

---

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Grundlagen der Geschlechtsbestimmung

#### 2.1.1 Geschlechtsbestimmungsmechanismen allgemein

Sowohl im Tierreich als auch im Pflanzenreich haben sich zwei Systeme der Geschlechtsdeterminierung entwickelt. Zum einen gibt es die Cosexualität, bei der die Geschlechtsorgane beider Geschlechter auf einem Organismus lokalisiert sind (z. B. bei marinen Invertebraten und den meisten Pflanzen: zwittrig und monözisch). Zum anderen hat sich die Diözie zum dominierenden System bei den Wirbeltieren entwickelt. Auch bei einigen Pflanzenarten wird dieses System getrenntgeschlechtlicher Individuen ausgebildet. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Diözie durch Mutationen aus der Cosexualität entwickelt hat. Antriebskraft dieser evolutionären Entwicklung könnte eine Ressourcen- und Energieeffizienz sowie die Vermeidung einer Akkumulation rezessiver Krankheitsgene durch Inzucht gewesen sein (**Charlesworth, 1991**).

Die Prozesse der Geschlechtsdeterminierung führen zu physischer Separation verschiedener Individuen einer Spezies, die in der Lage sind, männliche bzw. weibliche Gameten bilden zu können (**Tanurdzig und Banks, 2004**). Die genetische Regelung der Geschlechtsfestlegung bei Tieren enthält im Allgemeinen drei grundlegende Komponenten: ein primäres (genetisches) Signal, einen darauf reagierender Hauptregulator sowie ein Schaltersystem, das zwischen zwei alternativen sexuellen Programmen wählt (**Nöthiger und Steinmann-Zwicky, 1987**).

Bei Tieren ist bekannt, dass die Bestimmung des Geschlechts durch drei verschiedene Prozesse erfolgen kann (**Ayling und Griffin, 2002**). So werden zum Beispiel geschlechtsdeterminierende Transkriptionsprozesse bei Echsen, Krokodilen und Schildkröten durch die Inkubationstemperatur der Embryos beeinflusst. Andere Systeme sind gen-basierend. Bei solchen Prozessen wird das Geschlecht durch die Allelkonformation eines Gens bestimmt (z. B. bei staatenbildenden Hymenopteren). Der dritte Mechanismus der Geschlechtsdetermination wird durch das Vorhandensein ganzer Geschlechtschromosomen bestimmt. Diese Art der Geschlechtsdetermination kommt bei *Drosophila*, Fischen, Vögeln und Säugetieren vor. Auch einige diözische Pflanzen mit heteromorphen Geschlechtschromosomen zeigen diese Art der Geschlechtsdetermination.

Bei der chromosomalen Geschlechtsbestimmung gibt es verschiedene Systeme. Bei dem ZZ/ZW-System der Vögel und Schlangen (**Graves, 1998**) sind die Weibchen heterogametisch (ZW), während die Männchen mit zwei Z-Chromosomen homogametisch sind. Säugetiere haben ein XX/XY-System, bei dem die Männchen heterogametisch (XY) und die Weibchen homogametisch (XX) sind. Auch die Taufliege *Drosophila* besitzt ein XX/XY-System. Während bei Säugern das Geschlecht durch das Y-Chromosom gesteuert wird entscheidet bei *Drosophila* das Verhältnis zwischen X-Chromosom(en) und den Autosomen. In Abhängigkeit von diesem Verhältnis sind verschiedene Geschlechts- und Zwischenformen bekannt. Die Gene, die das weibliche Geschlecht bestimmen, werden auf dem X-Chromosom vermutet. Gene, die das männliche Geschlecht determinieren, befinden sich vermutlich auf den Autosomen (**Winter et al., 1998**). Bei Fischen und Amphibien gibt es verschiedene Systeme (z. B. XX/XY, ZW/ZZ, XX/X0). Leider sind diese Arten noch sehr wenig untersucht, so dass oftmals keine fundierten Aussagen möglich sind.

### 2.1.1.1 Entwicklung der Geschlechtschromosomen

Die Entwicklung von Systemen heteromorpher Geschlechtschromosomen bei phylogenetisch weit voneinander entfernten Arten lässt die Beteiligung gleicher bzw. ähnlicher Ursachen an diesen Systemen vermuten. Es ist anzunehmen, dass sich alle Geschlechtschromosomen aus Paaren von Autosomen entwickelt haben. Sogenannte Proto-X- und -Y-Chromosomen enthielten demnach ein einfaches diallelisches Geschlechtschromosomensystem (**Negrutiu, 2001**).

