ($H_e = 0,229$ mittels AFLP) (Hornemann et al. 2012), was positiv zu bewerten ist. Innerhalb Europa konnte eine italienische Studie eine mittlere genetische Diversität von 0,12 ermitteln (Rossi et al. 1992), auch diese liegen unter den Werten, die wir ermittelt haben. Trotz einer Isolation sind die Werte der genetischen Diversität konstant hoch. Besonders erfreulich ist hierbei, dass auch in kleinen Populationen hohe Werte festgestellt wurden, da in kleinen Populationen häufiger mit einer geringen genetischen Diversität zu rechnen ist (Ellstrand und Elam 1993).

Eine moderate genetische Differenzierung zwischen den Populationen deutet auf eine genetische Zusammengehörigkeit der Populationen hin. Ein aktueller Genfluss zwischen den Populationen ist kritisch zu betrachten, da Bestäuber die Entfernungen zwischen den Vorkommen oft nicht überwinden können. Ebenfalls scheint ein Austausch über Samenmaterial unwahrscheinlich. Auch wenn *A. morio* als Vertreter der Orchideen charakteristische, winzige, staubfeine Samen besitzt, die durch Wind verbreitet werden können, zeigten (Jersáková und Malinová 2007), dass sich nur ein kleiner Teil der Samen weiter als einen Meter von der Mutterpflanze verbreitet. Zu Ähnlichen Ergebnissen kamen Machon et al. (2003) an *S. spiralis*.

Häufig wird bei solchen Ergebnissen von einem Genfluss ausgegangen, der in der Vergangenheit lag (Hornemann et al. 2012) und heute, wenn überhaupt noch, nur limitiert vorhanden ist. Gerade bei langlebigen Arten können genetische Reaktionen auf sich ändernde Umweltbedingungen erst verzögert gezeigt werden (Ewers und Didham 2006). Auch eine Isolation sollte eine solche verzögerte genetische Reaktion bedingen können.

Inwiefern sich die genetische Differenzierung der hessischen Populationen über die Zeit verändert haben, ob sie früher eine geringere genetische Differenzierung aufwiesen, oder damals schon eine moderate genetische Diversität zeigten, lässt sich anhand der vorliegenden Daten

nicht sagen. Beobachtungen der genetischen Struktur anhand episodischer Prüfung könnten weitere Aufklärung zu möglichen Differenzierungsprozessen liefern. Die vorliegenden Daten zeigen lediglich eine Momentaufnahme und lassen nur Vermutungen in dieser Hinsicht zu. Um einen zukünftigen Trend vorhersagen zu können, würden genetische Daten aus früheren Jahren benötigt werden. Messbare Drift-Effekte sind durch die vergleichsweise hohen Werte der genetischen Diversität nicht zu vermuten.

Cypripedium calceolus

Bisher konnten keine aussagekräftigen populationsgenetischen Ergebnisse zu der genetischen Diversität oder der populationsgenetischen Struktur von *C. calceolus* generiert werden. Problematisch war hierbei der Prozess der Primerfindung und Optimierung. Vorversuche und Verfahren konnten nicht reproduziert werden und bereits geringe Abweichungen der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration zeigten teilweise starke Veränderungen der Bandenmuster in den Produkten der PCR. Geringe Abweichungen zwischen Bandenmustern gelten als normal, gerade bei anonymen Verfahren, wie es bei ISSR der Fall ist. Eine grundlegende Reproduzierbarkeit ist jedoch auch hier wichtig. Dass leichte Veränderungen von wenigen Grad (hier in den Versuchen von 0,5°C) bereits deutliche Unterschiede in den Bandenmustern zeigten, deutet auf ein empfindliches System hin. Bei den anderen Orchideenarten unserer Untersuchungen, zeigten sich keine Einflüsse solcher minimalen Schwankungen, sie erwiesen sich als robuster.

Eine mögliche Erklärung für diese Schwankungen könnte die Genomgröße liefern. Im Gegensatz zu den anderen Arten in diesem Projekt, hat *C. calceolus* ein sehr großes Genom. Es liegt bei $1C = 32,35\text{pg}$, während das Genom von beispielsweise *S. spiralis* bei $1C = 3,87\text{pg}$ liegt (Leitch et al. 2019). Die durchschnittlichen Genomgrößen der weiteren Gattungen liegen für *Anacamptis* bei $7,88\text{pg}$, für *Dactylorhiza* bei $5,87\text{pg}$, für *Herminium* bei $7,40\text{pg}$ und bei *Neotinea* bei $12,21\text{pg}$ (Leitch et al. 2009). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Genomgröße einen negativen Einfluss auf den Erfolg bei verschiedenen Fingerprint-Methoden hat (Garner 2002; Fay et al. 2005). Bei Orchideen mit einer Genomgröße bis zu 10pg kann die genetische Vielfalt abgeschätzt werden, während bei größeren Genomen Banden nicht stark genug amplifiziert werden, oder ein „Hintergrundrauschen“ vorlag (Fay et al. 2005).

Durch mehrfaches Testen desselben Primers, wollten wir herausfinden, wie zuverlässig einige Primer sind. Da es bei manchen Primern Abweichungen gab, bei anderen aber nicht lässt, sich vermuten, dass nur einige Primer nicht reproduzierbar sind, andere aber schon. Eine Begründung hierfür könnten die Häufigkeiten der Primersequenzen im Genom sein.

Um w

Dactylorhiza majalis

Dactylorhiza majalis wies mit 281 Individuen in 20 Populationen den größten Datensatz in dieser Untersuchung auf. Die genetische Diversität rangiert bei der ISSR Analyse zwischen $H_j = 0,264$ mit der Population EB und $H_j = 0,343$ bei der Population FA, während die Werte bei der SCoT Analyse zwischen $H_j = 0,186$, ebenfalls bei Population EB, und $H_j = 0,302$ bei der Population PF_ I liegen. Diese Werte zeigen eine moderate genetische Diversität, welche auch von Naczk und Zięta (2019) bei einer Studie an *D. majalis* subsp. *majalis* in Nord-Polen gefunden

