

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Markierung der Geschlechtschromosomen des Hanfes durch die Hybridisierung von Chromosomenpräparaten mit spezifischen Sonden. Damit sollte es ermöglicht werden, die Geschlechtschromosomen im Mikroskop sichtbar zu machen. Die Identifizierung der Geschlechtschromosomen mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung stellt ein wichtiges Hilfsmittel dar, um den Geschlechtsvererbungsmechanismus beim Hanf aufzuklären. Solche geschlechtsspezifischen Sonden könnten dann für die Untersuchung der chromosomalen Konfiguration monözischer Hanfformen von großem Nutzen sein. Bisher ist nicht bekannt, wie es zur Entstehung unisexueller Formen des ursprünglich diözischen Hanfes kommt und inwieweit neben den geschlechtschromosomal lokalisierten Faktoren auch Faktoren auf den Autosomen eine Rolle bei der Geschlechtsausprägung des Hanfes spielen.

4.1 Entwicklung geschlechtsspezifischer Sonden

4.1.1 Entwicklung von geschlechts- und PAR-spezifischen SCAR-Markern

Bereits vorhandene geschlechts- und PAR-spezifische RAPD- und AFLP-Marker (**Riedel, 2000; Flachowsky, 2003**) sollten als Sonden für die *in situ* Hybridisierung genutzt werden. Dazu mussten diese AFLP- bzw. RAPD-Marker in sequenzspezifische SCAR- (sequence characterized amplified region) Marker konvertiert werden. Dieser Schritt war notwendig, da die Produkte der AFLP- und RAPD-Reaktionen aus unterschiedlichen Fragmenten verschiedener Größen bestanden, von denen jedoch nur jeweils ein Fragment die gewünschten Eigenschaften aufwies. Für spezifische Sonden sind allerdings lediglich die mit dem Geschlecht bzw. der PAR gekoppelten DNA-Fragmente von Interesse, da mit den Sonden nur die Geschlechtschromosomen markiert werden sollten. Die anderen unspezifischen AFLP- oder RAPD-Fragmente würden bei einer *in situ* Hybridisierung nur störende Signale erzeugen. Weitere Vorteile dieser sequenzspezifischen SCAR-Marker bestehen in ihrer einfacheren Handhabung im Rahmen von Markeranalysen, verbunden mit Einsparungen in den Bereichen Arbeitsaufwand und Arbeitszeit. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass dominante AFLP- bzw. RAPD-Marker konvertiert in SCAR-Marker kodominantes Verhalten zeigen. Bei Markeranalysen sind kodominante Marker gegenüber dominanten Markern informativer.

Synonym zur Bezeichnung SCAR-Marker wird in der Literatur teilweise auch der Begriff STS- (sequence tagged site) Marker verwendet.

Erfolgreiche Konvertierungen von RAPD-Markern in SCAR-Marker wurden bei **Paran und Micheltore (1993)** beschrieben. Dabei gelang es ihnen, bei *Lactuca sativa* von neun mit dem Mehlttauresistenzgen *Dm* gekoppelten RAPD-Markern drei in dominante und weitere drei in kodominante SCAR-Marker umzuwandeln. **Dedryver et al. (1996)** konnten ebenfalls einen mit dem Braunrostresistenzgen *Lr24* gekoppelten RAPD-Marker in einen für das Resistenzzüchtungsprogramm im Weizen einfach anwendbaren SCAR-Marker umwandeln. Auch AFLP-Marker konnten erfolgreich in SCAR-Marker konvertiert werden. So gelang z. B. **Sardesai et al. (2002)** die Umwandlung eines AFLP-Markers für die Resistenz von Reis gegen die Gallmücke *Orseolia oryzae* in einen SCAR-Marker. Die erfolgreiche Konvertierung geschlechtsspezifischer AFLP- bzw. RAPD-Marker in sequenzspezifische SCAR-Marker konnte bereits bei verschiedenen diözischen Pflanzen wie *Actinia spec.* (**Gill et al., 1998**), Feige (**Parrish et al., 2004**), Hopfen (**Polley et al., 1997**), Papaya (**Parasnis et al., 2000; Urasaki et al., 2002**) und Spargel (**Jiang und Sink, 1996; Reamon-Büttner und Jung, 2000**) durchgeführt werden. Bei der hinsichtlich der Geschlechtsvererbung am besten untersuchten zweihäusigen Pflanze *Silene latifolia* wurden ebenfalls männlich-spezifische SCAR-Marker entwickelt (**Zhang et al., 1998; Nakao et al., 2002**). Dabei konnten **Zhang et al. (1998)** männlich-spezifische RAPD-Marker in fünf SCAR-Marker konvertieren. Einige dieser SCARs ließen sich auch bei verwandten Arten wie *Silene dioica* und *Silene diclinis* erfolgreich als Geschlechtmarker anwenden. Die Identifizierung eines männlich-spezifischen AFLP-Markers für die diözische Feige *Ficus fulva* gelang **Parrish et al. (2004)**. Die Umwandlung in einen männlich-spezifischen SCAR-Marker scheiterte allerdings. Der SCAR-Marker erzeugte bei beiden Geschlechtern ein Fragment gleicher Größe. Sequenzhomologien des Locus zwischen männlichen und weiblichen Pflanzen wurden als Ursache dafür angegeben. Weitere geschlechtsspezifische SCAR- und STS-Marker wurden für die Kulturpflanze *Asparagus officinalis* L. durch **Jiang und Sink (1996)** bzw. **Reamon-Büttner und Jung (2000)** entwickelt. Aufgrund ihres höheren Ertrages und der längeren Lebensdauer werden männliche Spargelpflanzen im kommerziellen Anbau bevorzugt. Die Züchtung homogener männlicher Linien geschieht durch die Kreuzung weiblicher Pflanzen (XX) mit sogenannten Supermännchen (YY). Eine morphologische Unterscheidung der nach zwei Jahren blühenden normalen (XY) Männchen von den Supermännchen (YY) ist nicht möglich. Nach herkömmlichen Methoden konnten die Supermännchen nur durch aufwändige

Testkreuzungen identifiziert werden. Die Entwicklung kodominanter geschlechtsspezifischer Marker für den Spargel ermöglicht eine wesentlich schnellere Identifizierung der verschiedenen Geschlechtstypen. **Jiang und Sink (1996)** konvertierten einen mit dem männlichen Geschlecht gekoppelten RAPD-Marker in einen dominanten SCAR-Marker. Versuche, daraus einen kodominanten Marker zu entwickeln, scheiterten. Dagegen konnten **Reamon-Büttner und Jung (2000)** ausgehend von einer AFLP-Markeranalyse einen kodominanten STS- (sequence tagged site) Marker entwickeln.

Auch für den Hanf wurden bereits männlich-spezifische RAPD- und SCAR-Marker beschrieben (**Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1999; Törjék et al., 2002a, b**). Männlich-spezifische AFLP-Marker des Hanfes wurden erstmals von **Flachowsky (2003)** an ALF-Sequenzergelen isoliert und in SCAR-Marker konvertiert.

4.1.1.1 Konvertierung von geschlechtsspezifischen RAPD-Markern in SCAR-Marker

Um geeignete Sonden für die *in situ* Hybridisierung herstellen zu können, sollten die zwei männlich-spezifischen RAPD-Marker OPE-11₃₀₀ und OPC-11₂₇₀₀ (**Riedel, 2000**) in SCAR-Marker umgewandelt werden.

Nach erfolgreicher Isolierung des Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ aus einem Agarosegel wurde es kloniert und von beiden Seiten ansequenziert. Ein Vergleich der Sequenzdaten (blastx) erbrachte Homologien zu gag / pol Vorläuferproteinen eines *Ty3-gypsy-like* Retrotransposons bei Wein (**Kobayashi et al., 2004**) und Retroelementen anderer Pflanzen. Retroelemente sind weit im pflanzlichen Genom verstreute Sequenzen mit virenähnlicher Struktur. Homologien geschlechtsspezifischer DNA-Marker mit retrotransposon-ähnlichen Sequenzen konnten bereits bei diözischen Pflanzen festgestellt werden. So fanden **Pritham et al. (2003)** bei *Silene latifolia* ein aktives Y-gekoppeltes *Ac-like* transponibles Element. Ein *Ty3-gypsy-like* Retrotransposon konnten **Obara et al. (2002)** gleichfalls in einem männlich-spezifischen RAPD-Fragment bei *Silene latifolia* nachweisen. Auch bei *Rumex acetosa* konnten **Clark und Parker (1993)** ähnliche Sequenzen auf dem Y-Chromosom finden. **Mandolino et al. (1999)** fanden bei Hanf Homologien des männlich-spezifischen RAPD-Fragmentes MADC2 zu Retrotransposons von Gerste, Erbse und anderen Pflanzenarten. Ebenfalls bei Hanf fand die Arbeitsgruppe um **Sakamoto et al. (2000)** ein Y-spezifisch akkumuliertes LINE-like Retrotransposon.