Während der Evolution der Geschlechtschromosomen von Tieren wird allgemein davon ausgegangen, dass die Suppression von Rekombination (Crossing over) zu einer funktionellen und strukturellen Degeneration des Y-Chromosoms führte. Für diese Degeneration z. B. durch die Akkumulation von fixierten Mutationen auf dem Y-Chromosom werden u. a. Vorgänge wie Muller's ratchet, (**Muller, 1964**) und Hitchhiking (**Rice, 1987**) verantwortlich gemacht. Muller's ratchet beschreibt einen Mechanismus genetischer Drift, bei dem Deletionen zur Verhinderung von Rekombination führen, was wiederum deren Fixierung zur Folge hat. Das Fortschreiten dieses Prozesses führt zu einer Anreicherung weiterer Mutationen. Das Modell des Hitchhikings bei Y-Chromosomen beschreibt das Auftreten von günstigen Mutationen in einem nicht-rekombinierenden Bereich des Y-Chromosoms, was zur Fixierung aller

Deletionen dieses Chromosoms führt. Die Fixierung der Deletionen hat eine reduzierte genetische Aktivität der Y-Chromosomen zur Folge (**Rice, 1987**).

Trotz der weitestgehenden Unterdrückung von Rekombination der Geschlechtschromosomen gibt es bei einigen Organismen noch Regionen auf X und Y, die während der Meiose paaren und rekombinieren können. Solche Regionen werden Pseudo Autosomale Regionen (PAR) genannt. Diese Regionen können durch Translokationen autosomaler Gene entstanden sein (**Graves, 1995; Graves et al., 1998**). Als gut untersucht gilt die PAR von Säugetieren wie Mäusen und Menschen (**Ayling und Griffin, 2002**). Sie ermöglicht den Austausch zwischen den X- und Y-Chromosomen und gewährleistet eine korrekte Separation des Geschlechtschromosomenpaares während der Meiose. Bei Mäusen konnte festgestellt werden, dass Fehler bei diesem Vorgang zu einer Reduktion der Fertilität führten (**Hassold et al., 1991; Kipling et al., 1996**). Auch bei Menschen führen Deletionen in der PAR zu Fehlern bei der Spermatogenese. Allerdings fehlen PARs bei allen Beuteltieren und einigen Nagern. Homologe Paarung ist demnach keine universelle Notwendigkeit für die Fertilität (**Graves et al., 1998**). Die PARs von Menschen bzw. Mäusen haben Größen von 2600 kb bzw. 2000 kb (**Ayling und Griffin, 2002**). Zusätzlich zur 2600 kb großen PAR1 haben Menschen eine zweite ca. 500 kb große PAR, die PAR2. Diese PAR2 ist evolutionär jüngeren Ursprungs und kommt bei den nächsten Verwandten des Menschen, den Primaten, nicht vor (**Ellis et al., 1990**). Außerhalb des Tierreiches wurde das Vorkommen einer PAR erst bei einer Gattung diözischer Pflanzen beschrieben. Bei den Y-Chromosomen der Lichtnelke *Melandrium album* (syn. *Silene latifolia*) beschreibt **Westergaard (1953)** differenzierende, nicht-paarende Regionen und paarende Regionen (PAR). Der erste molekulare Nachweis der PAR bei Pflanzen gelang **Di Stilio et al. (1998)** bei einer Pflanzenart (*Silene dioica* L.) der gleichen Gattung. Es wird angenommen, dass die PAR Region im Verlauf der Evolution zugunsten einer vollständigen Differenzierung der Geschlechtschromosomen verschwindet (**Graves et al., 1998**).

Y-Chromosomen besitzen meist nur wenige aktive Gene. Viele der auf dem Y-Chromosom lokalisierten Gene, die homologe Gene auf dem X-Chromosom besitzen, haben im Verlauf der Evolution durch die Fixierung von Mutationen ihre Funktion verloren und wurden zu Pseudogenen. Andere erlangten durch Mutation eine männlich-spezifische Funktion. Das für die Entwicklung des männlichen Geschlechtes wichtigste Gen ist *SRY* (sex-determining region Y). Dieses Gen initiiert eine Kaskade von Genaktivierungen und Genunterdrückungen, die zur Expression des männlichen Geschlechtes führen (**Ayling und Griffin, 2002**).

Sowohl die Mechanismen der Geschlechtsvererbung als auch der Aufbau der Geschlechtschromosomen von Pflanzen zeigen große Ähnlichkeit zu den bekannten Systemen von Tieren. Eigenschaften wie z. B. die Degeneration der Y-Chromosomen bei Pflanzen und Tieren werden als Hinweis genereller evolutionärer Prozesse bei der Entwicklung von Geschlechtschromosomen gedeutet (Negrutiu, 2001; Charlesworth, 2002). So zeigen molekulare Vergleiche des Y-Chromosomes von *Marchantia* mit dem des Menschen deutliche Ähnlichkeiten (Tanurdzig und Banks, 2004). Ähnliches gilt auch für die Geschlechtschromosomen der beiden Pflanzenarten *Silene latifolia* und *Rumex acetosa*.

