

**“Erstellung einer genetischen Karte an Hanf (*Cannabis sativa* L.)
mit molekularen Markern”**

Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

als

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieur Henryk Flachowsky

geb. am 05.10.1971

in Meerane

Deutschland

Gutachter: 1. Gutachter: Prof. Dr. habil W. E. Weber

2. Gutachter: Prof. Dr. habil W. Diepenbrock

3. Gutachter: PD Dr. habil Th. Debener

Verteidigung am: 07.07.2003

Halle / Saale 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005637

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005637>]

Inhaltsverzeichnis

	Thema	S. 1
1.	Einleitung	S. 2
2.	Stand des Wissens	S. 4
2.1.	Botanische Grundlagen	S. 4
2.1.1.	Taxonomische Zuordnung	S. 4
2.1.2.	Aufbau der Hanfpflanze	S. 5
2.1.3.	Geschlechts- und Wuchsformen bei Hanf	S. 6
2.2.	Zytologische Grundlagen	S. 7
2.3.	Die Größe des Hanfgenoms	S. 7
2.4.	Die Geschlechtsvererbung	S. 8
2.4.1.	Allgemeine Geschlechtsvererbung	S. 8
2.4.2.	Geschlechtsvererbung bei Pflanzen	S. 9
2.4.2.1.	Sexuell monomorphe Pflanzen	S. 9
2.4.2.2.	Sexuell polymorphe Pflanzen	S. 11
2.5.	Die Hanfzüchtung	S. 13
2.6.	Genetische Marker	S. 15
2.6.1.	AFLP-Marker	S. 18
2.6.2.	Mikrosatellitenmarker	S. 19
2.7.	Stand der molekularen Arbeiten bei Hanf	S. 20
3.	Material und Methoden	S. 21
3.1.	Material	S. 21
3.1.1.	Pflanzenmaterial	S. 21
3.1.2.	Bakterien und Vektoren	S. 22
3.1.3.	Zusammensetzung von Puffern und verwendete Chemikalien	S. 22
3.2.	Methoden	S. 27
3.2.1.	Erstellung des Ausgangsmaterials für die DNA-Gewinnung	S. 27
3.2.2.	DNA-Isolierung (Saghai Maroof et al., 1984)	S. 28
3.2.3.	RNA-Verdau	S. 28
3.2.4.	Restriktionsverdau	S. 29

- Inhaltsverzeichnis -

3.2.5.	PCR (polymerase chain reaction) basierte Methoden	S. 29
3.2.6.	Elektrophorese	S. 32
3.2.7.	Isolierung spezifischer Fragmente aus AFLP-Gelen	S. 33
3.2.8.	Elution von DNA	S. 34
3.2.9.	Klonierung von DNA	S. 35
3.2.10.	Dauerkulturen	S. 36
3.2.11.	Mini-Präparation	S. 36
3.2.12.	DNA-Sequenzierung	S. 37
3.2.13.	Blotten von DNA	S. 37
3.2.14.	Blotten von Bakterienkolonien	S. 37
3.2.15.	Hybridisierung von Nylonmembranen	S. 38
3.2.16.	Erstellung der genetischen Karte	S. 39
4.	Ergebnisse	S. 41
4.1.	Entwicklung von AFLP-Markern	S. 41
4.1.1.	Entwicklung geschlechtsspezifischer AFLP-Marker mittels Bulked Segregant Analysis	S. 41
4.1.2.	Größenbestimmung ausgewählter Marker der Klasse 1	S. 45
4.1.3.	Überprüfung der männlich spezifischen Banden an den Einzelpflanzen der Bulks	S. 46
4.2.	Konvertierung von AFLP-Markern in sequenzspezifische SCAR-Marker	S. 50
4.2.1.	Isolierung und Klonierung spezifischer AFLP-Fragmente	S. 51
4.2.2.	Bestimmung der Nukleinsäuresequenz der Inserts ausgewählter Klone und Erstellung sequenzspezifischer Primer	S. 54
4.2.3.	Überprüfung der abgeleiteten Primerpaare an männlichen und weiblichen Hanfpflanzen und Entwicklung neuer Primer	S. 56
4.3.	Mikrosatelliten	S. 65
4.4.	Erstellung der genetischen Karte	S. 68
5.	Diskussion	S. 74
5.1.	Erstellung einer Kartierungspopulation	S. 74

- Inhaltsverzeichnis -

5.2.	Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung genomischer DNA	S. 74
5.3.	Entwicklung geschlechtsspezifischer AFLP-Marker	S. 75
5.3.1.	Auswahl, Anzucht und Bonitur von Pflanzen für eine Markeranalyse	S. 76
5.3.2.	Bulk-Analyse	S. 77
5.3.3.	Überprüfung der Marker an den Einzelpflanzen der Bulks	S. 79
5.3.4.	Überprüfung der 8 AFLP-Kombinationen an der Kartierungs- population	S. 81
5.3.5.	Konvertierung von AFLP-Markern in PCR-Marker	S. 81
5.3.5.1.	Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Banden aus einem ALF-Gel	S. 83
5.3.5.2.	Ableiten sequenzspezifischer Primerpaare	S. 86
5.3.5.3.	Ableiten neuer Primer anhand bestehender Sequenzunterschiede	S. 88
5.4.	Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern	S. 90
5.5.	Erstellung einer genetischen Karte	S. 92
5.5.1.	Generelle Karte	S. 92
5.5.2.	Kartierung der Geschlechtschromosomen	S. 93
6.	Zusammenfassung	S. 98
7.	Literaturverzeichnis	S. 100
8.	Anlage	S. 120
	- Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	
	- Fach- und Fremdwortverzeichnis	
	- Abkürzungen	
	- Erklärung	
	- Selbständigkeitserklärung	
	- Danksagung	
	- Lebenslauf	

**Erstellung
einer genetischen Karte an Hanf (*Cannabis sativa* L.)
mit molekularen Markern**



1. Einleitung

Hanf (*Cannabis sativa* L.) ist eine der ältesten Nutzpflanzen der Erde. Durch seine vielseitigen Möglichkeiten zur Verwertbarkeit von Fasern und Öl sowie zur Gewinnung rauschhaltiger Drogen stellte Hanf über einen langen Zeitraum eine der wichtigsten landwirtschaftlich genutzten Pflanzen dar. Über viele Jahrhunderte hinweg war Hanf vor allem eine Rohstoffquelle für die Herstellung von Seilen, Segeltuch, Bekleidungstextilien, Papier, Baustoffen und Ölprodukten. Verbunden mit dem Niedergang der Segelschifffahrt, der Einfuhr immer preiswerterer Importfasern und der Nutzung von Synthetikfasern für den Textilbereich ging der Hanfanbau jedoch stark zurück und brach im ersten Drittel des letzten Jahrhunderts fast völlig zusammen. Vollständig zum Erliegen kam der Hanfanbau in Deutschland mit dem Erlass des Betäubungsmittelgesetzes im Jahre 1980.

Ein ähnlicher Trend ist für die Weltproduktion zu verzeichnen. Lag die Weltfaserproduktion bei Hanf 1965 noch bei 335.300 t, so waren es im Jahr 1994 nur noch 97.000 t. 1994 wurden in Europa lediglich in Frankreich, Spanien und Rumänien noch geringe Mengen Hanffasern produziert. Nur in Asien war ein leichter Anstieg des Produktionsumfanges zu verzeichnen. Zu den Hauptanbaugebieten zählen dort Indien, China, Nordkorea und Pakistan. In Südamerika blieb der Anbauumfang von Hanf seit dem zweiten Weltkrieg etwa auf dem selben Niveau. Mit dem Niedergang der Hanffaserproduktion ging auch die Weltproduktion an Hanfsamen von 1955 (98.300 t) bis 1994 (43.793 t) um über 50% zurück. Anfang der neunziger Jahre war der Hanfanbau schwerpunktmäßig in Asien konzentriert. Allein 84% der Weltanbaufläche für Hanf (1994 ca. 119.000 ha) wurden in den Ländern China, Indien und Nordkorea bestellt.

Mit der Neufassung des Betäubungsmittelgesetzes im Jahre 1996 wurde es in Deutschland wieder möglich, Nutzhanfsorten mit einem THC (Tetrahydrocannabinol)-Gehalt $\leq 0,3\%$ anzubauen. Bis 1999 nahm der Anbauumfang deutlich zu und erreichte 4.066 ha. Im Jahr 2000 war jedoch ein Rückgang der Hanfanbaufläche auf 2.967 ha und im Jahr 2001 auf 1.993 ha zu verzeichnen (Nova, 2002).

Parallel zur Legalisierung des Hanfanbaus ist ein wachsendes Interesse an der Hanfzüchtung entstanden. Dabei geht es in erster Linie um die Entwicklung von Sorten für die industrielle Nutzung. Da die Verwendungsmöglichkeiten von Hanf breit gefächert sind, ist

damit zu rechnen, dass zukünftig unterschiedliche Sortentypen nachgefragt werden. So sind neben faserreichen Typen beispielsweise Sorten mit einem hohen Samenertrag und Ölgehalt interessant (**Matthäus et al., 2001**). Für die Herstellung von Pharmaka spielen rauschhaltige Typen eine entscheidende Rolle. Für Mitteleuropa ist es notwendig, Sorten zu entwickeln, die besser an die klimatischen Bedingungen adaptiert sind. Ein entscheidender Punkt hierbei ist die Vorverlegung des Blüh- und Reifezeitpunktes.

Um solche unterschiedlichen Sortentypen entwickeln zu können, müssen geeignete Kreuzungspartner ausgewählt und diese durch gezielte Kreuzungen kombiniert werden. Für die Selektion von Kreuzungspartner ist die frühzeitige Bestimmung des Geschlechts der Pflanzen vor der Blüte von entscheidender Bedeutung. Dazu müssen zuverlässige, einfach zu handhabende molekulare Marker, die an das Geschlecht gekoppelt sind, entwickelt werden. Des Weiteren können molekulare Marker, die an züchterisch interessante Merkmale gekoppelt sind, den Selektionsprozess verkürzen, da auf aufwendige Analyseverfahren zur Qualifizierung und Quantifizierung der Merkmale verzichtet werden kann. Diese Merkmale können anhand der Kopplung zu molekularen Markern in genetischen Karten lokalisiert werden.

Ziele der hier vorgelegten Arbeit sind:

- S der Aufbau einer segregierenden Hanfpopulation,
- S die Etablierung einer effizienten Markermethode an Hanf,
- S die Entwicklung geschlechtsspezifischer molekularer Marker und
- S die Erstellung einer ersten Hanfkarte.

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* (Riesenhanf) 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 -

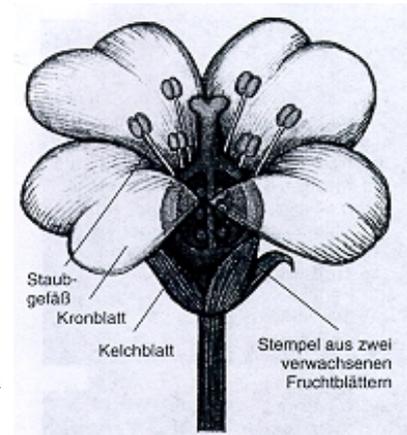
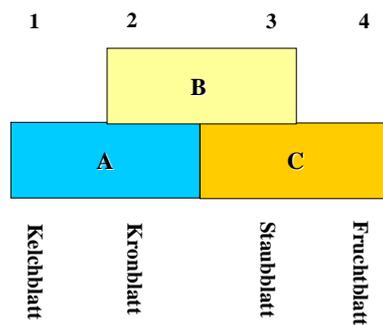


Abbildung 1: Die Blüte sexuell monomorpher Pflanzen

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.

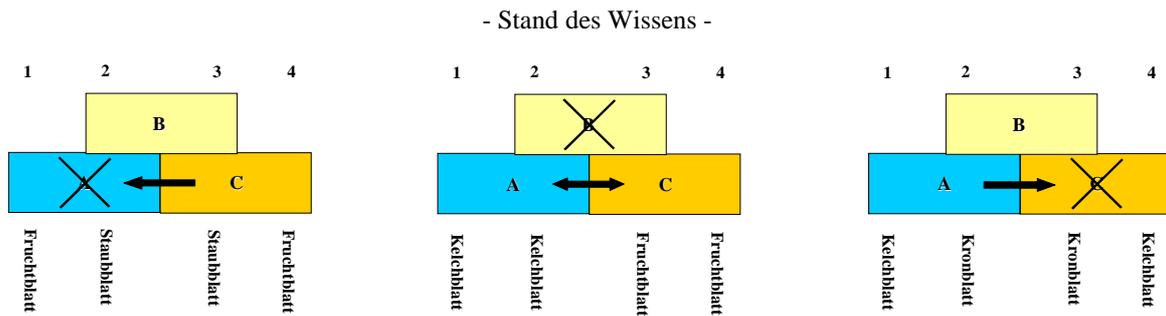


Abbildung 2: Schema des ABC Modells für die Festlegung der Blütenorganidentität
Abbildung 2 zeigt schematisch das ABC Modell des Blütenaufbaus (Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994). Fehlt die Funktion eines Gens, so wird diese durch die Funktionen der beiden anderen ersetzt. Die Ziffern 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 nucleotid 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**).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Pflanzenmaterial

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren Hanfpflanzen der ungarischen Sorte ‘Kompolti’ (diözisch), der Sorten ‘Northern Light’ und ‘White Widow’ sowie der beiden diözischen Abstammungen CAN17 und CAN18, die uns freundlicherweise von der Genbank Gatersleben (IPK, Gatersleben)¹ zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Durchführung einer Bulkanalyse zur Entwicklung geschlechtsgekoppelter Marker wurden im Sommer 1998 18 Pflanzen (10 männliche und 8 weibliche) der diözischen Abstammung CAN17 sowie 32 Pflanzen (16 männliche und 16 weibliche) der diözischen Abstammung CAN18 im Freiland bonitiert. Von diesen Pflanzen wurde Blattmaterial zur DNA-Gewinnung abgenommen.

Weiterhin wurden zahlreiche Kreuzungen durchgeführt, in dem männliche und weibliche Hanfpflanzen gemeinsam unter einer Folienhaube zur Blüte gebracht wurden. Lediglich eine Kreuzung zwischen den Pflanzen CAN18/1 und CAN18/2 führte mit einer Anzahl von 81 F₁-Nachkommen zu einer Population ausreichender Größe. Die Pflanzen dieser Population wurden mit A2/ (A steht für das Aussaatjahr 1999 und 2 ist die Nummer der Population) und einer entsprechenden Pflanzennummer bezeichnet. Das resultierende Saatgut dieser Kreuzung wurde geerntet und im Winter 1998/1999 im Phytotron ausgesät. Zur gleichen Zeit wurden im Phytotron 30 Einzelpflanzen (24 weibliche und 6 männliche) der diözischen Abstammung CAN17 (Population A7) angezogen. Sowohl die 81 F₁-Pflanzen von CAN18 als auch die 30 Einzelpflanzen von CAN17 wurden nach 4 Wochen in 8cm Plastiktöpfe gepflanzt und für die weitere Anzucht ins Gewächshaus überführt.

¹ http://tox-serv.ipk-gatersleben.de/scripts/vtpcgitp.pl?IDCFile=/idc_htx/sbot.idc

3.1.2. Bakterien und Vektoren

Für die Erstellung der genomischen Bank wurde der Laborstamm *Escherichia coli* Dh10B verwendet. Als Vektor diente der Phagemidvektor pBluescript SK⁻ (Stratagene, Heidelberg²). Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte in den Vektor PCR 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Groningen³), welcher in die zugehörigen One Shot[™] Zellen transformiert wurde.

3.1.3. Zusammensetzung von Puffern und verwendete Chemikalien

AFLP-Filler	5mg Blue Dextran in 1ml deionisiertem Formamid lösen
Agarosegel	0,8 -2% Agarose in 1x TAE-Puffer durch aufkochen lösen, auf ca. 60°C abkühlen und 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugeben
5M Ammoniumacetat	38,55g NH ₄ Ac lösen, auf 100ml auffüllen und anschließend sterilfiltrieren
10% APS	Ammoniumperoxidsulfat lösen und aliquotieren
76%EtOH/ 10mM NH ₄ AC	
Ampicillin (Stock)	50mg/ml Ampicillin lösen und anschließend sterilfiltrieren Aliquots bei -20°C lagern
Bindesilan	3µl Bindesilan in 1000µl EtOH lösen und bei -20°C lagern

² http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript_sk_plus.pdf

³ http://www.invitrogen.com/content/vectors/pcr2_1topo_map.pdf

- Material und Methoden -

Blocking stock solution	10% Blocking Reagenz in DIG-B I Puffer lösen
CSPD:Detektionspuffer (1:100)	1ml CSPD mit 99ml Detektionspuffer mischen
CTAB-Extraktionspuffer	100mM Tris pH 7,5; 0,7M NaCl; 10mM EDTA lösen und autoklavieren, vor Gebrauch 1% CTAB und 1% β -Mercapto-Äthanol zugeben
Denaturierungspuffer	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
Detektionspuffer	0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl, pH 9,5
Diffusionspuffer	0,5M Natriumacetat; 10mM MgAc; 1mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS in autoklaviertem H ₂ O lösen
DIG-B I-Puffer	0,15M NaCl; 0,1M Maleinsäure; pH 7,5 einstellen
DIG-B II-Puffer	Blocking Stock solution: DIG-B I = 1 : 10
DIG-B III-Puffer	0,1M Tris pH 9,5; 0,1M NaCl; 50mM MgCl
DIG-Hybridisierungspuffer	5x SSC; 0,1% (w/v) Lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS; 1% Blocking Reagenz
DIG-Waschpuffer	DIG-B I + 0.3% Tween 20
0,5M EDTA	0,5M EDTA, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

- Material und Methoden -

Ethidiumbromid	1mg/ml; Gefäß in Alufolie einwickeln und bei 4°C lagern
FB-Medium	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 5g/l NaCl; 8,28g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$; 0,45g/l Na-Citrat; 0,9g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1,8g KH_2PO_4 ; 55,44g/l Glycerin; nach dem Autoklavieren 50-100µg/ml Ampicillin zugeben
IPTG	24mg IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)/ml
Ladepuffer 1	0,25% Xylene Cyanol FF; 40% (w/v) Saccharose
Ladepuffer 2	0,25% Bromphenolblau; 40% (w/v) Saccharose
LB-Medium	10g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast Extrakt; 10g NaCl; pH 7,0 mit 5N NaOH einstellen
LB-Platten	11 LB-Medium mit 15g Agarose autoklavieren; abkühlen auf 50°C 32mg/l X-Gal; 7,68mg/l IPTG; 50-100mg/l Ampicillin zugeben Platten gießen und kühlen lassen; mit Parafilm abdichten und bei 4°C lagern; 1-2h vor Gebrauch aufwärmen lassen
3M Natriumacetat	3M Natriumacetat, mit Eisessig pH 5,2 einstellen
76% EtOH/ 0,2M NaAc	76ml EtOH; 2ml 10M NaOH auf 100ml auffüllen
Neutralisierungspuffer	1M Tris; 1,5M NaCl; mit HCl pH 7,5 einstellen
40% PAA 19:1	76g Polyacrylamid; 4g N,N'-Methylen-bis-acrylamid; mit autoklaviertem H_2O auf 200ml auffüllen

- Material und Methoden -

PAA-Gel (denaturierend)	7M Urea; 6% PAA (19:1); 1x TBE-Puffer
PAA-Gel (nichtdenaturierend)	5% PAA (19:1); 1x TBE-Puffer
Plasmidlösung I	50mM Glucose; 25mM Tris pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0; vor Gebrauch 3mg/ml Lysozym einwiegen
Plasmidlösung II	0,2N NaOH; 1% SDS immer frisch mit autklaviertem H ₂ O herstellen
Plasmidlösung III	5M Kaliumacetat; 1,8M Eisessig
1x RL-Puffer	10mM Tris/HCl; 10mM Mg-Acetat; 50mM K-Acetat; 5mM DTT pH 7,5
SOB-Medium	20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; pH 7,0
SOC-Medium	20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; 20mM Glucose; pH 7,0
20x SSC (Transferpuffer)	0,3M Natriumcitrat; 3M Natriumchlorid; pH 7,0 einstellen
Stripppuffer	0,5M NaOH; 0,1% SDS
50x TAE	2M Tris-Acetat; 50mM EDTA pH 8,0

- Material und Methoden -

10x TBE	242,28g Tris; 102,64g Borsäure; 7,44g EDTA auf 2l auffüllen
TE-Puffer	10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0
1M Tris	1M Trisbase; mit HCl pH-Wert einstellen
Waschpuffer 1	2x SSC; 0,5% SDS
Waschpuffer 2	0,3x SSC; 0,5% SDS
X-Gal	22,5mg X-Gal/ml in N'N'-Dimethylformamid lösen

3.2. Methoden

3.2.1. Erstellung des Ausgangsmaterials für die DNA-Gewinnung

Das Saatgut der ungarischen Sorte ‘Kompolti’ sowie der beiden diözischen Abstammungen CAN17 und CAN18 wurde, wie bei **Schumann et al. (1999)** beschrieben, Anfang Mai 1998 von Hand in 3m² große Parzellen, bestehend aus maximal 5 Reihen von 1m Länge und 50cm Reihenabstand zueinander ausgesät.

Für die Erstellung gezielter Kreuzungen erfolgte die Isolierung weiblicher Hanfpflanzen unter Folienhauben (**Crescini, 1940**). Zum Zeitpunkt der Blüte wurde der Blütenstand einer männlichen Pflanze mit unter die Haube gebunden.

Eine andere Möglichkeit der gezielten Bestäubung weiblicher Pflanzen bestand darin, männliche und weibliche Elternpflanzen gemeinsam unter einer Haube zu isolieren. Nach der Abblüte und Reife der Samen wurden die Foliehauben entfernt und das Saatgut geerntet.

