Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. 37 (1): 30-40; 2020

Einfluss von Nährmedium und Licht auf die Höhe der Keimrate zur Bestimmung der Fitness von *Dactylorhiza majalis*

Heiner Hensen, Sandra Dullau & Sabine Tischew

Keywords:
Orchidaceae, *Dactylorhiza majalis,* vitality, fitness, germination rate, nutrient medium, light condition.

Zusammenfassung/Summary:
Hensen, H., Dullau, S. & S. Tischew (2020): Einfluss von Nährmedium und Licht auf die Höhe der Keimrate zur Bestimmung der Fitness von *Dactylorhiza majalis* – Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. 37 (1): 30-40.

Im Rahmen von Artenschutzbemühungen spielt insbesondere für kleine Populationen die Fähigkeit der Samen zur Keimung zu gelangen eine wichtige Rolle. Die Bestimmung der Keimrate kann helfen, die Fitness einer Population und damit das Aussterberisiko einzuschätzen. Für die gefährdete und einen andauernd negativen Bestandstrend aufweisende heimische Orchideenart *Dactylorhiza majalis* wurden als Grundlage für weiterführende Keimversuche drei Nährmedien und zwei Beleuchtungsvarianten auf ihre Eignung zur Keimratenbestimmung getestet. Die Verwendung von Wasser-Agar-Agar in Kombination mit einer zehntägigen Initialbeleuchtung erwies sich als besonders geeignet, ein frühes Stadium der Keimung zu erreichen und damit die Keimrate von *D. majalis* zu bestimmen.

Germination ability is important for species of conservation concern that have small population sizes. The determination of germination rate can help to assess population fitness and thus the extinction risk. We performed a germination experiment using three different nutrient media and two different lighting conditions as a basis for further experiments on *Dactylorhiza majalis*, an endangered terrestrial orchid species with declining population trend. Best result was achieved by using water agar in combination with a ten day initial lighting.

1 Einleitung

Nach erheblichen Bestandseinbußen ist *Dactylorhiza majalis* (Breitblättrige Fingerwurz) zwar auch heute noch gemeinsam mit *Dactylorhiza fuchsii* (Fuchssche Fingerwurz) die am weitesten verbreitete Orchideenart der feuchten bis nassen Standorte (BfN 2013). Der Handlungsbedarf für diese Art, für deren Erhaltung Deutschland aus globaler Perspektive in hohem Maß verantwortlich ist (Ludwig et al. 2007, BfN 2019), wächst jedoch zunehmend. *D. majalis* ist auf allen Roten Listen der Bundesländer vermerkt. Teilweise wurde die Art dort bereits in die Kategorie 2 (stark gefährdet) eingestuft. Beispielhaft für den Zustand konnten jüngst im Südharz neben dem kompletten Verlust von nahezu der Hälfte der Fundpunkte auch vielfach abnehmende Individuenzahlen beobachtet werden (Dullau et al. 2019). Verbunden mit schrumpfenden Populationen oder einer zunehmenden Isolierung stellt sich immer die Frage nach der Fitness der verbliebenden Vorkommen. Die Bestimmung der Keimrate ist dafür ein geeigneter Parameter und wird vielfach angewendet (z.B. Brunzel 2010, Steiner 2011). Als vorbereitende Untersuchung für einen groß angelegten Keimtest in Petrischalen wurden verschiedene Nährmedien und Lichtverhältnisse auf ihre Eignung hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Sammeln und Lagerung der Samen

Die verwendeten Samen stammen aus einem der drei letzten großen *Dactylorhiza majalis*-Vorkommen (> 2000 Individuen) des Biosphärenreservats Karstlandschaft Südharz. Die Samenkapseln wurden im Juli 2018 von 23 Individuen geerntet, getrocknet und anschließend 3 Monate bei 8° C dunkel gelagert. Die Samen der einzelnen Individuen wurden zu einer Mischprobe zusammengeführt.