Die Y-Chromosomen vieler diözischen Pflanzenarten (z. B. *Silene*, *Rumex* und *Cannabis*) sind im Gegensatz zu den Y-Chromosomen der Säugetiere erheblich größer als die X-Chromosomen. Die Akkumulation repetitiver Sequenzen wird hierbei als Ursache angenommen. Solche repetitiven Sequenzen konnten unter anderem bei *Silene latifolia*, *Asparagus officinalis* und *Rumex acetosa* nachgewiesen werden.

Sexuell polymorphe Pflanzenarten mit auf Geschlechtschromosomen basierenden Systemen der Geschlechtsbestimmung entstanden im Laufe der Evolution mehrfach und unabhängig voneinander aus hermaphroditen Vorfahren. Infolge phylogenetischer Untersuchungen der Gattung *Silene* sind zwei Ursprünge der Diözie zu vermuten. Insgesamt wird angenommen, dass sich diözische Formen bei den Blütenpflanzen mehr als 100 mal entwickelt haben. So wird der Zeitpunkt der Separation der Geschlechtschromosomen bei *Silene* vor ca. 20 Millionen Jahren vermutet (Charlesworth, 2002). Im Vergleich dazu schätzt man, dass vor ca. 240 bis 320 Millionen Jahren die Evolution menschlicher Geschlechtschromosomen begonnen hat (Lahn und Page, 1999). Pflanzliche Geschlechtschromosomen gelten deswegen als relativ rezente Entwicklungen, an denen die Frühstadien der Evolution von Geschlechtschromosomen untersucht werden können (Charlesworth, 2002).

### 2.1.2 Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen

Ungefähr 90% der Blütenpflanzen sind Hermaphroditen mit zwittrigen Blüten, die auf die Produktion von Mikrosporen (♂) bzw. Makrosporen (♀) spezialisiert sind (Charlesworth, 2002). Von den restlichen Arten sind ca. 50% monözisch. Diese Pflanzen besitzen unisexuelle Blüten. Wobei die Blüten beider Geschlechter auf ein und dem selben Individuum lokalisiert sind. Zu den übrigen 50% (sexuell polymorph) gehören die diözischen Pflanzen. Bei diesen Pflanzen sind die männlichen und weiblichen Blüten auf getrennten Individuen lokalisiert.

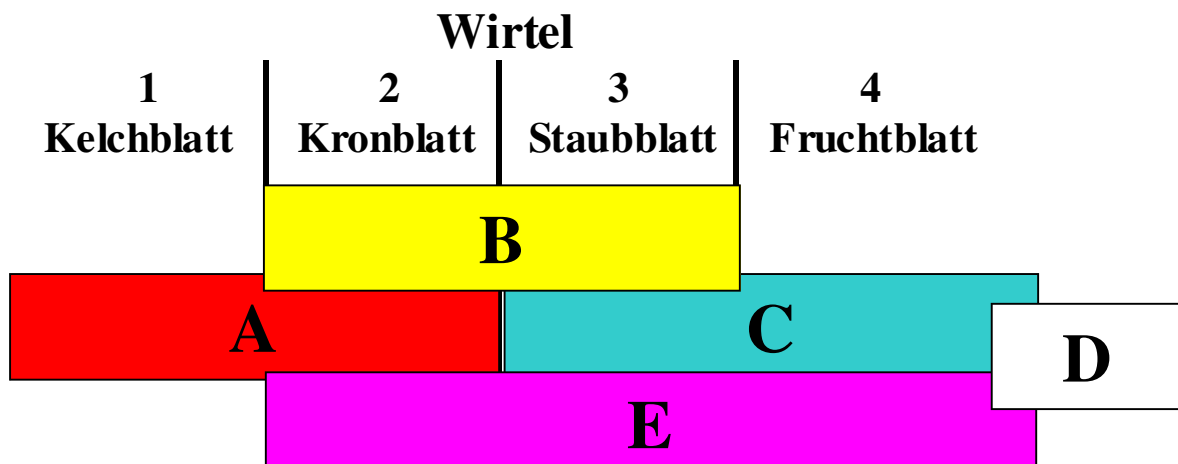
### 2.1.2.1 Sexuell monomorphe Pflanzen

Sexuell monomorphe Pflanzen, zu denen die Hermaphroditen und monözischen Pflanzenarten gehören, stellen die größte Gruppe der Blütenpflanzen dar.