wurden ($H_e=0,315-0,522$, Mikrosatelliten) mit einer ähnlich hohen Individuen Anzahl (312 Individuen in 16 Populationen). Der Großteil der genetischen Varianz liegt innerhalb der Populationen und weist bei der ISSR eine moderate genetische Differenzierung ($\Phi_{PT} = 0,079$; $p=0,001$) und bei SCoT eine geringe genetische Differenzierung auf ($\Phi_{PT} = 0,044$; $p = 0,001$). Dies ist in der Studie bei Naczk und Zięta (2019) nicht der Fall hier liegt eine höhere Differenzierung zwischen den Populationen vor ($F_{st}=0,101$). Allerdings haben auch Sie eine hohe Varianz zwischen den Individuen gefunden (84%). Die PCoA und STRUCTURE Analysen zeigen in unserer Studie deutlich, dass hier keine Clusterbildungen nach Populationen erkennbar ist, die Population EB zeigt jedoch eine teilweise Abgrenzung zu den anderen Populationen. Ein Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz konnte nicht identifiziert werden. Nordström und Hedrén (2008) zeigen in ihrer Studie am *Dactylorhiza*-Komplex, dass die Hybridisation eventuell ein Schlüssel zur Variation und Diversität in dieser Gattung sein könnte, da es nach wie vor an einigen Stellen schwierig ist die Arten klar zu differenzieren (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005, S. 319–322; Eccarius 2016). Es zeigt sich aber das in den Hessischen Population anhand der hier aufgestellten Daten es noch zu keiner deutlichen Differenzierung zwischen den Populationen gekommen ist. Da sie eine der wenigen Arten ist die noch in allen Bundesländern Deutschlands vorhanden ist (64% nach 1980 (Kretzschmar 2018, S. 95)), ist trotz allem ein deutlicher Rückgang zu beobachten (84% vor 1980 (Kretzschmar 2018; Eccarius 2016)).

Herminium monorchis

Die zwei untersuchten Populationen von *H. monorchis* zeigten in beiden Analysen eine ähnliche genetische Diversität $H_j = 0,34$ bis $H_j = 0,369$. Auch der Großteil der genetischen Varianz liegt in beiden Analysen innerhalb der Populationen und wies eine moderate genetische Differenzierung auf. Die PCoA zeigt in beiden Markersystemen für die beiden untersuchten Populationen, bis auf wenige Ausnahmen, getrennte Cluster.

Wie bei *Anacamptis morio*, sind die Werte der genetischen Diversität trotz der Isolation der Populationen voneinander bemerkenswert hoch, besonders da der aktuelle Bestand dieser Art so gering ist, dass von den fünf Vorkommen, die uns laut Fundpunktdaten aktuell bekannt sind, nur zwei Vorkommen beprobt werden konnten. Nach Kull et al. (2016) ist *H. monorchis* eine der am meisten bedrohten Arten in Europa. Auch die aktuelle Verbreitung in Deutschland von nur 3,5% (Kretzschmar 2018, S. 156), und der Status von mindestens stark gefährdet in Europa (Ulrich 2022), bestätigen diese Aussage.

Da von fünf Vorkommen in unseren Beprobungszeitraum (2023 und 2024) nur zwei Vorkommen aufgefunden werden konnten, ist es schwierig zuverlässige genetische Aussagen für die hessischen Populationen von *H. monorchis* zu machen. Auch in der Literatur sind keine anderen genetischen Studien an dieser Art aus Europa zu finden, welche einen Vergleich der Daten zuließe. Umso wichtiger ist es, dass sichergestellt wird, ob auf den verbliebenen Standorten intakte Populationen vorhanden sind. Ein engmaschiges Monitoring dieser Art von Experten wird daher empfohlen.

Sind bei den anderen drei Standorten noch Pflanzen aufzufinden, sollten auch bei nur wenigen Individuen Proben für genetische Untersuchungen gesammelt werden. Anhand dieser Proben kann herausgefunden werden, ob diese Populationen mit Samenmaterial von den anderen zwei

Standorten unterstützt werden könnten, um die Individuenzahl der Standorte zu stärken und die genetische Struktur von *H. monorchis* in Hessen zu erfassen.

Neotinea ustulata

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen zeigen eine moderate genetische Differenzierung der Populationen in beiden Markersystemen. Der Großteil der genetischen Variabilität lag hier innerhalb der Populationen. Deutlich voneinander abgrenzbare Cluster ließen sich in der PCoA nicht erkennen, wobei auch keine übermäßige Durchmischung der Populationen zu sehen war. Eine tendenzielle Abgrenzung der Population HE ist vorhanden. Die Werte der genetischen Diversität lagen im Mittel bei der ISSR- Analyse bei 0,283 und bei der SCoT-Analyse bei 0,321. Eine Korrelation zwischen der genetischen und der geografischen Distanz konnte nicht gezeigt werden.

Ähnlich, wie bei anderen Studien mit isolierten, langlebigen und seltenen Arten, scheint ein aktueller Genfluss zwischen den Populationen eher unwahrscheinlich (Hornemann et al. 2012). Insektenbestäuber haben meist einen Aktionsradius von nur wenigen Kilometern und könnten eine solche Entfernung, wie sie bei den meisten uns bekannten Standorten vorliegt, nicht überwinden. Verbreitungskarten, die die Vorkommen von vor und nach 1980 vergleichen, zeigen (wie bei den meisten Orchideen) einen deutlichen Rückgang der bekannten Standorte (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005, S. 641; Kretzschmar 2018, S. 171), sodass die Distanzen zwischen den einzelnen Vorkommen größer geworden sind.

Die Werte der genetischen Diversität sind auf einem ähnlichen Niveau, wie die Daten von *Anacamptis morio*. Auch hier sind die Werte in Anbetracht der hauptsächlich kleinen und isolierten Populationen erfreulich.

Genaue Aussagen sind jedoch schwer abzuschätzen, aufgrund der geringen Stichprobenanzahl von nur sechs untersuchten Populationen. Auch die Anzahl der untersuchten Individuen der Populationen, schwankte zwischen einem und 15 Individuen, wobei nur an zwei der sechs Populationen eine Anzahl von über 10 beprobten Individuen erreicht werden konnte (Population HE mit 11 und EF mit 15). Bei den anderen vier Populationen konnten nur zweimal ein Individuum beprobt werden (Population OS und RA), bei Population HB zwei Individuen und bei Population BB drei Individuen. Da eine AMOVA und AFLPsurv Berechnungen auf Mittelwerten basieren, konnten in diesen Berechnungen nur vier Populationen einfließen und repräsentieren somit nur zwei Drittel der untersuchten Populationen.