2.2 Auswahl und Anlage der Nährmedien

Es konnten für die Gattung *Dactylorhiza* zwei geeignete und im Handel erhältliche Nährmedien recherchiert werden. TGZ-N (von E. Lucke o.J., über Röllke-Orchideen) und BM-1 (auf Hinweis von J. Ponert). Als drittes Medium wurde Wasser-Agar-Agar (8 % w/v) ohne Zugabe weiterer Nährstoffe auf seine Eignung

getestet (Agar-Agar Kobe I, Carl Roth GmbH). Ponert et al. (2011) verwendeten für *Dactylorhiza*-Keimversuche das Medium Michl-15, das jedoch nicht käuflich zu erwerben war und deswegen nicht mit in den Versuch aufgenommen wurde. Die Rezepturen können Tab. 1 entnommen werden. Die Medien wurden jeweils mit bidestilliertem Wasser und 8 % Agar-Agar (w/v, bis auf TGZ-N) angesetzt, autoklaviert und nach Messung des pH-Wertes (5,75 ± 0,5) auf Petrischalen verteilt.

Tab. 1: Rezepturen der Nährmedien. Michl-15 wurde nicht verwendet.

g/L	Inhaltsstoff	**TGZ-N** (nach Lucke o.J.)	**BM-1** (Van Waes et al. 1986)	**Wasser-Agar-Agar** (Kobe I-Carl Roth)	**Michl-15** (Michl 1988, veränd. von Ponert 2009)
Nährstoffe	KH_2PO_4	0,25	0,3		0,216
	KCl				0,150
	$MgSO_4*7H_2O$				0,246
	$MgSO_4$	0,12	0,1		
	$CaCl_2$				0,022
	$CaSO_4$	0,1			
	Fe-Chelat	0,05			
	NH_4NO_3	0,18			
	Borsäure		0,01		
	Kobaldchlorid*$6H_2O$		0,000025		
	Kupfersulfat*$5H_2O$		0,000025		
	Na_2 EDTA*$2H_2O$		0,03725		
	Eisensulfat*$7H_2O$		0,02785		
	Mangansulfat*$2H_2O$		0,025		
	Molybdänsäure*$2H_2O$		0,00025		
	Zinksulfat*$7H_2O$		0,01		
Organische Bestandteile	Caseinhydrolysat/ Pepton	0,5	0,5		0,5
	Hefeextrakt	0,5			0,5
Vitamine	Thiamin		0,0005 (HCl)		0,001
	Pyridoxin		0,0005 (HCl)		0,001
	Nikotinamid				0,001
	D-Biotin		0,00005		
	myo-Inositol		0,1		
	Folsäure		0,0005		
	Nikotinsäure		0,005		
Aminosäuren	L-Glutamin		0,1		
	Glycin		0,002		
Andere organische Bestandteile	Zitronensäure				0,192
Zucker	Sucrose	10	20		10
Sonstige	Aktivkohle	1,3			1,2
	Agar-Agar	6,5	8,0	8,0	8,0
	pH	5,75±05	5,75±05	5,75±05	5,8

2.3 Herstellung einer 5 % Calciumhypochlorit-Lösung mit pH 11,4 (± 0,1)

Für die Herstellung der Bleichlauge zur Oberflächensterilisierung der Samen wurden 16 g Ca(OCl)2 Granulat (Carl Roth, > 65 % Aktivchlorgehalt) in 100 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst. Nach 15 bis 20 Minuten Rühren wurde die Lösung, um diese zu klären, zentrifugiert und durch Filterpapier gefiltert. Über iodometrische Titration wurde ein Gehalt von 10 % an aktivem Chlor ermittelt. Durch 1:1 Verdünnung (100 ml 10 % Bleichlauge + 100 ml autoklaviertes deionisiertes Wasser) wurde die benötigte 5 % Ca(OCl)2 -Lösung hergestellt (pH 11,4 ± 0,1, s. Ponert et al. 2011). Die zur Oberflächensterilisierung von Orchideensamen ebenfalls häufig verwendete Natriumhypochlorit-Lösung scheint für *Dactyloriza majalis* ungeeignet zu sein, da Ponert et al. (2011) damit nur sehr geringe Keimraten erzielen konnten.