Bei den Hermaphroditen wurde die genetische Steuerung der Blütenbildung durch Analyse von Mutationen bei den Arten *Arabidopsis* und *Antirrhinum* untersucht. Dabei wurden zwei grundlegende Klassen von Genen identifiziert. Die eine Genklasse ist verantwortlich für die Identität der Meristeme, während die der anderen Klasse zugehörigen Gene für die Ausbildung der Blütenorgane zuständig sind.

Der Prozess der Blütenbildung beginnt mit der Umwandlung von vegetativen Meristemen in Infloreszenzmeristeme und anschließend in florale Meristeme. Bisher wurden vier Gene (*EMF*: *Embryonic Flower*, *TFL*: *Terminal Flower*, *API*: *APETALA1* und *LFY*: *LEAFY*) identifiziert, die an diesen Vorgängen beteiligt sind. So führt beispielsweise die Suppression von *EMF* zur Umwandlung vom vegetativem Meristem zum Infloreszenzmeristem. Das *TFL* Gen ist verantwortlich für die Entwicklung des Infloreszenzmeristems bzw. für die Suppression des floralen Meristems. *API* und *LFY* sind für die downstream Expression von Genen (Blütenorganidentität) nötig.

Die genetische Steuerung der Blütenorganidentität wird durch das sogenannte ABC-Modell (**Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994**) beschrieben (**Abb. 1.1**). Hiefür verantwortlich sind drei, in ihrer Funktion überlappende Klassen (A, B, und C) homöotischer Gene. Die Proteinsequenzen vieler homöotischer Gene enthalten konservierte DNA- und proteinbindende Motive. Diese K-Box bzw. MADS-Box genannten Motive haben ähnliche Funktionen entwickelt, wie die für die Organidentität wichtigen Homöoboxgene der Tiere. Diese Gene codieren für verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren. Jede Klasse beeinflusst die Ausprägung von zwei Wirteln der Blütenanlage. Jeder dieser Wirtel bildet den Ursprung von jeweils einem der vier verschiedenen Blütenorgane. Die Gene der Klasse A beeinflussen die Ausbildung der Wirtel 1 und 2 (Kelch- und Kronenblätter). Klasse B Gene beeinflussen die Wirtel 2 und 3 (Kronen- und Staubblätter), während die Gene der Klasse C die Ausbildung der Wirtel 3 und 4 (Staub- und Fruchtblätter) beeinflussen (**Dellaporta und Calderon-Urrea, 1993**).



**Abbildung 1.1: Modell der Steuerung der Blütenorganidentität**

links: Die Ziffern 1 bis 4 bezeichnen die einzelnen Wirtel, darunter sind die durch die Genfunktion beeinflussten Blütenorgane angegeben. Die Genfunktionen sind mit A, B, C, D und E bezeichnet.

Neuere Modelle gehen von zwei weiteren Gen-Klassen (D und E) aus. Dabei spielen die D-Klasse Gene eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung der Eizellenidentität (**Colombo et al., 1995**). Die Gene der Klasse E (**Theissen, 2001**) exprimieren Proteine, welche mit den Proteinen der anderen Klasse interagieren. Durch die Identifizierung dieser beiden neuen Klassen wurde das klassische ABC-Modell von **Theissen (2001)** zum sogenannten Quartett-Modell erweitert. In diesem Modell wird die Identität der Blütenorgane durch vier verschiedene Kombinationen homöotischer Proteine bestimmt.

Bei der anderen Gruppe sexuell monomorpher Pflanzen, den Monözisten, erfolgt die Determination des Geschlechts der Blüten lokal während der Blütenentwicklung. Monözische Pflanzen können hinsichtlich ihrer Geschlechtsausprägung vereinfacht in zwei Gruppen geteilt werden. So gibt es Arten, die ausschließlich unisexuelle Blüten auf dem selben Individuum bilden und Arten, die neben den unisexuellen Blüten auch zwittrige Blüten auf dem selben Individuum produzieren. Zur ersten Gruppe gehört der Mais (*Zea mays*). Die Unisexualität von Maisblüten wird durch die selektive Eliminierung der Staubblätter in den weiblichen Blütenständen (Kolben) bzw. der Stempel in den männlichen Blütenständen hervorgerufen. Aufgrund der Untersuchung von Mutanten konnte hier ein entscheidender Einfluss von Gibberellinsäuren (GA) sowie anderen steroidartigen Hormonen bei der Unterdrückung der Staubblattentwicklung nachgewiesen werden (**Irish, 1999**).