Spiranthes spiralis

Die Werte der genetischen Diversität liegen zwischen 0,226 und 0,284 bei der ISSR Analyse und zwischen 0,073 und 0,239 bei der SCoT Analyse. Die Ergebnisse der genetischen Struktur zeigen eine hohe genetische Differenzierung ($\Phi_{PT} = 0,169$; $p = 0,001$) bei den ISSR Markern und eine geringe genetischer Differenzierung ($\Phi_{PT} = 0,007$; $p = 0,319$) bei den SCoT Markern. Eine ebenfalls geringe genetische Differenzierung bei *S. spiralis* ($F_{ST} = 0,022$) wurde bei französischen Populationen um Paris gefunden (Machon et al. 2003). Die Berechnungen der PCoA zeigen keine eindeutige Clusterbildung, nur Population MS weist eine Tendenz zur Abgrenzung auf. Dies wird von der STRUCTURE Analyse unterstützt, die einen dominantes ge-

netisches Cluster in den Individuen zeigt, aber keine vollständige genetische Isolation der Populationen voneinander erkennen lässt. Im Hinblick auf die genetischen und geografischen Distanzen, konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden.

Die deutlichen Unterschiede zwischen den ISSR $H_j = 0,226-0,284$ / $\Phi_iPT = 0,169$ Werten und den SCoT $H_j = 0,073-0,239$ / $\Phi_iPT = 0,007$ Werten, können in den genutzten Methoden liegen welche bei dieser Art zu diesen Auswertungen geführt haben. Die SCoT Primer sind um die ATG-Region verankert und den hochkonservierten Regionen davor und danach (Collard und Mackill 2009), Unterschiede können bei der Methode vielleicht nicht detektiert werden, da Unterschiede unterrepräsentiert sind wegen hoher Konservierung der genetischen Regionen und die Variablere ISSR-Methode hier ihre Vorteile hat.

Die Aktuelle Verbreitung liegt bei 4,9% (Kretschmar 2018, S. 237) und ist hier auch im Rückgang begriffen, vor allem wird bei *S. spiralis* deutlich wie stark manche Orchideen von der jeweiligen Bewirtschaftung der Flächen abhängig sind. Eine Studie von Paušič et al. (2017) zeigte das eine späte Mahd bzw. Reduktion der Vegetationshöhe für eine deutlich bessere Fitness bei den Pflanzen sorgte, da diese ihre Blattrosetten über den Winter nicht zurück bilden. Für diese Wintergrüne Art ist es besonders wichtig das nach der Blüte und Samenreife die Umgebungsvegetation sehr stark zurück genommen wird (Mahd /Beweidung) und für den Winter eine sehr kurzrasige Fläche entsteht.

5.2 Keimungs- und Anzuchtversuche

Anacamptis morio

An *A. morio* wurde die Erfolgsrate der Keimung unter Licht und unter Dunkelheit untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei optisch normalen Samen unter der Keimung bei Licht eine Protokormrate von 28,29% erreicht wurde und bei der Keimung in Dunkelheit eine Protokormrate von 8,369%. Die Protokormrate der Platte unter Licht war demnach 3,5 mal höher als die, die in Dunkelheit gekeimt ist. Des Weiteren haben sich bei der Platte unter Lichteinfluss, im Untersuchungszeitraum, zwei Sprosse entwickelt. Dies konnte bei der Platte in Dunkelheit nicht beobachtet werden.

Wir konnten zeigen, dass *A. morio*, sowohl unter Licht als auch unter Dunkelheit keimfähig ist. Es lässt sich vermuten, dass *A. morio* unter einem gewöhnlichen Tag-Nacht-Rhythmus besser keimt als unter Ausschluss von Licht. Eine statistisch relevante Aussage kann hierzu leider nicht gemacht werden, da die Stichprobe zu gering ist. Durch wenig Samenmaterial und das Risiko einer Kontamination, ist es schwierig eine ausreichend große Stichprobe für Aussagekräftige Ergebnisse zu generieren.

Obwohl seit Längerem die Annahme gilt, dass terrestrische Orchideen ausschließlich/besser in Dunkelheit keimen, gibt es Studien, die diese These in Frage stellen und den Einfluss von Licht auf die Keimung von Erdorchideen untersuchen. Verallgemeinernde Aussagen zum Einfluss von Licht auf die Keimung von Orchideensamen scheinen artspezifisch zu sein und bedürfen daher weiterer Untersuchungen (Arditti et al. 1981). Dulić et al. (2019) zeigten, dass die Photoperiode keinen Einfluss auf *Himantoglossum jankae* Samen hatte, wohl aber auf *Spiranthes spiralis*. Eine Photoperiode von 16 Stunden Licht hatte dort einen positiven Effekt auf die Embryo- und Protokormentwicklung. Es zeigte sich eine schnellere Entwicklung, einen höheren Anteil an Rhizoiden und Trieben, sowie die Bildung von einem ersten und zweiten Blatt im

Vergleich zu Dunkelheit. Auch innerhalb der gesamten Gattung *Spiranthes* würde für optimale Entwicklung Licht benötigt werden (Zale et al. 2021).

An türkischem Samenmaterial von *A. morio* konnte auf unterschiedlichen Medien in Dunkelheit eine Protokormrate von 16,09 – 70,42% festgestellt werden (Kemec Hürkan et al. 2018). Gerade auf dem Medium, dass sich wie unseres an den Vorgaben von Malmgren orientiert, konnte mit 70,42% eine deutlich höhere Protokormrate erreicht werden. Mögliche Unterschiede könnten im Samenmaterial begründet sein. Weiterhin wurden die Samen bei Kemec Hürkan et al. (2018) bei einer Temperatur von ca. 18°C kultiviert, diese lag 2-3°C unter unserer Temperatur. Inwiefern dies ein Unterschied macht, würde Gegenstand weitere Untersuchungen sein.

Cypripedium calceolus

Für die Ermittlung der Protokormraten aus 2025 wurden selbstbestäubte und fremdbestäubte Kapseln von zwei verschiedenen Standorten unterschieden. Die Kapseln wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die gesamte Samenanzahl auf den Platten variiert zwischen 356 und 2505, von denen keine optisch unterentwickelte Samen identifiziert werden konnten. Die Protokormraten variieren sowohl zwischen, als auch innerhalb der Standorte, ebenso wie sie innerhalb der Bestäubungssysteme und zwischen den Bestäubungssystemen variiert.

Die ermittelten Protokormraten wichen stark von den geschätzten Keimraten der Vorjahre ab. Der Grund hierfür liegt vermutlich an dem Samenmaterial selbst, da auch die Aussaaten in den Gläsern von 2025 eine nicht so hohe Protokormrate aufwiesen, wie in den Jahren zuvor. Unterentwickelte Samen waren bei *C. calceolus* nicht bzw. schwer zu identifizieren. Das Samenmaterial schien innerhalb einer Kapsel unterschiedlich entwickelte Reifegrade aufzuweisen, sodass es nicht möglich war, optisch unterentwickelte Samen von noch nicht dem derzeitigen Reifestadium entsprechenden Samen zu unterscheiden.