2.4 Oberflächensterilisation der Samen und Auslegen auf die Nährmedien

Um Verunreinigungen mit Pilzen, Bakterien oder anderen Mikroorganismen zu vermeiden, ist eine Oberflächensterilisierung der Samen vor dem Aufbringen auf die Nährmedien unerlässlich. Außerdem wird durch eine Hypochlorit-Behandlung die Keimung terrestrischer europäischer Orchideen bei Aussaaten deutlich gefördert (z.B. Brechen der Keimruhe, Weinert 1992). Die Sterilisierung erfolgte nach der Methode von Ponert et al. (2011) in mehreren Schritten mittels Einwegspritzen auf einer Sterilwerkbank. Dabei wurde zwischen die Spritze und die Kanüle (1.2 mm Ø) ein feinmaschiges Nylongewebe als Filter gesetzt. Daraufhin wurde die Spritze mit Hilfe eines gefalteten Papieres mit *Dactylohiza*-Samen befüllt. Im ersten Sterilisierungs-Schritt wurde über die Kanüle eine 70 %ige (v/v) Ethanol-Lösung so in die mit Samen befüllte Spritze gezogen, dass möglichst keine Luft mit hineingelangte und die Samen vom Alkohol umschlossen waren. Nach zwei Minuten wurde der Alkohol vorsichtig ausgespritzt, ohne dabei die Samen am Spritzenende zu zerdrücken. Es folgten drei Spülgänge mit autoklaviertem deionisiertem Wasser. Anschließend wurde die 5 % Calciumhypochlorit-Lösung, ebenfalls luftblasenfrei, aufgezogen und nach zehn Minuten wieder ausgegeben. Es folgten erneut drei Spülungen mit autoklaviertem deionisiertem Wasser. Abschließend wurde erneut ein wenig (ca. 2 ml) autoklaviertes Wasser in die Spritze aufgezogen, die Kanüle und das Nylongewebe entfernt und die Samen portionsweise (ohne Kanüle) auf die Platten gespült. Dabei reichten wenige Tropfen der im Wasser gelösten Samen

Abb. 1: Samen und Samenkapsel von *D. majalis* [H. Hensen].

Abb. 2: Oberflächensterilisation der Samen nach Ponert et al. (2011) [H. Hensen].

aus, um eine ausreichende Anzahl an Samen auf die Petrischalen zu spülen (> 100 Samen pro Petrischale). Es erwies sich dabei als günstig, die Spritzenöffnung nach oben zu halten, da die Samen in der Spritze nach oben aufstiegen, und vorsichtig solange mit dem Finger dagegen zu schnipsen, bis ein kleiner Samenklumpen bis zum Auslauf der Spritze aufgestiegen war, welcher dann auf die Petrischale gegeben werden konnte. Die Petrischalen wurden anschließend beschriftet und mit Parafilm verschlossen. Für jedes Nährmedium wurden sechs technische Replikate angefertigt, welche anschließend zu gleichen Teilen in die zwei Beleuchtungsvarianten aufgeteilt wurden. Die Petrischalen wurden invertiert im Keimschrank gelagert, um eine Austrocknung der Oberflächen der Nährmedien zu verhindern.