Die Gurke (*Cucumis sativus*) gehört zur zweiten Gruppe monözischer Pflanzen. Auch hier sind alle Blüten ursprünglich hermaphroditisch angelegt. Die Unterbrechung der Entwicklung männlicher bzw. weiblicher Organe führt zur Ausbildung unisexueller Blüten. Drei Gene (F, A und M) beeinflussen die Ausbildung und Anordnung unisexueller Blüten. Das semidominante F-Gen bewirkt eine Zunahme des weiblichen Charakters in apikaler Richtung. Das A-Gen ist dazu epistatisch und wird ebenfalls für die Expression der Weiblichkeit benötigt. Das M-Gen ist nötig für die Entwicklung männlicher Blüten. Die Kombination der verschiedenen Allele von M und F entscheidet über die Geschlechtsausprägung der Pflanze. Einen weiteren Einfluss haben neben diesen drei Genen Phytohormone wie Gibberellinsäuren und Ethylen (**Tanurdzig und Banks, 2004**).

Bei Papaya (*Carica papaya*) wird das Geschlecht durch drei verschiedene Allelzustände eines einzigen Gens gesteuert. Die dominanten Allele M und M<sup>h</sup> führen zur Expression männlicher bzw. hermaphroditer Blüten. Die Expression des rezessiven Allels m führt zu weiblichen Blüten (**Storey, 1953**). Männchen haben die Konstitution Mm, Hermaphroditen M<sup>h</sup>m und Weibchen mm. Homozygote Zustände dominanter Allele (MM, M<sup>h</sup>M<sup>h</sup>) sowie Heterozygote (MM<sup>h</sup>) sind vermutlich letal.

### 2.1.2.2 Sexuell polymorphe Pflanzen

Sexuell polymorph sind neben primitiven Pflanzen wie dem Brunnenlebermoos *Marchantia polymorpha* einige Nacktsamer (Gymnospermae) sowie wenige Arten der Bedecktsamer (Angiospermae). Nur ca. 6% der bedecktsamigen Blütenpflanzen sind diözisch (**Renner und Ricklefs, 1995**). Dazu gehören Arten wie die Lichtnelken *Silene dioica* und *Silene latifolia*, der Spargel (*Asparagus officinalis* L.), die Pistazie (*Pistacia vera*), der Scheinhanf (*Datisca cannabina*), Arten der Gattungen *Rumex* (Ampfer) und *Actinia* (Kiwiartige) sowie die beiden *Cannabinaceen* Hanf (*Cannabis sativa*) und Hopfen (*Humulus lupulus*).

Die genetische Determination des Geschlechts diözischer Pflanzen erfolgt auf Ebene der gesamten Pflanze. Der sexuelle Dimorphismus diözischer Pflanzen wird in sehr frühen Phasen der Blütenentwicklung festgelegt (**Ainsworth et al., 1998**). Diese Festlegung erfolgt während oder nach den Prozessen der Blütenbildung des ABC-Modells und ist von diesem völlig unabhängig.

Eine Pflanze, bei welcher der Mechanismus der Geschlechtsvererbung gut untersucht ist, ist *Marchantia polymorpha*. Bei diesen primitiven Pflanzen dominiert der haploide Gametophyt den Lebenszyklus. Die von den Gametangien des Gametophyten gebildeten Gameten

vereinigen sich zum diploiden Sporophyten, der wiederum haploide Sporen hervorbringt. Aus den Sporen entwickeln sich dann wieder neue Gametophyten. Das Geschlecht der Gametophyten wird durch das Vorkommen cytologisch heteromorpher Geschlechtschromosomen determiniert. Männliche Gametophyten besitzen neben den acht Autosomen noch ein Y-Chromosom. Weibliche Gametophyten weisen an Stelle des Y-Chromosoms ein X-Chromosom auf (**Lorbeer, 1934**). Durch die Konstruktion X- bzw. Y-spezifischer PAC-(P1-based artificial chromosome) Banken konnten **Okada et al. (2000, 2001)** feststellen, dass ein Viertel bis ein Drittel des Y-Chromosoms aus variablen repetitiven Elementen besteht. Weiterhin wurden sechs potenziell proteincodierende Gene gefunden. Davon waren zwei Gene spezifisch für das Y-Chromosom. Die anderen vier Gene kamen auf Y und in geringen Kopienzahlen auch auf dem X-Chromosom vor.