Die aus der Kreuzung einer weiblichen Pflanze mit einer männlichen Pflanze von CAN18 resultierenden 81 F₁-Nachkommen (48 weibliche und 33 männliche), sowie 30 Einzelpflanzen der diözischen Abstammung CAN17 (24 weibliche und 6 männliche) wurden vier Wochen im Phytotron mit einer Lichtphase von 18h Licht, 26°C und 60% Luftfeuchte und einer Dunkelphase von 6h Dunkelheit bei 18°C und 60% Luftfeuchte angezogen. Die ersten beiden Wochen erfolgte dies in Anzuchtschalen und später in Plastiktöpfen mit einem Durchmesser von 8cm. Nach vier Wochen wurden die Pflanzen ins Gewächshaus überführt. Alle Pflanzen wurden hinsichtlich des Geschlechtes bonitiert. Dabei erfolgte die Bonitur an Freilandpflanzen einmal zu Beginn der Blüte anhand der Infloreszenzen. Alle Gewächshauspflanzen wurden im Verlauf der Blüte viermal bonitiert. Dabei wurden anhand der Infloreszenzen männliche und weibliche Pflanzen unterschieden. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle aller Pflanzen auf das Vorhandensein einzelner andersgeschlechtlicher Blütenorgane an den Seitentrieben, am Stamm bzw. in den Blattachseln. Die Boniturdaten für alle untersuchten Pflanzen sind in Tabelle A1 in der Anlage dargestellt.

3.2.2. DNA-Isolierung (Saghai Maroof et al., 1984)

Von allen Pflanzen wurden junge Blätter abgenommen, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

400mg frisches bzw. tiefgefrorenes Blattmaterial wurden unter flüssigem N₂ gemörsert und mit 9ml CTAB-Extraktionspuffer für 30min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4,5ml CHCl₃/Oktanol (24:1) und 5min Mischen fand eine Zentrifugation für 5min bei 1000x g und 20°C statt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 10ml eiskaltem Äthanol (-20°C) zur Fällung gebracht. Die gefällte DNA wurde mit einem Glashaken gefischt und in 1ml 76% Äthanol, 0,2M Natriumacetat für ca. 20min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift für 1min in 76% Äthanol, 10mM Ammoniumacetat. Nach einem letzten Waschschrift in 1ml 70% Äthanol für 1min bei Raumtemperatur wurde die DNA im Exsikkator getrocknet und anschließend in 500µl 1mM Tris pH 8,0 gelöst.

3.2.3. RNA-Verdau

Zur Inaktivierung der DNA'se in der RNA'se A wurden 50mg RNA'se A in 5ml 0,01M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst. Der Ansatz wurde für 15min auf 100°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens 1M Tris (pH 4,0) wurde die RNA'se A aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Die in 1mM Tris (pH 8,0) gelöste DNA wurde mit RNA'se A (10µg/ml) für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1x Volumen Phenol und kräftigem Schütteln für 5min folgte eine Zentrifugation für 5min bei 4°C und 13.000rpm. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit je 0,5x Volumen Phenol und 0,5x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 5min geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde erneut die wässrige Phase abgenommen. Es folgte die Zugabe von 1x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach kräftigem Mischen für 5min und einer äquivalenten Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen. Das Fällen der in dieser Phase

gelösten DNA erfolgte mit 2x Volumen Äthanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde 10min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit 500ml 70% Äthanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte eine Zentrifugation für 5min bei 13.000rpm und 4°C. Anschließend wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet und dann in 500µl 10mM Tris (pH 8,0) resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C eingefroren und gelagert.

3.2.4. Restriktionsverdau

Der Verdau genomischer DNA erfolgte in einem einfach konzentrierten Reaktionsansatz (10x Restriktionspuffer, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) mit 2U Enzym je Mikrogramm eingesetzter DNA über Nacht bei 37°C. Im Anschluss daran wurde die DNA mit 2x Volumen Äthanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) über Nacht bei -20°C gefällt und in 10mM Tris gelöst.

Für den Verdau von Plasmid-DNA wurden 7µl DNA aus einem Plasmid Minipräp. in einem 10µl Reaktionsansatz bestehend aus 1x Puffer (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) und 1U Enzym für 1h bei 37°C verdaut.

Zur Entwicklung von AFLP-Markern wurde Hanf-DNA auf 25ng/µl verdünnt. Verdaut wurden je 250ng DNA in einem 25µl Ansatz bestehend aus 1x Restriktions-/Ligationspuffer (RL), 2,5U *HindIII* und 2,5U *MseI* über Nacht bei 37°C.

3.2.5. PCR (polymerase chain reaction) basierte Methoden

Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Anlage in Tabelle A2 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in 1x Puffer (10mM Tris, 1,5-2,0mM MgCl₂, 50mM KCl, pH 8,3; Hybaid, Heidelberg) durchgeführt.

Für die Amplifikation von SCAR (sequence characterized amplified region)-Markern wurden 50ng Hanf-DNA in einem 25µl Ansatz bestehend aus 1x Puffer, 0,25µM Primer universe,

0,25µM Primer reverse, 1U Taq-Polymerase und 0,2mM dNTP's unter den folgenden Bedingungen amplifiziert. Nach einer Denaturierung von 5min bei 94°C folgten 35 Zyklen mit je 1min Denaturierung bei 94°C, 1min Annealing bei 40-57°C und 2min Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongationsphase von 10min bei 72°C wurde die PCR auf 4°C gekühlt.

Zur Erhöhung der Spezifität wurde teilweise ein Touchdown PCR (**Don et al., 1991**) verwendet. Dabei folgten im Anschluss an eine erste Denaturierung für 4min bei 94°C ein Amplifikationszyklus mit 1min Denaturierung bei 94°C, ein Annealingzyklus für 1min bei 60°C und eine Elongationsphase bei 72°C für 90s. In den folgenden sechs PCR-Zyklen wurde die Annealingtemperatur jeweils um 1°C je Zyklus gesenkt. Danach folgten 35 Zyklen mit 1min Denaturierung bei 94°C, 1min Annealing bei 53°C und 90s Elongation bei 72°C. Einer abschließenden Elongation von 5min bei 72°C schloss sich das Abkühlen der PCR auf 4°C an. Diese Touchdown PCR wurde je nach Primerpaar mit unterschiedlichen Startannealingtemperaturen durchgeführt.

Für die Überprüfung der Hopfenmikrosatellitenprimer wurden PCR-Reaktionen, wie für die SCAR-Marker beschrieben, bei Annealingtemperaturen zwischen 40°C und 60°C durchgeführt. Als Primer fanden die zwei Hopfenmikrosatelliten 11A59 und 7A82 (**Brady et al., 1996**) Verwendung. Eine abschließende Elongation erfolgte hier für 5min bei 72°C. Danach wurde die PCR auf 4°C abgekühlt.

Die AFLP-Prozedur erfolgte nach **Vos et al. (1995)** mit folgenden Modifikationen: zur mit *HindIII* und *MseI* verdauten DNA wurden 5µl eines Ligationsansatzes bestehend aus 0,25U T4 DNA Ligase (Boehringer, Mannheim), 1x RL Puffer, 1,2mM ATP, 2,5pmol *HindIII*-Adapter sowie 25pmol *MseI*-Adapter zugegeben. Die Ligation erfolgte für 3,5h bei 37°C. 5µl dieser Ligation wurden in einem 50µl Ansatz bestehend aus Puffer, 0,2mM dATP, je 75ng preselektiver Primer (*HindIII*+A und *MseI*+A bzw. +G) und 5U Taq DNA-Polymerase mit 50µl Paraffinöl überschichtet und in zwanzig Zyklen unter nachfolgenden Bedingungen amplifiziert: 1min Denaturieren bei 94°C, 1min Annealing bei 60°C und 2min Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongationsphase von 10min bei 72°C wurde die PCR auf 4°C gekühlt.

Im Anschluss an die Preamplifikation erfolgte eine Amplifikation mit Primern mit je 3

selektiven Basen. Dazu wurde die preselektive Amplifikation 1:20 mit H₂O (5µl Preamplifikation und 95µl H₂O) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2,5µl in einem 20µl-Ansatz bestehend aus Puffer, 10ng *Hind*III+ANN (Cy5 markiert), 60ng *Mse*I+ANN (bzw. *Mse*I+GNN), 0,1U Taq DNA-Polymerase und 0,2mM dNTP's mit 25µl Paraffinöl überschichtet und unter nachfolgenden Bedingungen amplifiziert. Nach einer Denaturierungsphase für 1min bei 94°C folgten das Anlagern der Primer für 1min bei 65°C und eine Elongation für 90s bei 72°C. In den folgenden neun Zyklen wurde die Annealingtemperatur um 1°C/Zyklus gesenkt. Danach folgten 23 Zyklen mit einer Denaturierungsphase für 1min bei 94°C, einem Annealingsschritt für 1min bei 56°C und einer Elongation für 1min bei 72°C. Zum Schluss wurde die PCR auf 4°C abgekühlt. Der schematische Ablauf der AFLP-Prozedur ist in Abbildung 3 dargestellt.

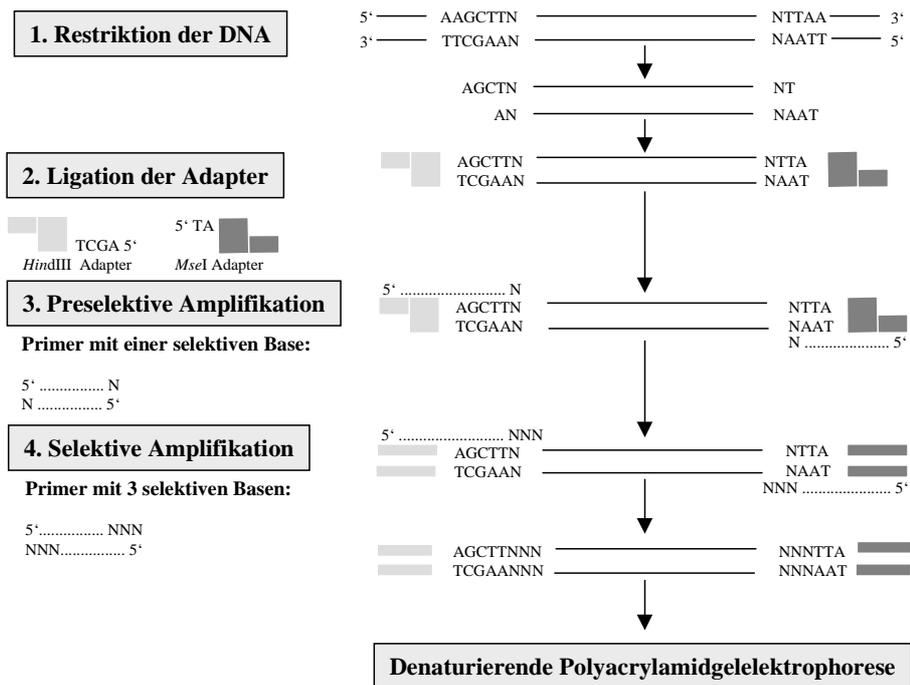


Abbildung 3: Erstellung von AFLP-Markern

Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf bei der Entwicklung von AFLP-Markern. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den einzelnen Abschnitten näher beschrieben.

Zur Reamplifikation von DNA, isoliert aus einem AFLP-Gel, wurden 2,5µl Eluat in einem 20µl Ansatz bestehend aus Puffer, 10ng *HindIII*+ANN, 60ng *MseI*+ANN und 0,2mM dNTP's mit Öl überschichtet und unter den Bedingungen einer selektiven Amplifikation amplifiziert. Für die Klonierung wurde das Eluat mit dem preselective Primer *HindIII*+A reamplifiziert. Die Elution der DNA-Fragmente ist in 3.2.8. beschrieben.

3.2.6. Elektrophorese

Zur Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 3µl einer entsprechenden Amplifikation mit 3µl AFLP-Filler für 90s bei 90°C denaturiert und auf ein 0,3 bzw. 0,5mm starkes PAA-Gel (7M Urea, 6% PAA, 1x TBE) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 540min bei 1500V, 38mA, 34W, 50°C und einem Sampling von 2s. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

Die Auswertung dieser Gele erfolgte mit den Software-Programmen ALFwin™ Version 1.00, ALFwin™ Sequence Analyser 2.00 bzw. ALFwin™ Fragment Analyser 1.01 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Die nichtdenaturierende Gelelektrophorese wurde mit 1mm starken Gelen (5% PAA, 1x TBE-Puffer) in einer PROTEAN™ II Slab Cell-Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 80V und 4°C über Nacht durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Die Auswertung dieser Gele erfolgte wie bei **Yap and McGee (1992)** beschrieben durch Färbung mit Ethidiumbromid. Dazu wurde das Gel für 30min in 0,5mg Ethidiumbromid/l 1x TAE-Puffer geschüttelt und anschließend unter UV-Licht auf einem Transilluminator analysiert.

Für die Agarosegelelektrophorese wurden Gele mit 0,8-2% Agarose, 1x TAE und 0,5µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgte in 1-16h bei 25-80V in 1x TAE-Puffer. Die Auswertung dieser Gele erfolgte unter UV-Licht auf einem Transilluminator.

3.2.7. Isolierung spezifischer Fragmente aus AFLP-Gelen

Für die Isolierung von spezifischen Fragmenten aus AFLP-Gelen wurden diese wie folgt vorbereitet. Beide Glasplatten wurden mit 0,1mM NaOH gereinigt. Nach einer Inkubation von 10min folgten ein gründliches Entfernen der NaOH mit sterilem H₂O sowie eine weitere Behandlung mit 70% Äthanol. Danach wurde eine der beiden Platten ganzflächig mit einem 4:1 Gemisch, bestehend aus einem Bindsilan-Äthanol-Gemisch (siehe 3.1.3.) und 10% Essigsäure, eingerieben. Das Gießen des Gels erfolgte wie unter 3.2.6. beschrieben.

Auf dieses Gel wurden die PCR-Produkte (ausgewählter Primerkombinationen) einer männlichen und einer weiblichen Pflanze in sechsfacher Wiederholung (siehe Abbildung 4) aufgetragen.

Mit dem Erscheinen der gewünschten Bande auf dem Monitor wurde der Lauf des Gels unterbrochen und die Position des Lasers auf der mit Bindsilan behandelten Platte markiert. Danach wurden 2mm breite Bereiche im Abstand von 0-8mm unterhalb des Lasers angezeichnet (siehe Abbildung 4). Die andere Platte wurde vorsichtig entfernt, um das Gel nicht zu beschädigen. Das Gel wurde an den markierten Linien mittels Skalpell durchtrennt, die einzelnen Gelstücke mit einem Spatel abgehoben und in separate Eppendorfgefäße eingewogen.

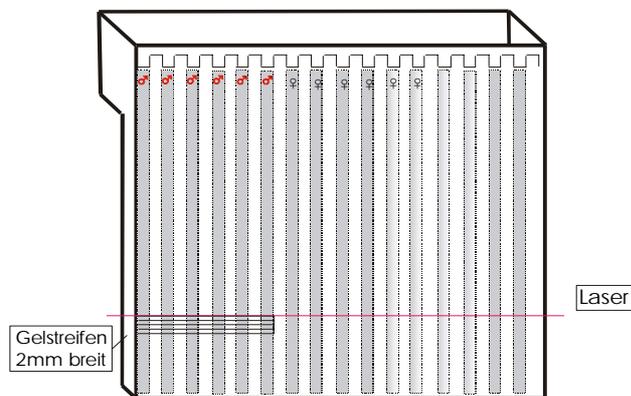


Abbildung 4: Isolierung spezifischer Fragmente aus einem AFLP-Gel

In Abbildung 4 ist das Ausschneiden der Gelstreifen dargestellt. Auf der linken Seite sind die PCR-Produkte der männlichen Hanfpflanze aufgetragen. Daneben zum Vergleich die Produkte der weiblichen Pflanze. Die Position des Lasers ist rot markiert.

3.2.8. Elution von DNA

Die Elution von DNA aus einem Polyacrylamidgel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden). Dazu wurden Stücke mit dem zu eluierenden DNA-Bereich aus dem Gel ausgeschnitten und in 2x Volumen Diffusionspuffer (200µl/100mg Gel) für 30min bei 50°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 1min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde mittels Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 3x Volumen Puffer QX1, 10µl QIAEX II und 10µl Natriumacetat (pH5,2) erfolgte unter gelegentlichem Mischen eine Inkubation für 10min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 30s bei 14.000rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes folgten zwei Waschschrte in je 500µl Puffer PE. Einer folgenden Zentrifugation für 30s bei 14.000rpm schloss sich ein Trocknen des Pellets für ca. 25min bis zur Weißfärbung an. Durch Zugabe von 20µl Puffer EB (Elution Buffer) wurde das Pellet resuspendiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30s bei 14.000rpm. Der Überstand mit der darin gelösten DNA wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen. Für die Elution von DNA aus einem Agarosegel wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und die interessierenden Bereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Elution der DNA aus den Gelstücken mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) wie in der Anleitung beschrieben oder mittels Biotraps (Schleicher & Schuell, Dassel). Dazu wurden die Gelstücke in die Biotraps geladen und die DNA für 2h in 1x TAE bei 150V durch eine semipermeable Membran eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2x Volumen Äthanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Pelletierung für 10min bei 13.000rpm und 4°C und einem Waschschrte mit 70% Äthanol wurde die DNA kurz getrocknet und in 10µl H₂O gelöst.

3.2.9. Klonierung von DNA

Für die Klonierung von *AluI*-restringierter Hanf-DNA wurden 1µl DNA in einem 10µl Ansatz bestehend aus 1x Ligationspuffer (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe) und 1U Ligase (Gibco BRL) mit 1µl (51ng/µl) des mit *EcoRV* vorbereiteten Vektors pBluescript SK⁻ ligiert. Die Ligation erfolgte für 1h bei Raumtemperatur und 1h bei 37°C.

Zur Transformation des Ligationsansatzes in Bakterien des Stammes *E. coli* Dh10B wurden zunächst elektrokompente Zellen hergestellt. Dazu wurden 5ml SOB Medium mit einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37°C und 250rpm über Nacht. Die Bakterien wurden in 500ml SOB Medium überführt und unter äquivalenten Bedingungen bis zu einer OD_{600nm} von 1 angezogen. Nach Sedimentation der Zellen für 15min bei 4.500rpm und 4°C folgte ein zweimaliges Waschen mit 500ml 10% Glycerin. Anschließend wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert. Für die Bestimmung der OD_{550nm} wurde eine 1:300 Verdünnung der Zellen mit 10% Glycerin verwendet. Anschließend wurden das Volumen der Zellen so eingestellt, das die optische Dichte von 1ml elektrokompenter Zellen bei 550nm in einem Bereich zwischen 250 und 300 liegt. Die Zellen wurden in Aliquots von 200µl in einem -80°C kalten Metallblock schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für eine Transformation wurden 40µl elektrokompente Zellen des Laborstammes Dh10B mit 1µl des Ligationsmixes vorsichtig gemischt. Die Transformation erfolgte mit einem *E. coli* pulser (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 2,5kV, 25µF und 200Ω. Nach Zugabe von 1ml SOC-Medium folgte eine Erholungsphase für 1h bei 37°C. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf Selektionsmedium ausgestrichen. Nach dem Wachstum über Nacht bei 37°C wurden Einzelkolonien in 384er Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 75µl FB-Medium je Well gepickt und diese für 16-18h bei 37°C inkubiert.

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit (Invitrogen, Groningen). Für die Ligation wurden 4µl PCR-Produkt, 1µl Salzlösung und 1µl Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] sanft gemischt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. 2µl dieser Ligation wurden in One Shot[™] Zellen transformiert. Dazu wurden

Ligation und Zellen kurz gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem sich anschließenden Hitzeschock für 30s bei 42°C wurden die Zellen für 2min auf Eis abgekühlt. Es folgten die Zugabe von 250µl SOC und eine Erholungsphase von 1h bei 37°C. Je 50-200µl jeder Transformation wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

3.2.10. Dauerkulturen

Bakterieneinzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in jeweils 2ml LB-Medium (+ entsprechende Antibiotika) überführt und über Nacht bei 37°C und 125rpm angezogen. 0,85ml dieser Kulturen wurden mit 0,15ml Glycerin in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt, auf einem Vortexgerät gemixt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.11. Mini-Präparation

Einzelkolonien wurden in 2ml LB-Medium (+ 50-100µg/ml Antibiotika) über Nacht bei 37°C und 125rpm angezogen. Die Zellen von 1,5ml dieser Kultur wurden für 2min bei 13.000rpm pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in 100µl Lösung I resuspendiert. Die Lyse erfolgte während einer Inkubation für 5min auf Eis. Nach Zugabe von 200µl Lösung II folgte ein sanftes Mischen. Im Anschluss an die Zugabe von 150µl Lösung III schlossen sich eine Inkubationsphase für 5min auf Eis sowie eine Zentrifugation für 5min bei 10.000rpm an. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde mit 1ml Äthanol (-20°C) für 20min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde mittels Zentrifugation für 5min bei 13.000rpm pelletiert und mit 500µl 70% Äthanol gewaschen. Nach einem kurzen Trocknen für ca. 5min im Exsikkator wurde das Pellet in 40µl 1x TE/RNA'se (10µg/ml RNA'se) aufgenommen und bei 37°C für 15min inkubiert.

3.2.12. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechend der Anleitung.

6µl jeder Sequenzierungsreaktion wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 3.2.6.) aufgetragen und analysiert.

3.2.13. Blotten von DNA

2-10µg restringierte DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern Blot (**Southern, 1975**) auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Nach einer Laufzeit von ca. 16 Stunden wurde der Blot abgebrochen und die Membran 2min mit 2x SSC gewaschen. Das Fixieren der DNA auf der Filteroberfläche erfolgte entweder durch eine UV-Behandlung bei 254nm für 15min oder durch Hitzebehandlung für 1 Stunde bei 80°C.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz DIG-markierter DNA-Sonden wurden je 2,5pmol, 50fmol, 10fmol, 2fmol, 0,4fmol und 0,08fmol markierte Sonde mittels Dot Blot auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Diese wurde 1 Stunde bei 80°C gebacken, detektiert und entwickelt. Anschließend fand eine Auswertung aufgrund der Signalstärken statt.

3.2.14. Blotten von Bakterienkolonien

Die Bakterienkolonien wurden mit einem 384er Stempel (Nunc, Wiesbaden) auf eine Hybond- N⁺ Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gestempelt. Um Hybridisierungsartefakte auszuschließen, wurde auf die gleiche Membran in diagonaler Anordnung ein zweites Mal gestempelt. Im Anschluss wurden die Filter zum Wachsen der Bakterien auf LB-Platten gelegt. Nach einer Wachstumsphase bei 37°C über Nacht erfolgte

die Lyse der Bakterien auf einem mit 10% SDS getränktem Whatmanfilter (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England) für 3min. Anschließend wurde für 3min auf einem mit Denaturierungspuffer getränktem Whatmanfilter denaturiert. Es folgten zwei Neutralisierungsschritte für je 3min auf einem mit Neutralisierungspuffer getränktem Filterpapier. Danach wurde mit 2xSSC gewaschen. Nach dem Backen für 1h bei 80°C wurden die Membranen unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Inkubation mit je 1ml (1mg/ml) Proteinase K für 1h bei 37°C wurde die Bakterienmembran zwischen zwei mit H₂O getränkten Whatmanfiltern platziert. Durch Überrollen der Filter mit einer Glasflasche wurde das Whatmanpapier unter leichtem Druck auf die Bakterienfilter gepresst. Beim Entfernen der oberen Lage Whatmanfilter blieben die Proteine daran kleben und wurden somit von den Filtern entfernt. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt. Anschließend wurden die Filter mit der daran haftenden Plasmid-DNA mit 2x SSC in Folie eingeschweißt.