Das Samenmaterial wurde zu unterschiedlichen Zeiten nach der Bestäubung entnommen. Der ideale Reifezeitpunkt für eine erfolgreiche Grünaussaat ist etwa sechs Wochen nach der Bestäubung (Wagner und Hansel 1994). Dieser Prozess hängt von äußeren Faktoren ab, die den Prozess beschleunigen oder verlangsamen können. Den idealen Zeitpunkt für die Ernte abzupassen ist daher auch mit diesen Informationen schwierig. Die uns zur Verfügung stehenden Kapseln wiesen unterschiedliche Stadien auf. Während der Großteil der Samen vom 26.06.2025 weiß, breiig und demnach als frühreif zu bezeichnen war, wies der Großteil der Samen vom 23.07.2025 eine dunkle Testa aufwiesen und war demnach deutlicher entwickelt. Die geringe Keimrate könnte daher durch einen nicht idealen Erntezeitpunkt (zu früh oder zu spät) begründet sein, auch wenn unterschiedliche Reifegrade der Samen innerhalb einer Kapsel diese Effekte teilweise abpuffern könnten. Befindet sich der Großteil der Samen aber nicht in diesem idealen Reifestadium, würde auch die Keimrate sinken.

Es konnte ein Unterschied zwischen den Protokormraten aus selbstbestäubtem (9,68%) und fremdbestäubtem (3,65%) Samenmaterial beobachtet werden. Im Gegensatz zu unseren Erwartungen wies das selbstbestäubte Material eine höhere Protokormrate auf.

Neben den geringen Keimraten stellte die Zählung der Samen auf Petrischalen einige Herausforderungen dar. So war es schwierig die genaue Anzahl an Samen auf den Platten zu identifizieren, da die Samen in den frühen Stadien zusammenklebten und nicht auseinandergehalten werden konnten. Weiterhin war es schwierig das Protokormstadium zu identifizieren, da *C.*

calceolus keine Rhizoiden ausbildet, an denen bei den anderen Arten das Protokormstadium festgemacht wurde. Als Dunkelkeimer stellt sich weiterhin die Frage, inwiefern der wöchentliche Einfluss des Lichts der Stereolupe Auswirkungen auf den Keimungsprozess haben könnte.

Dactylorhiza majalis

Die Ergebnisse der Keimungsversuche zeigten auf dem Standard-Nährboden ohne Kartoffelextrakt eine Protokormrate der optisch normalen Samen von insgesamt 6,49%.

Die Keimung war grundsätzlich erfolgreich, allerdings fiel die Protokormrate nicht so hoch aus wie erwartet. Bei asymbiotischen Keimungen mit *D. majalis* konnten (Rasmussen et al. 1990) eine maximale Keimrate von 21% erzielen, als sie den Einfluss von der Temperatur auf die Keimung untersuchten. Die Spitzenkeimungen konnten hier in einem Bereich zwischen 23,5°C bis 25,7°C ermittelt werden, während sie bei einer höheren Temperatur auf 8% sank. Dies entspricht in etwa der Rate, die wir in diesem Versuch erreicht haben. Eine Temperatur über 25°C als Ursache für eine so geringe Keimrate können wir ausschließen, das Labor war klimatisiert bei Temperaturen zwischen 20°C und 22°C. Eine geringere Keimrate könnte daher zustande gekommen sein, dass die optimale Keimungstemperatur nicht erreicht wurde, wobei 6,49% auch hierfür sehr gering sind (Rasmussen et al. 1990), zumal nach Malmgren und Vogler (2019) eine Keimrate von 100% in wenigen Wochen erreicht werden kann.

Dactylorhiza gilt als recht leicht zu vermehren (Malmgren und Vogler 2019, 2019, S. 200). Angelescu et al. (2023) trugen in ihrem Artikel die Keimraten bedrohter, terrestrischer Orchideenarten aus verschiedenen Studien zusammen. Diese zeigten bei der Gattung *Dactylorhiza* Keimerfolge zwischen 37% und 70%. Die hier erreichte Protokormrate liegt weit unter diesen Ergebnissen.

Warum bei einer recht leicht zu keimenden Art eine so geringe Protokormrate nachgewiesen wurde, ist fraglich. Mit einem Anteil von 83,31% normaler Samen, ist die Begründung der niedrigen Keimrate unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Da wir unsere Protokolle nach denen von Malmgren und Vogler (2019) entwickelt haben, sollte das Nährmedium den Ansprüchen der Pflanze entsprechen. Limitierende Faktoren könnte die Belüftung, oder eine nicht optimale Luftfeuchtigkeit sein. Bisherige Aussaaten wurden in Gläsern mit Schraubverschluss durchgeführt, die hier verwendeten Petrischalen haben vermutlich ein anderes Mikroklima. Laut Rasmussen (1990) benötigen *D. majalis* Samen 14 Tage Dunkelheit, um eine normale Keimrate zu erreichen. Es stellt sich hier die Frage, ob das Licht der Stereolupe bei der Zählung einen Einfluss auf die Keimrate dieser Art hatte. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Faktoren zu prüfen.

Herminium monorchis:

Im Gegensatz zu den erfolgreich durchgeführten Vorversuchen, die mit Samenmaterial von Herr M. Stühler durchgeführt wurden, konnten aus dem Samenmaterial von dem Wildstandort nur 42 Protokorme angezogen werden. Abweichungen bei der Durchführung ließen sich nicht feststellen.

Laut Malmgren und Vogler (2019, S. 214) ist die Vermehrung von *H. monorchis* relativ leicht. Bereits nach 4 Wochen beträgt die Keimrate 30-50%. Dies konnten wir in unserer Untersuchung nicht erreichen. Mögliche Ursachen für den geringen Erfolg könnte das Saatgut selbst

gewesen sein. Neben genetischen Faktoren, wie der Infertilität der Samen, haben auch klimatische Bedingungen einen Einfluss auf die Qualität des Saatguts. Der optische Zustand des Samenmaterials könnte daher eine erste Tendenz aufzeigen, wie keimfähig das Material ist. Optisch wies das vorhandene Samenmaterial allerdings keine größeren negativen Auffälligkeiten auf. Eine genaue Rasterzählung wie bei den Protokormratenerfassungen von 2025 wurde jedoch nicht durchgeführt, sodass eine genaue Erfassung nicht vorliegt.

