

2. Stand des Wissens

2.1. Botanische Grundlagen

2.1.1. Taxonomische Zuordnung

Der Hanf, *Cannabis sativa* L., ist eine sommerannuelle Kurztagspflanze. Er ist Windbestäuber, Fremdbefruchter und gehört zur Gruppe der *Dicotyledoneae*. Ursprünglich wurde Hanf innerhalb der Ordnung der *Urticales* in die Familie der *Moraceae* (Maulbeerbaumgewächse) eingruppiert (**Reuter, 1987**). Von dieser unterscheidet er sich aber in wesentlichen Details. So überragen zum Beispiel in den weiblichen Blüten die Tragblätter die Blütenorgane. Des Weiteren fehlen die für die *Moraceae* typischen milchsaftführenden Zellen. Deshalb gehört der Hanf heute zu den *Cannabaceae*, den Hanfgewächsen (**Hanf, 1997**). Die Familie der *Cannabaceae* stellt mit drei Arten die kleinste Familie der *Urticales* dar. Die beiden landwirtschaftlich bedeutenden Arten dieser Familie sind der Hopfen, *Humulus lupulus* L., und der Hanf, *Cannabis sativa* L..

Zur Unterteilung der Gattung *Cannabis* gibt es unterschiedliche Angaben. **Hoffmann et al. (1970)** unterteilt z.B. in zwei Arten, in *C. sativa* und *C. indica*. Diese sind jedoch eher als geographische Varietäten anzusehen. Sie sind untereinander leicht kreuzbar und erzeugen fertile Nachkommen. Innerhalb der Art *C. sativa* werden noch die beiden Unterarten subsp. *culta* (Kulturhanf) und subsp. *spontanea* (Wildhanf) differenziert.

Schultes (zitiert bei **de Meijer et al., 1992**) unterteilt die Gattung *Cannabis* in drei Arten, in *C. sativa*, *C. ruderalis* und *C. indica*. Anderen Angaben zufolge hat die Gattung *Cannabis* nur die eine Art, *Cannabis sativa* L.. Diese Art wird in die vier Varietäten *vulgaris* (gewöhnlicher Hanf), *indica* (indischer Hanf), *gigantea* (Rieshanf) und *ruderalis* (wilder Hanf) unterteilt (**Mansfeld, 1986; Schuster, 1986**). Anderen Autoren zufolge ist diese Unterteilung umstritten (**Small, 1979; Reuter, 1987**).

2.1.2. Aufbau der Hanfpflanze

Der Hanf ist eine krautige Pflanze, die in unseren Breiten zwischen 2 m und 4 m hoch werden kann (**Schumann et al., 1999; Flachowsky et al., 2001**). Die Wurzel besteht aus einer radiären Hauptwurzel, die auf tiefgründigen Mineralböden bis zu 2 m tief in den Boden ragt. Von dieser Hauptwurzel zweigen Seitenwurzeln erster Art ab. Diese können sich bis zu einer Länge von 80 cm ausdehnen. An ihnen entwickeln sich weitere Nebenwurzeln. Die intensivste Durchwurzelung des Bodens beläuft sich auf die oberen 20-40 cm (**Hanf, 1997**).

Die Stängel der Hanfpflanze sind zu Beginn viereckig. Im Lauf der Vegetation werden sie sechseckig. An der Basis und der Spitze sind die Stängel rund. Der Durchmesser beträgt in Abhängigkeit von Sorte und Bestandesdichte 2-20 mm (**Heuser, 1927**). **Schumann et al. (1999)** erhielten in einem Parzellenversuch mit monözischen und diözischen Sorten und Abstammungen durchschnittliche Stängeldurchmesser von 9 mm. Im Inneren des Stängels ist ein Hohlraum, der bis zu einem Sechstel des Durchmessers betragen kann. Im Rindenteil werden Faserbündel angelegt, in denen sich die primären Fasern befinden. Diese erreichen eine Länge von bis zu 20 mm. Aus dem Kambium heraus entwickeln sich die sekundären Fasern. Diese erreichen eine Länge von maximal 2 mm.

Die Blätter der Hanfpflanze besitzen 5-9 lanzettförmige Blattfinger, deren Ränder gezahnt sind.

Beim Blütenaufbau unterscheidet man die diözischen von den monözischen Formen. Während diözische Weibchen ihre Blüten in Form von Scheinähren in den Blattachseln eines dichten laubigen Sprosses anlegen, gleicht der Blütenstand der diözischen Männchen einer lockeren Rispe (**Heuser, 1927; Hoffmann et al., 1970**). Im Gegensatz dazu sitzen die weiblichen Blüten monözischer Pflanzen an den Spitzen der Seitentriebe. Die männlichen Blüten befinden sich vereinzelt in den Blattachseln.

Die Früchte der Hanfpflanze entwickeln sich aus einem einsamigen Fruchtknoten (**Heuser, 1927**). Von der Form her handelt es sich um eiförmige Nüsschen, deren Färbung von weiß, gelb, orange, grau, braun bis schwarz gehen kann (**Fruwirth, 1922**). Die Farbe der Früchte kann einheitlich bis marmoriert sein und ist auch innerhalb einer Pflanze unterschiedlich. Sie wird in erster Linie durch das Vorhandensein oder Fehlen eines anthocyanhaltigen Stoffes in

den subepidermalen Schichten sowie in den Pallisadenzellen hervorgerufen (**Fruwirth, 1922**).