Bei den diözischen bedecktsamigen Blütenpflanzen ist die Lichtnelke *Silene latifolia* L. am besten untersucht. Dort wird die Bildung unisexueller Blüten, ähnlich wie die Blüten monözischer Pflanzen, durch eine Einstellung der Entwicklung ursprünglich angelegter Androecien bzw. Gynoecien erreicht (**Grant et al., 1994**). Auch bei *Silene latifolia* wird die Geschlechtsdetermination durch Geschlechtschromosomen gesteuert. Das Y-Chromosom ist hier das größte Chromosom. Männliche Pflanzen sind heterogametisch (XY) und weibliche Pflanzen homogametisch vom Typ XX. Frühe Untersuchungen an Deletionsmutanten mit Deletionen am Y-Chromosom (**Westergaard, 1958**) führten zu der Erkenntnis, dass das Y-Chromosom über drei für die Geschlechtsexpression wichtige Regionen verfügt. Die erste Region wird als  $Su^F$  Region bezeichnet. Diese Region dient als Suppressor der Entwicklung weiblicher Organe. Im Gegensatz dazu kontrollieren die beiden anderen Regionen die Entwicklung der Antheren. Spätere Arbeiten von **Farbos et al. (1999)**, **Lardon et al. (1999)** und **Lebel-Hardenack et al. (2002)** konnten diese Erkenntnisse bestätigen. Bisher war es möglich, vier Gene zu identifizieren, welche auf dem Y-Chromosom liegen. Bei diesen Genen handelt es sich um *SLY-1* (**Delichere et al., 1999**), *SLY-4* (**Atanassov et al., 2001**), *MROS3\_Y<sup>a</sup>* (**Matsunaga et al., 1996**; **Guttman und Charlesworth, 1998**) und *DD44Y* (**Moore et al., 2003**). Jedes dieser Gene besitzt ein homologes Gen auf dem X-Chromosom. Zusätzlich dazu scheint *MROS3\_Y<sup>a</sup>* zu einer Familie von low copy Genen zu gehören, deren Mitglieder auch auf den Autosomen verteilt sind (**Kejnovsky et al., 2001**). Männlich-spezifische Expression zeigten nur die Gene *SLY-1* und *MROS3\_Y<sup>a</sup>*. Diese Gene scheinen aber nicht die geschlechtskontrollierenden Orte zu sein, sondern werden eher geschlechtsabhängig kontrolliert (**Charlesworth, 2002**).



Eine weitere gut untersuchte diözische Pflanzengruppe ist die Gattung *Rumex*. Die Geschlechtsbestimmung basiert hier auf heterogametischen Geschlechtschromosomen. Die weiblichen Pflanzen dieser Gattung besitzen zwei X-Chromosomen. Die Männchen dagegen besitzen neben dem X-Chromosom noch zwei Y-Chromosomen. Bei der Art *Rumex acetosa* wird das Geschlecht durch das Verhältnis weiblicher Faktoren auf dem X-Chromosom und männlicher Faktoren auf den Autosomen bestimmt (**Ainsworth et al., 1998; Stehlik und Blattner, 2004**). Die hoch heterochromatischen Y-Chromosomen haben lediglich Einfluss auf die männliche Fertilität, nicht aber auf die Geschlechtsexpression.

Beim Spargel (*Asparagus officinalis* L.) sitzt der geschlechtsbestimmende Faktor auf dem homomorphen Chromosomenpaar L5. Neben heterozygoten Männchen und homozygoten Weibchen gibt es hier sogenannte Supermännchen, die homozygot sind. Der mit dem Hanf nah verwandte Hopfen besitzt ebenfalls ein XY-basierendes System der Geschlechtsdetermination. **Shephard et al. (2000)** beschreiben die Geschlechtschromosomen als homomorph. Mittels differenzieller Färbetechniken mit dem Farbstoff DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride) war es **Karlov et al. (2003)** dennoch möglich, morphologische Unterschiede bei den Geschlechtschromosomen des Hopfens zu finden. Dabei konnte das Y-Chromosom als kleinstes aller Chromosomen identifiziert werden. Das X-Chromosom ist von mittlerer Größe.

## 2.2 Hanf

### 2.2.1 Botanik

Hanf, *Cannabis sativa* L., gehört innerhalb der Dicotyledoneae (zweikeimblättrige Pflanzen) zu den *Urticales* (Brennnesselartige) und innerhalb dieser zur Familie der *Cannabaceae* (syn.: *Cannabidaceae*). Die Familie der *Cannabaceae* (Hanfgewächse) besteht aus zwei Gattungen (*Cannabis* und *Humulus*). Die Arten beider Gattungen sind ursprünglich diözisch (zweihäusig).