Auch wenn sich durch eine optische Begutachtung schon im Vorfeld die Keimfähigkeit einzelner Samen abschätzen lässt, ist ein Keimungserfolg optisch unauffälliger Samen nicht garantiert.

Es ist schade, dass unsere Aussaatversuche mit *H. monorchis* nicht so gut funktioniert haben. Die Unterstützung der heimischen Populationen durch künstliche Anzucht wäre für die Arterhaltung wünschenswert. Kull et al. (2016) identifizierten *H. monorchis* als eine der am meisten bedrohten Arten in Europa. Auch in Deutschland sind die Populationen stark zurück gegangen (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005, S. 474), so beträgt die Verbreitung nach 1980 in Deutschland nur 3,5% (Kretzschmar 2018, S. 156). Laut der Roten Liste Hessen ist *H. monorchis* in Kategorie 2, stark gefährdet eingeordnet (HLNUG 2019). Weiterhin konnten in dieser Studie durch die Fundpunkt-Daten des HLNUG und die Kontakte zum Arbeitskreis Heimische Orchideen Hessen sehr wenig Vorkommen identifiziert und nur zwei Standorte beprobt werden.

Die aktuelle Situation von *H. monorchis* ist daher alarmierend, trotz der hohen genetischen Diversitätswerte, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Samenmaterial sollte weiter für Anzuchten verwendet werden, um die Populationen zu stützen, oder verschollene Standorte wieder anzupflanzen, gerade weil es laut (Malmgren und Vogler 2019, S. 214) und unserer eigenen Vorversuche recht einfach ist, *H. monorchis* zu kultivieren.

Neotinea ustulata

Die Keimungsversuche von *N. ustulata* waren nicht erfolgreich. Es konnte sich nur ein Protokorm auf den untersuchten Platten entwickeln. Das Samenmaterial stammt von einer 34cm Pflanze. Die Pflanze stand auf einer Teilfläche des Untersuchungsgebiets, das nicht Teil der Bestäubung durch uns gewesen ist.

N. ustulata hat generell den Ruf, nicht gut zur Keimung gebracht werden zu können, auch wir hatten mit unseren Methoden keinen Erfolg.

Grundsätzlich war das Samenmaterial der unterschiedlichen Teilflächen in unterschiedlich gutem Zustand. Während das frühreife Samenmaterial noch so undifferenziert war, dass sich hier keine optischen Unterschiede ausmachen ließen, zeigten ältere Reifestadien eine Differenzierung der Samen in optisch normale Samen und in optisch unterentwickelte Samen. Das reife, bzw. nahezu reife Samenmaterial, der Pflanzen, die von uns bestäubt wurden, wies einen Anteil optisch normaler Samen von unter 40% auf. Das Samenmaterial der Pflanze auf der Hauptfläche besaß sogar nur einen Anteil von 4% auf. Die 34cm Pflanzen auf der zweiten Teilfläche hingegen besaßen zwischen 40-80% normaler Samen.

Laut (Rasmussen 1995) hängt die Anzahl keimfähiger Samen von einer effektiven Bestäubung ab. Ausschlaggebend ist hierbei, ob ausreichend Pollen auf die Narbe gelangt ist, ist dies nicht der Fall, kann das bei manchen Arten problematisch sein (Rasmussen 1995). Dies könnte ein Grund für die geringe Keimrate sein.

Weiterhin haben äußere Faktoren wie Wetter und Temperatur einen Einfluss auf die Qualität des Samenmaterials (Hornemann et al. 2012). Die beobachteten Witterungsbedingungen in Kombination mit der Lage und Ausrichtung der Flächen, können eine Begründung für die unterschiedlichen Zustände des Samenmaterials liefern. Die Hauptfläche und die von uns bestäubten Teilfläche waren deutlich trockener und der Anteil der optisch unterentwickelten Samen deutlich höher als bei der Teilfläche mit der 34 cm Pflanzen, welche näher am Wald standen, wodurch das warme und trockene Wetter abgepuffert worden sein könnte. Zudem standen am unteren Ende dieser Teilfläche *Dactylorhiza majalis* Pflanzen, die feuchtere Habitat bevorzugen (Arbeitskreis Heimischer Orchideen 2005). Einen ähnlichen Zusammenhang kann auch zwischen dem Zustand der Mutterpflanzen auf den Flächen gezogen werden. Die Pflanzen auf der zweiten Teilfläche waren deutlich größer und in einem deutlich besseren Zustand als die Pflanzen auf den anderen Flächen. Die Beobachtungen bestätigen daher, dass *N. ustulata* eine Art zu sein scheint, die nicht trockenresistent ist (Tali et al. 2004). Eine Erklärungsversuch, weshalb die Pflanze trotzdem eher auf trockenen Standorte zu finden ist, wird auf die hohe Verfügbarkeit von Licht zurückgeführt, was positiv für *N. ustulata* sein könnte (Adamska et al. 2025).

Eine weitere interessante Beobachtung war an den 34cm Pflanzen zu sehen. Hier fiel auf, dass sich nur an den jüngeren Blüten Kapseln entwickelten. Dies deutet auf eine Verschiebung der Rhythmen zwischen Pflanzen und Insekten hin, die bei Orchideen durch einen wärmeren Frühling vorkommen können (Robbirt et al. 2014).

Die ökologischen Gegebenheiten deuten auf einen starken Einfluss von Wetter und Temperatur hin. Im Zuge des Klimawandels, wird es zu höheren Temperaturen und andauernder Trockenheit kommen. Unter dem Aspekt, dass Beobachtungen unsererseits bereits unter den aktuellen Bedingungen eine verringerte Fitness und Vitalität zumindest auf der Hauptfläche und der ersten Teilfläche feststellen konnten, kann man vermuten, dass diese Effekte mit steigenden Temperaturen und ausbleibendem Niederschlag kritische Auswirkungen auf die vorhandene Population haben könnten. Auch der Hinweis auf eine Asynchronität von Bestäubern und Pflanzen, ist bedenklich. Unter diesen Umständen sind populationsstützende Maßnahmen durch erfolgreiche Anzuchten zu empfehlen. Einer Etablierung künstlicher Anzuchten von *N. ustulata* sollte daher Priorität eingeräumt werden, zumal die aktuelle Verbreitung der Art in Deutschland nur 11% beträgt (Kretzschmar 2018, S. 171).