3.2.15. Hybridisierung von Nylonmembranen

Nach einer Vorhybridisierung der Membran für 1h bei 37-60°C in DIG-Hybridisierungspuffer erfolgte die Hybridisierung im gleichen Puffer unter äquivalenten Bedingungen mit einer DIG-markierten Sonde (6,4pmol/ml-10pmol/ml) über Nacht. Die Markierung der DNA-Proben mit Digoxigenin erfolgte nach **Ross et al. (1999)**.

Die Hybridisierung erfolgte mit 1ml Hybridisierungslösung/100cm² Membran nach der "Sandwich"-Methode (**Fladung und Rai Ahuja, 1995**) bzw. mit 15ml Hybridisierungslösung in Glasflaschen oder Plastiktaschen (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Das Label wurde anschließend in Falcons abgefüllt und bei -20°C verwahrt.

Zur Detektion DIG-markierter Signale wurden hybridisierte Membranen zweimal für 5min mit 2x SSC, 0,5% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend folgten zwei weitere Waschungen für jeweils 15min mit 0,5x SSC, 0,5% SDS bei 65°C. Nach dem Entfernen der Pufferreste mit DIG-Waschpuffer wurden die Filter in 1x Blocking Stock Solution für 30min bei Raumtemperatur equilibriert. Danach folgten die Zugabe von Anti DIG-AP im Verhältnis

5000:1 und eine Inkubationsphase für 30min bei Raumtemperatur. Zum Entfernen nicht-gebundener Antikörper wurde zweimal mit DIG-Waschpuffer für je 15min gewaschen. Die Membran wurde für 5min in Detektionspuffer equilibriert und anschließend für 5min mit jeweils 500 μ l CSPD:Detektionspuffer = 1:100 in einer Folie inkubiert. Nach dem Einschweißen in eine neue Folie und Inkubation für 15min bei 37°C wurden die Filter zur Exposition auf Lumi Nonradioactive Detection Filme (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) aufgelegt. Die Filme wurden nach 6-16h in Entwickler (Ilford Phenisol, Tetenal Photowerk, Norderstedt) ca. 5min entwickelt und anschließend mit Fixierer (Tetenal Superfix, Tetenal Photowerk, Norderstedt) ca. 6-8min fixiert.

Um gleiche Membranen mehrmals hintereinander hybridisieren zu können, wurden die Sonden durch Strippen wieder entfernt. Dazu wurde die Membran 2min mit H₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte der Strippvorgang für 2x 15min mit Stripppuffer bei 37°C. Das Abwaschen der Pufferreste wurde in 5x SSC für 5min bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln durchgeführt. Im Anschluss wurden die Filter mit 2x SSC in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.2.16. Erstellung der genetischen Karte

Zur Erstellung der Kopplungskarte wurden 80 F₁-Nachkommen (A2/1-A2/100 außer A2/71) der Kreuzung CAN18/1 x CAN18/2 verwendet.

In einem ersten Schritt wurden alle Marker (AFLP, STS und SCAR) erfasst, welche innerhalb der Kartierungspopulation Polymorphismen zeigten. Diese wurden im Anschluss in einer binären (0/1) Matrix zusammengestellt. Dabei stehen die 0 für die Abwesenheit und die 1 für das Vorhandensein des Markers bei der jeweils analysierten Pflanze.

Im Anschluss wurden anhand dieser Daten die Spaltungsverhältnisse für die einzelnen Marker mit dem Programm Joinmap Single Locus Analysis (2.0) errechnet und mittels χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft. Dabei wird für dominante Marker in Abhängigkeit von der Ausgangssituation der Eltern ein Spaltungsverhältnis von 3:1 oder 1:1 erwartet (**Schumacher et al., 1997**). Diese Verhältnisse entsprechen der F₂-Situation (beide Eltern heterozygot) und

der Rückkreuzungssituation (ein Elter heterozygot, der andere ohne Bande). Marker, die nicht eindeutig einem der beiden Spaltungsverhältnisse zuzuordnen waren, wurden sowohl als 1:1 als auch als 3:1 spaltend behandelt.

Die anschließende Kartierung erfolgte mit dem Programm Joinmap 1.3 (**Stam, 1993**) bei einem kritischen LOD-Wert (Likelihood Odds Ratio) von 4,0. Der LOD-Wert ist definiert als $\log_{10} L/L_0$. Dabei ist L die Wahrscheinlichkeit dafür, dass zwei Marker gekoppelt sind. L_0 ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass keine Kopplung vorliegt. Die graphische Darstellung der Kopplungsgruppen erfolgte mit dem Programm Draw Map. Die einzelnen Kopplungsgruppen wurden in das Programm Corel Draw 8.0 (Corel Corporation, Unterschleissheim) übertragen und zu einer Karte zusammengestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung von AFLP-Markern

4.1.1. Entwicklung geschlechtsspezifischer AFLP Marker mittels Bulk Segregant Analysis

Für die Entwicklung geschlechtsspezifischer Marker wurde DNA von Einzelpflanzen aus dem Freiland der beiden diözischen Herkünfte CAN18 (16 männliche und 16 weibliche Pflanzen) und CAN17 (10 männliche und 8 weibliche Pflanzen) isoliert und für eine AFLP-Analyse vorbereitet. Anschließend wurde die DNA von Pflanzen einer Abstammung wie bei **Michelmore et al. (1991)** beschrieben als DNA-Gemisch zu männlichen und weiblichen Bulks zusammengestellt.

An diesen Bulks wurden 39 AFLP-Primerkombinationen getestet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 2 dargestellt. Innerhalb der 39 Primerkombinationen wurden insgesamt 1802 Banden amplifiziert. Das entspricht einer Anzahl von 46,2 Banden pro Kombination. 249 (13,8%) Banden waren polymorph, was einem Durchschnitt von 6,4 polymorphen Banden pro Primerpaar entspricht. Dabei variiert die Anzahl der polymorphen Banden innerhalb verschiedener Kombinationen von zwei (z.B. Kombination *HindIII*+AGA/*MseI*+AAA) bis 21 (z.B. Kombination *HindIII*+AGA/*MseI*+ACC). Die Größe der amplifizierten Fragmente lag zwischen 50 bp und 500 bp. Der größte Teil der polymorphen Banden bewegte sich zwischen 50 bp und 350 bp. Die Ergebnisse der einzelnen AFLP-Kombinationen sind in der Anlage in Tabelle A3 dargestellt.

Tabelle 2: Auswertung der Bulkanalyse zur Entwicklung geschlechtsspezifischer Marker

Ergebnisse der Bulkanalyse			
Primerkombination	<i>HindIII+AGA</i>	<i>HindIII+ACC</i>	<i>HindIII+ACT</i>
Anzahl der getesteten Kombinationen	13*	13*	13*
Anzahl detektierter Banden insgesamt	661	545	596
Anzahl detektierter Banden je Kombination	50,8	41,9	45,8
Anzahl polymorpher Banden insgesamt	82	76	91
Anzahl polymorpher Banden je Kombination	6,3	5,8	7
Anzahl polymorpher Banden in %	12,4	13,9	15,3

* Die einzelnen Primerkombinationen sind in der Anlage in Tabelle A3 aufgeführt

Um geschlechtsspezifische Marker detektieren zu können, wurden bei der Auswertung der Bulkanalyse polymorphe Banden sechs unterschiedlichen Klassen zugeordnet. Diese Klassen sind im Folgenden dargestellt:

Klasse 1 - Es wird eine Bande in beiden männlichen Bulks amplifiziert. Diese Bande erscheint in keinem der weiblichen Bulks bzw. deutlich schwächer.

- Ergebnisse -

- Klasse 2 - Es wird eine Bande in beiden weiblichen Bulks amplifiziert. Diese Bande erscheint in keinem der männlichen Bulks bzw. deutlich schwächer.
- Klasse 3 - Die Bande ist nur im männlichen Bulk von CAN18. Oder sie ist sowohl in beiden Bulks von CAN17 als auch im männlichen Bulk von CAN18. Im weiblichen Bulk von CAN18 erscheint sie gar nicht oder schwächer.
- Klasse 4 - Die Bande erscheint nur im weiblichen Bulk von CAN18, gegebenenfalls auch in beiden Bulks von CAN17. Im männlichen Bulk von CAN18 erscheint sie gar nicht oder bedeutend schwächer.
- Klasse 5 - Die Bande ist nur im männlichen Bulk von CAN17. Oder sie ist in beiden Bulks von CAN18 und im männlichen Bulk von CAN17. Im weiblichen Bulk von CAN17 erscheint sie gar nicht oder bedeutend schwächer.
- Klasse 6 - Die Bande ist nur im weiblichen Bulk von CAN17. Oder sie ist in beiden Bulks von CAN18 und im weiblichen Bulk von CAN17. Im männlichen Bulk von CAN17 erscheint sie gar nicht oder bedeutend schwächer.

Nach diesem Schema wurden alle polymorphen Banden analysiert. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel für die Auswertung eines AFLP-Gels der Bulkanalyse. Banden, welche einer der sechs Klassen zuzuordnen sind, wurden entsprechend durch farbige Pfeile gekennzeichnet.

- Ergebnisse -

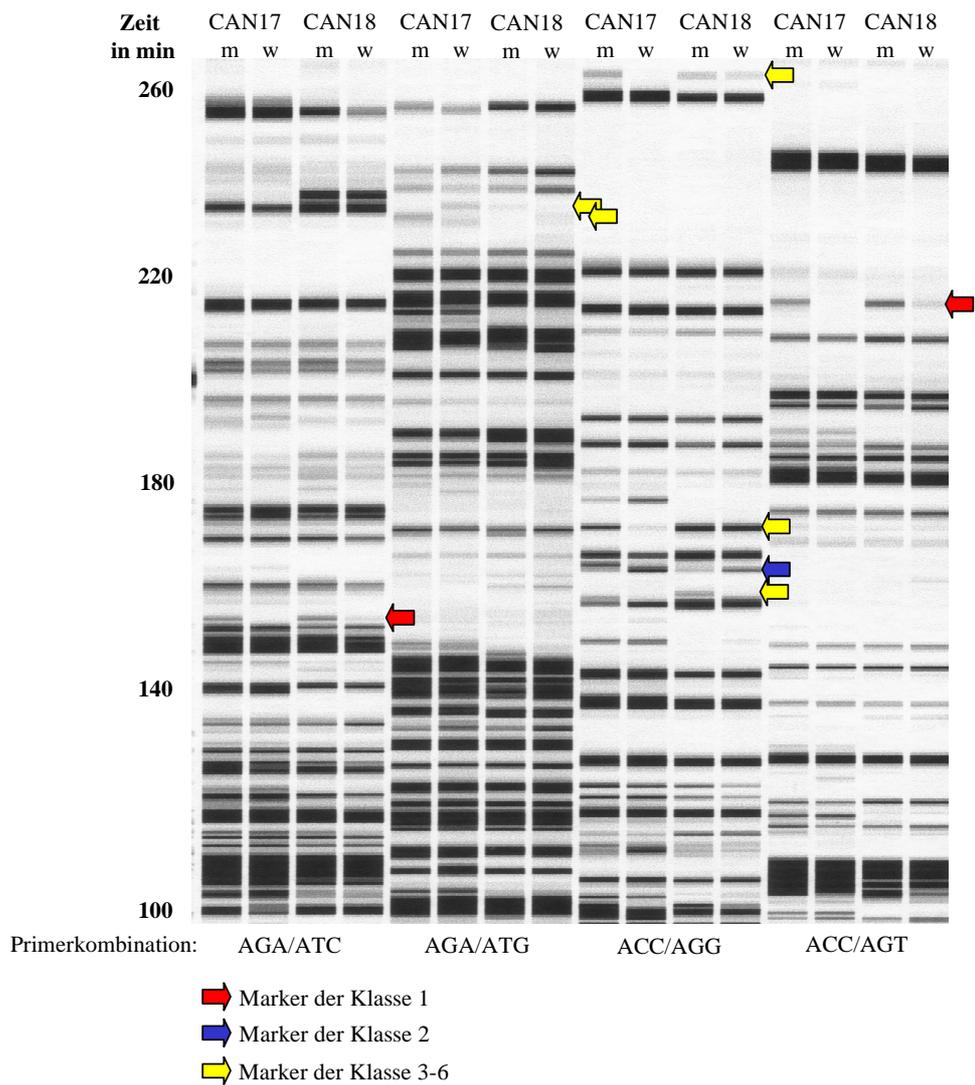


Abbildung 5: Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Bulkanalyse

Abbildung 5 zeigt einen Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Bulkanalyse. Die einzelnen Bulks wurden in der Reihenfolge CAN17 (männlich), CAN17 (weiblich), CAN18 (männlich) und CAN18 (weiblich) aufgetragen. Beispielhaft wurden Marker der verschiedenen Klassen durch farbige Pfeile gekennzeichnet.

Insgesamt konnten 41 polymorphe Banden der Markerklasse 1 zugeordnet werden und deuten damit auf eine Beziehung zum männlichen Geschlecht hin. Diese 41 Banden verteilen sich auf 23 Primerkombinationen mit 1 bis 5 Banden. Wesentlich weniger Banden (14) ließen sich

für die Markerklasse 2 detektieren. Sie verteilen sich auf 8 Kombinationen mit 1 bis 3 Banden. Dabei treten die Banden sowohl im weiblichen als auch im männlichen Bulk beider Abstammungen auf. In den weiblichen Bulks sind sie jedoch wesentlich intensiver ausgeprägt. Den größten Anteil mit 194 Polymorphismen bilden jene, die den Klassen 3-6 zuzuordnen sind. Diese Marker lassen eine Spezifität für einen Bulk einer einzelnen Abstammung vermuten. Sie fehlen entweder in den anderen Bulks oder treten bei der anderen Abstammung sowohl im weiblichen als auch im männlichen Geschlecht auf. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind im Einzelnen in Tabelle A4 in der Anlage zusammengestellt.

4.1.2. Größenbestimmung ausgewählter Marker der Klasse 1

Von den 23 *HindIII+.../MseI+...* AFLP-Primerkombinationen, welche spezifische Banden in beiden männlichen Bulks aufwiesen, wurden 8 Primerkombinationen ausgewählt, um die Größe der zu analysierenden Fragmente zu bestimmen. Dabei handelt es sich um die AFLP-Kombinationen ACC/AAG, ACC/AGA, ACC/ATC, ACT/ACA, ACT/ACC, AGA/AAC, AGA/ACT und AGA/AGG.

Für die Größenbestimmung wurden die AFLP-Produkte beider Eltern CAN18/1 und CAN18/2 der Kartierungspopulation A2, sowie drei weibliche Pflanzen (A2/1, A2/2 und A2/3) und drei männliche Pflanzen (A2/8, A2/9 und A2/11) der Kartierungspopulation gegen einen Größenstandard aufgetragen. Mit den 8 ausgewählten AFLP-Kombinationen wurden bei CAN18 16 männlich spezifische Banden amplifiziert. Von diesen wurden im Anschluss die Fragmentgrößen durch den Vergleich zum Standard bestimmt. Danach wurden diese Marker benutzt, um sowohl die Einzelpflanzen der Bulks von CAN17 und CAN18 als auch die der Kartierungspopulation zu untersuchen. Bei den Untersuchungen an den Pflanzen von CAN17 wurden ebenfalls die Fragmentlängen der männlichen Banden im Vergleich zum Standard bestimmt (siehe Tabelle 3).

4.1.3. Überprüfung der männlich spezifischen Banden an den Einzelpflanzen der Bulks

Bei dieser Untersuchung der Einzelpflanzen der Bulks konnten alle 16 Banden in CAN18 wiedergefunden werden (Tabelle 3). Keine der Banden konnte ausschließlich an männlich bonitierten Pflanzen nachgewiesen werden. Abbildung 6 zeigt ein Beispiel aus diesen Untersuchungen.

Elf Marker von CAN18 konnte ebenfalls an den Einzelpflanzen von CAN17 identifiziert werden (Tabelle 3). Auch hier wurde kein Marker gefunden, der ausschließlich in männlich bonitierten Pflanzen erscheint. Zusätzlich gibt es bei CAN17 weitere sechs Marker.

Tabelle 3: Überprüfung der männlich spezifischen Fragmente an den Einzelpflanzen zweier Abstammungen

Primerkombination		Größe der männlich spezifischen Fragmente in bp	
<i>HindIII</i> +	<i>MseI</i> +	CAN18 Einzelpflanzen	CAN17 Einzelpflanzen
ACC	AAG	112, 250	112, 124, 275
ACC	AGA	323	88, 163, 323
ACC	ATC	87, 292	87, 292
ACT	ACA	75, 202	75, 116
ACT	ACC	99	-
AGA	AAC	76, 213, 229	76, 213
AGA	ACT	323	221, 323
AGA	AGG	70, 101, 165, 275	70, 165, 275

Bei näherer Betrachtung der Marker an den abweichenden Pflanzen beider Abstammungen fiel jedoch auf, das sie auch da ein einheitliches Muster (Tabelle 4) zeigen.

Tabelle 4: Untersuchung der Einzelpflanzen der Bulks mit den AFLP-Primerkombinationen der Bulkanalyse

Geschlechts- spezifische AFLP-Marker	CAN17		CAN18	
	10 männlich bonitierte Pflanzen	8 weiblich bonitierte Pflanzen	16 männlich bonitierte Pflanzen	16 weiblich bonitierte Pflanzen
Anzahl von Pflanzen mit männlichen Banden	6 ¹	0	13	3
Anzahl der Pflanzen ohne männliche Bande	4	8	3	13

¹ einer von diesen Pflanzen fehlt eine männlich spezifische Bande

Nur 6 der 10 putativen Männchen von CAN17 zeigen die männlich spezifischen Fragmente. Die restlichen 4 Pflanzen (CAN17/2, CAN17/3, CAN17/4 und CAN17/6) verhalten sich genau wie Weibchen. Bei ihnen konnte kein männlicher Marker nachgewiesen werden.

Bei CAN18 finden sich die männlichen Banden in 13 von 16 männlich bonitierten Pflanzen wieder. Drei Pflanzen (CAN18/3, CAN18/9 und CAN18/13) verhalten sich wie Weibchen. Dagegen werden die männlich spezifischen Fragmente in 3 (CAN18/21, CAN18/24 und CAN18/31) der 16 weiblich bonitierten Pflanzen amplifiziert. Bei der Pflanze CAN18/21 konnten alle männlichen Marker bis auf zwei wiedergefunden werden. Bei näherer Betrachtung fiel auf, dass bei dieser Pflanze das AFLP-Muster anders als bei den übrigen Pflanzen war. Das lässt den Schluss zu, dass es sich hier um eine Pflanze anderer Herkunft handelt. Bei CAN17 gibt es eine männliche Pflanze (CAN17/9), bei welcher der Marker AGA/ACT_221 fehlt. Ansonsten zeigt diese Pflanze alle Marker, die auch in den übrigen männlich bonitierten Pflanzen detektiert worden waren.

- Ergebnisse -

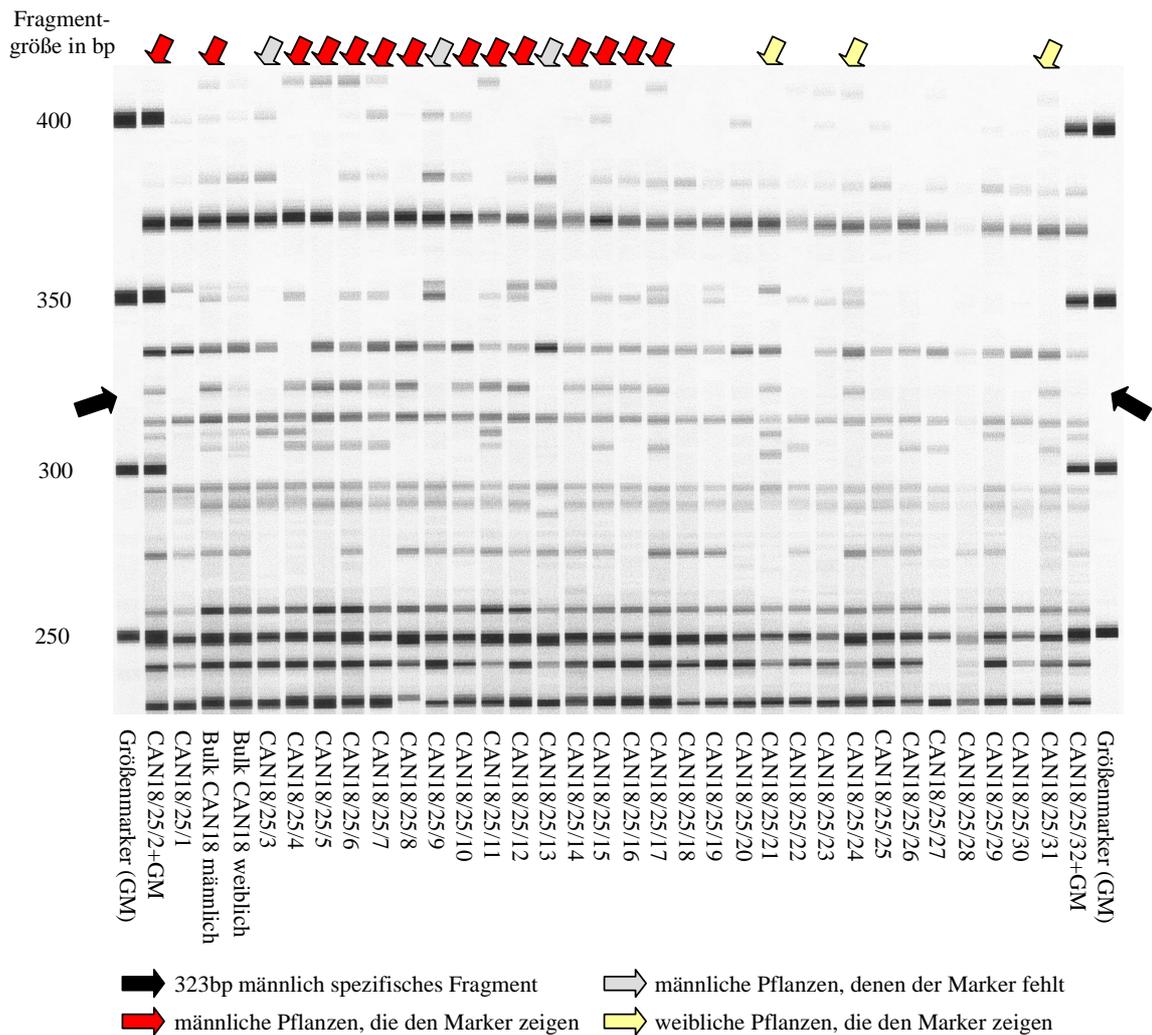


Abbildung 6: Überprüfung der Einzelpflanzen der Bulks von CAN18 mit der Primerkombination *HindIII*+*AGA/MseI*+*ACT*

Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt aus der Einzelpflanzenanalyse der Bulks von CAN18. Das 323 bp große männlich spezifische Fragment ist durch schwarze Pfeile markiert. Rote Pfeile kennzeichnen männliche Pflanzen, die den Marker zeigen. Graue und gelbe Pfeile markieren Pflanzen, bei denen Geschlecht und Marker nicht übereinstimmen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Geschlechtsbestimmung um Fehlbonituren handelte, und um genauere Kenntnis zur Übereinstimmung der Marker mit dem männlichen Geschlecht

zu erlangen, wurden die 8 ausgewählten Primerkombinationen an 80 F₁-Einzelpflanzen (alle außer A2/71) der Kreuzung CAN18/1♀ x CAN18/2♂ (33 männliche und 47 weibliche Pflanzen) sowie an den 30 Einzelpflanzen (6 männliche und 24 weibliche Pflanzen) der diözischen Abstammung CAN17 getestet. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel aus diesen Untersuchungen.