2.1.3. Geschlechts- und Wuchsformen bei Hanf

Von Natur aus ist der Hanf diözisch (zweihäusig), d.h. es gibt männliche und weibliche Pflanzen. Zusätzlich gibt es monözische (einhäusige) Formen. Diese monözischen Formen sind erblich (**Hoffmann et al., 1985**). Die Intersexen variieren in der Stärke ihrer Ausbildung von fast männlichen bis zu nahezu weiblichen Pflanzen. Diese Variation betrifft sowohl die Anzahl männlicher und weiblicher Blüten, als auch die Form des Wuchses. Demnach lassen sich die auftretenden Geschlechtsformen in zwei Reihen einteilen (Tabelle 1). Grundlage hierfür ist die Wuchsform der jeweiligen Pflanze.

Tabelle 1: Unterschiedliche Wuchs- und Geschlechtsformen innerhalb der Gattung *Cannabis* (Hoffmann et al., 1985)

Mögliche Geschlechts- / Wuchsformen bei Hanf			
feminine Wuchsform		maskuline Wuchsform	
Weibchen	ausschließlich weibliche Blüten	Männchen	ausschließlich männliche Blüten
feminine Monözisten	männliche und weibliche Blüten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen	maskuline Monözisten	männliche und weibliche Blüten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen
feminine Männchen	ausschließlich männliche Blüten	maskuline Weibchen	ausschließlich weibliche Blüten

Innerhalb beider Reihen können sowohl rein männliche, rein weibliche als auch gemischte Formen unterschiedlichster Ausprägung auftreten (**Hoffmann, 1947a**).

2.2. Zytologische Grundlagen

Der Hanf ist diploid mit $2n = 2x = 20$ Chromosomen. Weiterhin ist bekannt, dass die Zellen der primären Rinde vielfach tetraploid sind (**Breslavetz, 1928, 1932; Riedel, 2000**). Es gibt 9 Autosomenpaare und ein Heterosomenpaar. Dabei wird das eine Heterosom mit X (weibliches Chromosom) und das andere mit Y (männliches Chromosom) bezeichnet (**Hirata, 1929; Breslavetz, 1932, Yamada, 1943; Hoffmann, 1938, 1947a**). Beim diözischen Hanf ist das weibliche Geschlecht homogametisch vom Typ XX. Das männliche Geschlecht ist heterogametisch vom Typ XY (**Neuer und von Sengbusch, 1943; von Sengbusch, 1943; Hoffmann, 1947a**). Das Y-Chromosom ist das größte Chromosom. Es ist subtelozentrisch mit einem Satelliten am terminalen Ende des kurzen Armes (**Sakamoto et al., 1998**). Das X-Chromosom ist submetazentrisch. Es besitzt ebenfalls einen Satelliten am Ende des kurzen Armes. Die Hanfchromosomen kondensieren von der mitotischen Prometaphase zur Metaphase in einem verwandten Muster. Dabei fällt auf, dass sowohl der lange Arm des Y-Chromosoms als auch die Satellitenregion auf dessen kurzen Arm fünf bis sechsmal stärker kondensieren (**Sakamoto et al., 1998**). Der Größenunterschied zwischen X und Y ist in normalen Metaphasepräparaten aber nicht deutlich wahrnehmbar.

2.3. Die Größe des Hanfgenoms

Der Hanf hat eine durchschnittliche Genomgröße im haploiden Stadium von rund 830 Mbp (**Sakamoto et al., 1998**), was in etwa der Größe des Zuckerrüben-genoms entspricht (**Bennett und Leitch, 1995**). Demzufolge ist das Hanfgenom mehr als sechsmal so groß wie das von *Arabidopsis thaliana* (**Kaneko et al., 1998; Sakamoto et al., 1998**). Vergleicht man die Größe des Hanfgenoms mit der anderer Bedecktsamer, so fällt auf, dass es immer noch sehr klein ist. Innerhalb der Bedecktsamer bewegen sich die Genomgrößen¹ im haploiden Stadium von 193 Mbp bei *Physocarpus bracteatus* (Rydb.) Rehd. bis 87.622 Mbp bei *Viscum album*

¹ Alle Angaben zu Genomgrößen sind als C-Werte bei **Bennett und Leitch (1995)** bzw. (**Sakamoto et al., 1998**) entnommen. Der C-Wert gibt den DNA-Gehalt in pg (pico gramm) an. Die Genomgröße in Mbp (Megabasenpaar) wurde errechnet ($1\text{pg} = 965\text{Mbp}$).

L.. Bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen haben Raps, Kartoffel und Spargel ebenfalls kleine Genome. Die Genome von Gerste und Mais sind mittelgroß. Der Weizen zählt mit rund 19.000 Mbp zu den Pflanzen mit sehr großen Genomen.

Nach **Sakamoto et al. (1998)** beträgt die Größe des weiblichen Genoms von Hanf im diploiden Zustand 1.636 ± 7 Mbp. Das Genom männlicher Pflanzen ist mit 1.683 ± 13.9 Mbp rund 47 Mbp größer. Ähnliches beschreibt **Herich (1961)** bei der Untersuchung der Größe von Zellkernen und Pollenkörnern bei Hanf. Auch hier sind sowohl Zellkerne als auch Pollenkörner des XY-Typs größer als die von XX-Typen. Als Grund dafür wird der Größenunterschied zwischen X und Y angesehen.