Spiranthes spiralis

Eine Schwierigkeit mit der Anzucht von *S. spiranthes* Samen war, dass häufig Kontaminationen auftraten, trotz grünlicher Desinfektion der Samen und Kapseln. Die Kapseln von *S. spirales* reifen zwischen Oktober und November, zwei potenziell sehr regnerische Monate. Möglicherweise war das Samenmaterial nicht ausreichend getrocknet, wodurch schnell eine Pilzkontamination auf dem Anzuchtmedium auftreten konnte. Als Konsequenz haben wir das Samenmaterial bei der nächsten Entnahme länger trocknen lassen und erst ein paar Tage nach der Ernte auf das Aussaatmedium ausgebracht. Des Weiteren hat *S. spiralis* eine relativ kurze Bleichzeit, im Vergleich zu anderen Arten, wodurch Pilze und Bakterien nicht vollständig abgetötet werden und so Aussaaten kontaminieren können (Zale et al. 2021).

Bei *S. spiralis* wurde 2025 die Protokormrate von Aussaatmedium mit und ohne Kartoffelextrakt untersucht. Hierbei ergab sich eine Protokormrate der optisch normalen Samen von

45,21% mit Kartoffelextrakt und 40,93% ohne Kartoffelextrakt. Der Anteil der optisch normalen Samen variierte sehr stark zwischen 26,7% und 94,93%. Bei einer durchschnittlichen Samenanzahl von 800 pro Kapsel (Machon et al. 2003), ergibt sich eine vom Wildstandort entnommene Samenmenge von 11200 Samen, mit einer Protokormrate von 16,69%.

Die Keimraten der beiden Aussaatmedien liegen sehr nah beieinander. Es konnte nur ein Unterschied von 5% zwischen den beiden Nährmedien gezeigt werden. Eine erfolgreiche Keimung ist daher auf beiden Aussaatmedien möglich. Die Gattung *Spiranthes* gilt als sehr anpassungsfähig an verschiedene Nährmedien und Substrate und lässt auf eine Übertragbarkeit der angewendeten Protokolle von Arten innerhalb dieser Gattung schließen (Zale et al. 2021). Neben einer hohen Bandbreite an möglichen Medien, ist für die optimale Entwicklung von *S. spirantes* Licht notwendig, auch wenn die Pflanze im Dunkeln keimfähig ist (Dulić et al. 2019; Zale et al. 2021). Eine Wiederholung der Versuche unter einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus würden die Erfolgsrate sehr wahrscheinlich erhöhen.

Die Protokormrate von 16,69% des gesamten vom Wildstandort entnommenen Samenmaterials erscheint im ersten Moment nicht sonderlich hoch, wobei Orchideen generell einen sehr hohen Samenansatz im Verhältnis zu einer geringen Keimrate haben, die in der Natur nur 0,2-0,3% betragen kann. Eine Keimrate von knapp 17 Prozent des gesamten entnommenen Samenmaterials ist daher als gut zu bewerten.

Fazit

Abgesehen von *C. calceolus*, zu der noch keine Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung vorliegen, waren die Analysen erfolgreich. Die genetische Diversität der meisten Arten/Populationen war höher als erwartet. Bei allen Arten befindet sich der Großteil der genetischen Varianz innerhalb der Populationen. Die populationsgenetischen Analysen deuten daher auf einen genetischen Austausch hin, der bedingt durch die aktuelle Isolation der Populationen, wahrscheinlich in der Vergangenheit liegt.

Die Kulturexperimente ergaben, erfolgreiche Anzuchten von *A. morio*, *C. calceolus*, *D. majalis*, und *S. spiranthes*. Die Versuche zu *H. monorchis* und *N. ustulata* waren in diesem Projekt leider nicht erfolgreich. Gerade hier besteht weiterer Forschungsbedarf, um in Zukunft Individuen aus diesen Arten anzuziehen, da sowohl *H. monorchis* als auch *N. ustulata* in Hessen von einem enormen Rückgang betroffen sind. Bei unseren Untersuchungen konnten nur zwei Standorte von *H. monorchis* aufgefunden werden und von sechs *N. ustulata* – Standorten Proben genommen werden.

Trotz der erfreulichen populationsgenetischen Erkenntnisse, dass in den hier untersuchten Arten noch keine Hinweise auf Inzuchteffekte detektiert werden konnten, sind populationsstärkende Maßnahmen an allen Orchideen zu empfehlen. In Erster Linie müssen die Standorte entsprechend der Bedürfnisse der Arten gepflegt werden bzw. für einige Arten auch nach klimatisch günstigeren Standorten geschaut werden. Da alle hier untersuchten Orchideen Arten in erster Linie durch den Verlust ihres Lebensraumes betroffen sind, müssen hier als erstes Maßnahmen ergriffen werden, um vorhandene Standorte entsprechend zu sichern.

Aus dem Projekt entstandene Publikationen

Metzsch J. & Cilgin K., Müller C. M., Wissemann V. (2023) Diversity of Hessian Orchids, their artificial view, culture and reintroduction, Section Meeting Biodiversity & Evolutionary Biology of the German Botanical Society, Justus-Liebig-University, Gießen, Germany.

Metzsch J. & Cilgin K., Müller C. M., Wissemann V. (2023) Diversität hessischer Orchideen, ihre künstliche Anzucht, Kultur und Wiederausbringung, Landesnaturschutztagung, Gießen, Germany.

Metzsch J. & Cilgin K., Müller C. M., Wissemann V. (2024) Diversity of Hessian Orchids, their artificial cultivation, culture and replanting - first results, Botaniker-Tagung International Conference of the German Society for Plant Science (DBG), Halle/ Saale, Germany.

Metzsch J., Müller C. M., Wissemann V. (2025) Population genetics in the Hessian endangered orchid *Anacamptis morio* (L.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase – first results, Section Meeting Biodiversity & Evolutionary Biology of the German Botanical Society, University of Heidelberg.

Cilgin K., Müller C. M., Wissemann V. (2025) The genetic diversity of *Herminium monorchis* (L.) R. Br. In Hesse and its implications for conservation, Section Meeting Biodiversity & Evolutionary Biology of the German Botanical Society, University of Heidelberg.