Alle 16 männlich spezifischen Banden der Abstammung CAN18 konnten bei den 80 Einzelpflanzen wiedergefunden werden und zeigten dort eine vollständige Übereinstimmung mit dem männlichen Geschlecht. Keine der ausgewählten Banden konnte in einer weiblichen Pflanze nachgewiesen werden. Ebenso konnten die für CAN17 detektierten Marker an den Gewächshauspflanzen von A7 (CAN17) wiedergefunden werden. Auch hier wurde eine vollständige Übereinstimmung mit dem im Gewächshaus bonitierten Geschlecht festgestellt. Vermutlich waren daher im Freiland einige Pflanzen hinsichtlich des Geschlechtes falsch bonitiert.

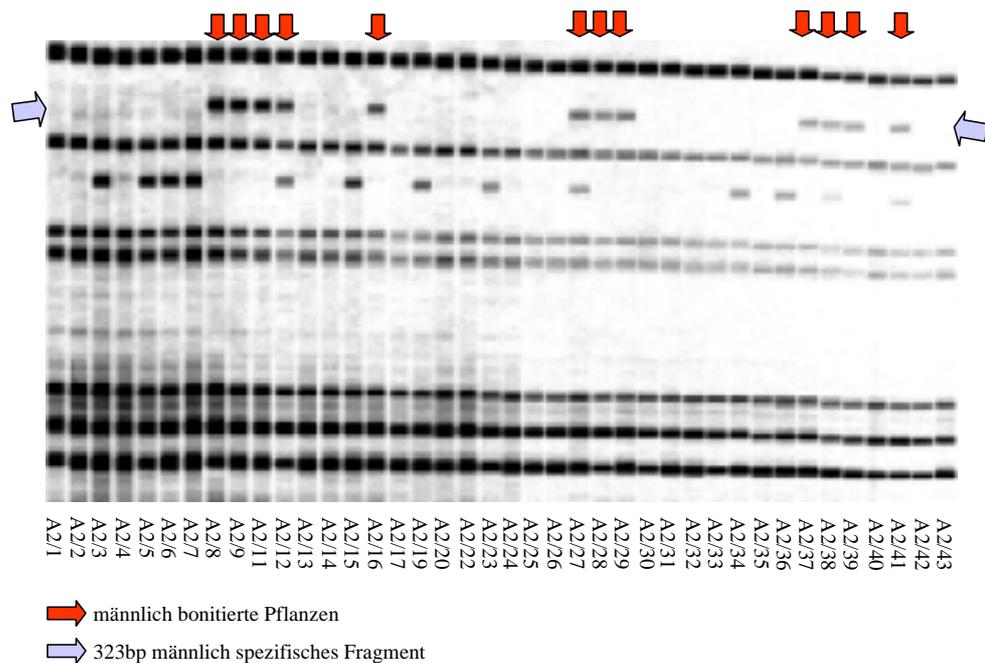


Abbildung 7: Überprüfung von AFLP-Markern an den F₁-Einzelpflanzen

Abbildung 7 zeigt einen Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Primerkombination *Hind*III+AGA und *Mse*I+ACT, getestet an 40 F₁-Einzelpflanzen von A2. Alle männlich bonitierten Pflanzen wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die 323 bp männlich spezifische Bande ist blau markiert.

4.2. Konvertierung von AFLP-Markern in sequenzspezifische SCAR-Marker

Für die Konvertierung von AFLP-Markern in SCAR-Marker ist es notwendig, die Sequenz des entsprechenden AFLP-Fragmentes zu bestimmen. Dazu muss die Bande aus dem Gel isoliert, in einen Vektor kloniert und sequenziert werden. Bislang wurde bei der Isolierung von AFLP-Markern aus Gelen nichtradioaktiver Protokolle auf Silberfärbung bzw. Detektion durch ^{32}P zurückgegriffen. Um diesen Schritt schneller und effizienter zu gestalten, wurde ein Verfahren entwickelt, welches es ermöglicht, Banden direkt aus Gelen nichtradioaktiver Protokolle auszuschneiden und zu isolieren. Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf von der Isolierung der Bande bis zur Sequenzierung.

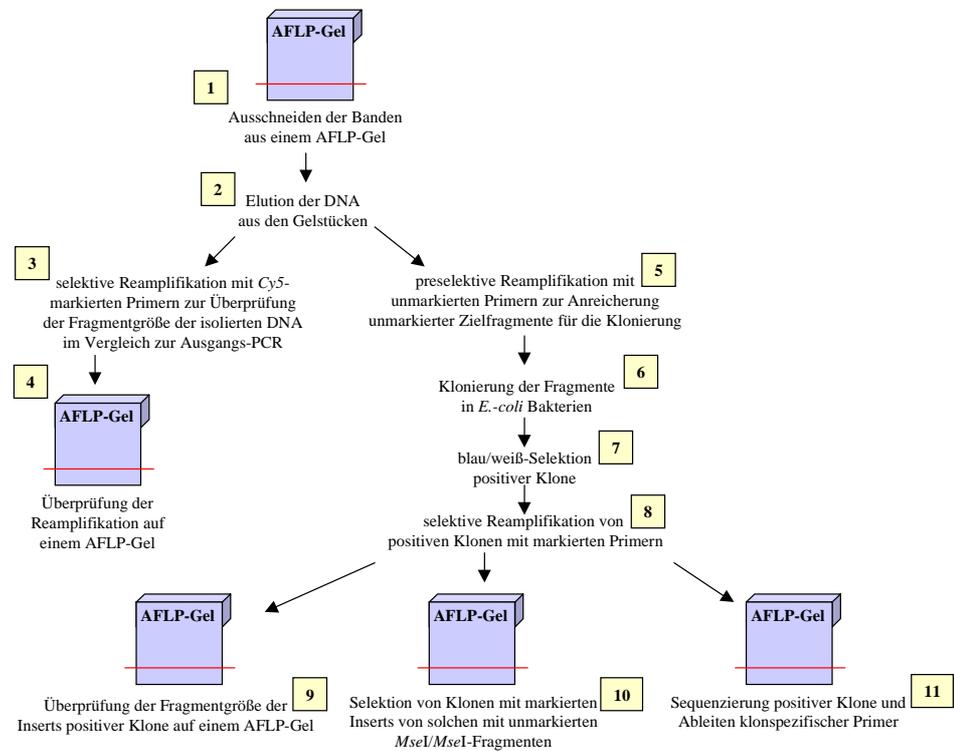


Abbildung 8: Isolierung und Klonierung von AFLP-Fragmenten zur Konvertierung in SCAR-Marker

Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf der Isolierung von Fragmenten aus einem AFLP-Gel. Die Zahlen eins bis elf bezeichnen die einzelnen Arbeitsschritte der Reihe nach.

4.2.1. Isolierung und Klonierung spezifischer AFLP-Fragmente

Für die Umwandlung von AFLP-Markern in STS oder SCAR-Marker wurden die beiden 323 bp großen männlich-spezifischen Fragmente der Primerkombinationen *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT und *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA ausgewählt (Tabelle 3). Die Banden wurden aus dem AFLP-Gel wie unter 3.2.7. beschrieben ausgeschnitten und die DNA eluiert. Jeweils 2,5µl der eluierten DNA wurden in einer selektiven PCR reamplifiziert und auf ein AFLP-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 9).

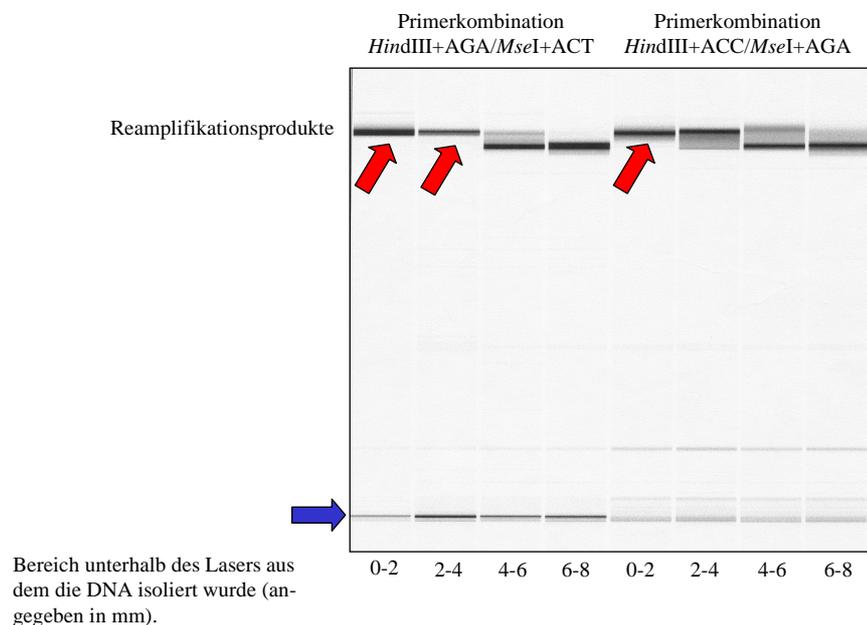


Abbildung 9: Überprüfung der Reamplifikation isolierter AFLP-Fragmente

Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt aus der Überprüfung der Reamplifikationsprodukte isolierter AFLP-Fragmente auf einem AFLP-Gel. Der blaue Pfeil markiert die Primerfront. Die roten Pfeile zeigen den Bereich an, aus dem ausschließlich das Zielfragment isoliert wurde.

Als Ergebnis dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass bei beiden Primerkombinationen im Bereich von 0-8mm unterhalb des Lasers mindestens zwei Banden ausgeschnitten worden waren. Dabei scheint es sich bei dem Fragment im Bereich von 0-2mm unterhalb des Lasers um die gewünschte Bande zu handeln. In den folgenden drei Bereichen wurde neben der gewünschten Bande zusätzlich noch mindestens eine weitere Banden isoliert. 2,5µl der eluierten DNA aus dem Bereich von 0 bis 2mm wurden in einer

präselektiven PCR reamplifiziert. Im Anschluss erfolgten die Klonierung von je 4µl dieser PCR mittels TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen) in den Vektor pCR® 2.1-TOPO® sowie die Transformation in die dazugehörigen One Shot™ Zellen. 200µl jeder Transformation wurden ausplattiert und 48 positive (weiße) Klone je Primerkombination (Nr. 1-48 *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT und Nr. 49-96 *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA) mittels blau/weiß Screening selektiert. Von allen positiven Klone wurden Dauerkulturen angelegt.

Parallel dazu wurden 6 ausgewählte Klone je Primerkombination in einer selektiven PCR reamplifiziert und auf einem AFLP-Gel überprüft. Zum Vergleich wurden je 2 Proben (A2/7♀ und A2/8♂) der Ausgangs-PCR mit auf das Gel aufgetragen (siehe Abbildung 10).

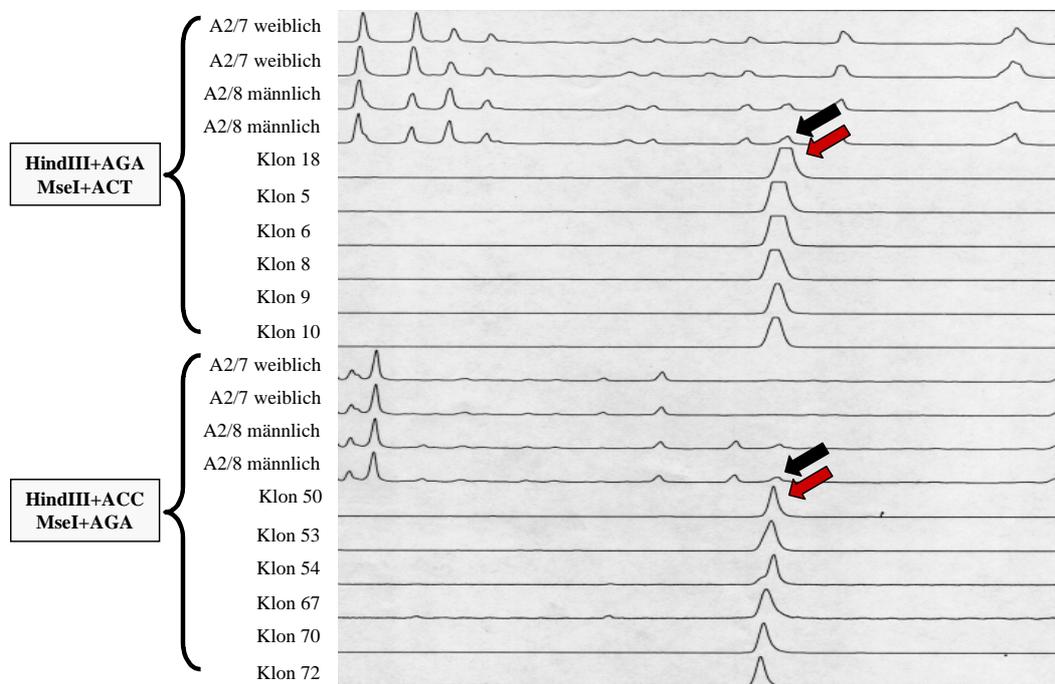


Abbildung 10: Vergleich klonierter Fragmente mit den Banden der Ausgangs-PCR
Die jeweils oberen vier Spuren zeigen die Bandenmuster von A2/7♀ und A2/8♂ männlich. Anschließend folgen je sechs Klone jeder Primerkombination. Die 323 bp große männlich spezifische Bande ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Der rote Pfeil zeigt auf die PCR-Produkte der sechs Klone.

Aus Abbildung 10 geht hervor, dass die klonierten Fragmente der sechs ausgewählten

positiven Klone in ihrer Größe mit den männlich spezifischen Banden der Ausgangs-PCR übereinstimmen. Da durch das Ausschneiden von AFLP-Fragmenten sowohl gewünschte Fragmente mit mindestens einem *HindIII*-Ende als auch unerwünschte Fragmente mit zwei *MseI*-Enden isoliert und folglich kloniert werden, muss im Anschluss ein Selektionsschritt erfolgen. Um Klone mit erwünschten Inserts mit mindestens einem *HindIII*-Ende von solchen mit unerwünschten Inserts gleicher Größe mit zwei *MseI*-Enden zu unterscheiden, wurde das in Abbildung 10 dargestellte Gel ein zweites Mal mit der Software ALFwinTM Fragment Analyser 1.01 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgewertet. Diese Darstellung ermöglicht es Klone mit gewünschten Inserts (mindestens ein *Cy5* markiertes *HindIII*-Ende) von solchen mit unmarkierten Fragmenten (zwei *MseI*-Enden) zu unterscheiden. Einen Ausschnitt aus diesem Screening zeigt die im folgenden dargestellte Abbildung 11.

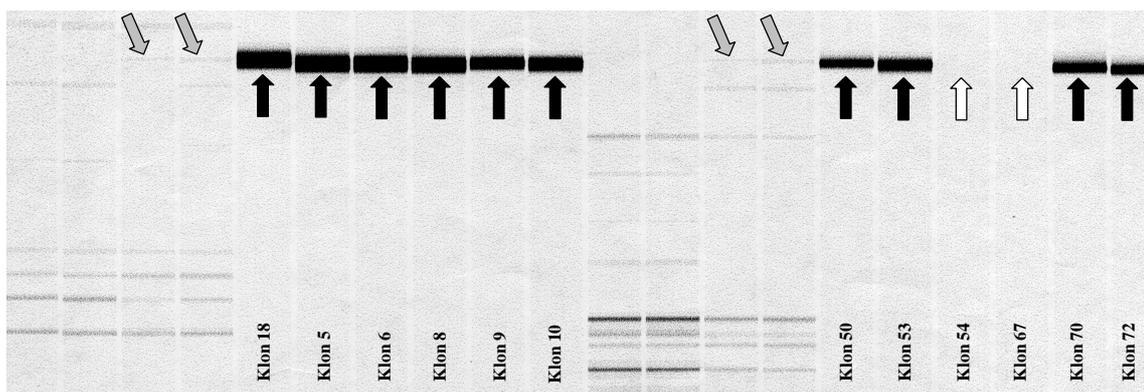


Abbildung 11: Überprüfung positiver Klone auf *HindIII*-Fragmente

Je sechs Klone jeder Primerkombination (*HindIII*+AGA/*MseI*+ACT linke Bildhälfte und *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA rechte Bildhälfte) wurden im Vergleich zur Ausgangs-PCR der Pflanzen A2/7♀ und A2/8♂ aufgetragen. Die männlich spezifischen Fragmente der Ausgangs-PCR sind durch graue Pfeile markiert. Schwarze Pfeile weisen auf Klone mit markierten Inserts hin. Mit weißen Pfeilen wurden Klone mit unmarkierten Fragmenten markiert.

Bei der Betrachtung dieser Abbildung wird deutlich, dass alle sechs Klone der AFLP-Kombi-

nation *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT (Klone 18, 5, 6, 8, 9 und 10) markierte Inserts enthalten. Die Klone 50, 53, 70 und 72 der Kombination *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA haben ebenfalls markierte Inserts. Demgegenüber scheint es sich bei den Fragmenten der Klone 54 und 67 um unmarkierte *MseI*/*MseI*-Inserts zu handeln.

4.2.2. Bestimmung der Nukleinsäuresequenz der Inserts ausgewählter Klone und Erstellen sequenzspezifischer Primer

Um die Ergebnisse der in Abbildung 11 dargestellten Untersuchung zu überprüfen, wurden die Fragmente der Klone 5, 18, 50, 53, 54 und 67 sequenziert. Dazu wurden die Bakterien in 2ml LB-Medium über Nacht angezogen und die Plasmid-DNA mittels Plasmid Mini-Prep. isoliert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung von je 2µg Plasmid-DNA mit dem ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software ALFwin™ Sequence Analyser 2.00. Anhand der Sequenzdaten bestätigte sich, dass die Klone 5 und 18 der AFLP-Kombination *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT markierte Inserts mit je einem *HindIII*- und einem *MseI*-Ende enthalten. Beide Fragmente sind 324 bp lang und sind in ihren Sequenzen identisch. Für die Sequenz des Inserts von Klon 18 wurden die sequenzspezifischen Primer HK18u und HK18r erstellt (Abbildung 12).

Bei der Sequenzdatenanalyse der Klone 50, 53, 54 und 67 der Primerkombination *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA ergab sich Folgendes. Die Klone 50 und 53 enthalten jeweils ein markiertes Insert mit je einem *HindIII*- und einem *MseI*-Ende und differieren in der Abfolge ihrer Sequenz. Folglich wurden bei der Isolierung zwei verschiedene Cy5-markierte Fragmente isoliert. Für beide Fragmente wurden sequenzspezifische Primer erstellt (Klon 50 - Primer HK50u und HK50r; Klon 53 - Primer HK53u und HK53r). Diese sind ebenfalls in Abbildung 12 dargestellt.

Bei den Inserts der Klone 54 und 67 handelt es sich um unmarkierte Fragmente mit zwei *MseI*-Enden. Sie sind beide 322 bp lang und stimmen in ihrer Sequenz überein. Bei diesen Klonen handelt es sich um ein und dasselbe Fragment.

- Ergebnisse -

```

                                HK18u - TAAAGAC CAAAGCGAAA A->
Klon 18  1  GATGAGTCCT GAGTAAAGAC CAAAGCGAAA AGAGAGTTTT TTGGCTTCAA
                                HK50u - CTCAA GTTTTATCCCAATG->
Klon 50  1  GATGAGTCCT GAGTAAAGAC CTAAATATTT TATTTCTCAA GTTTTATCCC
                                HK53u - TAAAGAG TGTATGCTTC CT->
Klon 53  1  GATGAGTCCT GAGTAAAGAG TGTATGCTTC CTCCCGAGAC AAGACTTGAG
                                .
                                .
                                .
                                .
                                <-GA TAGAACGAAT ACCATTCGA - HK18r
Klon 18  274 CCGCATTGTG TTTGTCTTCT ATCTTGCTTA TGGTAAGCTG GTACGCAGTC
                                <-AAAATTTTG ACCATTCGA - HK50r
Klon 50  277 CAAGAGACTG CAAAACGGC CAAAATTTTG AGGTAAGCTG GTACGCAGTC
                                <-GTTGAGAAGA CCATTCGA - HK53r
Klon 53  272 CCACTYTACT ATCCTKTACA CAACTCTTCT GGTAAAGCTKG TACCGCAGTY

```

Abbildung 12: Sequenzen der Hanfklone 18, 50 und 53

Dargestellt sind Ausschnitte aus den Sequenzen der Klone 18, 50 und 53. Dabei sind in der oberen Bildhälfte die Sequenzbereiche der *HindIII*-Seite der Fragmente dargestellt. In der unteren Bildhälfte handelt es sich entsprechend um die Ausschnitte der *MseI*-Seite. Die Sequenz der *HindIII*-Primer ist rot markiert. *MseI*-Primer Sequenzen sind grün hinterlegt. Blaue Sequenzen stellen die jeweiligen abgeleiteten fragmentspezifischen Primer dar.