Anhand der Sequenzdaten der Enden des RAPD-Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ wurden die Primer C11Komp_L, C11Komp_R und C11Seq_L abgeleitet. Der weiter im Inneren des Fragmentes liegende Primer C11Seq_L wurde ursprünglich für die Durchsequenzierung des gesamten Fragmentes abgeleitet. Die Amplifikation wurde mit DNA von Pflanzen der Population A2 durchgeführt. Dabei zeigte das Primerpaar C11Komp_L + C11Komp_R die erwartete Bande bei allen männlichen, aber auch bei einigen weiblichen Pflanzen. Dagegen konnte mit dem Primerpaar C11Seq_L + C11Komp_R ein ca. 2,2 kb großes Fragment nur bei männlichen Pflanzen amplifiziert werden. Die vollständige Kopplung dieses Fragmentes mit dem männlichen Geschlecht konnte bei allen 74 Pflanzen der Population A2 nachgewiesen werden. Dieser männlich-spezifische Marker wurde als C11Seq bezeichnet. Damit stand ein ca. 2,2 kb großes männliches DNA-Fragment zur Verfügung, das in eine Sonde umgewandelt werden konnte.

Die Konvertierung des RAPD-Markers OPE-11₃₀₀ in einen männlich-spezifischen SCAR-Marker konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.

4.1.1.2 Konvertierung von PAR-spezifischen AFLP-Markern in SCAR-Marker

Die PAR-spezifischen Fragmente der AFLP-Marker AGA_AAT_330 und AGA_GAA_510 (Flachowsky, 2003; Peil et al., 2003) wurden aus einem ALF-Sequenzier-Gel isoliert, kloniert und sequenziert. Alle Klone des Markers AGA_AAT_330 wiesen die gleiche Sequenz auf. Das Auffinden der Primingsites der selektiven AFLP-Primer *Hind*III und *Mse*I führte zu der Annahme, dass die selektierten Klone das gewünschte Fragment integriert hatten. Auch die Größe des Fragmentes lag mit 280 bp im erwarteten Bereich. In der Sequenz des Fragmentes konnte ein Mikrosatellit mit der siebenfachen Wiederholung des Motivs „CA“ gefunden werden.

Anhand der Sequenzdaten wurden für das Fragment AGA_AAT_330 zwei Primerpaare abgeleitet. Dabei sollte das Primerpaar AAT330Komp das gesamte Fragment amplifizieren, während das Primerpaar AAT330CA direkt um den Mikrosatelliten gelegt wurde. Das Primerpaar AAT330Komp zeigte bei der Amplifikation mit 74 Pflanzen der Population A2 die gleiche Aufspaltung wie der AFLP-Marker AGA_AAT_330. Damit konnte abschließend bestätigt werden, dass das isolierte Fragment dem PAR-spezifischen Fragment des AFLP-Markers entsprach.

Die PCR-Bedingungen des Primerpaares AAT330CA mussten durch die Verwendung eines Touchdown-Protokolls optimiert werden. Durch diese Maßnahme konnte ein kodominantes Aufspaltungsverhältnis dieses Mikrosatelliten-Markers erzeugt werden. Bei der Amplifikation mit 74 Pflanzen der Population A2 konnte bei allen Pflanzen, die die PAR-spezifische Bande des AFLP-Markers AGA_AAT_330 zeigten, ein ca. 120 Basenpaare großes Fragment amplifiziert werden. Alle anderen Pflanzen amplifizierten ein anderes ca. 490 Basenpaare großes Fragment. Diese Segregation deutet darauf hin, dass beide Fragmente vom Vater der Population stammen. Dabei scheint das 120 bp große Fragment ursprünglich auf dem Y-Chromosom des Vaters lokalisiert zu sein, während das 490 bp große Fragment vom X-Chromosom des Vaters stammt.

Die Sequenzierung von vier Klonen des PAR-spezifischen AFLP-Fragmentes AGA_GAA_510 erbrachte drei verschiedene Sequenzen. Ein Klon (510_A10) wies an beiden Enden des Fragmentes Primingsites des *MseI*-Primers auf. Fragmente, die nur durch *MseI*-Primer amplifiziert werden, können bei den AFLP-Reaktionen ca. 16 mal häufiger vorkommen als die mit *HindIII*- und *MseI*-Primern amplifizierten Fragmente. Nur mit *MseI*-Primern amplifizierte Fragmente sind auf dem AFLP-Gel des ALF-Sequenzers allerdings nicht sichtbar, da nur die *HindIII*-Primer markiert sind. Zwei weitere Klone (510_B3 und -B4) wiesen identische, der vierte Klon (510_B9) eine andere Sequenz auf. Bei diesen Klonen konnten die Primingsites der selektiven AFLP-Primer *HindIII*+AGA und *MseI*+GAA nachgewiesen werden. Die Sequenzen der Klone 510_B3 bzw. -B4 und 510_B9 unterscheiden sich in der Länge um 14 Basenpaare.

Ähnliche Beobachtungen konnten von **Stackelberg et al. (2003)** bei der Umwandlung von AFLP-Markern in STS-Marker bei Erbse machen. Hier wurden pro AFLP-Bande 1-5 verschiedene Fragmente kloniert. Dabei werden kontaminierende DNA-Fragmente, welche im Gel auf Höhe der interessierenden AFLP-Bande mitlaufen, als Ursache angegeben. Auch **Reamon-Büttner und Jung (2000)** sowie **Stehlik und Blattner (2004)** konnten je AFLP-Bande mehrere DNA-Fragmente finden.

Für die Fragmente der Klone 510_B3 und 510_B9 wurde jeweils ein Primerpaar abgeleitet. Die Primer wurden mittels Gradienten-PCRs an Pflanzen der Population A2 getestet. Mit dem Primerpaar GAA510_B3 konnte kein Fragment amplifiziert werden. Das durch das Primerpaar GAA510_B9 amplifizierte ca. 450 bp große Fragment zeigte gegenüber dem Ausgangsmarker AGA_GAA_510 keine Kosegregation. Auch bei CAPS- (cleaved amplified

polymorphic sequence) und SSCP- (single strand conformation polymorphism) Analysen konnte keine Cosegregation gegenüber dem Ausgangsmarker festgestellt werden.

Vergleichbare Resultate veröffentlichten auch **von Stackelberg et al. (2003)**. Sie konnten bei der Konvertierung von AFLP-Markern für den *def* Locus der Erbse nur drei von zwölf AFLP-Marker in STS-Marker umwandeln. Ein Großteil der aus klonierten AFLP-Fragmenten abgeleiteten STS-Primer zeigte keine polymorphe Aufspaltung. Um dennoch spezifische STS-Marker zu entwickeln, wurden anhand der klonierten Sequenzen AFLP-Primer mit zusätzlich zwei bis fünf selektiven Basen abgeleitet. Diese Primer, eingesetzt in einer sogenannten „sequence specified AFLP“ (ssAFLP), erzeugten dann in fünf Fällen die gewünschten Polymorphismen. **Reamon-Büttner und Jung (2000)** lösten Probleme mit unspezifischen AFLP-Fragmenten durch die Nutzung der RFLP-Technik. Hier wurden klonierte AFLP-Fragmente als Sonde eingesetzt, um geschlechtsspezifische low copy AFLP-Fragmente aufzufinden. Diese wurden anschließend erfolgreich in STS-Marker umgewandelt. Einen anderen Weg gingen **De Jong et al. (1997)** und **Negi et al. (2000)** bei Kartoffel bzw. *Brassica juncea*. Die Ableitung polymorpher SCAR-Marker aus den isolierten AFLP-Fragmenten scheiterte auch hier. Erst durch die Amplifikation der flankierenden Sequenzen der AFLP-Fragmente durch inverse PCR (I-PCR) bzw. PCR Walking konnten diese Autoren aus den Sequenzinformationen der flankierenden Regionen polymorphe SCAR-Marker entwickeln. Ein solcher Ansatz könnte auch bei dem AFLP-Fragment 510_B9 zum Erfolg führen.