Geplante Veröffentlichungen:

Kardelen Çilgin Doktorarbeit 2026

Julia Metzsch Doktorarbeit 2027

und die damit verbundenen Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Literaturverzeichnis

- Adamska, Agnieszka; Kozub, Łukasz; Kucharzyk, Jan; Łazarski, Grzegorz; Dembicz, Iwona (2025): Habitat extremity promotes the survival of rapidly declining orchid *Neotinea ustulata* in Poland. In: *Preslia* 97 (2), S. 217–239. DOI: 10.23855/preslia.2025.217.
- Anghelescu, Nora E.; Vafaei, Yavar; Ahmadzadeh, Kolsum (2023): Asymbiotic Seed Germination in Terrestrial Orchids: Problems, Progress, and Prospects. In: Pragya Tiwari und Jentsung Chen (Hg.): *Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics*. Singapore: Springer Nature Singapore, S. 221–260.
- Arbeitskreis Heimischer Orchideen (Hg.) (2005): *Die Orchideen Deutschlands*. Uhlstädt-Kirchhasel: Verlag der Arbeitskreis Heimische Orchideen Deutschlands.
- Arditti, Joseph (1984): An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. In: *Botanical Journal of the Linnean Society* 89.
- Arditti, Joseph; Michaud, Justine D.; Oliva, Allison P. (1981): Seed Germination of North American Orchids. I. Native California and Related Species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. In: *Botanical Gazette* 142 (4).
- Barthlott, Wilhelm; Große-Veldmann, Bernadette; Korotkova, Nadja (2014): Orchid seed diversity. A scanning electron microscopy survey. Berlin: Botanic Garden and Botanic Museum Berlin-Dahlem (Englera, 32).
- Bektas, Ersan; Cüce, Mustafa; Sökmen, Atalay (2013): In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. In: *Turkish Journal of Botany*. DOI: 10.3906/bot-1205-28.
- Collard, Bertrand C. Y.; Mackill, David J. (2009): Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. In: *Plant Mol Biol Rep* 27 (1), S. 86–93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.
- Dogan, Bekir; Duran, Ahmet; Bagci, Yavuz; Dinc, Muhittin; Martin, Esra; Cetin, Ozlem; Ozturk, Meyem (2010): Phylogenetic Relationships Among the Taxa of the Genus *Joherenia* Dc. (Apiaceae) from Turkey Based on Molecular Method. In: *Bangladesh J. Plant Taxon* 17 (2), S. 113–120. DOI: 10.3329/bjpt.v17i2.6693.
- Dulić, Jovana; Ljubojević, Mirjana; Ognjanov, Vladislav; Barać, Goran; Dulić, Tamara (2019): In vitro germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz & Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. In: *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 55 (4), S. 380–391. DOI: 10.1007/s11627-019-09997-z.
- Eccarius, Wolfgang (2016): *Die Orchideengattung Dactylorhiza*. Phylogenie, Taxonomie, Morphologie, Biologie, Verbreitung, Ökologie und Hybridisation. 1. Auflage. Eisenach: W. Eccarius.
- Ellstrand, Norman C.; Elam, Diane R. (1993): Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. In: *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, S. 217–242.

- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. In: *Molecular ecology* 14 (8), S. 2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Ewers, Robert M.; Didham, Raphael K. (2006): Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 81 (1), S. 117–142. DOI: 10.1017/S1464793105006949.
- Fay, Michael F.; Cowan, Robyn S.; Leitch, Ilia J. (2005): The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. In: *Annals of Botany* 95 (1), S. 237–246. DOI: 10.1093/aob/mci017.
- Garner, Trent W. J. (2002): Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. In: *Genome* 45 (1). DOI: 10.1139/g01-113.
- Gholami, Soheila; Vafaei, Yavar; Nazari, Farzad; Ghorbani, Abdolbaset (2021): Molecular characterization of endangered Iranian terrestrial orchids using ISSR markers and association with floral and tuber-related phenotypic traits. In: *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology* 27 (1), S. 53–68. DOI: 10.1007/s12298-020-00920-0.
- Harzli, Ines; Özdenir Kömpe, Yasemin (2025): Impact of Fungal Symbionts of Co-occurring Orchids on the Seed Germination of *Serapias orientalis* and *Spiranthes spiralis*. In: *Current microbiology* 82 (2), S. 79. DOI: 10.1007/s00284-024-04055-3.
- HLNUG (2019): Rote Liste der Farn- und Samenpflanzen Hessens. - 5. Fassung. Wiesbaden. Online verfügbar unter https://www.hlnug.de/fileadmin/dokumente/naturschutz/Rote_Listen/RL_HE_Farn-_und_Samenpflanzen_Fassung5_2019.pdf, zuletzt geprüft am 28.04.2026.
- Hornemann, Gitte; Michalski, Stefan; Durka, Walter (2012): Short-term fitness and long-term population trends in the orchid *Anacamptis morio*. In: *Plant Ecology* 213 (10).
- IUCN (2026): IUCN Red List of Threatened Species. Online verfügbar unter https://www.iucnredlist.org/terms/terms-of-use#2.%20Copyrights_Ownership, zuletzt aktualisiert am 29.04.2026, zuletzt geprüft am 29.04.2026.
- Jacquemyn, Hans; Hutchings, Michael J. (2010): Biological Flora of the British Isles: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. In: *Journal of Ecology* 98 (5), S. 1253–1267. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2010.01701.x.
- Jakobsson, Mattias; Rosenberg, Noah A. (2007): CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (14), S. 1801–1806. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm233.
- Jersáková, Jana; Malinová, Tamara (2007): Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. In: *The New phytologist* 176 (2), S. 237–241. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02223.x.
- Kemec Hürkan, Yasemin; Hürkan, Kaan; Aki, Cüneyt (2018): Comparative growth media performances on in vitro propagation of some salep orchids. In: *Anadolu University Journal*

of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology (1), S. 52–62. DOI: 10.18036/aubtdc.331328.

Knudson, Lewis (1922): Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. In: *The Botanical Gazette* 73 (1), 1–25.

Kretzschmar, Horst (2018): Die Orchideen Deutschlands. Finden und Bestimmen. 3. Auflage. Wiebelsheim: Quelle & Meyer Verlag GmbH.

Kull, Tiiu; Selgis, Ulvi; Peciña, Miguel Villoslada; Metsare, Mirjam; Ilves, Aigi; Tali, Kadri et al. (2016): Factors influencing IUCN threat levels to orchids across Europe on the basis of national red lists. In: *Ecology and evolution* 6 (17), S. 6245–6265. DOI: 10.1002/ece3.2363.

Leitch, I. J.; Johnston, E.; Pellicer, J.; Hidalgo, O.; Bennett, M. D. (2019): Angiosperm DNA C-values database (release 7.1, Apr 2019). Online verfügbar unter <https://cvalues.science.kew.org/>, zuletzt geprüft am 12.04.2026.