Die Unterteilung innerhalb der Gattung *Cannabis* ist umstritten. Ältere Arbeiten unterteilen die Gattung in zwei (**Hoffmann et al., 1970**) oder drei Arten (**Schultes et al., 1974**). Aktuellere Untersuchungen gehen von einer Art mit mehreren Unterarten aus. Dabei unterscheiden **Small und Cronquist (1976)** Unterarten unabhängig von morphologischen Faktoren als THC-reiche Formen (*C. sativa* ssp. *indica*) und THC-arme Formen (*C. sativa*

ssp. *sativa*). Ebenfalls auf der Ebene der Unterarten werden breitblättrige und dichtverzweigte Drogenhanfe aus Afghanistan und Pakistan (*C. sativa* ssp. *indica*) von schmalblättrigen Faser- und Drogenhanfen (*C. sativa* ssp. *sativa*) der restlichen Welt unterschieden (**de Meijer, 1999**). Hanf ist eine einjährig, aufrecht wachsende, krautige Pflanze mit einer Wuchshöhe von bis zu fünf Metern. Die Wuchshöhe ist abhängig vom Typus und den Wachstumsbedingungen. Unter suboptimalen Bedingungen erreichen die Pflanzen die generative Phase schon bei erheblich geringeren Wuchshöhen (**Ranalli, 1999**). Die generative Phase der Kurztagspflanze Hanf wird durch lange Tageslängen verzögert. Die im Jugendstadium viereckige Sprossachse entwickelt im Verlauf des Wachstums einen sechseckigen Querschnitt. Das Wurzelsystem besteht aus einer radiären Hauptwurzel mit Seiten- und Nebenwurzeln. Die gefingerten Laubblätter besitzen 5 bis 13 lanzettförmige, gezähnte Spreitenabschnitte.

Anhand des Blütenaufbaus wird zwischen monözischen (einhäusigen) und diözischen (zweihäusigen) Hanfpflanzen unterschieden. Männliche Blütenstände diözischer Pflanzen sind blattlos in Form einer lockeren Rispe ausgebildet. Die kurzgestielten Blüten sind fünfzählig. Die Blüten diözischer weiblicher Pflanzen bilden als Scheinähren ein laubiges und unverzweigtes Sprossende (**Hoffman, 1947; Dierks und von Sengbusch, 1967**). Die weiblichen Blüten sind von Vorblättern eingeschlossen, welche mit einer Vielzahl von THC-sekretierenden Drüsenhaaren bedeckt sind (**Stearn, 1970**). Bei den diözischen Formen besitzen die weiblichen Pflanzen eine längere Lebensdauer (ca. 2–4 Wochen zur Ausreifung der Samen) als die Männchen, die nach der Pollenreife absterben.

Bei monözischen Formen entwickeln sich die männlichen Blüten von den Blattachsen ausgehend. Weibliche Blüten sind an Seitentrieben lokalisiert. Bei den monözischen Hanfformen können verschiedene Wuchs- und Geschlechtstypen unterschieden werden. Nach der Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale unterscheidet man Pflanzen mit weiblichem und männlichem Wuchstyp (**Hoffmann, 1947**). Innerhalb dieser Wuchstypen werden anhand des Verhältnisses männlicher und weiblicher Blüten weitere Unterscheidungen vorgenommen. Zu den weiblichen Wuchstypen zählen: normale Weibchen, feminisierte Monözisten (verschiedene Anteile männlicher und weiblicher Blüten) sowie feminisierte Männchen (ausschließlich männliche Blüten). Normale Männchen, maskulinisierte Monözisten (verschiedene Anteile männlicher und weiblicher Blüten) sowie maskulinisierte Weibchen (ausschließlich weibliche Blüten) gehören zum männlichen Wuchstypus. In seltenen Fällen konnte das Auftreten von zwittrigen Blüten festgestellt werden.

Die Früchte des Hanfes sind einfarbige bis marmorierte Nüsschen (Achäne).

### 2.2.2 Cytologie

Der diploide Hanf besitzt  $2n=20$  Chromosomen (**Hirata, 1929**). In den Zellen der primären Wurzelrinde kommen tetraploide Zellen vor (**Breslavetz, 1928, 1932; Riedel, 2000**). Wie bei einigen anderen diözischen Arten besitzt der Hanf ein heteromorphes Geschlechtschromosomenpaar (**Hirata, 1929; von Sengbusch, 1943; Hoffmann, 1947**). Die chromosomale Konfiguration monözischer Hanfformen ist unbekannt. **Yamada (1943)** beschreibt nach mikroskopischen Untersuchungen, dass diözische weibliche Pflanzen zwei X-Chromosomen und Männchen ein X- und ein Y-Chromosom besitzen. Das Y-Chromosom wird hier als das größte Chromosom des Hanfes beschrieben. Aktuelle Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (**Sakamoto et al., 1998**) bestätigen diese Befunde und charakterisieren das Y-Chromosom als subtelozentrisch mit einem Satelliten am kurzen Arm. Die Satellitenregion sowie der lange Arm des Y-Chromosomes kondensieren beim Übergang von der mitotischen Prophase in die Metaphase erheblich stärker als das X-Chromosom und die Autosomen. Die Akkumulation von Y-spezifischen LINE- (long interspersed element) like Retrotransposons (**Sakamoto et al., 2000**) wird als möglicher Grund für dieses Verhalten angeführt.

Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben bei diploiden Hanfformen Genomgrößen von 1636 Megabasenpaaren (Mbp) bei weiblichen Pflanzen und 1683 Mbp bei männlichen Pflanzen. Der Unterschied zwischen beiden Geschlechtern wird auf das erheblich größere Y-Chromosom zurückgeführt. Damit korrespondieren auch die Beobachtungen von **Herich (1961)**, welcher bei Untersuchungen der Größe von Pollenkörnern Unterschiede zwischen Pollen mit X- bzw. Y-Chromosomen finden konnte. Dabei war Y-Pollen im Vergleich zu X-Pollen wesentlich größer. Zum Vergleich dazu besitzt der Weizen mit 16000 Mbp ein erheblich größeres Genom. Die für ihr sehr kleines Genom bekannte Art *Arabidopsis thaliana* besitzt mit 260 Mbp ein etwa sechsmal kleineres Genom als der Hanf (**Kaneko et al., 1998; Sakamoto et al., 1998**). Genomgrößenunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Pflanzen konnten auch bei anderen diözischen Pflanzen gefunden werden. So besitzen männliche Pflanzen von *Silene latifolia* ein 2% bis 5% größeres Genom als weibliche Pflanzen (**Costich et al., 1991; Vagera et al., 1994; Dolezel und Göhde, 1995**)

### 2.2.3 Molekulargenetik

Molekularen Untersuchungen an Hanf werden seit Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Dazu gehörten Markeranalysen mittels RFLP- (restriction fragment length polymorphism) und RAPD- (random amplified polymorphic DNA) Technologie sowie Mikrosatellitenanalyse (STR: short tandem repeat, SSR: simple sequence repeat) zur Geschlechtsdetermination (**Sakamoto et al., 1995, 2000; Mandolino et al., 1999, 2002; Riedel, 2000; Törjék et al., 2002a, b; Moliterni et al., 2004, Rode et al., 2005**) sowie zur Analyse genetischer Diversität (**Faeti et al., 1996; Jagadish et al., 1996; Shirota et al., 1998; El-Ghany, 2001; Forapani et al., 2001, Kojoma et al., 2002, Alghanim und Almirall 2003**). Die AFLP- (amplified fragment length polymorphism) Technik nutzten **Flachowsky et al. (2001)** bzw. **Peil et al. (2003)**, um männlich- bzw. PAR-spezifische Marker zu identifizieren.

Arbeiten zur Untersuchung konservierter intergenischer Spacer-Regionen des Hanfes wie Internal Transcribed Spacer (ITS) und Chloroplasten Gene *trnL/F* wurden ebenfalls veröffentlicht (**Linacre und Thorpe, 1998** bzw. **Gigliano, 1999**).

Bei den Untersuchungen zur molekularen Geschlechtsdetermination konnten einige mit dem männlichen Geschlecht gekoppelte AFLP- und RAPD-Marker identifiziert werden. **Sakamoto et al. (1995)** fanden zwei RAPD-Primer, die 500bp bzw. 730bp große DNA-Fragmente nur mit DNA männlicher Pflanzen ein Fragment erzeugten. Die Umwandlung des männlich-spezifischen RAPD-Markers OPA<sub>8400</sub> gelang **Mandolino et al., 1999**. Mit Hilfe der AFLP-Technologie gelang es **Flachowsky (2003)** eine Vielzahl von männlich-spezifischen Marker zu identifizieren. Dabei konnte die erfolgreiche Umwandlung von zwei männlich-spezifischen AFLP-Markern in SCAR-Marker demonstriert werden.

Ebenfalls bei AFLP-Markeranalysen an Hanf (**Flachowsky, 2003; Peil et al., 2003**) zeigten die mit dem Y-Chromosom des Vaters gekoppelten Marker AGA\_AAT\_330 und AGA\_GAA\_510 bei den Nachkommen eine Rekombinationsrate von  $r=0,25$ . Es wird angenommen, dass sich diese Marker auf einer Region des Y-Chromosom des männlichen Elters befinden, die Homologien zum X-Chromosom besitzt. Diese Marker weisen auf eine PAR (Pseudo Autosomale Region) auf den Geschlechtschromosomen des Hanfes hin.