Von zwei für die PAR von Hanfchromosomen spezifischen AFLP-Markern konnte einer erfolgreich in zwei spezifische SCAR-Marker umgewandelt werden. Dabei gelang mit der Ableitung des Primerpaares 330CA die Umwandlung eines dominanten AFLP-Markers in einen kodominanten SCAR-Marker. Beide Marker eignen sich für PCR-Analysen, aber als Sonde für die *in situ* Hybridisierung sind sie zu klein. Zwar können kurze Sonden (<1 kb) bei Chromosomen von Mensch und Maus routinemäßig detektiert werden, bei Pflanzenchromosomen ist das aber weniger sicher (**Schwarzacher und Heslop-Harrison 2000**). Sonden mit kleinen Fragmentgrößen erzeugen bei der FISH nur dann Signale, wenn deren Zielsequenzen in tandemartigen Wiederholungen vorkommen. Um dennoch geeignete Sonden aus den spezifischen AFLP-Fragmenten zu erzeugen, wurde versucht, diese zu verlängern. Eine Möglichkeit dafür bestand darin, mittels PCR in die flankierenden Bereiche links und rechts der AFLP-Fragmente hinein zu amplifizieren. Die somit erzeugten größeren Sonden sollten bei der FISH besser detektierbar sein. Zur Amplifikation in die flankierende Region wurde ein PCR-Walking Protokoll verwendet. Bei anderen Arbeiten wurde zur Amplifikation

in unbekannte flankierende Sequenzen die I-PCR genutzt (**De Jong et al., 1997; Nakao et al., 2002**). PCR Walking ist gegenüber der I-PCR der bessere Ansatz zur Amplifikation flankierender Bereiche (**Devic et al., 1997**). Durch PCR Walking können zum einen größere Fragmente erzeugt werden, zum anderen entfallen langwierige Optimierungsprozeduren. **Siebert et al. (1995)** zeigten die erfolgreiche Anwendung dieser Methode bei der Amplifikation der Upstreamregion des menschlichen Plasminogen Aktivator Exons 1. Bei Pflanzen wurde die Eignung dieser Methode ebenfalls in vielen Arbeiten nachgewiesen. So nutzten **Negi et al. (2000)** diese Technologie bei der Umwandlung eines AFLP-Marker für die Samenfarbe bei *Brassica juncea* in einen SCAR-Marker. Da die Fragmente, welche mit direkt aus dem spezifischen AFLP-Fragment hergestellten Primer amplifiziert wurden, für eine Unterscheidung auf den Agarosegel zu geringe Größenunterschiede aufwiesen, wurden die flankierenden Regionen des AFLP-Fragmentes amplifiziert. Mit den Sequenzdaten der flankierenden Bereiche konnte dann ein kodominanter SCAR-Marker generiert werden. Sehr erfolgreich wurde die Methode des PCR Walkings auch bei der Analyse T-DNA-flankierender Regionen transgener Pflanzen eingesetzt (**Cottage et al., 2001, Ortega et al., 2002**).

Durch das PCR Walking in die flankierenden Regionen links und rechts des PAR-spezifischen AFLP-Fragmentes AGA_AAT_330 wurden neben einer Vielzahl von schwachen Nebenbanden drei Hauptbanden amplifiziert. Für beide Seiten konnte je eine Hauptbande mit einer Fragmentgröße von mehr als 4 kb isoliert werden, die anderen starken Banden waren deutlich kleiner. Ähnlich große Fragmente wurden auch von **Siebert et al. (1995)** erwähnt. Hier wurde allerdings nur jeweils eine Hauptbande erzeugt. Andere Arbeiten konnten nur kleinere Fragmente amplifizieren (**Negi et al., 2000**). Das Auftreten von schwachen Nebenbanden konnte bei diesen Arbeiten jedoch auch beobachtet werden.

Durch PCR Walking wurde das ursprünglich 280 bp lange AFLP-Fragment AGA_AAT_330 auf ca. 8 kb Länge vergrößert. Nach der Klonierung der beiden längsten Hauptbanden (330GW_L bzw. 330GW_R) konnte durch Ansequenzierung der Enden der Klone deren Herkunft bestätigt werden.

4.1.2 Southern-Blot Analyse molekularer Marker

Die Spezifität der entwickelten SCAR-Marker wurde durch die Hybridisierung von Southern Blots mit aus den SCAR-Markern hergestellten Sonden überprüft. Bei der Southern-Blot Analyse kann zudem geklärt werden, ob die durch die SCAR-Marker amplifizierten

Fragmente einmal (single copy), mehrfach (low copy) oder sehr oft (multi copy bzw. repetitiv) im Genom vorkommen. Weiterhin wurden Southern Blots genomischer DNA des Hanfes mit männlich-spezifischen Sonden von *Silene latifolia* hybridisiert, um mögliche Homologien zwischen beiden Arten zu finden.

Bei der für die Herstellung der Southern Blots notwendigen gelelektrophoretischen Auftrennung der verdauten genomischen DNA konnten keine geschlechtsspezifischen Restriktionsmuster festgestellt werden. Solche Muster können aber z. B. bei der Restriktion von DNA der diözischen Pflanze *Rumex acetosa* mit dem Enzym *EcoRI* (**Ruiz Rejon et al., 1994; Shibata et al., 2000**) beobachtet werden.

Southern Blots mit DNA männlicher und weiblicher Pflanzen wurden mit geschlechtsspezifischen SCAR-Markern als Sonden hybridisiert. Southern Blots mit DNA von Pflanzen, die die PAR-spezifischen AFLP-Marker zeigen bzw. nicht zeigten, wurden mit den PAR-spezifischen SCAR-Markern als Sonden hybridisiert.

Die Sonde C11Komp (Primerpaar C11Komp_L + C11Komp_R) erzeugte vor allem im höhermolekularen Bereich mehr oder weniger verschmierte Hybridisierungsmuster. Solche Schmiere, bei denen Einzelbanden schwer bzw. nicht unterscheidbar sind, weisen auf repetitive DNA-Fragmente hin, die in hohen Kopienzahlen im Genom vorkommen. Daneben konnten auch einige stärkere Einzelbanden festgestellt werden. Des Weiteren wurde bei *HindIII* verdauter DNA im Bereich von unter 500 bp ein geschlechtsspezifischer Größenpolymorphismus gefunden. Die betreffende Bande wies bei männlicher DNA eine um ca. 50 bp verringerte Größe als bei weiblicher DNA auf. Als Ursache für den Größenpolymorphismus kann ungleichmäßiges Auftrennen der DNA ausgeschlossen werden, da die anderen Banden der *HindIII* verdauten DNA auf gleicher Höhe erschienen. Auch das Restriktionsmuster des für diesen Blot hergestellten Agarosegels weist bei *HindIII* verdauter DNA kein unterschiedliches Laufverhalten auf.

Das gleichzeitige Auftreten von spezifischen und unspezifischen Hybridisierungssignalen kann damit erklärt werden, dass nur eine im Genom vorkommende Kopie des Fragmentes C11Komp geschlechtsspezifische Eigenschaften hat oder nur ein Teil der Sondensequenz geschlechtsspezifisch ist. Der aufgetretene Polymorphismus manifestiert sich dabei in der Länge der Sequenz des mit der Sonde hybridisierenden Bereiches, verursacht durch unterschiedliche Positionen der *HindIII*-Schnittstellen oder einer Deletion innerhalb der Sequenz. Die Akkumulation von Mutationen auf dem Y-Chromosom spielt als Bestandteil fortschreitender Degeneration bei der Differenzierung der Geschlechtschromosomen eine