4.2.3. Überprüfung der abgeleiteten Primerpaare an männlichen und weiblichen Hanfpflanzen und Entwicklung neuer Primer

Alle drei fragmentspezifischen SCAR-Primerpaare wurden an je neun bzw. zehn F₁-Einzelpflanzen (vier bzw. fünf männliche und fünf weibliche Pflanzen) der Kartierungspopulation, wie unter 3.2.5. beschrieben, bei einer Annealingtemperatur von 51 °C getestet. Dabei amplifizierten die Primerpaare HK18u/HK18r und HK50u/HK50r je eine einzelne Bande in der entsprechenden Größe. Diese Bande wurde sowohl in Männchen als auch in Weibchen detektiert (Abbildung 13A). Mit dem Primerpaar HK53u/r konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Im Anschluss wurden die Amplifikationsprodukte der Primerpaare HK18u/HK18r und HK50u/HK50r auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei zeigte es sich, dass das Primerpaar HK18 eine einheitliche Bande sowohl in Männchen als auch in Weibchen amplifiziert. Des Weiteren tritt eine etwas kleinere Bande auf, welche ausschließlich in männlichen Pflanzen erscheint (Abbildung 13B). Das Primerpaar HK50u/r amplifiziert eine einzige Bande. Diese tritt sowohl in männlichen als auch in weiblichen Pflanzen gleichermaßen auf.

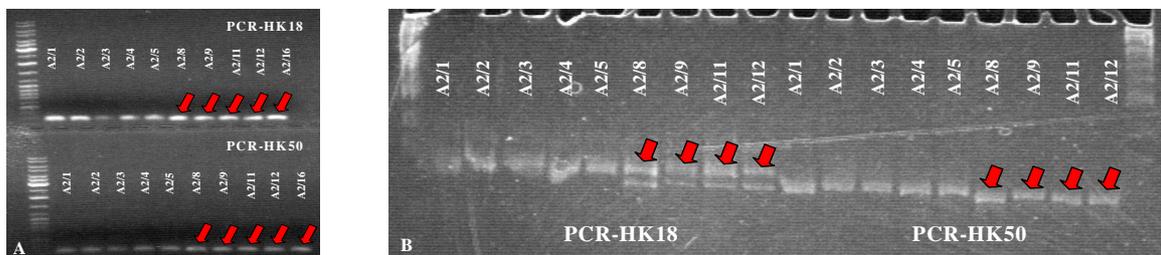


Abbildung 13: Überprüfung der SCAR-Primer an männlichen und weiblichen Einzelpflanzen

Aufgetragen wurden die PCR-Produkte von je 5 weiblichen und 5 (A) bzw. 4 (B) männlichen Pflanzen von A2 (A - auf einem Agarosegel und B - auf einem nichtdenaturierendem PAA-Gel). Männliche Pflanzen wurden mit Pfeilen markiert. In der ersten Spur (A) bzw. in der ersten und letzten Spur (B) befindet sich Größenmarker (MBI Fermentas, St. Leon Roth).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung wurden das Primerpaar HK18u/r an 80 F₁-Einzelpflanzen (außer A2/71) der Kartierungspopulation getestet (in Abbildung 14 sind die Ergebnisse von A2/1 - A2/35 beispielhaft dargestellt). Dabei bestätigte es sich, dass die kleinere der beiden Banden ausschließlich in allen männlichen Pflanzen erscheint. Sie ist somit spezifisch für das männliche Geschlecht. Die größere der beiden Banden wird in beiden Geschlechtern gleichermaßen amplifiziert. Sie wurde in allen 80 untersuchten Pflanzen nachgewiesen.

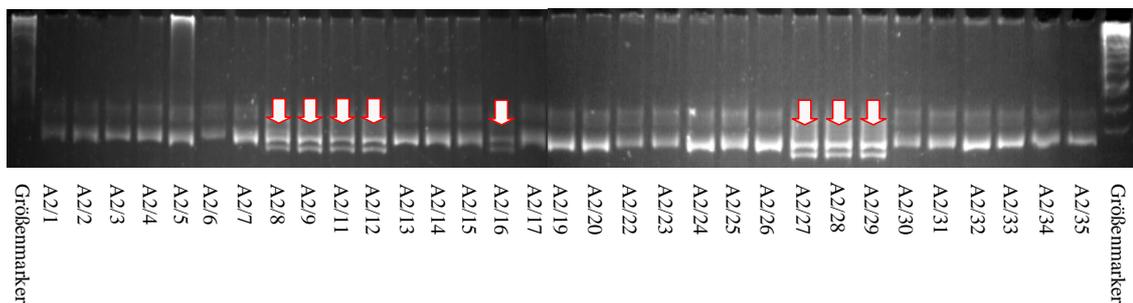


Abbildung 14: Amplifikation männlich spezifischer Fragmente mit den SCAR-Primerpaar HK18u und HK18r

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem nichtdenaturierenden PAA-Gel (6% PAA, 0,5x TBE, 4°C, 80V ü/N). Aufgetragen wurden die PCR-Produkte von 32 F₁-Einzelpflanzen von A2, amplifiziert mit dem Primerpaar HK18u/r. Alle männlichen Pflanzen sind durch Pfeile markiert.

Weiterhin wurde das Primerpaar HK18u/r an den 30 Gewächshauspflanzen der diözischen Abstammung CAN17 (A7) getestet. Auch hier wurde eine Bande detektiert, welche ausschließlich in männlichen Pflanzen erscheint.

Das Primerpaar HK50u/r wurde ebenfalls an den 80 F₁-Einzelpflanzen der Kartierungspopulation getestet. Mit diesen Primern wurde eine einzige Bande amplifiziert, welche in beiden Geschlechtern gleichermaßen auftritt.

Um Sequenzunterschiede im Bereich der Schnittstellen von *Hind*III und *Mse*I ausschließen zu können, wurden je 50ng DNA von männlichen und weiblichen Hanfpflanzen mit beiden Enzymen geschnitten und anschließend mit dem Primerpaar HK50u/r amplifiziert. Auch hier

wurde eine einzelne Bande detektiert, die gleichermaßen in Männchen und Weibchen auftritt. Zur Detektion von eventuellen Sequenzunterschieden zwischen den Banden von männlichen und weiblichen Hanfpflanzen wurden je 4µl des Amplifikationsproduktes der PCR mit den Primern HK50u/HK50r der weiblichen Pflanze A2/7 sowie der männlichen Pflanze A2/8 in den Vektor pCR[®] 2.1- TOPO[®] kloniert und anschließend in die dazugehörigen One Shot[™] Zellen transformiert. Je 20 positive Klone wurden selektiert (Klon 1...19 - A2/8m, Klon 20...39 - A2/7w) und dauerkultiviert. Von den Klonen 13,14, 20 und 22 wurde Plasmid-DNA isoliert. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung dieser Klone mit den Standardprimern M13 F und M13 R.

Die Sequenzdaten wurden verglichen und die Konsensussequenzen von A2/7 weiblich und A2/8 männlich gegenübergestellt. Anhand der Sequenzunterschiede wurden spezifische Primerpaare für das männliche Fragment (HK50mu/mr) und das weibliche Fragment (HK50wu/wr) erstellt (Abbildung 15).

Für die Überprüfung der gesamten Schnittstelle und angrenzender Bereiche wurde das Primerpaar (HK50ku/kr) unter Verwendung der Sequenz von HK50 erstellt, welche die kompletten Erkennungssequenzen beider Enzyme enthält. In Abbildung 15 ist lediglich der Primer HK50ku eingezeichnet. Der Primer HK50kr liegt außerhalb der hier dargestellten Sequenz.

Im Anschluss an den Vergleich der Sequenzen und die Erstellung neuer spezifischer Primer wurden diese an den im Gewächshaus bonitierten männlichen und weiblichen Einzelpflanzen der Kartierungspopulation (A2) sowie der diözischen Abstammung CAN17 (A7) getestet. In diesem Test wurden alle Primer in unterschiedlichen Amplifikationsprotokollen verwendet. Für das Primerpaar HK50mu/mr erwies sich eine Hot start-Touch down-PCR (Startannealingtemperatur von 63°C) als erfolgreich. Unter diesen Bedingungen amplifizierte das Primerpaar HK50mu/mr innerhalb der 80 F₁-Pflanzen der Kartierungspopulation eine einzige Bande in der entsprechenden Größe. Diese Bande wurde ausschließlich an männlichen Pflanzen nachgewiesen (Abbildung 16).

Diese Bande konnte bei keiner der weiblichen Pflanzen detektiert werden. In den männlichen Pflanzen fehlte das Fragment lediglich in den beiden Pflanzen A2/37 und A2/38 (Abbildung 16, weiße Pfeile). In einer 2. PCR konnte die Bande auch an diesen beiden Pflanzen nach-

- Ergebnisse -

gewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

```
HK50wr          GATCTAC....ACTTCCCGACG.....T--->
HK50mr          AT....TTGCACTTC.....TTCCA--->
HK50r          CTCAAGTTTTATCCCAAT----->
A2/8 männlich  CTCAAGTTTTATCCCAATGAATTGGAGAT....TTGCACTTC.....TTCCATA
A2/7 weiblich  CTCAAGTTTTATCCCAATGAATTGGAGATCTAC....ACTTCCCGACG.....TA
.
.
.
<---CG.GAGCGT.CCTCTGAAA          HK50wu
<---CGAGCGTTC.TCTGA..CG          HK50mu
<---GTTTTAAAACCTCCATTC..GAA      HK50ku
<---TTTTAAAACCTCCATTC..GA        HK50u
TTTGGTACCCATG.GCTCGCAAG.AGACT..GCCAAAATTTGAGGTAAG..CT  A2/8 männlich
TTTGGTACCCATGC.CTCGCA.GGAGACTTTGCCAAAATTTGAGGTAAG..CT  A2/7 weiblich
```

Abbildung 15: Erstellung neuer fragmentspezifischer Primer

Abgebildet ist ein Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der Pflanzen A2/8 und A2/7. Bereiche mit Sequenzunterschieden sind durch Punkte gekennzeichnet. Anhand solcher Unterschiede wurden neue Primer HK50mu/mr (blau, männliches Fragment), HK50wu/wr (rot, weibliches Fragment) und HK50ku (grün, komplettes Fragment) erstellt. Die Sequenzen der Primer HK50u/r sind fett gedruckt.

- Ergebnisse -

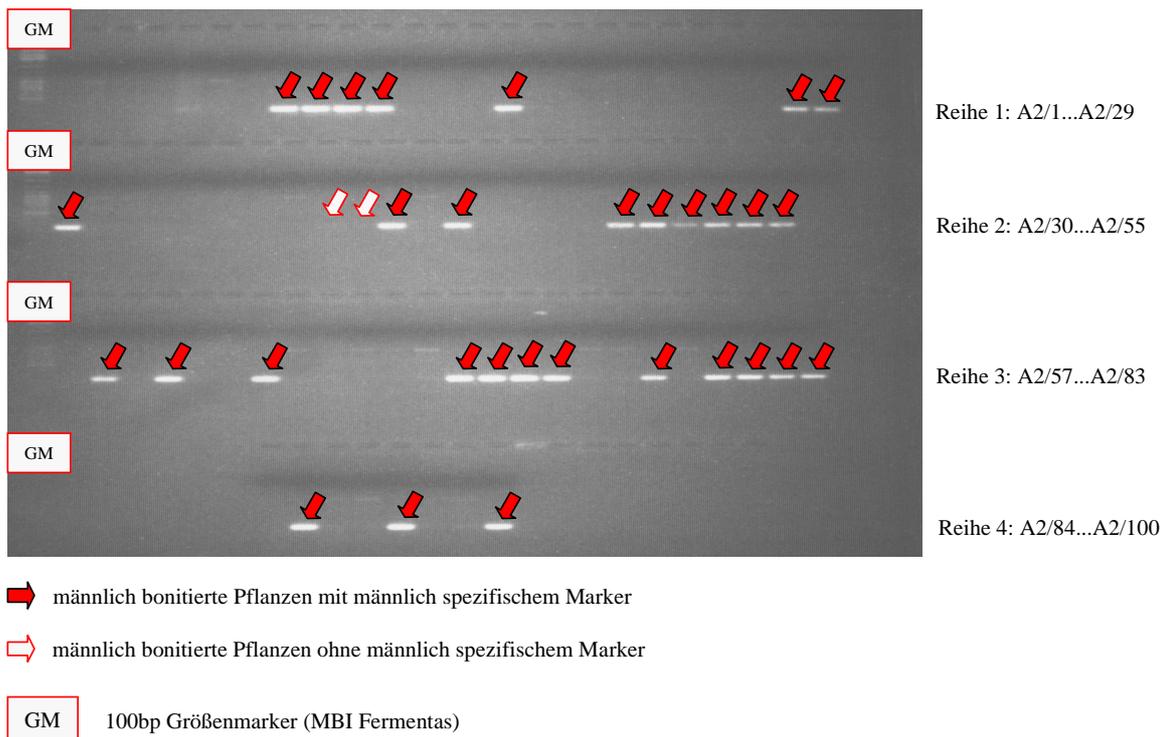


Abbildung 16: Primerpaar HK50mu/mr getestet an der Kartierungspopulation

Die PCR-Produkte der 80 Einzelpflanzen von A2 amplifiziert, mit dem Primerpaar HK50mu/mr, wurden auf ein Agarosegel (1% Agarose, 2,5h bei 80V) aufgetragen. Alle männlichen Pflanzen sind durch Pfeile markiert.

Weiterhin wurde das Primerpaar HK50mu/mr an den 30 Einzelpflanzen von A7 getestet. Der Test erfolgte ebenfalls mittels Hot start-Touch down-PCR. Zur Erhöhung der Spezifität wurde mit unterschiedlichen Startannealingtemperaturen gearbeitet. An diesen Pflanzen konnte ebenfalls eine Bande in der erwarteten Größe detektiert werden. Sie erscheint in männlichen und weiblichen Pflanzen gleichermaßen. Zwar scheint sie in Männchen etwas stärker zu sein, jedoch erscheint sie nicht in allen Pflanzen (siehe Pflanze A7/6, Abbildung 17). Gleichzeitig tragen einige weibliche Pflanzen, wenn auch deutlich schwächer, das Fragment. Zusätzlich tritt bei einigen weiblichen Pflanzen eine zusätzliche Bande im Bereich zwischen 1.000 bp und 1.100 bp auf. Damit konnte das Fragment in der Abstammung A7 nicht eindeutig als männlich spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 17).

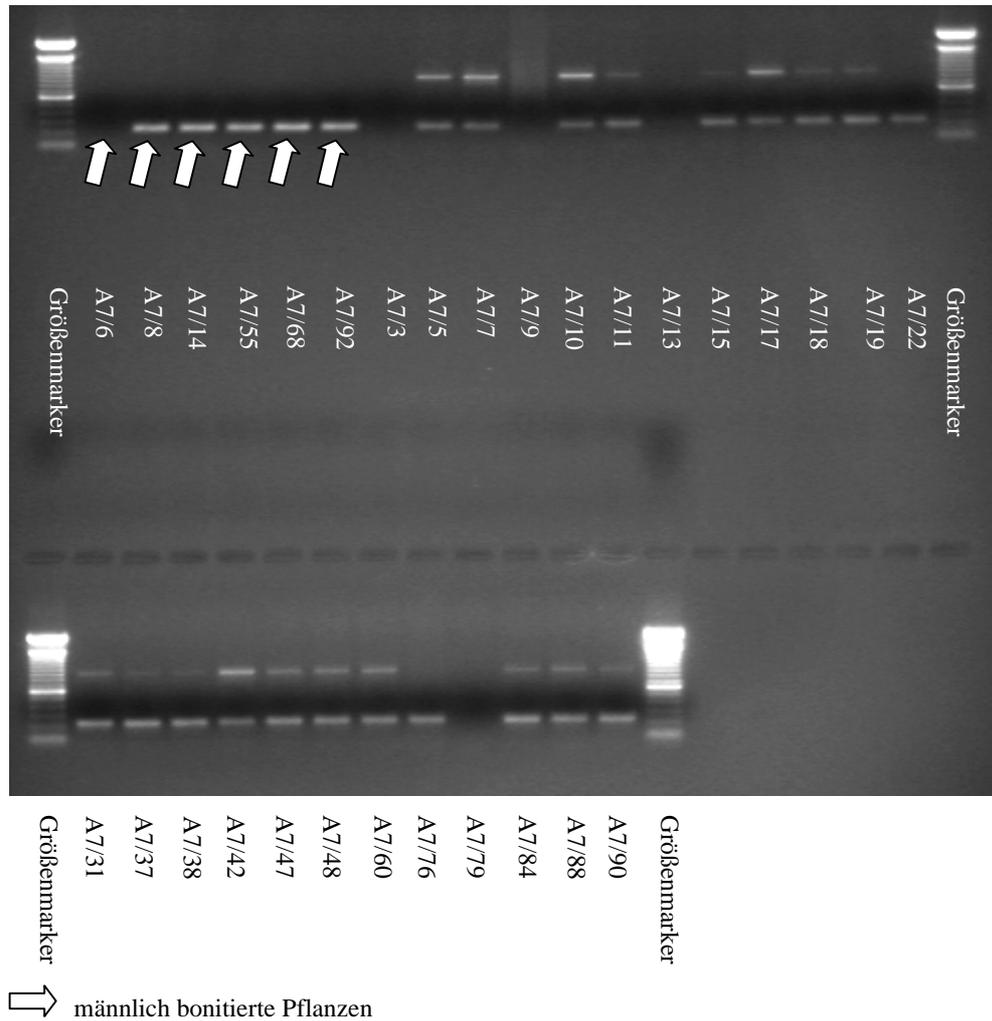


Abbildung 17: Primerpaar HK50mu/mr getestet an den 30 Einzelpflanzen von A7

Die PCR-Produkte der 30 Gewächshauspflanzen von A7, amplifiziert mit dem Primerpaar HK50mu/mr, wurden auf einem 1% Agarosegel (2,5h bei 80V) aufgetrennt. In die linke und rechte Spur wurde 100 bp-Größenmarker (Life Technologies, Karlsruhe) aufgetragen. Alle männlichen Pflanzen sind durch Pfeile markiert.

Bei der Analyse von 80 bzw. 30 Gewächshauspflanzen von A2 bzw. A7 mit dem Primerpaar HK50wu/wr stellte sich heraus, dass diese Primer eine einheitliche Bande in Männchen und Weibchen amplifizieren. Es konnten keine Unterschiede innerhalb der untersuchten Pflanzen detektiert werden.

Bei der Überprüfung des Primerpaares HK50ku/kr an je drei männlichen und drei weiblichen Einzelpflanzen von A2 auf einem hochprozentigen Agarosegel wurden zwei Banden unterschiedlicher Größe festgestellt (Abbildung 18).

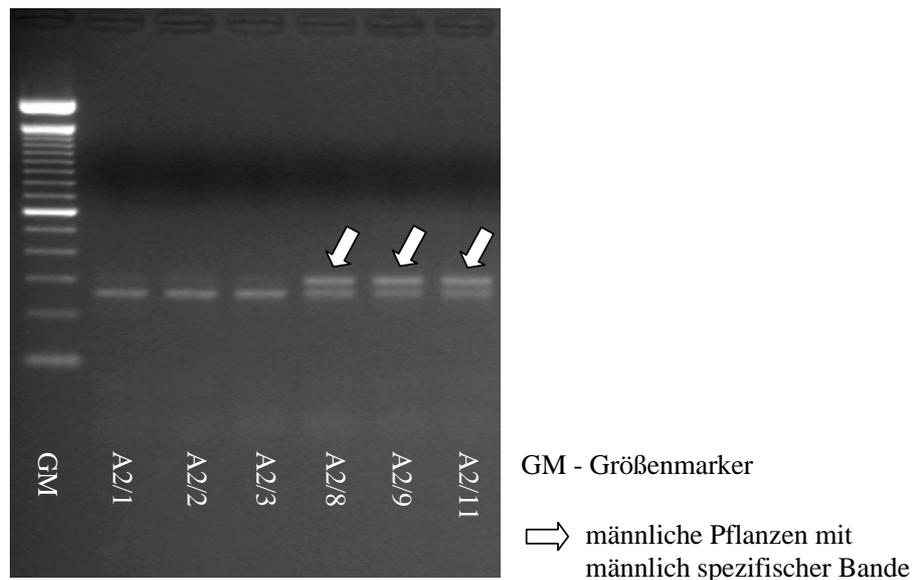


Abbildung 18: Überprüfung der Primer HK50ku und HK50kr

Abbildung 18 zeigt drei weibliche und drei männliche Hanfpflanzen von A2, getestet mit dem SCAR-Primerpaar HK50ku/kr bei einer Annealingtemperatur von 55°C. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel (2% Agarose, 3h bei 80V) elektrophoretisch aufgetrennt. In der linken Spur wurde der 100 bp-Größenmarker (Life Technologies, Karlsruhe) aufgetragen. Die männlichen Pflanzen sind durch Pfeile markiert.

Die kleinere der beiden Banden (ca. 250 bp) ist sowohl in Weibchen als auch in Männchen vorhanden. Die größere Bande (ca. 300 bp bis 320 bp) scheint in männlichen Pflanzen deutlich stärker ausgeprägt zu sein. Auf Grund dieser Tatsache wurden diese Primer an allen

- Ergebnisse -

Gewächshauspflanzen von A2 und A7 mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen getestet. Dabei bestätigte sich die Vermutung, dass die größere der beiden Banden ausschließlich in männlichen Pflanzen erscheint. Dies gilt sowohl für die Pflanzen von A2 (Abbildung 19) als auch für die von A7 (Abbildung 20). Es konnte keine Abweichung zum bonitierten Geschlecht gefunden werden.