Solche Unterschiede in der Genomgröße zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht finden wir ebenfalls bei *Melandrium album* (Mill.) Garcke. Hier beträgt die Größe des Genoms der Weibchen (XX) im diploiden Zustand rund 5.501 Mbp. Das Genom der Männchen (XY) bzw. (YY) ist mit ca. 5.694 Mbp bzw. 5.790 Mbp deutlich größer (**Bennett und Leitch, 1995**).

2.4. Die Geschlechtsvererbung

2.4.1. Allgemeine Geschlechtsvererbung

Die Vererbung des Geschlechts von Pflanzen und Tieren ist schon seit langem eine zentrale Frage in der genetischen Forschung. In der Hauptsache gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann sie durch Gene gesteuert werden, die im Genom verteilt sind (autosomal). Zum anderen wird sie durch Gene gesteuert, die auf so genannten Geschlechtschromosomen lokalisiert sind. Bei der Vererbung über Geschlechtschromosomen gibt es unterschiedliche Systeme. Bei einigen Tieren, wie dem Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) und dem in Ratten parasitisch lebenden Nematoden (*Strongyloides ratti*) sind die Weibchen homozygot und besitzen zwei X-Chromosomen (Typ XX). Die Männchen dagegen sind vom Typ XO und besitzen nur ein Geschlechtschromosom (**Harvey und Viney, 2001; Hawthorne, 2001**). Bei anderen Tieren wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), Vögeln und Säugetieren wird die sexuelle Vererbung durch zwei heteromorphe Chromosomen gesteuert. Diese werden bei Vögeln mit Z und W bezeichnet. Während weibliche Tiere heterozygot vom Typ

ZW sind, sind die männlichen Tiere homozygot vom Typ ZZ. Bei *Drosophila* und vielen Säugetieren (z.B. Mäusen und Menschen) werden diese Heterosomen mit X und Y bezeichnet. Im Gegensatz zu Vögeln sind hier die Weibchen homozygot vom Typ XX und die Männchen heterozygot vom Typ XY (**Morgan et al., 1925; Lahn und Page, 1999; Lahn et al., 2001; Mekada et al., 2001; Stitou et al., 2001**).

2.4.2. Geschlechtsvererbung bei Pflanzen

Bei Pflanzen unterscheiden wir in der Regel die sexuell monomorphen, zu denen neben den Hermaphroditen auch die monözischen zählen, von den sexuell polymorphen, den diözischen Pflanzen (**Charlesworth, 2002**).

2.4.2.1. Sexuell monomorphe Pflanzen

Die Ausprägung des Geschlechts bei den sexuell monomorphen, die etwa 95% aller Blütenpflanzen ausmachen (90% hermaphrodite und 5% monözische), wird durch homöotische Gene gesteuert (**Dellaporta und Calderon-Urrea, 1993; Charlesworth, 2002**), die oft auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Dabei wird die Blüte in vier verschiedene Bereiche, so genannte Wirtel (Abbildung 1), unterteilt (**Coen und Meyerowitz, 1991; Meyerowitz, 1995**). Während in den Wirteln eins und zwei die Kelch- und Kronblätter lokalisiert sind, befinden sich die Sexualorgane (Staubblatt und Fruchtblatt) in den Wirteln drei und vier (**Dellaporta und Calderon-Urrea, 1993**). Sowohl die Position als auch die Identität der Organe werden innerhalb dieser Bereiche durch kombinierte Funktionen homöotischer Gene in drei überlappenden Funktionsbereichen (A, B und C) des Blütenprimordiums gesteuert (**Dellaporta und Calderon-Urrea, 1993**). Ist eine dieser Funktionen in einem Wirtel unterbunden (Abbildung 2), wird diese durch die anderen beiden Funktionen überdeckt (**Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994; Kater et al., 2001**). Über die Auswirkung der Expression homöotischer Gene auf die Blütenentwicklung wurde in den letzten Jahrzehnten vielfach berichtet.

- Stand des Wissens -

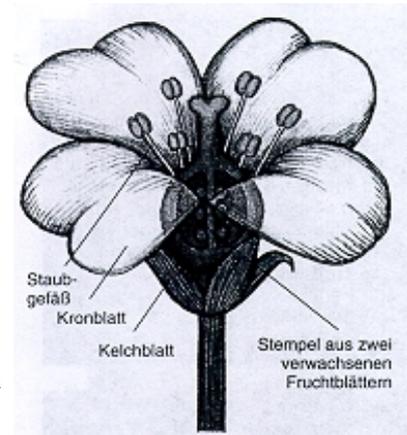
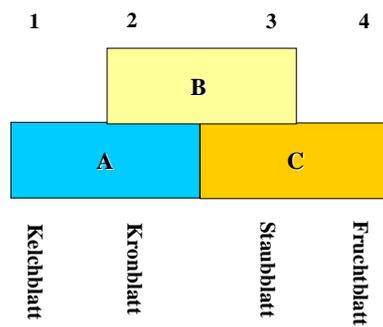


Abbildung 1: Die Blüte sexuell monomorpher Pflanzen

Abbildung 1 zeigt den Blütenaufbau der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Auf der linken Seite ist der Aufbau schematisch dargestellt (entnommen bei **Kater et al., 2001**). Die rechte Seite zeigt eine graphische Darstellung des Blütenaufbaus (entnommen bei **Meyero-witz, 1995**). Die Ziffern 1, 2, 3 und 4 bezeichnen die einzelnen Wirtel. Die drei verschiedenen Genfunktionen sind mit A, B und C bezeichnet.