wichtige Rolle (**siehe Kap. 1.2.7**). Das Auftreten der anderen hauptsächlich repetitiven Hybridisierungsmuster bei der Sonde C11Komp lässt sich durch die Homologie der Sondensequenz mit Retroelementen erklären (**siehe Kap. 3.1.1 und 4.1.1**). Retroelemente sind oft in hoher Kopienzahl dispers im heterochromatischen Bereich des Genomes verteilt zu finden. Daneben gibt es aber auch chromosomenspezifische Anreicherungen von Retroelementen. Beispielsweise konnten **Sakamoto et al. (2000)** bei Hanf die Y-spezifische Akkumulationen eines LINE-like Retrotransposons dokumentieren. Southern-Blot Analysen dieses LINE-like Retrotransposons zeigten ähnlich den Ergebnissen der Southern Analyse des Fragmentes C11Komp neben geschlechtsspezifischen Banden auch Banden, die bei beiden Geschlechtern gleich waren. Das gleichzeitige Vorkommen spezifischer und unspezifischer Hybridisierungsmuster wurde auch bei **Nakao et al. (2002)** erwähnt. Sie hybridisierten genomische Southern Blots mit 18 Klonen männlich-spezifischer RAPD-Fragmente von *Silene latifolia*. Dabei zeigten vier Klone neben unspezifischen Banden wenigstens ein männlich-spezifisches Fragment. Nur ein einziger Klon davon zeigte ausschließlich eine geschlechtsspezifische Bande. Ebenfalls bei *Silene latifolia* konnte das Auftreten homologer Sequenzen und Gene auf den X- und Y-Chromosomen festgestellt werden (**Matsunaga et al., 1996; Guttman and Charlesworth, 1998; Delichere et al., 1999; Atanassov et al., 2001; Moore et al., 2003**)

Der durch die Sonde AAT330Komp erzeugte intensiv ausgeprägte Schmier weist auf einen noch stärker repetitiven Charakter des Fragmentes hin. Die Spezifität des SCAR-Markers, aus dem diese Sonde entwickelt wurde, beruht demnach wahrscheinlich auf Einzelbasenunterschieden an den Anlagerungsstellen der Primer. Solche geringen Unterschiede können mit den hier benutzten Southern Blots auch bei höchster Stringenz nicht detektiert werden. Um mittels Southern Blot diese Einzelbasenunterschiede zu erfassen, müsste die zu blottende DNA mit den Restriktionsenzymen geschnitten werden, welche auch bei der AFLP-Reaktion verwendet wurden. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Spezifität des SCAR-Markers auf Schnittstellenpolymorphismen der bei der AFLP-Methode verwendeten Restriktionsenzyme basiert.

Im Gegensatz zu den anderen Markern zeigte das Fragment GAA_510_B9 bei der Southern-Blot Analyse keine repetitiven Hybridisierungssignale sondern je DNA-Spur nur ein Signal. Da auch der aus diesem Fragment entwickelte SCAR-Marker nicht mit dem AFLP-Marker, aus dem er entwickelt wurde, kosegregierte, war bei der Southern-Blot Analyse kein anderes Ergebniss zu erwarten.

Bei der Southern-Blot Analyse der flankierenden Sequenzen des AFLP-Fragmentes AGA_AAT_330 konnten ebenfalls keine PAR-spezifische Hybridisierungsmuster festgestellt werden. Das Auftreten stärkerer z. T. verschmierter Signale weist auf einen repetitiven Charakter der Fragmente hin. Daneben konnten einige dominanter z. T. hintereinander liegende Banden (in den *EcoRI* und *HindIII* Spuren) gefunden werden. Solche Hybridisierungsmuster können z. B. bei der Hybridisierung tandemartig angeordneter Sequenzmotive beobachtet werden. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Spezifität des Ausgangsmarkers auf Einzelbasenunterschieden an den Primeranlagerungsstellen beruht, die nicht durch die hier durchgeführten Southern-Blot Analysen erfasst werden können. Unspezifische Hybridisierung geschlechtsspezifischer Sonden konnten auch **Zhang et al. (1998)** bei *Silene latifolia* feststellen. Hier wurden sieben männlich-spezifische RAPD-Marker in SCAR-Marker umgewandelt. Obwohl die SCAR-Marker unter optimalen PCR-Bedingungen männlich-spezifische Fragmente amplifizierten, erzeugten sie, eingesetzt als Sonden bei Southern-Blot Analysen, nur unspezifische Hybridisierungsmuster in Form eines Schmiere. **Mulcahy et al. (1992)** berichteten vergleichbare Ergebnisse. Auch für AFLP-Marker werden ähnliche Ergebnisse berichtet (**Reamon-Büttner und Jung, 2000**). Bei der Umwandlung Y-spezifischer AFLP-Marker des Spargels in STS-Marker zeigten viele der klonierten AFLP-Fragmente repetitive Hybridisierungsmuster. Sowohl RAPD- als auch AFLP-Marker sind bekannt dafür, oft in repetitiven Genombereichen lokalisiert zu sein (**Meksem et al., 1995; Reamon-Büttner und Jung, 2000**). Da der größte Teil des Pflanzengenoms aus repetitiver DNA besteht, ist es wahrscheinlich, dass ein Großteil der molekularen Marker auch im repetitiven Bereich lokalisiert ist. Auch der von **Mandolino et al. (1999)** beschriebene männlich-spezifische RAPD-Marker OPA₈₄₀₀ bei Hanf wies bei Southern-Blot Analysen männlicher und weiblicher Pflanzen keine geschlechtsspezifischen Polymorphismen auf. Die Spezifität von RAPD- und AFLP-Primern basiert oft auf Polymorphismen an den Primingsites bzw. den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme (**Nakao et al., 2002; Reamon-Büttner und Jung, 2000**).

Allerdings konnten RAPD-Marker in anderen Fällen geschlechtsspezifische Hybridisierungsmuster erzeugen. Dies gelang **Polley et al. (1997)** bei Hopfen mit einem männlich-spezifischen RAPD-Fragment. Allerdings zeigte diese Sonde nach sehr langer Belichtungszeit auch bei weiblicher DNA Signale. Auch bei Papaya zeigte ein männlich-spezifisches RAPD-Fragment nur bei der Hybridisierung mit genomischer DNA männlicher sowie hermaphroditer Pflanzen ein Signal, nicht aber bei DNA weiblicher Pflanzen (**Urasaki et al., 2002**).

Bei der Southern-Blot Analyse mit den von der diözischen Pflanzenart *Silene latifolia* stammenden männlich-spezifischen Sonden *Sly1* und *Sly4* konnten keine Signale detektiert werden. Daher kann angenommen werden, dass es beim Hanf keine homologen Bereiche zu den beiden Sonden *Sly1* und *Sly4* gibt. Zwischenartliche Sequenzhomologien bestehen vor allem bei Genen, die grundlegende Prozesse des Lebens steuern. Solche Gene (z. B. rDNA-Gene oder Cytochrom B) besitzen konservierte Bereiche, die bei vielen nicht miteinander verwandten Arten ähnlich sind. Da davon ausgegangen wird, dass sich die Geschlechtschromosomen bei den verschiedenen Arten unabhängig voneinander entwickelt haben, sind Sequenzhomologien bei den Geschlechtschromosomen verschiedener Arten wenig wahrscheinlich.

4.1.3 Screening von DNA-Banken nach geschlechtsspezifischen Klonen

Eine von **Flachowsky (2003)** zum Auffinden von Hanf-Mikrosatelliten erstellte DNA-Bank wurde mit genomischer DNA männlicher bzw. weiblicher Pflanzen als Sonde differentiell hybridisiert, um nach repetitiven männlich-spezifischen Klonen zu suchen. Da für die Bank DNA-Fragmente von 0,5 bis 10 kb Größe kloniert wurden, konnten hier im Vergleich zu den PCR-basierenden Methoden größere geschlechtsspezifische Fragmente erwartet werden. Dabei war es nur möglich repetitive Klone zu identifizieren. Klone, die nur in einer Kopie (single copy) vorkommen, erzeugen bei der Hybridisierung der Bank mit genomischer DNA als Sonde keine detektierbaren Signale. Repetitive männlich-spezifische Klone hätten, als Sonden bei der FISH eingesetzt, den Vorteil, starke Signale zu erzeugen. Für die Y-Chromosomen von *Drosophila*, verschiedenen Nagetieren (**Kozlova et al., 2003**), bei dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* (**Okada et al., 2001**) sowie bei *Rumex acetosa* (**Shibata et al., 2000**) und *Silene latifolia* (**Obara et al., 2002**) konnten solche repetitiven geschlechtsspezifischen Sequenzen bereits beschrieben werden.