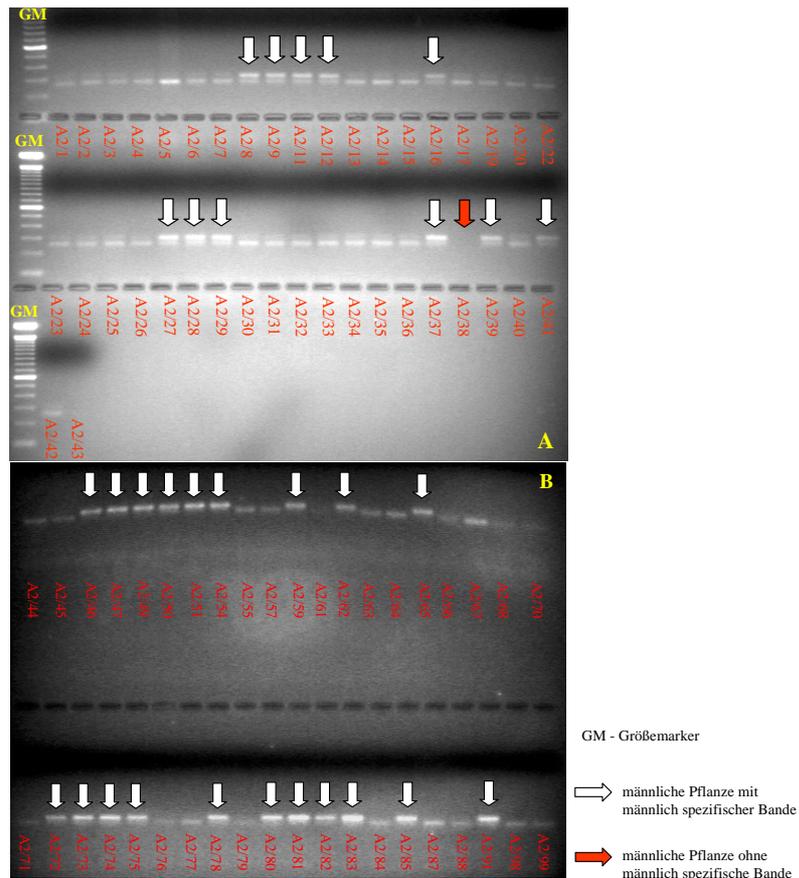
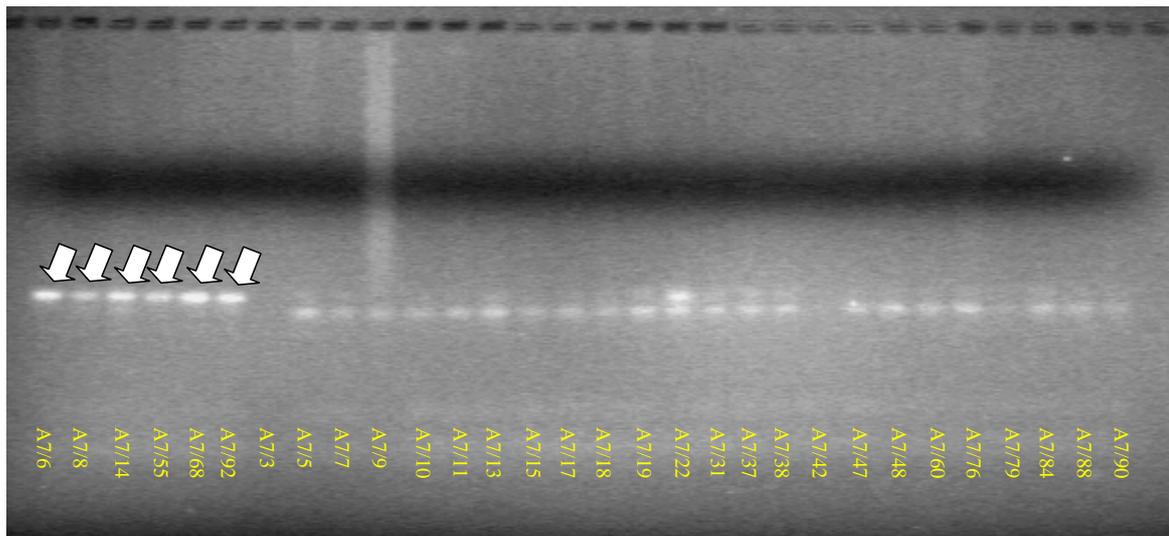


Abbildung 19: Überprüfung der Einzelpflanzen von A2 mit HK50ku/kr

Dargestellt sind die PCR-Produkte von 80 Gewächshauspflanzen von A2 (außer A2/100) amplifiziert mit dem SCAR-Primerpaar HK50ku/kr. Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 57°C durchgeführt und auf einem Agarosegel (2% Agarose, 4h bei 60V) aufgetrennt. In die beiden linken Spuren (A) wurde der 100 bp-Größenmarker (Life Technologies, Karlsruhe) aufgetragen. Bei der Pflanze A2/38 (roter Pfeil) wurde die PCR wiederholt und das Fragment nachgewiesen (Ergebnisse nicht dargestellt).

- Ergebnisse -



→ männliche Pflanzen

Abbildung 20: Überprüfung der Gewächshauspflanzen von A7 mit HK50ku/kr
Aufgetragen wurden die PCR-Produkte der 30 Pflanzen von A7. Alle männlichen Pflanzen sind durch weiße Pfeile markiert.

4.3. Mikrosatelliten

Zunächst wurden 2 der 4 von **Brady et al. (1996)** entwickelten Hopfenmikrosatelliten (H11A59; H7A82) an Hanf getestet. Beide Marker wurden an je 10 Einzelpflanzen (5 männlichen und 5 weiblichen) der Population A2 mit unterschiedlichen PCR-Temperaturregimes getestet. In keinem dieser Versuche konnte ein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Um hanfspezifische Mikrosatelliten entwickeln zu können wurde eine genomische DNA-Bank der Pflanze 'Kompolti 5' angelegt (Abbildung 21).

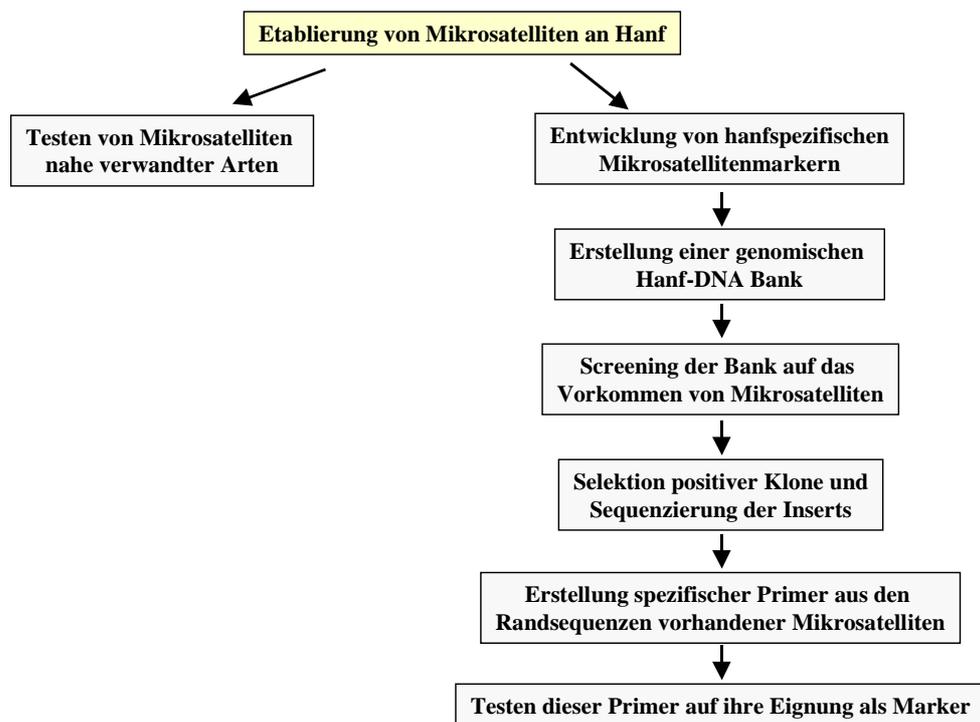


Abbildung 21: Etablierung von Mikrosatellitenmarkern an Hanf

Abbildung 21 zeigt schematisch die Vorgehensweise bei der Etablierung von SSR-Markern.

Für die Erstellung dieser DNA-Bank wurde Gesamt-DNA der männlichen Hanfpflanze 'Kompolti 5' mit dem Enzym *AluI* restringiert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt. Aus dem DNA-Schmier wurde ein Bereich von 500 bp-10 kb mittels Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Im Anschluss erfolgte die Ligation des Eluats in den Vektor pBluescript SK⁻ (Stratagene GmbH, Hilden). Nach Transformation des Vektors in Bakterien des Laborstammes *E. coli* Dh10B wurden die Zellen ausplattiert und mittels blau/weiß-Selektion gescreent. Auf diese Art und Weise konnten insgesamt 15.460 positive (weiße) Kolonien gepickt werden. Diese wurden als Dauerkulturen bei -80°C gelagert.

Für das Screening der genomischen Bank wurden die im Anhang in Tabelle A2 aufgeführten Mikrosatellitenmotive verwendet. Diese wurden mit DIG markiert und die Markierungseffizienz mittels Dot Blot überprüft. Die maximale Nachweisgrenze lag dabei zwischen 10fmol und 2fmol.

Einen ersten Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Mikrosatelliten im Hanfgenom lieferte die Hybridisierung eines Southern Blot-Filters mit dem Mikrosatellitenmotiv AC 15. Für die Erstellung des Southern Blots waren je 10µg Gesamt-DNA der beiden Pflanzen NL3 ('Northern Light') und WW7 ('White Widow') mit folgenden Enzymen restringiert worden: *AluI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* und *RsaI*. Die fragmentierte DNA wurde elektrophoretisch getrennt und auf eine Hybond-N⁺ Membran (Boehringer, Mannheim) geblottet. Bei der Auswertung der Hybridisierung konnten mehrere, wenn gleich nur schwach sichtbare, Banden unterschiedlicher Größe detektiert werden.

Im Anschluss an diese Southern Blot-Analyse erfolgte das Screening der Bank. Dazu wurden die Bakterienfiltern mit Mikrosatellitenmotiven hybridisiert. In diesem 1. Screening wurden 7.680 Bakteriekclone analysiert. Dabei konnten insgesamt 19 positive Klone selektiert werden. Ein Beispiel dieser Untersuchungen ist in Abbildung 22 dargestellt.

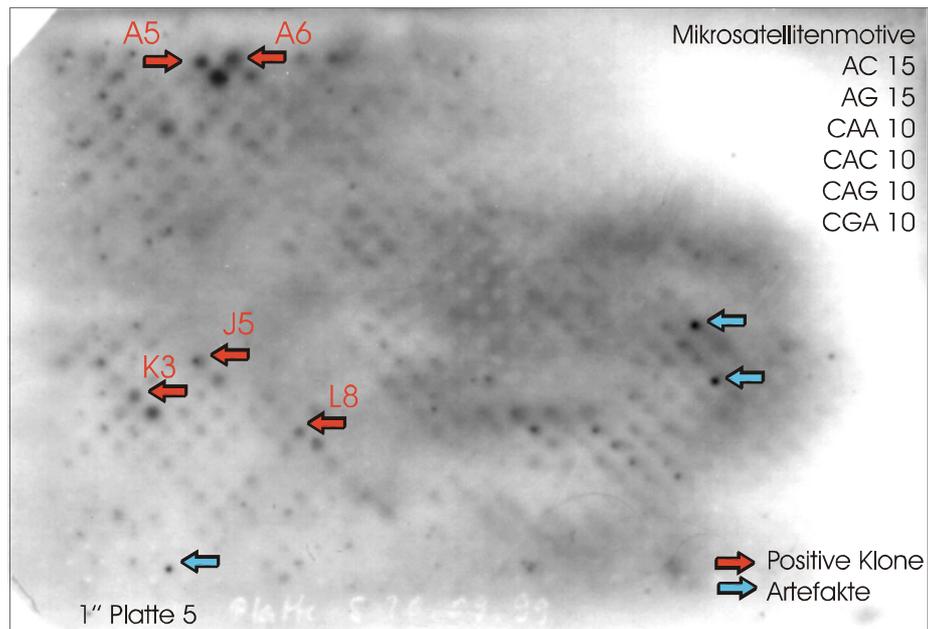


Abbildung 22: Screening der Bank mit DIG-markierten Mikrosatellitenmotiven

Abbildung 22 zeigt eine Membran, auf der sich 384 Bakterienkolonien, in diagonaler Anordnung wiederholt, befinden. Die für die Hybridisierung verwendeten Mikrosatellitenmotive sind in der Abbildung angegeben. Die roten Pfeile markieren positive Klone (zwei Signale in diagonaler Anordnung). Blaue Pfeile weisen auf Artefakte hin (nur ein Signal, Kontrolle diagonal rechts darunter fehlt).

Alle positiven Klone des ersten Screenings wurden anschließend in einer Southern Blot-Analyse überprüft. Dazu wurde die Plasmid-DNA dieser Bakterienkolonien isoliert, die Inserts mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten, Inserts und Plasmid-DNA mittels Elektrophorese getrennt und auf eine Membran transferiert. Diese Membran wurde im Anschluss mit den gleichen Motiven der Dot Blot-Analyse hybridisiert.

Dabei zeigte es sich, dass die Ergebnisse des ersten Screenings nicht reproduziert werden konnten. Keiner der positiven Klone der Dot Blot-Hybridisierung zeigte ein Signal. Trotzdem wurden 8 Klone mit besonders starken Signalen (im 1. Screening) ausgewählt und sequen-

ziert. Bei der Auswertung dieser Sequenzen mußte festgestellt werden, dass keine Motivwiederholungen bestätigt werden konnten.

4.4. Erstellung der genetischen Karte

Für die Erstellung der genetischen Karte wurden 22 AFLP-Primerkombinationen sowie die männlich-spezifischen SCAR-Marker SCAR08 (Mandolino et al., 1999), HK18 und HK50m an allen 80 F₁-Einzelpflanzen der Kartierungspopulation CAN18/1 ♀ x CAN18/2 ♂ getestet. Mit diesen 22 AFLP-Primerkombinationen wurden insgesamt 1523 Banden amplifiziert. Das entspricht einem Durchschnitt von 69 Banden pro Primerpaar. Alle Banden wurden hinsichtlich auftretender Polymorphismen analysiert. Dabei waren von den 1.523 Banden 202 (13%) polymorph (Tabelle A5 im Anhang). Abbildung 23 zeigt noch einmal alle möglichen Ausgangssituationen eines Markers bei den Eltern. Weiterhin gibt diese Abbildung Auskunft über die zu erwartende Aufspaltung eines Markers in der Nachkommenschaft. So wird unter anderem deutlich, dass es zwei Möglichkeiten der Aufspaltung (1:1 bzw. 3:1) von dominanten Markern in der Nachkommenschaft gibt.

Aus diesem Grund wurden alle polymorphen Banden in einer Spaltungsanalyse auf 1:1 bzw. 3:1 getestet. Für die Marker AGA_ATA348 und AGA_GAA379 war keine eindeutige Zuordnung möglich. Da das Kartierungsprogramm Joinmap 1.3 (Stam, 1993) jedoch eine eindeutige Zuordnung jedes Markers zum F₂- bzw. Rückkreuzungstyp erfordert, gehen diese Marker doppelt in die Kartierung ein. Sie wurden einmal als 1:1 und ein zweites Mal als 3:1 spaltende Marker behandelt. Anschließend erfolgte die Kartierung aller Marker mit einem kritischen LOD-Wert von 4.0.

- Ergebnisse -

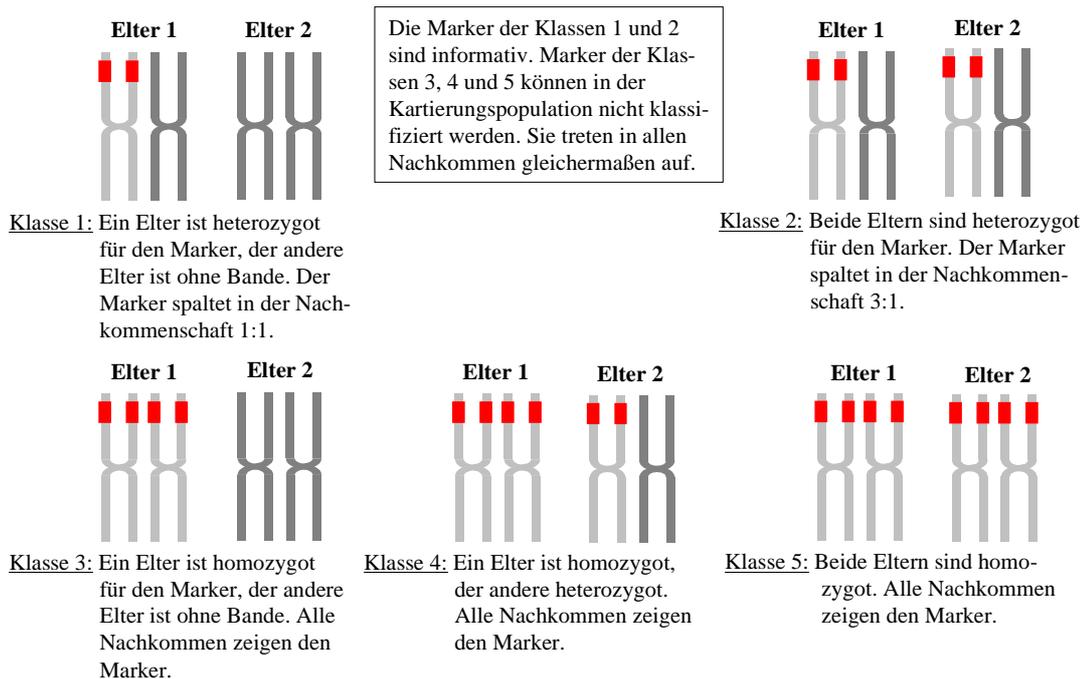


Abbildung 23: Ausgangssituationen und Spaltungsverhalten dominanter Marker

Abbildung 23 zeigt fünf verschiedene Ausgangssituationen für Marker bei den Eltern. Lediglich Marker der Klassen 1 und 2 geben in der darauffolgenden Generation eine Information über ihre Herkunft. Marker der Klassen 3, 4 und 5 treten in allen Nachkommen der Folgegeneration auf und sind somit nicht informativ.

Bei dieser ersten Kartierung konnten 193 AFLP-Marker, das Geschlecht sowie die drei männlich-spezifischen SCAR-Marker insgesamt 12 Kopplungsgruppen zugeordnet werden. Die Marker ACT_ACC300, ACT_ACC298, AGA_AAA127, AGA_AAA133, ACC_AGA285, AGA_AGA124, AGA_AGA125, AGA_AGA144, AGA_AGA398, AGA_AGA522 und AGA_AGT128 zeigen weder Kopplung zu einer der Gruppen noch untereinander. Die beiden Marker AGA_AGA155 und AGA_ATG167 sind miteinander gekoppelt, zeigen aber keine Kopplung zu einer der 12 Gruppen.

66 Marker (62 AFLP-Marker, 3 SCAR-Marker und das Geschlecht) wurden der Kopplungsgruppe 1 zugeordnet. Diese Marker sind mit dem Geschlecht gekoppelt.

Für die geschlechtsgekoppelten Marker lassen sich auf Grund der Segregation in den männ-

lichen bzw. weiblichen Nachkommen 5 verschiedene Markerklassen (A, B, C, D und E) bilden. Grundlage dafür ist die Verteilung der Marker bei den Eltern und ihr Spaltungsverhalten in den männlichen und weiblichen F₁-Pflanzen (Tabelle 5).

Es gibt Marker, die nur bei männlichen Pflanzen auftreten, also auf dem Y-Chromosom zu liegen scheinen (Klasse E). Andere Marker sind auf mindestens einem X-Chromosom, aber nicht auf dem Y-Chromosom vorhanden (Klassen A, B, C), da bei den Nachkommen Männchen ohne Fragment gefunden wurden. Für Klasse B ist keine direkte Zuordnung zu den Geschlechtschromosomen möglich, da diese Marker in den männlichen und weiblichen Nachkommen 1:1 spalten. Ihre Zugehörigkeit ergibt sich aber indirekt über Kopplung mit Markern der Gruppen A, C und D. Für Marker der Klasse D ist anzunehmen, dass sie sowohl auf einem X-Chromosom des weiblichen Elters als auch auf dem Y-Chromosom des männlichen Elters liegen, da beide Eltern und jedes Männchen bei den Nachkommen das Fragment zeigen.

Tabelle 5: Fünf mögliche Klassen für polymorphe Marker der Geschlechtschromosomen, die Genotypen der Eltern und die erwartete Spaltung in den männlichen und weiblichen Nachkommen

Eltern				F ₁ -Nachkommen								Spaltung		Markerklassen
weiblich		männlich		weiblich				männlich				weiblich	männlich	
X ₁	X ₂	X ₃	Y	X ₁	X ₃	X ₂	X ₃	X ₁	Y	X ₂	Y			
+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	1:0	1:1	A
+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	1:1	1:1	B
-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1:0	0:1	C
+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	1:1	1:0	D
-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	0:1	1:0	E

Die Spaltungsverhältnisse aller Marker wurden überprüft und die Marker den entsprechenden Klassen zugeordnet. Im Ergebnis dieser Analyse wurden 7 Marker der Klasse A, 8 Marker der Klasse B, 5 Marker der Klasse D und 50 Marker (46 AFLP-Marker, 3 SCAR-Marker und das männliche Geschlecht) der Klasse E zugeordnet. Für Klasse C konnte kein Marker gefunden werden. Die einzelnen Marker und ihre Zuordnung in die entsprechende Klasse sind in

Tabelle A6 im Anhang dargestellt. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurden die geschlechtsgekoppelten Marker an den beiden Eltern der Kartierungspopulation getestet. Mit den Ergebnissen dieser Untersuchung konnten die theoretischen Vorüberlegungen weitestgehend bestätigt werden. Eine Ausnahme hierbei ist der Marker AGA/ACA_109. Dieser Marker ist aufgrund der Segregation in den Nachkommen der Klasse D zuzuordnen. Marker dieser Klasse sind bei den Elternpflanzen sowohl auf einem mütterlichen X-Chromosom als auch auf dem väterlichen Y-Chromosom lokalisiert. Somit sind diese Marker an beiden Eltern nachweisbar. Der Marker AGA/ACA_109 konnte jedoch nur am männlichen Elter wiedergefunden werden.

Nach dieser Eingruppierung wurde eine getrennte Kartierung der geschlechtsgekoppelten Marker durchgeführt. Dabei konnten 55 Marker (50 Marker der Klasse E sowie 5 Marker der Klasse D) auf dem Y-Chromosom lokalisiert werden. Auf dem X-Chromosom liegen 21 Marker (7 Marker der Klasse A, 8 Marker der Klasse B, 5 Marker der Klasse D und das weiblich bonitierte Geschlecht).