2.5 Beleuchtung und Temperatur im Keimschrank

Es wurden zwei Beleuchtungsvarianten getestet. Zum einen werden *Dactylorhiza*-Arten vielfach als Dunkelkeimer bezeichnet (Seaton et al. 2011). Zum anderen konnte Rasmussen et al. (1990) für *D. majalis* höhere Keimraten mittels einer zehn bis 14 tägigen Initialbeleuchtung mit weißem Licht in 16 stündigen Photoperioden mit anschließender konstanter Lagerung in Dunkelheit erzielen. Um beide Beleuchtungs-Varianten zu testen, wurden von jedem Nährmedium drei Petrischalen in Alufolie eingeschlagen (dunkel) und drei weitere Petrischalen über die Dauer von zehn Tagen jeweils 16 h mit weißem Licht beleuchtet. Der verwendete Keimschrank RuMed verfügt über jeweils zwei mal vier Leuchtstoffröhren, die Beleuchtungsstärke betrug 10.000 Lux. Die Temperatur des Keimschrankes wurde auf konstant 23° C (± 1° C) eingestellt. Nach einer zehntägigen Beleuchtung wurde das Licht ausgeschaltet.

2.6 Auszählung und Ermittlung der Keimrate

Nach 42 Tagen im Keimschrank (s. Rasmussen et al. 1990) erfolgte die Auszählung unter dem Stereomikroskop (Euromex NexiusZoom, 10× Vergröß.). Dafür wurde ein Gittermuster mit 32 Quadranten unter die Petrischalen gelegt, in jedem Quadranten alle gekeimten sowie nichtgekeimten Samen gezählt und anschließend die prozentuale Keimrate berechnet. Die Kriterien für eine erfolgreiche Keimung waren eine aufgeplatzte Testa und das Vorhandensein von Rhizoiden (vgl. Rasmussen et al. 1990).

Abb. 3: Petrischalen im RuMed-Keimschrank [H. Hensen].

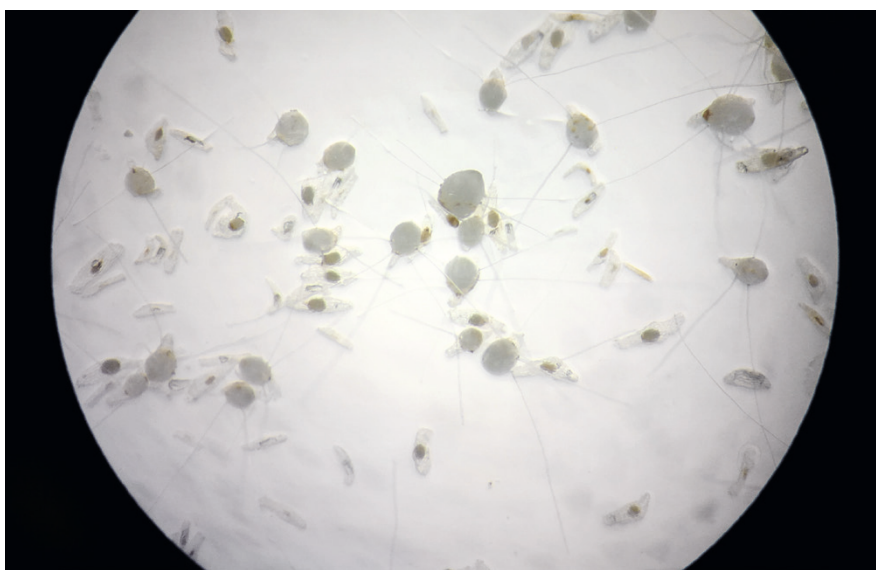

Abb. 4: Samen von *D. majalis* nach 42 Tagen im Keimschrank [H. Hensen].

Tab. 2: Übersicht über die Versuchsvarianten und Anzahl der Wiederholungen.

Variante	BM-1	TGZ-N	Wasser Agar-Agar
Licht	3	3	3
Dunkel	3	3	3

3 Ergebnisse

Auf allen Nährmedien, mit und ohne Initialbeleuchtung, wurde eine erfolgreiche Keimung der Samen festgestellt. Die ermittelten Keimraten wiesen dabei eine erhebliche Spannweite auf. Die höchsten Werte wurden jeweils mit und ohne Initialbeleuchtung auf Wasser-Agar-Agar erreicht (42,69 % bzw. 39,41 %). Die zweithöchsten Keimraten erzielten die BM-1-Varianten (39,10 % mit Initialbeleuchtung; 28,07 % ohne Initialbeleuchtung). Die niedrigsten Werte zeigten die TGZ-N-Varianten, wobei hier die Variante mit Initialbeleuchtung die niedrigere Keimrate erzielte (15,47 % mit Initialbeleuchtung; 19,45 % ohne Initialbeleuchtung).