Durch die differenzielle Hybridisierung der DNA-Bank konnten von den ca. 15000 Klonen der Bank 16 Klone identifiziert werden, die bei der Hybridisierung mit der DNA einer männlichen Pflanze ein Signal zeigten, bei der Hybridisierung mit DNA einer weiblichen Pflanze aber ohne Signal blieben. Allerdings ließen sich in einer anschließenden Überprüfung der Spezifität der Klone mittels Dot Blot die Ergebnisse nur zum Teil reproduzieren. Klone, die in beiden Dot-Blot Hybridisierungen übereinstimmende Ergebnisse aufwiesen, zeigten bei

einer anschließenden Southern-Blot Analyse keine geschlechtsspezifischen Hybridisierungsmuster.

Eine ähnliche Hybridisierungsstrategie verfolgten **Okada et al. (2000)** bei der Identifizierung Y-spezifischer PAC- (P1-based artificial chromosome) Klone bei *Marchantia polymorpha*. Im Gegensatz zum diploiden Hanf waren die Ausgangspflanzen dieser Untersuchungen die haploiden Gametophyten des Lebermooses *M. polymorpha* (**siehe auch Kap. 1.2.6**). Hier konnten mit vergleichsweise geringem Aufwand X- bzw. Y-spezifische Banken erstellt werden. Eine weitere Komponente für den Erfolg dieser Arbeiten stellte sicherlich die Klonierung großer DNA-Fragmente in PAC-Banken dar. Entsprechend gelangen erfolgreiche Identifikationen geschlechtsspezifischer Klone bei diözischen Pflanzen in letzter Zeit vor allem durch die Nutzung von BAC- (bacterial artificial chromosome) Banken (**Jamsari et al., 2004; Lengerova et al., 2004**) oder PAC-Banken (**Okada et al., 2000 und 2001**). In solchen DNA-Banken können wesentlich größere DNA-Fragmente kloniert werden als in dem in der vorliegenden Arbeit benutzten Vektor pBluescript SK⁺. So klonierten **Lengerova et al. (2004)** 100-500 kb große DNA-Fragmente von *Silene latifolia* in eine BAC-Bank. Durch das Screening dieser Bank konnten drei Klone gefunden werden, die als Sonde bei einer FISH-Analyse hauptsächlich auf den Geschlechtschromosomen hybridisierten. Bei **Okada et al. (2000)** betrug die durchschnittliche Insertgröße der beiden PAC-Banken 91 kb bzw. 98 kb. **Jamsari et al. (2004)** generierten eine aus über 86000 Klonen bestehende BAC-Bank aus der DNA einer für den Geschlechtslocus homozygoten (MM) männlichen Spargel-Pflanze. Die durchschnittliche Insertgröße betrug dabei 82 kb. Mit Hilfe von AFLP- und STS-Primern wurden für den M-Locus spezifische BAC-Klone identifiziert, aus welchen weitere spezifische Marker für die Feinkartierung des M-Gens abgeleitet werden konnten.

Die bei den oben genannten Arbeiten angewandten Strategien zur Identifizierung geschlechtsspezifischer Klone könnten in weiterführenden Arbeiten auch beim Hanf zum Erfolg führen.

In einem weiteren Ansatz sollte die DNA einzelner Pollen des Hanfes genutzt werden, um X- und Y-spezifische Sonden für die differentielle Hybridisierung der Hanf-DNA-Bank herzustellen.

Amplifizierte Pollen-DNA sollte auch für die Erstellung X- bzw. Y-spezifischer DNA-Banken genutzt werden, die analog zur Hanf-DNA-Bank mit X- und Y-spezifischen Sonden hybridisiert werden sollten, um männlich- und weiblich-spezifische Klone zu identifizieren.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten **Okada et al. (2000)** bei der Erstellung einer männlichen und weiblichen PAC-Bank des Lebermooses *Marchantia polymorpha*. Dabei gelang es ihnen,

männlich-spezifische PAC-Klone zu identifizieren. Sie konnten dafür den vorteilhaften Umstand nutzen, dass die Lebermoose in ihrem Generationszyklus einen haploiden Gametophyten aufweisen. Diese Gametophyten sind entweder männlich oder weiblich und besitzen, aufgrund ihres haploiden Genomes, nur ein Y- oder X-Chromosom. Da der Gametophyt ein vielzelliger Organismus ist, war die Erstellung einer PAC-Bank aus genomischer DNA wenig problematisch. Im Vergleich dazu ist die Erstellung einer genomischen Bank aus einem einzelnen haploiden Pollen schwieriger. Hierzu muss vor der Klonierung die DNA der Pollen mittels PCR vermehrt werden. Die Isolierung einzelner Pollen und deren anschließender Einsatz als Template für PCRs wurde bereits bei anderen Pflanzenarten beschrieben. So nutzten **Naseer Aziz et al. (1999)** einzelne Pollen der Kartoffel für eine RAPD-Analyse. Ebenfalls für eine RAPD-Analyse wurden Einzelpollen von Buchen verwendet (**Krabel et al., 1998**). Bei Roggenarten und Gerste konnten **Peterson et al. (1996)** erfolgreich Pollen isolieren und in PCR-Reaktionen überführen.

Die o. g. Autoren vermehrten mittels PCR immer nur bestimmte Bereiche des Pollengenoms. Bei der hier vorliegenden Arbeit sollte aber das gesamte Genom der Pollen amplifiziert werden. Dazu wurden nach der Entwicklung einer Methode zur Isolierung einzelner Hanfpollen aus einer Pollensuspension zwei verschiedene Methoden für die Amplifikation des Pollengenoms mit degenerierten Primern getestet. Zum einen kam eine „degenerated oligonucleotide primed“ PCR (DOP-PCR) zum Einsatz. Weiterhin wurde die Eignung der auf der PEP-PCR (**Zhang et al., 1992**) basierenden „improved primer extension preamplification“ PCR (I-PEP-PCR) nach **Dietmaier et al. (1999)** getestet.

Die DOP-PCR erwies sich als nicht geeignet, um die DNA der isolierten Pollen zu amplifizieren. Bei der I-PEP-PCR war es dagegen möglich, viele kurze Fragmente mit einer maximalen Länge von 500 bp zu amplifizieren. Die Ermittlung des Geschlechts der Pollen erfolgte durch die Amplifikation der Produkte der I-PEP-PCR mit einem männlich-spezifischen SCAR-Primer (SCAR_{OPA08}). Die männlich-spezifische Bande dieses Markers konnte bei einigen Pollenamplifikaten nachgewiesen werden. Bei Wiederholungen waren diese Ergebnisse aber nicht bei allen Pollen reproduzierbar. Auch konnten männlich-spezifische Banden bei einigen Blindproben amplifiziert werden. Dennoch wurde versucht, das Amplifikat eines Pollens, dessen Geschlechtsüberprüfung reproduzierbar war, zu klonieren. Das erwies sich als nicht erfolgreich.

Dass die PCRs mit dem männlich-spezifischen SCAR-Primer nur in wenigen Fällen reproduzierbar waren, könnte verschiedene Ursachen haben. Dabei sind Kontaminationen von

Proben oder Laborgeräten am wahrscheinlichsten. Beispielsweise kann durch Verunreinigungen der Proben mit Resten männlicher Blüten die Amplifikation von Artefakten verursacht werden. Dafür spricht auch die Amplifikation von männlich-spezifischen Banden bei einigen der Blindproben. Das Auftreten von Verunreinigungen unterschiedlichster Herkunft (Antherenreste, Mikropipetten, Insektennadel für Pollentransport) wurde auch bei der RAPD-Analyse von Kartoffelpollen (**Naseer Aziz et al., 1999**) erwähnt. Hier sollte die Verwendung getrockneter Pollen solche Verunreinigungen weitestgehend vermeiden. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode ist das anders, denn durch die Amplifikation des Pollengenoms mittels I-PEP-PCR können aufgrund des degenerierten Primers auch geringste Anteile eventuell vorhandener Kontaminationen mit vermehrt werden. Kontaminationen von z. B. Antherenresten können dann die anschließenden PCRs mit den geschlechtsspezifischen Primern erheblich beeinflussen. Dass mit Filterspitzen und sterilen Geräten gearbeitet wurde, stützt die These, die Pollensuspension selbst bzw. den Vorgang der Pollenvereinzelnung am Mikroskop als Quelle der Verunreinigungen anzusehen. Um das zu umgehen, wäre eine andere Vereinzelnungstechnik nötig gewesen. **Matsunaga et al. (1999)** beschreiben eine solche verunreinigungsfreie Technik mittels Laser-Mikrodissektion. Hier wurden erfolgreich Pollen von *Silene latifolia* vereinzelt und deren Genom mittels PCR amplifiziert. Als Ursache für die Artefakte ausschließen kann man allerdings die Erzeugung von Replikationsfehlern durch die Polymerase bei der I-PEP-Amplifikation. Da die hier verwendete Polymerase aus einem Mix aus *Taq* Polymerase und korrekturlesender *Pwo*-Polymerase bestand, sollte eine fehlerfreie Amplifikation gewährleistet sein. Die hohe Genauigkeit der Amplifikation mit der Methode der I-PEP-PCR konnte bei **Dietmaier et al. (1999)** nachgewiesen werden.