Insgesamt umspannen die 12 Kopplungsgruppen einen Bereich von 345,2 cM (Abbildung 24). Damit beträgt der durchschnittliche Kartenabstand rund 1,7 cM. Die Gruppe mit den meisten Markern ist die Kopplungsgruppe 1 (Y-Chromosom). Auf ihr befinden sich 55 Marker, welche einen Bereich von 42,9 cM umspannen. Von diesen 55 Markern zeigen 49 keine Rekombination mit dem männlichen Geschlecht und liegen in einem Cluster. 6 Marker zeigen Rekombinationsraten im Bereich von 1 cM bis maximal 33 cM. Fünf Marker (Klasse D) sind sowohl auf dem Y-Chromosom als auch auf dem X-Chromosom lokalisiert. Die Kopplungsgruppe 2 umgrenzt mit 21 Markern einen Bereich von 31,7 cM. Auf ihr befinden sich alle Marker, die ausschließlich mit dem X-Chromosom bzw. mit dem X- und Y-Chromosom (Klasse D) gekoppelt sind. Den größten Bereich mit 52,3 cM deckt die Kopplungsgruppe 11 ab. Diese Gruppe ist auch am gleichmäßigsten mit Markern abgedeckt. Demgegenüber ist die Kopplungsgruppe 10 sehr klein. Diese Gruppe gehört wahrscheinlich zu einer der anderen Gruppen.

Im Anschluss an die Kartierung wurde untersucht, ob sich die Marker des X-Chromosoms in den Bulks wiederfinden lassen. Dabei konnten von den 20 AFLP-Markern nur 13 Marker untersucht werden, da die anderen AFLP-Kombinationen nicht in der Bulkanalyse verwendet

- Ergebnisse -

worden waren. Von diesen 13 Markern konnten in den Bulks lediglich die Marker AGA/AAG_220, AGA/ACC_142 und AGA/ATG_122 als Marker der Klasse 4 (Klasse 4 ist auf Seite 43 erklärt) bestätigt werden. Dabei entspricht der Marker AGA/AAG_220 in der Bulkanalyse dem Fragment bei 238min (siehe Tabelle A4). Die Marker AGA/ACC_142 und AGA/ATG_122 sind identisch mit den Banden bei 148min und 120min der Bulkanalyse. Bei dem Marker AGA/ACC_142 handelt es sich um einen Marker der Klasse A (siehe Tabellen 5 und A6). Die anderen beiden Marker gehören der Klasse B an. Die restlichen 10 Marker konnten nicht wiedergefunden werden. Entweder war die Bande in beiden Bulks von CAN18 gleichermaßen vorhanden, oder sie war aufgrund des Bandenmusters nicht eindeutig zu identifizieren.

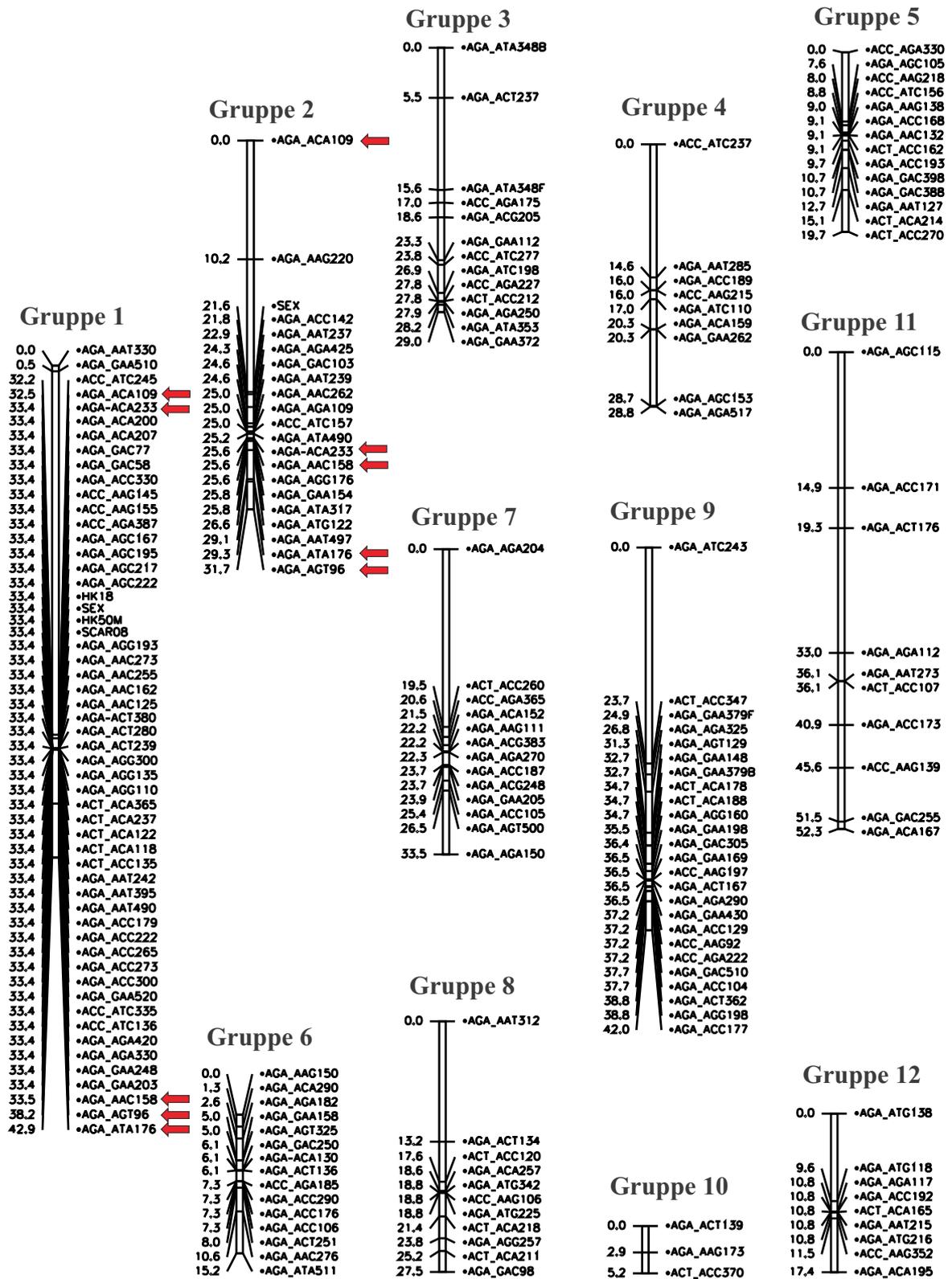


Abbildung 24: Hanfkarte

Abbildung 24 zeigt die Kartierung von 198 polymorphen Markern. Diese Marker konnten 12 Kopplungsgruppen zugeordnet werden und umspannen einen Bereich von 345,2 cM. Die meisten Marker wurden für die Gruppe 1 (männliches Geschlecht) gefunden. Die Marker der Gruppe 2 sind mit dem weiblichen Geschlecht gekoppelt. Marker der Klasse D befinden sich in Gruppe 1 und 2 und wurden durch rote Pfeile markiert.

5. Diskussion

5.1. Erstellung einer Kartierungspopulation

Seit dem Frühjahr 1996 wurden in der Institutsgärtnerei des Institutes für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Hohenthurm verschiedene monözische und diözische Hanfherkünfte angebaut und ausgewertet. Im Sommer 1998 wurde in Anlehnung an **Crescini (1940)** versucht, innerhalb und zwischen Sorten und Herkünften gezielte Kreuzungen zum Aufbau spaltender Populationen zu erstellen. Weibliche Hanfpflanzen wurden einzeln unter einer Foliehaube isoliert. Die Bestäubung dieser Pflanzen erfolgte durch männliche Infloreszenzen, die zum Zeitpunkt der Blüte mit unter die Haube gebunden wurden. Oder es wurden männliche und weibliche Hanfpflanzen gemeinsam unter einer Folienhaube zur Blüte gebracht (**Flachowsky et al., 2001**). Mit beiden Varianten war es möglich, Kreuzungssaatgut zu erzeugen. Dabei erwiesen sich die Folienhauben nicht als ideal. Unter der Folie entsteht ein feuchtwarmes Klima, wodurch ein Wachstum phytopathogener Pilze gefördert wird. Aus diesem Grund konnte lediglich bei 31 von 52 durchgeführten Testkreuzungen Saatgut geerntet werden. Lediglich von der Kreuzung CAN18/1x CAN18/2 konnte ausreichend Saatgut für eine Kartierungspopulation geerntet und im Frühjahr 1999 zur Aussaat gebracht werden.

5.2. Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung genomischer DNA

Da bei Hanf noch keine Methode zur Isolierung genomischer DNA existierte, mußte diese erst etabliert werden. Dazu wurden im Vorfeld der Arbeit die von **Shure et al. (1983)**, **Saghai-Marooif et al. (1984)**, **Taylor und Powell (1985)**, **Wagner et al. (1987)** und **Guillemaut und Maréchal-Drouard (1992)** beschriebenen Methoden getestet. Von diesen Methoden wurde die DNA-Extraktionsmethode nach **Saghai-Marooif et al. (1984)** ausgewählt. Diese Methode ermöglicht es, mit relativ geringem Arbeitsaufwand, kostengünstig DNA in ausreichender Menge und Qualität aus Hanfblättern zu isolieren.

5.3. Entwicklung geschlechtsspezifischer AFLP-Marker

Zur Entwicklung geschlechtsgekoppelter Marker wurden in den letzten Jahren sowohl bei Tieren als auch bei zahlreichen Pflanzen große Anstrengungen unternommen.

So identifizierten **Hornig und Huang (2000)** mittels RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism)-Analyse einen männlich- spezifischen Marker bei Holstein Rindern. **Kovács et al. (2001)** fanden bei Untersuchungen am Afrikanischen Katzenfisch (*Calarias gariepinus*) zwei männlich- spezifische RAPD-Marker. Diese wurden kloniert und anschließend in spezifische SCAR-Marker umgewandelt.

Bei Pflanzen sind männlich- spezifische Marker unter anderem bei *Silene latifolia* (**Zhang et al., 1998; Lebel-Hardenack et al., 2002; Nakao et al., 2002**), *Silene dioica* (**Di Stilio et al., 1998**), *Dioscorea tokoro* (**Terauchi und Kahl, 1999**), *Asparagus officinalis* (**Jiang und Sink, 1997; Reamon-Büttner et al., 1998; Reamon-Büttner und Jung, 2000**), *Carica papaya* (**Urasaki et al., 2002**), *Humulus lupulus* (**Polley et al., 1997; Patzak et al., 2002**), *Actinidia chinensis* (**Harvey et al., 1997**), *Rumex acetosa* (**Réjon et al., 1994**) und *Hippophae rhamnoides* L. (**Jeppson et al., 1999**) bekannt. Auch für das weibliche Geschlecht wurden bereits spezifische Marker beschrieben. So konnte bereits **Imai (1938)** in Folge einer Röntgenbehandlung von Hanfpollen gelb gefleckte und chlorotische Mutanten finden. In nachfolgenden Kreuzungsstudien stellte sich heraus, dass es sich bei beiden Mutationen um rezessive Gene handelt, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Molekulare weiblich- spezifische Marker wurden unter anderem von **Shirkot et al. (2002)** für Kiwi (*Actinidia delicosa* var. *delicosa*) und **Harvey et al. (1997)** für *Actinidia chinensis* beschrieben.

Auch bei Hanf wurde bereits mit der Entwicklung männlich- spezifischer molekularer Marker begonnen (**Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1999; Riedel 2000; Sakamoto et al., 2000**). Dabei erwies es sich als schwierig, Marker zu identifizieren, die vollständig an das männliche Geschlecht gekoppelt sind. Obwohl die von **Sakamoto et al. (1995)** und **Mandolino et al. (1999)** erzielten Ergebnisse an deren Pflanzenmaterial recht eindeutig waren, konnten sie an dem am Institut für Pflanzenzüchtung getesteten Material nicht bestätigt werden (**Riedel, 2000**). So war es beispielsweise nicht möglich, mit den von **Sakamoto et al. (1995)**

beschriebenen RAPD-Markern eine Banden im erwarteten Größenbereich zu amplifizieren. Der von **Mandolino et al. (1999)** beschriebene Marker SCAR08 zeigte lediglich eine Übereinstimmung mit dem Geschlecht von rund 80 Prozent. Auch die beiden von **Riedel (2000)** getesteten RAPD-Marker C11 und E11 (Roth, Karlsruhe) zeigten keine vollständige Übereinstimmung mit dem bonitierten Geschlecht. Um Marker mit vollständiger Kopplung zum männlichen Geschlecht zu suchen, wurde mit einer AFLP-Analyse begonnen.

5.3.1. Auswahl, Anzucht und Bonitur von Pflanzen für eine Markeranalyse

Für die Durchführung einer Markeranalyse zur Identifizierung geschlechtsspezifischer Marker sowie zur Erstellung einer genetischen Karte war es notwendig, geeignetes Pflanzenmaterial auszuwählen. Aus diesem Grund wurden im Sommer 1998, im Anschluss an eine Geschlechtsbonitur, je 16 männliche und 16 weibliche Pflanzen sowie 10 männliche und 8 weibliche Pflanzen der diözischen Abstammungen CAN18 und CAN17 ausgewählt. Dabei zeigte es sich, dass es im blühenden Bestand oftmals schwierig ist, die ca. 4m hohen Pflanzen eindeutig einem Geschlecht zuzuordnen (**Flachowsky et al., 2001**). Ähnliche Schwierigkeiten bei der Freilandbonitur beschreiben **Bósca und Karus (1997)** und **Riedel (2000)**. Während **Riedel (2000)** annimmt, dass aufgrund der enormen Wuchshöhe von bis zu 4m einzelne Blüten leicht übersehen werden können, begründet **Bósca und Karus (1997)** diese Fehler damit, dass im blühenden Bestand einzelne Blüten monözischer Pflanzen vom Wind ausgerissen werden. Solche monözischen Pflanzen treten spontan in diözischen Sorten und Abstammungen auf. Da es sich sowohl bei CAN17 als auch bei CAN18 um Abstammungen und nicht um reine Sorten handelt, ist das Auftreten solcher Pflanzen recht wahrscheinlich.

Um solche Fehler zu minimieren, wurden im Frühjahr 1999 81 F₁-Pflanzen der Kreuzung CAN18/1 x CAN18/2 sowie 30 Pflanzen der diözischen Herkunft CAN17 im Phytotron unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Mit dem Erreichen des Zweiblattstadiums erfolgte die Überführung in Plastiktöpfe (10 x 10cm) ins Gewächshaus (**Flachowsky et al., 2001**). Aufgrund des begrenzten Wurzelraumes in diesen Töpfen erreichten diese Pflanzen zur Blüte lediglich eine Größe von ca. 30-80 cm. Ähnliche Ergebnisse (20-40cm) erhielt **von Seng-**

busch (1952) nach einer Kastenaussaat und Anzucht von Hanfpflanzen im Gewächshaus. An diesen Pflanzen erfolgte die Bonitur des Geschlechts viermal von Beginn bis Ende der Vollblüte immer mit dem gleichen Ergebnis. Aufgrund der geringen Größe und eines gleichmäßigeren Blühverlaufs ist eine Identifizierung des Geschlechts wesentlich einfacher, schneller und zuverlässiger als im Feldbestand.

Während dieser Zeit wurde bereits mit der Entwicklung geschlechtsgekoppelter Marker an den Freilandpflanzen von CAN17 und CAN18 begonnen.

5.3.2. Bulk-Analyse

Für die Entwicklung spezifischer Marker für das Geschlecht wurde die DNA der 16 männlich bonitierten und 16 weiblich bonitierten Pflanzen von CAN18 sowie der 10 männlich bonitierten und 8 weiblich bonitierten Pflanzen von CAN17 für eine AFLP-Analyse vorbereitet und zu männlichen bzw. weiblichen Bulks zusammengestellt.

Die von **Michelmore et al. (1991)** beschriebene Methode der Bulkanalyse (Bulked Segregant Analysis) ermöglicht es, sehr schnell und effizient große Populationen mit zahlreichen Markern zu analysieren. Aus diesem Grund wurde sie in den letzten Jahren in zahlreichen Projekten an unterschiedlichsten Kulturpflanzen wie Mais (**Xu et al., 1999**), Weizen (**Bai et al., 1999**), Gerste (**Wei et al., 1999**), Reis (**Reddy et al., 2000**) und Pappeln (**Stirling et al., 2001**) angewandt.

Im Rahmen der hier durchgeführten Bulkanalyse wurden 39 AFLP-Primerkombinationen getestet. Dabei konnten im Durchschnitt 46 Banden pro Kombination amplifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten **Jakše und Javornik (2001)** bei Hopfen. **Lotti et al. (2000)** erhielten bei der Integration von AFLP-Markern in eine RFLP-Karte bei Durumweizen mit 30,1 Banden je Primerpaar deutlich weniger. Von wesentlich mehr Banden je Kombination (65,4 bzw. 110) berichten **Hartl und Seefelder (1998)** und **Sharma et al. (2000)** bei Untersuchungen zur Diversität von Hopfen bzw. Maulbeeren.

Mit diesen 39 AFLP-Kombinationen konnten insgesamt 1802 Banden amplifiziert werden. Davon waren 13,8 Prozent (6,4 Banden pro Kombination) polymorph. Das entspricht in etwa

den bei diploidem Hafer (5,7 Banden) und Tomate (6,9 Banden) erzielten Ergebnissen (**Yu und Wise, 2000; Saliba-Colombani et al., 2000**). Wesentlich mehr polymorphe Banden je Primerkombination (10,5-30,5) erhielten **Debener und Mattiesch (1999), Barcaccia et al. (1999), Wu et al. (2000)** und **Porceddu et al. (2002)** bei der Erstellung genetischer Karten an Rosen, Luzerne, Pappeln und Wiesenrispe.

Innerhalb der 39 Primerkombinationen schwankte die Anzahl polymorpher Banden zwischen 2 und 22. Diese Zahlen sind vergleichbar mit den von **Bai et al. (1999)** erzielten Ergebnissen bei Untersuchungen an Weizen zur Identifizierung von Markern, die mit Schorfresistenz gekoppelt sind.

Die Größe der amplifizierten Fragmente bewegte sich in einem Bereich zwischen 50 bp und 500 bp. Dabei lag der größte Teil zwischen 50 bp und 350 bp. Damit sind die erhaltenen Fragmentgrößen vergleichbar mit denen von Hopfen, Maulbeeren und Pappeln (**Jakše et al., 2001; Sharma et al., 2000 und Wu et al., 2000**). Größere Fragmente (700 bp bis 900 bp) wurden in den Untersuchungen von **Ren und Timko (2001)** und **Bai et al. (1999)** bei Tabak und Weizen detektiert. Jedoch waren auch hier die meisten polymorphen Banden wesentlich kleiner und beschränkten sich auf den Bereich zwischen 50 bp und 500 bp (**Bai et al., 1999**). Alle polymorphen Banden wurden ausgewertet und in 6 verschiedene Klassen eingeteilt (Abschnitt 4.2.1.). Dabei lag das Hauptaugenmerk auf Fragmenten der Klasse 1. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um solche, die vorwiegend in den männlichen Bulks der beiden Abstammungen CAN17 und CAN18 vorkommen. Für Marker dieser Klasse wurde angenommen, dass diese auf dem Y-Chromosom liegen. Ist dies der Fall, so dürften diese Marker ausschließlich bei Männchen auftreten.

Anders ist es bei den Markern der Klasse 2. Diese treten vorwiegend in den weiblichen Bulks auf. Wenn diese Marker auf dem X-Chromosom liegen, so ergeben sich in einer Nachkommenschaft in Abhängigkeit von der Ausgangssituation der Eltern folgende Möglichkeiten. Für einen solchen Marker existieren zwei unterschiedliche Zustandsformen A (Bande vorhanden) und a (Bande nicht vorhanden). Damit können männliche Pflanzen vom Typ Ya (ohne Bande) sowie YA (mit Bande) sein. Weibliche Pflanzen können heterozygot vom Typ Aa (mit Bande) sowie homozygot vom Typ AA (mit Bande) bzw. aa (ohne Bande) sein. Paart man homozygote Weibchen vom Typ aa mit Männchen vom Typ YA, so tragen alle weiblichen Nach-

kommen den Marker. An den männlichen Nachkommen, dürfte der Marker nicht zu finden sein. Kreuzt man das gleiche Männchen (YA) mit einem heterozygoten Weibchen (Aa), so tragen auch hier alle weiblichen Nachkommen den Marker. Bei den resultierenden Männchen spaltet der Marker 1:1. Anders ist es bei einer Kreuzung von einem heterozygoten Weibchen (Aa) mit Männchen vom Typ Ya. Hier spaltet der Marker sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Nachkommen 1:1.

Damit wird deutlich, dass die Marker der Klasse 2 nicht geeignet sind, Pflanzen eindeutig einem Geschlecht zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde sich im Folgenden in der Hauptsache auf die Marker der Klasse 1 beschränkt. Für diese Klasse konnten insgesamt 41 AFLP-Marker detektiert werden. Diese verteilen sich auf 23 Primerkombinationen. Dabei wird übersehen, dass so keine Marker der Klasse C gefunden werden.

5.3.3. Überprüfung der Marker an den Einzelpflanzen der Bulks

Im Anschluss an die Bulkanalyse wurden 8 AFLP-Primerkombinationen für eine Einzelpflanzenanalyse ausgewählt. Mit diesen AFLP-Kombinationen konnten an den Bulks von CAN17 und CAN18 insgesamt 16 Marker der Klasse 1 gefunden werden. Bei der Untersuchung der Einzelpflanzen der Bulks zeigten diese 8 Kombinationen jedoch 22 Banden, die eine enge Kopplung zum männlichen Geschlecht zeigten. Von diesen 22 Markern konnten 16 an den Einzelpflanzen von CAN18 wiedergefunden werden. Diese 16 sind mit den 16 Markern der Bulkanalyse identisch. Für CAN17 konnten lediglich 11 Marker der Bulkanalyse bestätigt werden. Darüber hinaus wurden für CAN17 sechs weitere männlich-spezifische Marker detektiert. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass es prinzipiell möglich ist, männlich-spezifische Marker in einer Bulkanalyse zu finden. Ein Teil der Marker konnte jedoch nicht an beiden Populationen bestätigt werden. Weiterhin treten an den Einzelpflanzen Banden auf, die in der Bulkanalyse nicht erfasst worden waren. Das bedeutet, dass ein Teil der Information durch die Bildung von Bulks unterdrückt wird. Um diesen Anteil der Information, die verloren geht, gering zu halten erscheint es besser, die Anzahl der Einzelindividuen je Bulk zu reduzieren.