Tab. 3: Mittlere Keimrate von *Dactylorhiza majalis* unter Verwendung verschiedener Nährmedien und Lichtverhältnisse.

Variante	BM-1	TGZ-N	Wasser-Agar-Agar
Licht (n = 3)	39,10 % ± 2,89	15,47 % ± 1,42	42,69 % ± 1,63
Dunkel (n = 3)	28,07 % ± 5,49	19,45 % ± 2,29	35,57 % ± 1,20

4 Diskussion

4.1 Einfluss des Nährmediums auf die Keimrate

Auf allen Nährmedien wurde Keimung von *Dactylorhiza majalis* beobachtet. Dabei schnitten die Medien Wasser-Agar-Agar und BM-1 im Vergleich zu TGZ-N mit vergleichsweise hohen Keimraten deutlich besser ab. Das Ergebnis zeigt, dass *Dactylorhiza majalis* bis zu diesem sehr frühen Stadium der Keimung fast keine Nährstoffe benötigt, da eine Kombination aus Wasser und Agar-Agar ausreichte, um die höchsten Keimraten zu erzielen. Für die ausschließliche Ermittlung der Keimrate nach dieser Methodik ist es daher

nicht notwendig fertige Nährmedien zu erwerben. Ein Nachteil der kostengünstigen Wasser-Agar-Agar-Variante ist, dass sich die Samen nicht gut über den Versuch zur Ermittlung der Keimrate hinaus weiterverwenden lassen. Ein erneutes Ansetzen und das Umsetzen der Samen auf ein Nährmedium mit Nährstoffen wären notwendig, um spätere Entwicklungsstadien zu erreichen. Sollen die gekeimten Samen für Anzucht verwendet werden, ist zu empfehlen von Beginn an auf ein anderes Nährmedium zurückgreifen. BM-1 würde sich dafür mit den zweithöchsten Keimraten gut eignen. TGZ-N besaß zwar die niedrigsten Keimraten im frühen Stadium der Keimung, jedoch entwickelten sich die Protokorme und Sprösslinge in den Petrischalen im Anschluss an den Keimversuch sehr gut, daher scheint es zwar für die Bestimmung der Keimraten im Rahmen von Untersuchungen zur Fitness eher nicht das geeignete Nährmedium zu sein, für die Aufzucht von *D. majalis* ist es dennoch empfehlenswert.

4.1 Einfluss von Beleuchtung auf die Keimrate

Wie bereits durch Rasmussen et al. (1990) für die symbiotische Keimung dokumentiert, wurde im Rahmen dieses asymbiotischen Versuches bei Wasser-Agar-Agar und BM-1 durch eine zehntägige Initialbeleuchtung mit weißem Licht ebenfalls eine Erhöhung der Keimrate erreicht. Die Empfehlung, die Gattung *Dactylorhiza* in Dunkelheit zur Keimung zu bringen (Lucke 1975, Seaton et al. 2011), kann daher für *D. majalis* auch unter asymbiotischen Bedingungen nicht unterstützt werden. Warum es sich bei dem Nährmedium TGZ-N nicht ebenso verhielt, bleibt offen.

5 Fazit

Bei allen Versuchsvarianten konnte nach 42 Tagen im Keimschrank ein frühes Stadium der Keimung von *Dactylorhiza majalis* erreicht werden. Die höchste Keimrate wurde nach einer zehntägigen Initialbeleuchtung auf Wasser-Agar-Agar erzielt. Die angewendete Methode ist daher im Vergleich am besten geeignet, um die Keimrate als Parameter für die Fitness zu bestimmen.