4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In der vorliegenden Arbeit sollte die Technik der FISH genutzt werden, um Chromosomen von Präparaten des Hanfes mit spezifischen Sonden zu hybridisieren. Ziel dabei sollte die Markierung der Y-Chromosomen mit männlich-spezifischen Sonden bzw. die Markierung der PAR mittels der PAR-spezifischen Sonden sein. Als Sonden sollten zum einen die hier entwickelten männlich- und PAR-spezifischen Fragmente genutzt werden. Zum anderen sollten die von **Flachowsky (2003)** bzw. **Mandolino et al. (1999)** entwickelten männlich-spezifischen SCAR-Marker HK18, HK50 und SCAR_{OPA08} als Sonde eingesetzt werden.

4.2.1 Etablierung der FISH bei Hanf

Für die Hybridisierung von Chromosomenpräparaten mit molekularen Sonden ist die Herstellung von qualitativ guten Chromosomenpräparaten von besonderer Wichtigkeit (Leitch et al., 1994). Deswegen wurden verschiedene Methoden zur Präparatherstellung auf ihre Eignung getestet. Zur Anreicherung der Chromosomen wurden Wurzelspitzen mit Hydroxyharnstoff (HU), Hydroxychinolin, Kolchizin bzw. Eiswasser behandelt. Durch die Hydroxyharnstoffbehandlung sollte eine Synchronisation der Chromosomen in der mitotischen G1-Phase erfolgen (Lee et al., 1997). Diese Synchronisation soll die Metaphaserate in einem darauffolgendem Anreicherungsschritt mit Hydroxychinolin, Kolchizin bzw. Eiswasser wesentlich erhöhen. Ein bemerkbarer Effekt der Hydroxyharnstoffbehandlung konnte nicht festgestellt werden. Mit der klassischen Methode der Kolchizinbehandlung der Wurzelspitzen für 4 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur konnten Präparate hergestellt werden, die eine ausreichend hohe Anzahl von Zellen mit Metaphasechromosomen besaßen. Die Chromosomen dieser Präparate befanden sich allerdings in einem stark kondensierten Zustand. Für die FISH sind solche Präparate weniger gut geeignet (Schwarzacher und Heslop-Harrison, 2000). Alternativ zur Kolchizinbehandlung wurden die Wurzelspitzen einer Eiswasserbehandlung unterzogen. In Abhängigkeit von der Dauer der Eiswasserbehandlung konnten die Chromosomen in Zustände verschieden starker Kondensation gebracht werden. Optimale Ergebnisse konnten mit einer 21stündigen Eiswasserbehandlung erzielt werden. Die so behandelten Chromosomen lagen in einem etwas gestrecktem Zustand vor.

Für die Hybridisierung der Chromosomenpräparate mit geschlechtsspezifischen Sonden ist es wichtig, das Geschlecht der Keimlinge, von denen die Wurzelspitzen stammen, zu kennen. Daher wurden die Keimlinge nach der Entfernung der Wurzelspitze in Multitopfplatten ausgepflanzt. Das Entfernen der Wurzelspitze der einzigen Keimwurzel der Hanfsprosse führte allerdings zu einer starken Schwächung der Keimlinge, wodurch der größte Teil der Sprosse nach kurzer Zeit des Wachstums abstarben. Eine Behandlung der Keimlinge mit Nährlösung zur Vitalisierung brachte allerdings keine Verbesserung der Anwachsrate. Die Pflanzen, die eine Entwicklung bis zum dritten Internodium schafften, stellten ihre Entwicklung in diesem Stadium ein. Dieser hohe Verlust an Keimpflanzen könnte durch eine Infektion der Keimwurzel mit bodenbürtigen Phytopathogenen an der Schnittstelle verursacht worden sein.

Um dennoch Präparate aus Zellen, deren Geschlecht determiniert war, zu bekommen, wurden junge Blüten männlicher Hanfpflanzen präpariert. Zellen männlicher Blüten besitzen sowohl ein X- als auch Y-Chromosomen. Geeignetes Zellenmaterial (Archespor) befand sich in Blüten, die die meiotische Teilung noch nicht durchlaufen hatten. Aus diesen Pflanzenteilen hergestellte Präparate erwiesen sich als sehr gut geeignet, da sich Blüten im gewünschten Stadium leicht auffinden ließen und viele Zellen der Präparate kondensierte Chromosomen aufwiesen. Die Chromosomen lagen zudem in einem im Vergleich zu Wurzelspitzenpräparaten erheblich gestreckteren Zustand vor. Oft konnte bei den Blüten eine Streuung der Teilungsstadien der Zellen von Pro- bis Anaphase beobachtet werden, wobei sich die meisten Zellen im Pachytän befanden. Chromosomen im Stadium des Pachytän eignen sich für die *in situ* Hybridisierung besonders, da sie hier in einem gestreckten Zustand vorliegen, wodurch die Sondensignale gut beobachtbar sind. Der Nachteil bei der Verwendung von männlichen Blüten besteht allerdings darin, dass mit diesem Material keine Präparate erzeugt werden können, die ausschließlich X-Chromosomen besitzen. Solche Präparate wären als Negativkontrollen sinnvoll. Vergleichbares Zellenmaterial von weiblichen Pflanzen (z. B. aus den Samenanlagen) zu präparieren, ist allerdings schwierig und im Vergleich zu Antherenzellen weniger ertragreich.

Die Eignung der verwendeten Chromosomenpräparationsmethoden für die *in situ* Hybridisierung wurde mit rDNA-Sonden getestet. Für diese Sonden wurden die kodierenden Sequenzen für die Synthetisierung der ribosomalen 5S-rDNA bzw. 25S-rDNA genutzt. Die Sequenzen ribosomaler DNA haben den Vorteil, in vielen tandemartig angeordneten Kopien im Genom vorzukommen. Dadurch werden auch bei der geringen Größe dieser Sonden (100 bis 250 bp) genügend starke Hybridisierungssignale produziert. Ein weiterer Vorteil besteht in dem hohen Konservierungsgrad ribosomaler DNA-Sequenzen. Die geringen Sequenzunterschiede der rDNA zwischen den Arten ermöglicht es, mit ribosomalen Sonden fremder Gattungen oder Familien erfolgreich zu hybridisieren. Die für die Etablierung der FISH an Hanfchromosomen verwendeten Sonden wurden mit Primerpaaren produziert, die bereits bei *Glycine max* (Gottlob-McHugh et al., 1990), *Vicia faba*, *Daucus carota* (Yokota et al., 1989) sowie *Allium ampeloprasum*, *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* und *Brassica napus* (Schrader et al., 2000) eingesetzt wurden. Die mit Hanf-DNA als Template amplifizierten rDNA-Fragmente hatten eine Größe von 120 bp (5S-rDNA) bzw. 250 bp (25S-rDNA). Amplifiziert mit genomischer DNA von *Allium ampeloprasum* (Schrader et al., 2000) konnten Fragmentgrößen von 117 bp bzw. 220 bp erzeugt werden.