Besonderes Interesse galt dabei der Familie der MADS Box Gene². Aus dieser Familie wurden zahlreiche Gene von unterschiedlichsten Pflanzen wie *Arabidopsis*, Apfel und Birke isoliert und charakterisiert (**Mandel und Yanofsky, 1995; Sung et al., 1999; Yao et al., 1999; Kotoda et al., 2000; Lemmetyinen et al., 2001** u.v.m.). Alle diese Gene spielen eine Rolle bei der Blütenbildung und können anhand ihrer Proteinsequenz und ihrer Funktion in Subfamilien eingeordnet werden.

² Die MADS Box ist eine hochkonservierte DNA-Binderegion, in der die entsprechenden Gene hohe Übereinstimmung zeigen. Die Bezeichnung MADS wurde aus den Namen der ersten vier bekannten Proteingene *MCM 1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* und *SRF* abgeleitet.

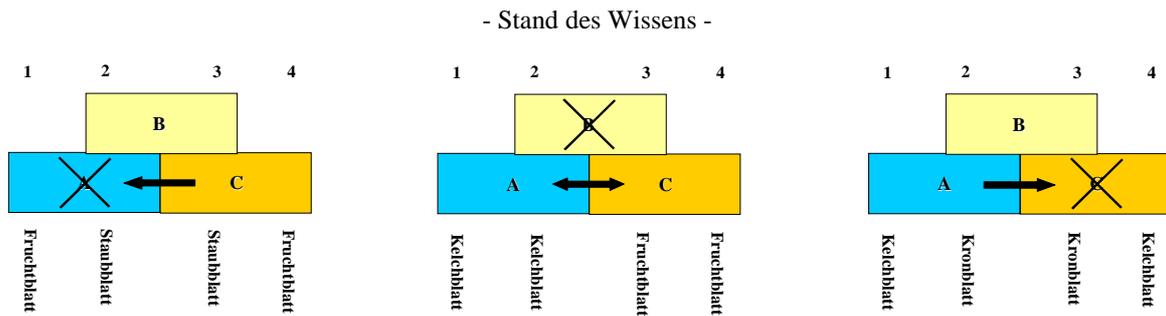


Abbildung 2: Schema des ABC Modells für die Festlegung der Blütenorganidentität
Abbildung 2 zeigt schematisch das ABC Modell des Blütenaufbaus (Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994). Fehlt die Funktion eines Gens, so wird diese durch die Funktionen der beiden anderen ersetzt. Die Ziffern 1, 2, 3 und 4 bezeichnen die einzelnen Wirtel. Die drei verschiedenen Genfunktionen sind mit A, B und C bezeichnet.

2.4.2.2. Sexuell polymorphe Pflanzen

Die sexuell polymorphen Pflanzen, zu denen neben der Weißen und der Roten Lichtnelke (*Silene latifolia* bzw. *dioica*), die Zaunrübe (*Bryonia dioica*), der Spargel (*Asparagus officinalis* L.), der Sauerampfer (*Rumex acetosa*), der Hopfen (*Humulus lupulus* L.), die Zimterdbeere (*Fragaria elatior* Ehrh.) und auch der Hanf (*Cannabis sativa* L.) gehören, sind eher selten (Linnert, 1991). Sie machen etwa 5% aller Blütenpflanzen aus (Charlesworth, 2002). Bei diesen diözischen Pflanzen wird die Vererbung des Geschlechts in der Hauptsache durch das Vorhandensein von Geschlechtschromosomen gesteuert. Dabei sind in der Regel weibliche Pflanzen homogametisch vom Typ XX und männliche Pflanzen heterogametisch vom Typ XY. Eine Ausnahme bildet hierbei die Zimterdbeere (*Fragaria elatior* Ehrh.). Dort gleicht das System der geschlechtlichen Vererbung dem von Vögeln. Weibliche Pflanzen sind heterogametisch (ZW) und männliche homogametisch (ZZ; Matsunaga und Kawano, 2001). Aus diesem Grund werden auch hier die Heterosomen mit Z und W bezeichnet. Die Geschlechtschromosomen haben sich im Laufe der Evolution aus Autosomen hermaphroditer Pflanzen entwickelt und sind denen von Tieren auffallend ähnlich (Charlesworth, 2002). Ihr Alter wird auf weniger als 20 Millionen Jahre geschätzt. Diese Entwicklung hat im

Verlauf der Evolution mehr als 100 mal im Pflanzenreich stattgefunden und betrifft inzwischen ca. 160 Familien (**Charlesworth, 2002**). Innerhalb der diözischen Pflanzen unterscheidet man Pflanzen mit einem homomorphen Paar Geschlechtschromosomen wie *Spinacea oleracea* (**Warmke und Blackeslee, 1939**) und *Asparagus officinalis* (**Bracale et al., 1991**) von denen, die ein heteromorphes Paar besitzen. Zur zweiten Gruppe gehören unter anderem *Silene latifolia*, *Coccinia indica* und *Cannabis sativa* (**Hirata, 1929; Kumar und Vishveshwaralah, 1952; Westergard 1953**). Des weiteren gibt es Pflanzen mit einem System multipler Geschlechtschromosomen. Zu ihnen gehören *Rumex acetosa* und *Humulus lupulus* (**Matsunaga und Kawano, 2001**).