Danksagung

Die Untersuchung fand im Rahmen des ELER-Projektes „Naturschutzgerechte und nachhaltige Grünlandbewirtschaftung in Sachsen-Anhalt zur Förderung der Lebensraumtypen 6210 (*), 6440 und 6510 sowie der Verantwortungsart *Dactylorhiza majalis*“ (Projektlaufzeit: 02/2017–09/2019, FKZ: 407.1.2-60128/630116000012) statt. Für ihre Unterstützung bei der Umsetzung des Versuchs danken wir Maximilia Kottwitz, Dr. Jörg Geistlinger und Marc Schöler.

Literatur

BfN Bundesamt für Naturschutz (2013a): Verbreitungskarten *Dactylorhiza majalis* agg., *Dactylorhiza fuchsii*. – FloraWeb www.floraweb.de.

BfN Bundesamt für Naturschutz (2013b): Arten in besonderer Verantwortung Deutschlands, https://biologischevielfalt.bfn.de/bundesprogramm/foerderschwerpunkte/verantwortungsarten.html.

Brunzel, S. (2010): Ex-situ-Kultivierung und In-situ-Management als Beitrag zum Artenschutz. – Naturschutz und Landschaftsplanung 42 (5): 148-156.

Dullau, S., Richter, F., Adert, N., Meyer, M. H., Hensen, H. & S. Tischew (2019) Handlungsempfehlung zur Populationsstärkung und Wiederansiedlung von *Dactylorhiza majalis* am Beispiel des Biosphärenreservat Karstlandschaft Südharz. – Hochschule Anhalt, Bernburg, 32 S.

Van Waes, J. M. & P. C. Debergh (1986): In vitro germination of some Western European orchids. – Physiologia Plantarum 67 (2): 253-261.

Lucke, E. (o.J.): Rezeptur TGZ-N, Bereitstellung der Rezeptur für „TGZ-N nach Lucke“ über Röllke-Orchideen GbR, 10.11.2018, schriftl. Mittl. Frank Röllke.

Lucke, E. (1975): Orchideenkultur für alle. Eine Anleitung zur zeitgemäßen Orchideenkultur. – Albrecht Philler Verlag Minden. 6. Auflage 1986, 120 S.

Ludwig G., May, R. & C. Otto (2007) Verantwortlichkeit Deutschlands für die weltweite Erhaltung der Farn- und Blütenpflanzen - vorläufige Liste. – Bonn-Bad Godesberg. BfN-Skripten 220.

Michl, J. (1988): Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny II. – Živa 3: 89-91.

Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K. & H. Lipavská (2011): European orchid cultivation–from seed to mature plant. – European Journal of Environmental Sciences 1 (2): 95-107.

Rasmussen, H., Andersen, T. F. & B. Johansen (1990): Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) in vitro. – Physiologia Plantarum, 79 (2): 226-230.

Seaton, P., Cribb, P., Ramsay, M. & J. Haggar (2011): Growing Hardy Orchids. Royal Botanic Gardens Kew.

Steiner, L. (2011): Einfluss von Fragmentierung und Isolation auf die Populationsbiologie und Diasporenbank von Kalk-Magerrasen (Mesobrometum erecti) in Südwestdeutschland. – Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. 408 S..

Weinert, M. (1992): Keimungsfördernde Faktoren bei schwerkeimenden europäischen Orchideen: 2. Eine verfeinerte Methode der Samen-Voraussaatbehandlung mit Natriumhypochlorit und Überprüfung der Vitalität mit Tetrazoliumchlorid*. – Die Orchidee 43 (6): 287-293.

Anschrift der Verfasser:

Heiner Hensen, Sandra Dullau, Sabine Tischew
Hochschule Anhalt, Fachbereich LOEL, Strenzfelder Allee 28, D-06406 Bernburg
E-Mail: heiner.hensen@hs-anhalt.de
sandra.dullau@hs-anhalt.de
sabine.tischew@hs-anhalt.de