Die Sonden wurden unterschiedlich markiert (DIG bzw. Biotin) und zusammen mit einem Chromosomenpräparat hybridisiert. Nach der Detektion konnten bei diploiden Zellen je Sonde zwei deutliche Signale beobachtet werden. Die Signale der 5S-rDNA Sonden befanden sich auf einem kleinen Satellitenchromosom im Telomerbereich eines Chromosomenpaares, während die Signale der 25S-rDNA Sonden im Zentromerbereich eines anderen Chromosomenpaares lokalisiert waren. Die rDNA-Signale erschienen hier als großflächige, leuchtende Bereiche. Signale in dieser Form konnten z. B. auch bei der Hybridisierung von Chromosomenpräparaten des Spargels (**Reamon-Büttner et al., 1999**) und *Arabidopsis thaliana* (**Weiss and Maluszynska, 2000**) mit 5S- und 25S-rDNA Sonden beobachtet werden. Oft haben Sondensignale bei *in situ* Hybridisierungen an Chromosomen die Form eines Doppelpunktes, wobei die einzelnen Signalpunkte parallel auf den benachbarten Chromatiden lokalisiert sind. Das Auftreten solcher rDNA-Doppelsignale konnte bei *in situ* Hybridisierungen mit Pflanzenarten wie *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* und *Brassica napus* (**Schrader et al., 2000**) oder *Silene latifolia* (**Lengerova et al., 2004**) dokumentiert werden.

Die Lokalisation der rDNA-Gene auf den Chromosomenarmen ist nicht statisch bei den verschiedenen Pflanzenarten. Sogar innerhalb des Chromosomensatzes können vor allem bei allopolyploiden Arten verschiedene Lokalisierungen der Gene gefunden werden. So befinden sich die 5S-rDNA-Signale oft im Telomerbereich von Chromosomen (*Sinapis alba*, *Silene latifolia*), aber auch im Bereich nahe des Zentromers (z. B. *Brassica napus*) können diese Gene lokalisiert sein.

Andere Pflanzen zeigten bei der Hybridisierung mit diesen Sonden mehr Signale. So konnten **Schrader et al. (2000)** bei *Sinapis alba* vier Signale bzw. sechs mit 5S-rDNA bzw. 25S-rDNA Sonden erzeugen. Chromosomen von *Raphanus sativus*, hybridisiert mit diesen Sonden, zeigten jeweils vier Signale. Bei *Brassica napus* konnten je Sonde zwölf Signale detektiert werden. Das Vorkommen von einer solchen Anzahl von rDNA-Signalen ist auf die polyphyletische Abstammung dieser zu den Brassicaceen zählenden Arten zurückzuführen. Das wird insbesondere bei dem allopolyploiden *Brassica napus* ersichtlich. Das Vorkommen von jeweils nur zwei rDNA-Signalen bei diploiden Zellen des Hanfes kann auf eine monophyletische Abstammung des Hanfes zurückgeführt werden.

Durch die Markierung mit den rDNA Sonden konnten von den zehn Chromosomenpaaren des Hanfes zwei Paare eindeutig identifiziert werden. Bisher wurden noch keine Daten über die Lokalisation der rDNA Gene bei Hanf veröffentlicht. Lediglich die Internal Transcribed

Spacer 1 und 2 (ITS 1 und 2) der n-rDNA des Hanfes konnten charakterisiert werden (**Siniscalco Gigliano, 1999**).

4.2.2 FISH mit geschlechtsspezifischen Sonden

Um Informationen über die chromosomale Lokalisierung der verschiedenen männlich-spezifischen Fragmente zu erhalten, wurden diese als Sonden für die *in situ* Hybridisierung bei Hanfchromosomen eingesetzt.

Bei der FISH mit den männlich-spezifischen AFLP-Fragmenten HK18 und HK50 (**Flachowsky, 2003**) als Sonden konnten keine Signale detektiert werden. Die Ursache dafür könnte bei der geringen Größe (<350 bp) der Fragmente zu suchen sein. Bei der FISH mit Pflanzenchromosomen ist es nicht mit Sicherheit möglich, Sonden unter 1 kb sichtbar zu machen (**Schwarzacher und Heslop-Harrison, 2000**). Bei der FISH menschlicher Chromosomen dagegen werden routinemäßig kleinere Sonden detektiert. Der Unterschied basiert hauptsächlich auf dem Vorhandensein der Zellwand pflanzlicher Zellen sowie auf dem hohen Kondensationsgrad der Metaphasechromosomen von Pflanzen. Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei den beiden Fragmenten um Sequenzen handelt, die nur in einer Kopie im Genom vorkommen, ist es nicht sehr wahrscheinlich sie mit normalen Detektionsmethoden sichtbar zu machen. In letzter Zeit konnten aber durch die Adaptation einer Detektionsmethode aus der Humangenetik sehr kurze Fragmente bei Zwiebel sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Tyramide-FISH Methode gelang es **Khrustaleva und Kirk (2001)** ein 710 bp langes single copy Gen auf den Chromosomen transgener Zwiebeln zu detektieren. Die Anwendung dieser Methode bei der Hybridisierung mit den kurzen aus männlich-spezifischen SCAR-Markern hergestellten Sonden könnte helfen, diese auf den Chromosomen sichtbar zu machen.

Die bei der FISH mit der männlich-spezifischen Sonde SCAR_{OPA08} erzeugten repetitiven Signale bestätigten die von **Mandolino et al. (1999)** beschriebenen Ergebnisse der Southern-Blot Analyse. Hier wurden verschiedene, nicht mit dem Geschlecht gekoppelte Hybridisierungsmuster erhalten. Eine Sequenzanalyse dieses Fragmentes zeigte begrenzte Homologien zu Retrotransposons bei Gerste, Kokos, Kiefer, Erbse und *Arabidopsis*. Aufgrund dieser Daten sind die beobachteten unspezifischen, repetitiven Hybridisierungssignale erklärbar.

Ähnliches gilt für die männlich-spezifische Sonde C11Komp. Die hier beobachteten repetitiven Signale korrespondieren mit den Southern-Blot Ergebnissen dieser Sonde. Die lokalen Akkumulationen von *in situ* Signalen sind vergleichbar mit den stärkeren Banden der Southern Hybridisierung der Sonde. Die auch in der Sequenz dieser Sonde gefundenen Homologien zu Retroelementen erklären die repetitive Verteilung der Hybridisierungssignale. Wurden Präparate der Kreuzungen der beiden diözischen Sorten 'Kompolti' und 'Skunk 1' mit der Sonde C11Seq (Primerpaar C11Seq_L + C11Komp_R) hybridisiert, konnte ebenfalls eine unspezifische Anordnung der Signale detektiert werden. Um einen direkten Vergleich der Hybridisierungsmuster zu ermöglichen, wurden einige Präparate für mehrere Hybridisierungen genutzt. Nach Entfernung der alten Sonde, konnten sie mit anderen Sonden neu hybridisiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Signale der Sonde C11Seq in ihrer Anordnung annähernd der Anordnung der Signale der Sonde C11Komp entsprachen. Die Signale von C11Seq waren aber wesentlich intensiver ausgeprägt. Da beide Sonden Bestandteil des RAPD-Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ sind, sind ähnliche Hybridisierungsmuster bei beiden Sonden zu erwarten.

Bei der Hybridisierung der Sonde C11Seq mit Chromosomenpräparaten von männlichen Blüten der Hanf-Herkunft CAN 18 konnten Zellen beobachtet werden, bei denen auf zwei Chromosomen je ein einzelnes Signal feststellbar war. Ein Signal befand sich im telomernahen Bereich eines sehr großen Chromosoms. Das andere Signal war dagegen zentromernah auf einem wesentlich kleinerem Chromosom lokalisiert. Auch Interphasezellen des selben Präparats zeigten zwei Signale. Da das Y-Chromosom das größte Chromosom des Hanfes ist (Sakamoto et al., 1998), während das X-Chromosom als deutlich kleiner beschrieben wurde, könnte es sich hierbei um Signale handeln, die spezifisch für die Geschlechtschromosomen sind. Dabei scheint die Sonde mit Bereichen zu hybridisieren, die bei beiden Geschlechtschromosomen homöolog sind. Homologe bzw. homöologe Bereiche auf den beiden Geschlechtschromosomen wurden auch bei der diözischen Art *Silene latifolia* dokumentiert (siehe Kap. 4.1.2). Ebenfalls bei *Silene latifolia* konnten Sonden gefunden werden, die bei der FISH hauptsächlich mit den beiden Geschlechtschromosomen hybridisierten (Lengerova et al., 2004). Für die Sonde C11Seq stehen leider keine Southern-Blot Daten zur Verfügung, welche für die Bestätigung der Ergebnisse der FISH nützlich wären. Die Sonde C11Seq ist aber Bestandteil der Sequenz der Sonde C11Komp, für die Southern-Blot Daten verfügbar sind. Möglicherweise hybridisiert der durch die Sonde C11Seq abgedeckte Sequenzbereich des RAPD-Fragmentes C11₂₇₀₀ spezifischer als der der Sonde