Während die Geschlechtsvererbung von Hopfen und Sauerampfer abhängig ist von dem Verhältnis der Anzahl X-Chromosomen zu den Autosomen, gibt es bei anderen Arten ein aktives Y-Chromosom. Zu diesen Arten zählen Spargel, Hanf und Lichtnelke (**Matsunaga und Kawano, 2001**).

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um Kenntnisse über die Struktur und Funktion der Geschlechtschromosomen zu erlangen. Die meisten Untersuchungen dazu erfolgten am Modellobjekt *Silene*. So konnte bereits Westergard ein strukturiertes Bild des männlichen Y-Chromosoms darstellen, welches bis heute Gültigkeit hat (**Westergard, 1953; Charleworth, 2002; Lebel-Hardenack et al., 2002**).

Bei Hanf konnte die Existenz eines heteromorphen Chromosomenpaares in zahlreichen zytologischen Studien nachgewiesen werden (**Hirata, 1929; Sinoto, 1929; Breslavetz, 1932, Mackay, 1939; Nishina et al., 1940; Nishiyama, 1940, 1941; Yamada, 1943; Rizet, 1946; Postma, 1946; Hoffmann, 1938, 1947a; Nishiyama et al., 1947; Takenaka, 1951; Tischler, 1953**).

Bei der Vererbung von Geschlecht und Wuchsform bei Hanf existieren bis heute zwei unterschiedliche Theorien. Die erste Theorie geht davon aus, dass Geschlecht und Wuchsform gemeinsam vererbt werden (**Neuer und von Sengbusch, 1943; von Sengbusch, 1952**). Demnach wird von einer "monomeren" polyallelen Vererbung ausgegangen. Weibliche Pflanzen sind vom Typ XX und männliche vom Typ XY. Monözische Pflanzen mit weiblichem Habitus sind vom Typ XX. Die Abstufung innerhalb der Monözie wird über allelomorphe Serien von Geschlechtsrealisatoren gesteuert. Dabei ist immer der Wert des größeren

dominant über den kleineren (**von Sengbusch, 1952**).

Die zweite Theorie geht von einer "polymeren" Vererbung des Geschlechts aus (**Hoffmann, 1947a; Köhler, 1958**). Auch hier sind die Weibchen generell vom Genotyp XX und die Männchen vom Typ XY. Die Ausbildung des Wuchstyps sowie der Geschlechtsorgane bei monözischen Pflanzen werden durch autosomale Gene gesteuert und können durch endogene und exogene Umweltfaktoren (z. B. Kurztag, Gibberelline) beeinflusst werden (**Köhler, 1961; Hoffmann et al., 1970; Mohan Ram und Jaiswal, 1972**).

2.5. Die Hanfzüchtung

Die züchterische Bearbeitung von Hanf spielte bereits Anfang bis Mitte des letzten Jahrhunderts eine entscheidende Rolle. Hauptschwerpunkte in dieser Zeit waren die Erhöhung des Faserertrages sowie die Verbesserung der Faserqualität. Um diese Ziele zu erreichen, wurden die unterschiedlichsten Strategien angewandt. Das Hauptaugenmerk bei der Verbesserung des Faserertrages lag einerseits in der Auslese faserreicher Typen und deren Verwendung für anschließende Kreuzungen (**Bredemann, 1924, 1927, 1942a und b, 1952; Neuer et al., 1946**). Dabei wurden in der Regel für die Neuauslese faserreicher Typen Ramsche ausgesät. Für die Kreuzung ausgelesener Typen wurde die Restsaatgutmethode angewendet (**Neuer et al., 1946**). Eine weitere Möglichkeit bestand im Einfrieren des Pollens in flüssigem Stickstoff, um so im Anschluss an eine Faseranalyse geeignete Väter für weitere Kreuzungsschritte auswählen zu können (**Bredemann et al., 1947**).

Andererseits wurde mit der Züchtung monözischer bzw. gleichzeitig reifender Sorten begonnen (**Hoffmann, 1941, 1947a; Huhnke et al., 1951; von Sengbusch, 1943, 1952; Bócsa, 1958; Bredemann et al., 1961**). Grund dafür war, dass die männlichen Pflanzen diözischer Sorten früher reifen als die Weibchen und bereits drei Wochen vor dem optimalen Erntezeitpunkt weiblicher Pflanzen absterben. In dieser Zeit beginnen bereits erste Faserabbauprozesse, die sich negativ auf die Höhe und die Qualität des Ertrages auswirken. Des Weiteren sehen **Hoffmann und Knapp (1940)** in der Züchtung selbstfertiler monözischer Sorten einen methodischen Vorteil. Solche Sorten bieten die Möglichkeit der Entwicklung homozygoter

Linien.

Für die Entwicklung solcher monözischen Sorten wurde die Ausgeizmethode verwendet. Dabei wurden in einer Kreuzungsnachkommenschaft Idealmonözisten ausgelesen. Alle anderen Pflanzen des Bestandes wurden eliminiert und bereits befruchtete Blüten ausgegeizt. Im Anschluss an das Ausgeizen blühten die Idealmonözisten ein zweites Mal und es erfolgte eine gegenseitige Befruchtung. Die resultierenden monözischen Nachkommen wurden anschließend mit faserreichen diözischen Sorten rückgekreuzt. Auf diese Weise entstanden Sorten und Zuchtstämme wie 'Fibrimon', 'Fibrimon 24', 'Fibrimon 56', 'Fedrina 19' und 'Felina 34' (**de Meijer et al., 1992; Handke, 1995; Loch, 1995**).