Leitch, I. J.; Kahandawala, I.; Suda, J.; Hanson, L.; Ingrouille, M. J.; Chase, M. W.; Fay, M. F. (2009): Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. In: *Annals of Botany* 104 (3), S. 469–481. DOI: 10.1093/aob/mcp003.

Li, Yu-Long; Liu, Jin-Xian (2018): StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. In: *Molecular ecology resources* 18 (1), S. 176–177. DOI: 10.1111/1755-0998.12719.

Lynch, Michael; Milligan, B. G. (1994): Analyses of populations genetic structure with RAPD marker. In: *Molecular ecology* 3, S. 91–99.

Machon, Nathalie; Bardin, Philippe; Mazer, Susan J.; Moret, Jacques; Godelle, Bernard; Austerlitz, Frederic (2003): Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. In: *New Phytologist* 157, S. 677–687.

Malmgren, Svante; Vogler, Irmin (2019): Erdorchideen. Naturschutz und Kultur im Garten. Münster: Natur und Tier- Verlag GmbH.

Nabieva, Aleksandra Yurievna (2021): Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Orchis militaris*, an endangered orchid in Siberia. In: *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19 (1), S. 122. DOI: 10.1186/s43141-021-00223-1.

Nacz, Aleksandra M.; Ziętara, Marek S. (2019): Genetic diversity in *Dactylorhiza majalis* subsp. *majalis* populations (Orchidaceae) of northern Poland. In: *Nordic Journal of Botany* 37 (4), Artikel njb.01989. DOI: 10.1111/njb.01989.

Nicolè, Florence; Brzosko, Emilia; Till-Bottraud, Irène (2005): Population viability analysis of *Cypripedium calceolus* in a protected area: longevity, stability and persistence. In: *Journal of Ecology* 93 (4), S. 716–726. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2005.01010.x.

Nordström, Sofie; Hedrén, Mikael (2008): Genetic differentiation and postglacial migration of the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri*/lapponica complex into Fennoscandia. In: *Pl Syst Evol* 276 (1–2), S. 73–87. DOI: 10.1007/s00606-008-0084-1.

- Opitz, Andreas; Müller, Christina M.; Gemeinholzer, Birgit; Wissemann, Volker (2018): Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen Populationen von *Cypripedium calceolus*. In: *Botanik und Naturschutz in Hessen* 30.
- Paušič, Igor; Kaligarič, Mitja; Bakan, Branko (2017): Late seasonal mowing enhances central European *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. (Orchidaceae) population viability. In: *Botany Letters* 164 (4), S. 401–412. DOI: 10.1080/23818107.2017.1396495.
- Peakall, Rod; Smouse, Peter E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (19), S. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Peterson, Brant K.; Weber, Jesse N.; Kay, Emily H.; Fisher, Heidi S.; Hoekstra, Hopi E. (2012): Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. In: *PloS one* 7 (5), e37135. DOI: 10.1371/journal.pone.0037135.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. In: *Genetics* 155 (2), S. 945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.
- Rasmussen, H.; Andersen, T. F.; Johansen, B. (1990): Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. In: *Plant Cell & Environment* 13 (2), S. 171–177. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1990.tb01289.x.
- Rasmussen, Hanne N. (1990): Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. In: *New Phytologist* 116 (1), S. 137–147. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00519.x.
- Rasmussen, Hanne N. (1995): Terrestrial Orchids. from seed to mycotrophic plant: Cambridge University Press.
- Reed, David H.; Frankham, Richard (2003): Correlation between Fitness and Genetic Diversity. In: *Conservation Biology* 17, S. 230–237.
- Robbirt, Karen M.; Roberts, David L.; Hutchings, Michael J.; Davy, Anthony J. (2014): Potential disruption of pollination in a sexually deceptive orchid by climatic change. In: *Current biology : CB* 24 (23), S. 2845–2849. DOI: 10.1016/j.cub.2014.10.033.
- Rosenberg, Noah A. (2004): Distruct : a program for the graphical display of population structure. In: *Molecular Ecology Notes* 4 (1), S. 137–138. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.
- Rossi, W.; Corrisas, B.; Arduino, P.; Cianchi, R.; Bullini, L. (1992): Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. In: *Plant Syst Evol* 179, S. 43–58.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (SCBD) (2010): 2010. Global Strategy for Plant Conservation. Updated Strategy 2011-2020. Online verfügbar unter <https://www.cbd.int/gspc/about.shtml>, zuletzt geprüft am 04.08.2016.

Stange, Madlen; Barrett, Rowan D. H.; Hendry, Andrew P. (2021): The importance of genomic variation for biodiversity, ecosystems and people. In: *Nature reviews. Genetics* 22 (2), S. 89–105. DOI: 10.1038/s41576-020-00288-7.

Tali, Kadri; Foley, Michael J. Y.; Kull, Tiiu (2004): *Orchis ustulata* L. In: *Journal of Ecology* 92 (1), S. 174–184. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2004.00858.x.

Tikendra, Leimapokpam; Potshangbam, Angamba Meetei; Amom, Thoungamba; Dey, Abhijit; Nongdam, Potshangbam (2021): Understanding the genetic diversity and population structure of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.-An endangered medicinal orchid and implication for its conservation. In: *South African Journal of Botany* 138, S. 364–376. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.01.002.

Ulrich, Thomas (2022): *Herminium monorchis* - übersehen und gefährdet. In: *ORCHIS* 1, S. 10–23.

Vekemans, Xavier (2002): AFLP-SURV 1.0. A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data. Universite Libre de Bruxelles.

Wagner, Johanna; Hansel, Annika (1994): In vitro Seed Germination of *Cypripedium calceolus* L. at Various Embryogenic Stages. In: *Angewandte Botanik* 68, S. 5–9.

Wells, T. C. E.; Synge, H. (1981): The biological aspects of rare plants conservation.

Wright, Sewall (1984): Evolution and the genetics of populations a treatise in four volumes. 4. Variability within and among natural populations. 2. Dr. Chicago u.a.: Univ. of Chicago Press.

Zale, Peter J.; Clayton, Ashley; Nix, John; Taylor, Matt (2021): Asymbiotic in vitro seed germination, in vitro seedling development, and ex vitro acclimatization of *Spiranthes*. In: *Applications in plant sciences* 10, Artikel e11494, S. 1–8. DOI: 10.1002/aps3.11494.

Abkürzungsverzeichnis

SCoT	Start Codon Targeted
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
H ₂ O	destilliertes Wasser
Betain	
Mono.	Betain-Monohydrat
BSA	bovine serum albumin/ Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Taq-	<i>Thermus aquaticus</i>
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
NaClO	Natriumhypochlorit