C11Komp. Ähnliches konnten auch **Sakamoto et al. (2000)** bei Hanf feststellen. Sie teilten die männlich-spezifische Sonde MADC1 in sieben Teile und zeigten, dass vor allem die Fragmente der 3'-Region der Sonde unspezifisch mit DNA beider Geschlechter hybridisiert. Die Interpretation der Hybridisierungsergebnisse der Chromosompräparate der Hanf-Herkunft CAN 18 wurde durch die geringe Anzahl auswertbarer Zellspreitungen erschwert. Im Vergleich zu den Präparaten der Kreuzungen von 'Kompolti' und 'Skunk 1' erwiesen sich die CAN 18-Präparate als qualitativ weniger geeignet. CAN 18-Präparate besaßen weniger Metaphasezellen, von denen nur wenige eine ausreichende Spreitung der Chromosomen zeigten. Oft waren die Chromosomen verklumpt im zentralen Bereich der Zellen lokalisiert. Die zur Verfügung stehenden Ergebnisse sind nicht ausreichend, um endgültige Aussagen über die Authentizität der Signale der Sonde C11Seq bei Präparaten von CAN 18 zu machen. So könnte es sich bei den beobachteten Signalen auch um Artefakte handeln. Ein Hinweis darauf ist das Auftreten des einzelnen Signals der Sonde C11Seq in Form eines einzelnen, starken Leuchtpunktes und nicht wie oftmals bei *in situ* Hybridisierungen an Chromosomenpräparaten zu beobachten, als parallel auf den Schwesterchromatiden angeordneter Doppelpunkt. Bei Wiederholungen mit neu hergestellten Sonden und Präparaten konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Bei Artefakten wäre das nicht zu erwarten. Das Auftreten des Signals in Form eines einzelnen Leuchtpunktes kann einerseits durch Verformung bzw. Übereinanderlagerung der Schwesterchromatiden bei der Präparatherstellung erklärt werden. Auch kann bei hoher Signalstärke die Vereinigung zweier Einzelsignale eine mögliche Ursache sein. So zeigen z. B. auch die beiden rDNA Sonden bei der Hybridisierung jeweils nur ein Sondersignal über beide Chromatiden und kein Doppelsignal. Bei den bisher zur FISH an Pflanzenchromosomen mit geschlechtsspezifischen Sonden veröffentlichten Publikationen konnten fast immer diese typischen Doppelsignale festgestellt werden. Beispielsweise zeigten männlich-spezifische repetitive Sequenzmotive von *Rumex acetosa*, eingesetzt als Sonde bei der FISH, deutliche, auf beiden Chromatiden der Y-Chromosomen lokalisierte Signale (**Shibata et al., 2000**). Signale konnten aber auch bei zwei Autosomenpaaren gefunden werden, was als Hinweis auf Translokationen mit den Autosomen gedeutet wird. Auch bei *Silene latifolia* zeigten Y-spezifische *in situ* Signale einer von einem RAPD-Fragment abstammenden Sonde ein deutliches Doppelsignal (**Nakao et al., 2002**). Ebenfalls ein deutliches Doppelsignal beobachteten **Sakamoto et al. (2000)** bei der *in situ* Hybridisierung des Y-spezifisch akkumulierten LINE-like Retrotransposons bei Hanf. Dagegen produzierte ein männlich-spezifischer PAC-Klon bei der Hybridisierung mit

Chromosomen von *Marchantia polymorpha* nur ein starkes Signal auf dem Y-Chromosom **Okada et al. (2000)**.

Die unterschiedlichen Hybridisierungsmuster bei den Präparaten der beiden verschiedenen Herkünfte lassen vermuten, dass die Spezifität der Sonde auf die Herkunft CAN 18 beschränkt ist. Pflanzen der selben Herkunft wurden auch für die RAPD-Markeranalyse verwendet, bei der der männlich-spezifische Marker OPC-11₂₇₀₀ aufgefunden wurde. Vergleichbare Beschränkungen der Spezifität von Markern auf bestimmte Populationen treten bei Markeranalysen öfters auf. Beispielsweise zeigte eine vergleichende Analyse von Resistenzgenen gegen Kronenrost an zwei Haferlinien, dass ein Marker für das Gen *Pc48* nur auf eine Linie beschränkt ist (**Wight et al., 2004**).

Um endgültige Aussagen über die Spezifität und Authentizität der Signale der Sonde C11Seq treffen zu können, sollten die Untersuchungen unter optimierten Bedingungen weitergeführt werden.

4.2.3 FISH mit PAR-spezifischen Sonden

Obwohl die PAR-spezifischen AFLP-Fragmente bei der Southern-Blot Analyse keine spezifischen Hybridisierungsmuster zeigten, wurden sie für die FISH verwendet, um dennoch Informationen über die chromosomale Lokalisierung dieser Fragmente zu erhalten. Als Sonden wurden der PAR-spezifische SCAR-Marker AAT330Komp bzw. die durch PCR Walking hergestellten Fragmente 330GW_L bzw. 330GW_R eingesetzt.

In keinem Fall konnten PAR-spezifischen Hybridisierungsmuster detektiert werden. Die Sonden hybridisierten mit allen Chromosomen. Dabei waren die repetitiven Signale gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt. Lokale Akkumulationen von Signalen im Bereich vom Übergang heterochromatischer Chromosomenabschnitte zu euchromatischen Bereichen konnten vor allem bei den Signalen der durch PCR Walking hergestellten Sonden festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Resultaten der Hybridisierung der PAR-spezifischen Sonden mit genomischer DNA der Southern Blots. Hier wurden ebenfalls lediglich repetitive Hybridisierungssignale sowie vereinzelte dominante Banden erzeugt. Ein Grund dafür kann in der repetitiven Natur der AFLP-Fragmente liegen. AFLP-Fragmente sind bekannt dafür, häufig in nichtkodierenden repetitiven Bereichen des Genomes lokalisiert zu sein. Solche repetitiven AT-reichen Regionen sind oft equilokal auf den Chromosomen verteilt (**Guerra, 2000**). Die bevorzugte Lokalisation der Fragmente in den

AT-reichen Regionen ist durch die Eigenschaften der hier verwendeten AFLP-Technik bedingt. Denn die Schnittstellen der verwendeten Enzyme *HindIII* und *MseI* liegen aufgrund der Erkennungssequenzen AAGCTT bzw. TTAA in AT-reichen Regionen. Dazu haben die AFLP-Primer einschließlich der selektiven Basen (AGA bzw. AAT) ebenfalls einen hohen AT-Anteil. Durch die Verwendung von Restriktionsenzymen, die in anderen Bereichen oder auch methylierungssensitiv schneiden, könnte die Verteilung der AFLP-Fragmente ausgeglichener und u. U. auch in den kodierenden Bereich verschoben werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen **Reamon-Büttner et al. (1999)** bei der Hybridisierung geschlechtsspezifischer AFLP-Fragmente mit Chromosomenpräparaten des Spargels. Auch hier wurden dispers über alle Chromosomen verteilte Hybridisierungsmuster beobachtet. Auch die klusterartig angeordneten Signale wurden bei einigen Sonden festgestellt. Von Fragmenten, die solche klusterartigen Signale erzeugten, wurde angenommen, dass sie zu repetitiven Sequenzfamilien gehören. Zwar zeigten die Fragmente als AFLP-Marker eine enge Kopplung mit dem männlichen Geschlecht, aber bei Southern Blot- und *in situ* Hybridisierungen konnten keine spezifischen Signale erzeugt werden. Hier wurde die Spezifität der Fragmente auf die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sowie auf die selektiven Basen der AFLP-Primer zurückgeführt.

Beim Einsatz des Fragmentes GAA_510_B9 als Sonde für die FISH konnten keine Signale detektiert werden. Die geringe Fragmentgröße kann dafür als Ursache angenommen werden. Durch PCR Walking in die flankierenden Regionen des Fragmentes wurde versucht, auf Basis des Fragmentes GAA510_B9 größere Sonden zu erhalten. Diese Arbeiten sollten weitergeführt werden. Auch mit der Tyr-FISH Methode bestände u. U. die Möglichkeit, die Hybridisierung dieser Sonde an Chromosomenpräparaten sichtbar zu machen.