Ein anderer Versuch dieses Problem zu umgehen war die Erzeugung unisexueller (rein weiblicher) Sorten (**Bócsa, 1961** zitiert bei **Rath, 1967**). Solche fast rein weiblichen F_1 -Populationen wurden aus Kreuzungen diözischer Weibchen mit monözischen Vätern erhalten (**Hoffmann, 1947a; von Sengbusch 1952**). Nach freier Abblüte sind diese Populationen in der F_2 -Generation wieder fast vollständig diözisch. Auf diese Weise entstand beispielsweise die Sorte 'Uniko B' (**Bócsa, 1995**).

Für die Verbesserung der Faserqualität wurde mit der Auslese von Mutanten begonnen. Diese Mutanten haben einen Defekt in der Stängelfarbe. Sie sind wesentlich heller als üblich und führen aufgrund dessen zu einer gleichmäßigeren Färbung bei der Verarbeitung der Fasern (**Hoffmann, 1947b**). Weitere Versuche den Ertrag zu steigern, waren die Erstellung polyploider Linien und die Erzeugung von Hybridsaatgut (**Rath, 1967**). Bei der Erzeugung von Hybridsaatgut wurden zwei unterschiedliche Wege verfolgt. Der eine lag in der Entwicklung von Inzuchtlinien. Diese wurden im Anschluss gekreuzt (**Wiehert-Kobusowa, 1962** zitiert bei **Rath, 1967**). Da sich die Entwicklung von Inzuchtlinien bei Hanf in Folge starker Inzuchtdepressionen als schwierig erweist, wurde von Bócsa mit der Erzeugung von Sortenhybriden ein weitaus praktikablerer Weg vorgeschlagen (**Hoffmann et al., 1970; Bócsa, 1995**).

Auch auf dem Gebiet der Züchtungsmethodik wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen. Neben Untersuchungen zur Anatomie der Stängel (**Tobler, 1940; Schneider, 1942**) wurden Methoden und Verfahren für die Bestimmung des Fasergehaltes auf indirekte und direkte Weise entwickelt und getestet (**Heuser, 1924; Bredemann, 1922a und b, 1924,**

1940, 1942a und b; Neuer et al., 1946; Bilcescu, 1965). Auf der anderen Seite begann man mit der Erforschung und Etablierung von Methoden für den Nachweis von THC (Hitzemann, 1941; Höppner und Menge-Hartmann, 1996; Petri et al., 1996; Taura et al., 1996; Kim und Mahlberg, 1997; Taura et al., 2000). Die Bestimmung des THC-Gehaltes erfolgt in der Regel mittels Gaschromatographie, Massenspektrometrie oder HPLC (High Performance Liquid Chromatographie; Debruyne et al., 1981). Durch die komplette Sequenzierung der Nukleinsäuresequenz der Tetrahydrocannabinolsäuresynthase durch Taura et al. (2000) ist der Nachweis des Gens mittels PCR möglich. Damit können zukünftig Untersuchungen zur Expression mittels RT-PCR und Quantitativer PCR erfolgen. Wichtig ist der Nachweis von THC, da ein geringer THC-Gehalt Voraussetzung für die Zulassung von Sorten für den Faserhanfanbau ist.

2.6. Genetische Marker

Die Bedeutung genetischer Marker hat in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung gewonnen (Weber und Wricke, 1994). Genetische Marker finden heute Verwendung bei Verwandtschaftsanalysen, bei der Kartierung einzelner Merkmale, zur Erstellung genetischer Karten ganzer Genome, einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte sowie zur kartengestützten Klonierung von Genen.

Generell folgen genetische Marker den von Mendel (1865) aufgestellten Vererbungsgesetzen. Lange Zeit hindurch konnten genetische Karten nur in Einzelfällen erstellt werden, da die Zahl der hierfür erforderlichen spaltenden Gene zu klein war. Die Entwicklung molekularer Marker führte zu einer hohen Markerdichte. Damit lassen sich bei allen wichtigen Kulturpflanzen mehr oder weniger dichte genetische Karten erstellen. Dies gilt auch für den Hanf. Für die Erstellung genetischer Karten wird eine Vielzahl an polymorphen Markern benötigt. Unter dem Sammelbegriff der polymorphen Markern versteht man Marker, die in einer gegebenen Population mehr als einen Ausprägungstyp bilden bzw. mit denen sich also Individuen unterscheiden lassen. Neben den morphologischen Merkmalen (Staub et al., 1996) waren dies zunächst die Isoenzyme und Speicherproteine sowie die zytologischen Marker.

Parallel zu den bereits genannten Markersystemen werden heutzutage besonders molekulare Marker eingesetzt. Voraussetzung dafür waren die Entdeckung der Restriktionsenzyme (**Linn und Arber, 1968**) sowie die Isolierung und Charakterisierung thermostabiler DNA-Polymerasen (**Mullis et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987**).

Die Vorteile der molekularen Marker sind darin zu sehen, dass auf der Basis von Unterschieden in mehr oder weniger spezifischen DNA-Bereichen relativ einfach und schnell große Stückzahlen von Individuen untersucht werden können. Darüber hinaus sind sie stabil nachweisbar in allen Geweben unabhängig von Wachstum, Differenzierung, Entwicklung oder Stadium der Zellen. Sie sind unabhängig von Umweltbedingungen (**Ovesná et al., 2002**), da nicht die von den Genen codierten Merkmale, sondern die DNA selbst analysiert wird. Aufgrund der raschen Entwicklung molekularer Markersysteme ist die Anzahl von Methoden auf eine fast unüberschaubare Menge angestiegen. In der Hauptsache werden jedoch vier große Gruppen unterschieden.

Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Marker, die auf Hybridisierungstechniken beruhen. Zu ihnen zählen unter anderem die RFLP's (restriction fragment length polymorphisms; **Botstein et al., 1980; Wyman und White, 1980**), das Oligonukletid Fingerprinting (**Ali et al., 1986; Weising et al., 1991**) und das Multi-locus Minisatelliten Fingerprinting (**Jeffreys et al., 1991**).

In der zweiten Gruppe handelt es sich um Marker, die durch Amplifikation unter Verwendung von zufälligen bzw. teilweise zufälligen Oligonukleotiden entstehen. Sie amplifizieren eine Vielzahl von Polymorphismen in einem oder mehreren Nukleinsäuremolekülen. Zu diesen Techniken gehören zum Beispiel die von **Williams et al. (1990)** beschriebenen RAPD's (random amplified polymorphic DNA's). Weiterhin zählen neben dem von **Caetano-Anollés et al. (1991)** beschriebenen DAF (DNA amplification fingerprinting) auch die AFLP's (amplified fragment length polymorphisms) dazu.

Diesen drei Markersystemen ist gemein, dass sie alle mit Gesamt-DNA durchführbar sind. Die mit ihnen detektierten Polymorphismen erstrecken sich über das gesamte Genom und schließen euchromatische sowie auch heterochromatische Bereiche ein. In der neueren Zeit ist die Tendenz zu Markersystemen zu beobachten, die ausschließlich in transkribierten Sequenzen lokalisiert sind. Damit sollen vor allem Unterschiede in funktionellen Bereichen

nachgewiesen werden. Zu ihnen gehört neben den cDNA-AFLP's (**Bachem et al., 1996**) und der DDRT-PCR (differential display reverse transcription; **Liang und Pardee, 1992**) auch die RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR; **Welsh et al., 1992**).

Zur dritten Gruppe der molekularen Marker gehören neben den SSR's (simple sequence repeats; **Litt und Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber und May 1989**) und der MVR-PCR (minisatellite variant repeat PCR; **Jeffreys et al., 1991**) auch eine Abwandlung der AFLP's, die AmpFLP (**Boerwinkle et al., 1989**). Dabei handelt es sich um Marker, die Polymorphismen in spezifischen unikaligen Zielsequenzen in Organellen bzw. im Kerngenom detektieren.

Bei der vierten Gruppe handelt es sich um Marker, die es ermöglichen, Unterschiede auf dem Niveau einzelner Nukleotide nachzuweisen. Zu ihnen gehören die STS's (sequence tagged sites; **Olson et al., 1989**), die SCAR's (sequence characterized amplified regions; **Paran und Michelmore, 1993**), die CAPS's (cleaved amplified polymorphic sequences; **Konieczny und Ausubel, 1993**), die SSCP's (single strand confirmation polymorphisms; **Orita et al., 1989**) und die SNP's (single nucleotide polymorphisms; **Lander und Schork, 1994**).

Um aus dieser Fülle an Möglichkeiten eine geeignete Methode für das jeweilige Objekt auszuwählen, spielt die Betrachtung verschiedener Kriterien eine Rolle. Dabei richtet sich die Entscheidung für oder gegen ein Markersystem nach den jeweiligen technischen Gegebenheiten, der Durchsatzgröße und dem Zeitaufwand. Außerdem tragen das Vorhandensein der notwendigen Ausstattung, die Fertigkeiten des Experimentators, der Grad der Automatisierung sowie die Höhe der anfallenden Kosten (**Karp et al., 1997**) zu einer Entscheidung bei. Zusätzlich spielen der Informationsgehalt, die Sensitivität sowie die Anwendbarkeit auf das zu untersuchende Objekt eine Rolle.

Unter Betrachtung aller dieser Gesichtspunkte wurden für die vorliegende Arbeit bei Hanf AFLP- und SSR-Marker ausgewählt.

2.6.1. AFLP-Marker

Bei den AFLP-Markern handelt es sich um eine Methode, die bereits eine weite Verbreitung bei Pflanzen gefunden hat. Sie findet Einsatz bei Untersuchungen zur Phylogenie und Diversität sowie bei zahlreichen Anwendungen in der Pflanzenzüchtung (**Savelkoul et al., 1999; Ovesná et al., 2002**). Zu diesen gehören neben dem Nachweis unerwünschter Selbstbefruchtung bzw. Fremdeinkreuzung in Zuchtprogrammen auch die indirekte Selektion züchterisch wertvoller Eigenschaften. Ferner unterstützt diese Methode Arbeiten im Genbankmanagement und hilft mit, aufwendige Rückkreuzungsprogramme zu verkürzen (**Savelkoul et al., 1999**).

Im Gegensatz zu RFLP's sind AFLP-Marker weder auf Hybridisierungstechniken noch auf partielle Restriktionsverdau angewiesen. Ihre Muster sind regelmäßig und leicht auszuwerten (**Savelkoul et al., 1999**). Des Weiteren laufen Amplifikationsschritte unter stringenten Bedingungen ab. Aus diesem Grund sind AFLP's wesentlich reproduzierbarer als RAPD's. **Jones et al. (1997)** überprüften AFLP-Muster in acht unterschiedlichen Labors. Bis auf eine fehlende Bande von 172 stimmten die Muster vollständig überein. Andere Autoren berichten von Größenordnungen in der Reproduzierbarkeit zwischen 95 und 98 Prozent (**Savelkoul et al., 1999**). Ein weiterer Vorteil liegt in ihrem geringen Bedarf an DNA. So gelang es **Rosendahl und Taylor** (zitiert bei **Mueller und Wolfenbarger, 1999**) AFLP-Marker aus einer Einzelspore von Mykorrhiza-Pilzen (~ 0,1- 0,5ng DNA) zu generieren. Im Vergleich zu vielen anderen Methoden sind AFLP's sehr schnell und effizient. Die Anzahl von AFLP-Markerkombinationen ist aufgrund der Verwendbarkeit verschiedener Restriktionsenzyme und Enzymkombinationen sowie der freien Kombination von Primern mit selektiven Basen fast uneingeschränkt (**Mueller und Wolfenbarger, 1999**).

Während die ursprünglich von **Vos et al. (1995)** beschriebene Methode auf den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MseI* beruht, sind bis heute weitere Enzymkombinationen beschrieben und etabliert. Eine bei Tieren sehr häufig verwendete Kombination ist *EcoRI* und *TaqI*. In der Mikrobiologie sind es *BamHI* und *BglIII*. Die am meisten verwendeten Enzyme sind *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* und *ApaI* kombiniert mit *MseI* oder *TaqI* (**Savelkoul et al., 1999**). In neueren Protokollen werden zunehmend Isochizomere wie *HpaII* und *MspI* in Verbindung

mit bereits erwähnten Enzymen wie *EcoRI* verwendet (**Xu et al., 2000; Sharked et al., 2001**). Der Vorteil dieser neuen Systeme ist in der unterschiedlichen Sensitivität der Isochizomere gegenüber Cytosinmethylierungen zu sehen. Dadurch erhält man Aussagen über unterschiedliche Methylierungsmuster von Zielgenomen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, relativ einfach AFLP-Muster von vorwiegend exprimierten Bereichen zu erstellen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Enzymkombination *HindIII* und *MseI* verwendet. Diese Methode war bereits am Institut an unterschiedlichen Kulturpflanzen etabliert.

2.6.2. Mikrosatellitenmarker

Da AFLP's nicht alle Regionen im Genom gleichermaßen abdecken und oft in Clustern vorliegen (**Charmet et al., 2000**), wurde mit den Mikrosatelliten ein zweites Markersystem ausgewählt. Bei den Mikrosatelliten handelt es sich um kurze Repeatwiederholungen mit einer Kernsequenz von ein bis fünf Basen z.B. $(TG)_n$ oder $(AAT)_n$. Diese Sequenzmotive wiederholen sich tandemartig, was bis zu einer Länge von 500bp erfolgen kann (**Bruford und Wayne, 1993**). Die auch als SSR's bezeichneten Marker sind Locus-spezifisch und werden kodominant vererbt (**Sefc et al., 1999**). Sie verteilen sich gleichmäßig über das gesamte Genom und liegen oftmals in Bereichen konservierter Loci, die kodierende Regionen enthalten (**Loxdale und Lushai, 1998**). Sie sind weit verbreitet in eukaryotischen Genomen und vielfach hochgradig polymorph (**Ovesná et al., 2002**). Des Weiteren lassen sich Mikrosatelliten aufgrund bestehender Sequenzhomologien oftmals auf nahe verwandte Arten übertragen (**Collevatti et al., 1999**). Sie sind im Pflanzenreich sehr weit verbreitet, gut reproduzierbar und benötigen wenig Template-DNA. In der Pflanzengenetik wurden SSR's bisher in zahlreichen Studien zur Erstellung genetischer Karten (**Bell und Ecker, 1994; Taramino und Tingey, 1996; Maliepaard et al., 1998; Lespinasse et al., 2000**) sowie bei Abstammungs- und Verwandtschaftsanalysen eingesetzt (**Sharma et al., 1995a, b; Weising et al., 1996; Peil et al., 1998; van de Wiel et al., 1998; Sefc et al., 1999**).

Für Hanf gibt es noch keine SSR-Marker. Aus nah verwandten Arten sind nur die vier von **Brady et al. (1996)** beschriebenen Hopfenmikrosatelliten bekannt. Diese können an Hanf

getestet werden. Für die Entwicklung von Hanfmikrosatelliten ist es notwendig, eine genomische Bank von Hanf zu erstellen und diese auf Mikrosatelliten abzusuchen. Anschließend werden positive Klone sequenziert und flankierende Primer abgeleitet. Das zeigt, dass SSR-Marker in ihrer Entwicklung sehr arbeits- und zeitintensiv sind (**Reddy et al., 1999**).

2.7. Stand der molekularen Arbeiten bei Hanf

Erste molekulare Arbeiten beschränken sich einerseits auf Untersuchungen zur Diversität verschiedener Abstammungen mit RAPD's (**Faeti et al., 1996; Jagadish et al., 1996; El-Ghany, 2001; Forapani et al., 2001**) und den molekularen Nachweis von Hanf anhand konservierter Regionen (**Linacre und Thorpe, 1998; Gigliano 1999**). Andererseits wurden bereits Studien zur Entwicklung von Markern, die mit dem Geschlecht gekoppelt sind, durchgeführt. Als Markersysteme kamen dabei RAPD's, STS's und AFLP's zum Einsatz (**Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1999; Riedel, 2000; Sakamoto et al., 2000; Flachowsky et al., 2001**).