Ähnliches fanden **Lebel-Hardenack et al. (2002)** bei Untersuchungen an zwei Populationen

von *Silene latifolia*. Für die Identifizierung männlich- spezifischer Marker wurden 56 AFLP-Primerkombinationen getestet. 21 Kombinationen brachten 48 männlich- spezifische Marker in der ersten Population. In der zweiten Population wurden 56 Marker mit 22 Kombinationen erzeugt. Lediglich 29 dieser männlich- spezifischen Banden waren in beiden Populationen identisch. Diese Marker verteilen sich auf 19 AFLP-Kombinationen.

Obwohl alle 22 Fragmente der Einzelpflanzenanalyse eine Kopplung mit dem bonitierten Geschlecht vermuten lassen, konnte kein Marker gefunden werden, der vollständig mit dem Geschlecht der im Freiland bonitierten Pflanzen übereinstimmt. Auffällig war jedoch, dass sowohl die 16 Marker von CAN18 als auch die 17 Marker von CAN17 ein einheitliches Muster an den untersuchten Pflanzen zeigten. Entweder hatte eine Pflanze alle Marker oder keinen. Von den 32 Pflanzen von CAN18 stimmen 26 mit dem bonitierten Geschlecht überein. Eine Pflanze ist vermutlich anderer Abstammung, da das AFLP-Muster von dem der übrigen Pflanzen abweicht. Die restlichen 5 Pflanzen verhalten sich genau wie das jeweils entgegengesetzte Geschlecht. Gleiches gilt auch für CAN17. Hier stimmen 14 von 18 Pflanzen mit der Bonitur überein. Die restlichen vier als Männchen bonitierten Pflanzen verhalten sich wie Weibchen. Das lässt den Schluss zu, dass es sich bei den abweichenden Pflanzen um falsch bonitierte Pflanzen handelt.

Solche Abweichungen lassen sich einerseits durch die schwierige Bonitur im blühenden Feldbestand erklären (**Bósca et al., 1997; Riedel, 2000; Flachowsky et al., 2001**). Andererseits kann es während der Vegetation in Folge von äußeren Einflüssen zur Ausbildung von Blüten des anderen Geschlechts kommen (**Mc Phee, 1925; Hoffmann, 1941; Heslop-Harrison, 1956; Mohan Ram und Jaiswal, 1972**). So bezeichnet **Köhler (1961)** beispielsweise das männliche Geschlecht als sehr labil in Hinblick auf Tageslänge und Lichtintensität. Je kürzer die Tageslänge ist, umso mehr bilden männliche Pflanzen Intersexe und weibliche Blüten aus. Diese männlichen Intersexe sind in der Regel schlecht fertil und bilden keinen oder nur sehr wenige Samen aus (**Hoffmann, 1941; von Sengbusch, 1952**). Demzufolge würden solche falsch bonitierten Pflanzen auch zum Zeitpunkt der Reife nicht auffallen. Weibliche Monözisten haben einen guten Samenertrag (**Hoffmann, 1941**) und gleichen auch im Habitus der rein weiblichen Pflanze. Die wenigen männlichen Blüten können leicht übersehen werden (**Huhnke et al., 1951**) und sind zum Zeitpunkt der Ernte bereits abgefallen.

Auffällig bei der Analyse der Einzelpflanzen war auch, dass die Anzahl der polymorphen Banden je Primerkombination im Vergleich zur Bulkanalyse höher war. Auf diese Tatsache wird unter 5.5. noch einmal näher eingegangen.

5.3.4. Überprüfung der 8 AFLP-Kombinationen an der Kartierungspopulation

Um die Gefahr einer Fehlbonitur bei der Geschlechtsbestimmung zu minimieren, wurden die 8 AFLP-Primerkombinationen sowohl an 80 F₁-Pflanzen (mit Ausnahme von A2/71) der Kartierungspopulation als auch den 30 Einzelpflanzen der diözischen Herkunft CAN17 getestet. Dabei konnten alle 22 Marker wiedergefunden werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an den Freilandpflanzen zeigten hier alle Marker eine vollständige Übereinstimmung mit dem bonitierten männlichen Geschlecht. Das zeigt zum einen, dass eine Bonitur an Topfpflanzen im Gewächshaus wesentlich zuverlässiger ist als unter Freilandbedingungen. Zum anderen stützt es die These, dass es sich bei den Abweichungen der vorangegangenen Analysen um Boniturfehler handelt.

Eine weitere Erklärung für das Vorkommen einzelner Abweichungen ist im Auftreten von Fehlern bei der Anwendung eines Markersystems zu suchen. So beruht die Detektion von Polymorphismen bei AFLP's auf mehreren Selektionsschritten. Der erste Schritt ist ein Restriktionsverdau. Ein unvollständiger Verdau der Ziel-DNA stellt eine erste Fehlerquelle dar. Weitere Fehler können sowohl bei der Ligation der Adapter als auch in den folgenden PCR-Schritten auftreten.

5.3.5. Konvertierung von AFLP-Markern in PCR-Marker

Um Fehlerquellen bei der molekulargenetischen Analyse zu minimieren bzw. zu umgehen, hat es sich in der Vergangenheit in vielen Fällen als nützlich erwiesen, RAPD- bzw. AFLP-Marker in sequenzspezifische PCR-Marker umzuwandeln. Die Konvertierung von RAPD- oder AFLP-Markern in PCR-Marker (SCAR-Marker) ermöglicht es einerseits, Marker zu

schaffen, welche mit weniger Arbeits-, Zeit- und finanziellem Aufwand zum Screening großer Populationen benutzt werden können. Andererseits erhöht sich durch die Umwandlung die Spezifität dieser Marker. Infolge dessen zeigen konvertierte sequenzspezifische Marker oft die tatsächliche Kopplung besser an den zu untersuchenden Locus an als ihre Ausgangsmarker. Um den geschlechtsbestimmenden Locus bei Hanf genau charakterisieren zu können, sollten Marker gefunden werden, die möglichst enge bzw. vollständige Kopplung zeigen. Denn je enger Marker an einen Locus gekoppelt sind, desto besser eignen sie sich zur Feinkartierung sowie zur kartengestützten Klonierung von Genen.

Beispielhaft dafür sind die Untersuchungen des *Vf*-Locus von *Malus floribunda* 821. So konvertierten **Xu et al. (2001)** 11 eng an *Vf* gekoppelte AFLP-Marker in SCAR-Marker. Diese 11 Marker sowie 5 weitere in der Literatur beschriebene Marker wurden im Anschluss zur Feinkartierung des *Vf*-Locus benutzt. **Vinatzer et al. (2001)** benutzten die zwei eng an *Vf* gekoppelten Marker M18 und AL07 zum Screening einer BAC (bacterial artificial chromosome)-Bank. Sie identifizierten ein Cluster von drei Genen *HcrVf1*, *HcrVf2* und *HcrVf3* am *Vf*-Locus. Weitere Beispiele für eine erfolgreiche Konvertierung von AFLP-Markern zur Erhöhung ihrer Spezifität beschreiben **Lu et al. (1999)**, **Schwarz et al. (1999)**, **Decousset et al. (2000)** und **Negi et al. (2000)**.

So wandelten **Decousset et al. (2000)** bei Untersuchungen an Gerste drei eng an das für frühe Blüte mitverantwortliche Gen *Ppd-H1* gekoppelte AFLP-Marker in STS-Marker um. Diese wurden im Anschluss für die Erstellung einer hochauflösenden Karte des *Ppd-H1* Locus benutzt. **Lu et al. (1999)** isolierten zwei allele DNA-Fragmente eines kodominanten AFLP-Markers für Nematodenresistenz bei Pfirsich (*Prunus persica*). Die beiden Fragmente sind annähernd gleich groß und differieren lediglich um vier Basen. Eine dieser Basen liegt im Erkennungsbereich des Restriktionsenzym *Sau3* AI. Mit Hilfe abgeleiteter STS-Primer und einem anschließenden Restriktionsverdau ist es möglich, die drei Genotypen homozygot resistent, heterozygot resistent und homozygot anfällig von einander zu unterscheiden.

Negi et al. (2000) benutzten AFLP-Marker zur Identifizierung von Markern für gelbe bzw. braune Samenfarbe bei *Brassica juncea*. Dabei zeigten drei Marker eine enge Kopplung zur braunen Samenfarbe. Durch Umwandlung dieser Marker in SCAR-Marker konnte mit SCM08 ein kodominanter SCAR-Marker entwickelt werden, der es ermöglicht, Pflanzen zu unter-

scheiden, welche die braune Samenfarbe homozygot bzw. heterozygot vererben.

Schwarz et al. (1999) wandelten einen eng an den Gerstenmehltauresistenzlocus *Mla* gekoppelten AFLP-Marker in einen STS-Marker um. Anschließend wurde dieser benutzt um, die *Mla*-Resistenz auf einem YAC (yeast artificial chromosome) zu kartieren.

Auch für die Entwicklung geschlechtsspezifischer Marker wurden bereits erste AFLP-Marker erfolgreich konvertiert. So wandelten **Reamon-Büttner und Jung (2000)** neun an das männliche Geschlecht von *Asparagus officinalis* L. gekoppelte AFLP-Marker in STS-Marker um. *Asparagus* ist wie der Hanf eine diözische Pflanze. Das männlich determinierende Chromosom wird hier mit L5 bezeichnet. Von der Praxis werden bei Spargel aufgrund der höheren Lebensdauer männliche Pflanzen gewünscht. Solche männlichen Linien entstehen aus der Kreuzung von Supermännchen (YY) mit normalen Weibchen (XX). Bislang konnten solche Supermännchen nur mit aufwendigen Kreuzungstests gefunden werden. Eine wesentlich schnellere Möglichkeit des Nachweises von Supermännchen stellen kodominante Marker dar. **Reamon-Büttner und Jung (2000)** konnten einen solchen Marker finden, der es ermöglicht YY-Pflanzen von XY- und XX-Pflanzen zu unterscheiden. Vier weitere Marker STS4150.1, STS4150.2, STS4150.3 und STS3156 zeigten vollständige Kopplung zum männlichen Geschlecht in fünf verschiedenen Populationen.

5.3.5.1. Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Banden aus einem ALF-Gel

Die Isolierung von AFLP-Markern aus getrockneten Polyacrylamidgelen unter Verwendung von radioaktiven Protokollen (**Shan et al., 1999**) bzw. nach Silberfärbung (**Gu Cho et al., 1996**) gehört heute schon zu den Standardmethoden in der Züchtungsforschung. Durch den zunehmenden Einsatz automatischer Sequenzanalyser in der Züchtungsforschung werden heute vermehrt nichtradioaktive Methoden zur Detektion von AFLP-Markern verwendet. Hier erscheint jedoch die Isolierung von Zielbanden aus AFLP-Gelen wesentlich schwieriger. Der Hauptgrund dafür ist in der Detektion der Banden zu sehen. Während bei gefärbten Gelen und radioaktiven Methoden Fragmente relativ einfach auf direktem bzw. indirektem Weg identifiziert werden können, ist das bei nichtradioaktiven Methoden nicht möglich. Hier werden

Banden nach Anregung einer Fluoreszenz mittels Laser durch eine Fotozelle detektiert. Das hat zur Folge, dass diese Banden auf dem Gel selbst nicht zu sehen sind.

Zur Überwindung dieser Schwierigkeit wurde in der Vergangenheit oftmals für die Isolierung von Markern auf eine der beiden etablierten Methoden zurückgegriffen. So gingen beispielsweise **Reamon-Büttner und Jung (2000)** für die Konvertierung der 9 geschlechtsgekoppelten AFLP-Marker von einem nicht-radioaktiven Protokoll auf ein radioaktives zurück. Eine solche Vorgehensweise ist mit einem wesentlich höheren Aufwand an Arbeit, Kosten und Zeit verbunden.

Dieses Beispiel zeigt die Notwendigkeit der Entwicklung von Methoden zur direkten Isolierung von AFLP-Markern aus Gelen nicht-radioaktiver Protokolle. Aus diesem Grund wurde am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, interessierende AFLP-Banden direkt aus einem ALF-Gel auszuschneiden.

Für die Isolierung wurden die beiden 323 bp großen männlich-spezifischen AFLP-Fragmente der Primerkombinationen *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT und *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA ausgewählt (Tabelle 3, Seite 46). Grund dafür war zum einen die für AFLP-Marker recht große Fragmentlänge. Zum anderen sind beide Fragmente gleich groß. Das ermöglicht es, beide Marker in einem Schritt zu isolieren. Der dritte Grund war die Komplexität der AFLP-Banden. Bei dem Marker *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT_323 handelt es sich um eine einzeln liegende, leicht zu isolierende Bande. Der zweite Marker *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA_323 dagegen ist eng von benachbarten Banden eingeschlossen. Dieser Marker wurde benutzt, um die Zuverlässigkeit der Isolierungsmethode zu überprüfen.

Beide Marker wurden wie beschrieben isoliert und die DNA aus den Gelstücken eluiert. Da es beim Klonieren markierter DNA-Fragmente zu Problemen aufgrund der Markierung kommen kann, wurde die DNA für die Klonierung mit den preselektiven AFLP-Primern reamplifiziert. Dadurch wird die Anzahl markierter DNA-Fragmente im Ansatz stark reduziert, wodurch sich der Erfolg einer Klonierung erhöht.

Da bei dem hier beschriebenen AFLP-Protokoll nur Banden detektiert werden, die mindestens ein Cy5-markiertes *HindIII*-Ende tragen, ist davon auszugehen, dass es sich bei den zu isolierenden Markern um Fragmente mit mindestens einem *HindIII*-Ende handeln muss. Da auf einem AFLP-Gel neben markierten Fragmenten auch viele unmarkierte Fragmente mit

zwei *MseI*-Enden parallel aufgetrennt werden, besteht die Gefahr, dass bei der Isolierung von Zielbanden sowohl markierte als auch unmarkierte Fragmente ausgeschnitten und kloniert werden. Um positive Klone mit markierten Inserts zu selektieren, wurden 6 Klone jedes Markers in einer selektiven PCR eingesetzt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte auf einem ALF-Gel aufgetrennt und analysiert. Äquivalente Selektionsschritte wurden in den Arbeiten von **Wong et al. (2001)** und **Xu et al. (2001)** für die Konvertierung von ³³P-markierten AFLP-Markern in PCR-Marker beschrieben.

Eine etwas andere Methode nutzten **Wei et al. (1999)**. Sie klonierten AFLP-Fragmente in den Vektor pGEM-T (Stratagene, Heidelberg). Anschließend wurden positive Klone in einem Screening mit den flankierenden Standardprimern SP6 und T7-1 amplifiziert. Die darauffolgende Überprüfung erfolgte allein nach der Fragmentgröße. **Cnops et al. (1996)** versuchten bereits vor dem Ausschneiden der Banden die Anzahl der Fragmente auf ein sechzehntel zu reduzieren. Sie verlängerten beide AFLP-Primer um je eine selektive Base und erhöhten somit deren Spezifität. Vorteil dieser Methode ist es, dass gewünschte Fragmente in wesentlich übersichtlicheren AFLP-Mustern vorliegen. Damit wird das Risiko der Isolierung falscher Banden stark verringert. Nachteil dieser Methode ist der erhöhte Kostenaufwand durch die Synthese von insgesamt acht neuen selektiven Primern. Des Weiteren muss ein und dasselbe Gel im Maximalfall acht mal wiederholt werden, um den gewünschten Polymorphismus wiederzufinden.

Bei den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass alle sechs Klone (5, 6, 8, 9, 10 und 18) der Kombination *HindIII*+AGA/*MseI*+ACT ein markiertes Fragment der gewünschten Größe integriert hatten. Von den 6 Klonen der Kombination *HindIII*+ACC/*MseI*+AGA (50, 53, 54, 67, 70 und 72) hatten lediglich vier Klone (50, 53, 70 und 72) ein markiertes Insert. Die Klone 54 und 67 trugen vermutlich ein Fragment der gleichen Größe mit zwei unmarkierten *MseI*-Enden. Um dies zu überprüfen, wurden neben den positiven Klonen 5, 18, 50 und 53 auch die beiden negativen Klone 54 und 67 sequenziert. Anhand der Sequenzen konnten die Ergebnisse des Screenings bestätigt werden. Sowohl die Klone 5 und 18 als auch 50 und 53 trugen Inserts mit je einem *HindIII*- und einem *MseI*-Ende. Bei den Inserts der Klone 54 und 67 handelte es sich, wie bereits vermutet, um Fragmente mit zwei *MseI*-Enden. Das zeigt, dass es sich bei dem hier beschriebenen Screening um eine effektive Methode handelt, die es in einem Schritt

und ohne zusätzliche Kosten ermöglicht, positive Klone zu selektieren.

In Folge der Sequenzierung wurde festgestellt, dass die Inserts der Klone 5 und 18 identisch sind. Bei den Inserts der Klone 50 und 53 handelt es sich um unterschiedliche Fragmente. Über die exakte Länge der beiden Fragmente kann keine Aussage getroffen werden, da beide Fragmente nur ansequenziert wurden. Die Sequenzen beider Fragmente stimmen sowohl im Bereich der flankierenden Schnittstellen (*Hind*III und *Mse*I) als auch der selektiven Basen überein. Entweder wurden bei der Isolierung der Fragmente zwei verschiedene Banden ausgeschnitten, oder es handelt sich um Fragmente, die in einer Bande lokalisiert sind. Betrachtet man die Überprüfung der isolierten Fragmentgrößen in Abbildung 9, so spricht das gegen den ersten Fall. Es scheint sich hier um zwei unterschiedliche Fragmente aus ein und der selben AFLP-Bande zu handeln. Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Rahmen anderer Untersuchungen gefunden. So sequenzierten **Meksem et al. (2001)** eine Vielzahl positiver Klone pro kloniertem AFLP-Fragment bei Untersuchungen an Sojabohnen. Dabei wurde festgestellt, dass es für eine AFLP-Bande mehrere verschiedene Fragmente gibt. Diese stimmen sowohl in ihrer Größe (1-2 bp Differenz), der Sequenz der Restriktionsschnittstellen als auch in den selektiven Basen überein. Darüber hinaus wurden sogar Sequenzenhomologien in Größenordnungen von 6 bp bis 15 bp in den flankierenden Bereichen gefunden. Die Anzahl solcher Sequenzen pro AFLP-Bande lag im Durchschnitt bei 6 und schwankte in Abhängigkeit von der Komplexität der Sequenz der Originalbande zwischen 1 und 15 (**Meksem et al., 2001**). **Reamon-Büttner und Jung (2000)** berichten ebenfalls vom Auftreten einer Reihe heterologer Sequenzen beim Klonieren von AFLP-Fragmenten.

5.3.5.2. Ableiten sequenzspezifischer Primerpaare

Im Anschluss an die Sequenzierung wurden für die Klone 18, 50 und 53 spezifische Primerpaare erstellt (HK18u/r; HK50u/r und HK53u/r). Diese wurden an je 5 männlichen und 5 weiblichen Pflanzen der Kartierungspopulation A2 getestet. Während die Primerpaare HK53u/r kein Amplifikationsprodukt lieferten, zeigten die beiden anderen Primerpaare beim Auftrennen auf einem Agarosegel eine Bande in beiden Geschlechtern. Um ein besseres

Auftrennen der PCR-Produkte zu gewährleisten, wurden die Proben der Primerpaare HK18u/r und HK50u/r auf einem nichtdenaturierenden PAA-Gel analysiert.

Solche Gele werden in der Regel bei SSCP-Analysen verwendet. Die von **Orita et al. (1989)** erstmals beschriebene Methode trennt DNA-Fragmente nicht nach ihrer Länge, sondern nach ihrer Konformation. Da sowohl RNA als auch Einzelstrang-DNA in Ermanglung eines Paarungspartners mit sich selbst paaren, kommt es in Abhängigkeit der Basenzusammensetzung zur Ausbildung unterschiedlicher Konformationen (Strukturen). Diese können im Anschluss bei geeigneten Temperaturen unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgrund unterschiedlicher Laufeigenschaften getrennt werden. Solche SSCP's wurden in der Vergangenheit unter anderem zur Erstellung genetischer Fingerprints benutzt (**Dusabenyagasani et al., 1998; Stavalone et al., 1998; Gasser et al., 1999; Magome et al., 1999 und Schneider et al., 1999**). Weiterhin beschreibt **Suzuki et al. (1991)** erstmals die Nutzung von SSCP's zum Auftrennen verschiedener Allele eines Fragments für eine anschließende Sequenzierung. Grundgedanke der Nutzung eines nichtdenaturierenden PAA-Gels in der hier vorliegenden Arbeit war, Größen- bzw. Allelunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Amplifikationsprodukten der Primerpaare HK18u/r und HK50u/r nachzuweisen.

Als Ergebnis dieser Untersuchung wurden für das Primerpaar HK18u/r zwei Banden detektiert. Eine Bande ist etwas größer und tritt in allen Pflanzen gleichermaßen auf. Die andere, etwas kleinere Bande konnte ausschließlich in Männchen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte sowohl bei den Untersuchungen der 80 Einzelpflanzen der Kartierungspopulation als auch an den 30 Pflanzen von A7 (CAN17) bestätigt werden. Damit existiert mit dem Marker HK18 ein erster PCR-Marker, der es ermöglicht, Pflanzen innerhalb der Abstammungen CAN17 und CAN18 eindeutig einem Geschlecht zuzuordnen.

Für das Primerpaar HK50u/r konnte im Rahmen der SSCP-Analyse nur eine Bande nachgewiesen werden. Diese tritt in allen Pflanzen gleichermaßen auf. Um dennoch bestehende Sequenzunterschiede zwischen den Amplifikationsprodukten männlicher und weiblicher Pflanzen zu identifizieren, wurde das Fragment der weiblichen Pflanze A2/7 sequenziert. Durch einen Vergleich dieser Sequenz mit der Ausgangssequenz der männlichen Pflanze A2/8 konnten spezifische Unterschiede festgestellt werden.

5.3.5.3. Ableiten neuer Primer anhand bestehender Sequenzunterschiede

Anhand der Sequenzunterschiede wurden sowohl für das männliche als auch für das weibliche Fragment neue fragmentspezifische Primer abgeleitet (HK50mu/mr und HK50wu/wr). Zusätzlich wurden Primer abgeleitet, welche die komplette Sequenz beider Schnittstellen (*HindIII* und *MseI*) sowie den angrenzenden Bereich einschließen (HK50ku/kr). Sowohl **Reamon-Büttner und Jung (2000)** als auch **Qu et al. (1998)** gehen davon aus, dass es für eine erfolgreiche Konvertierung von AFLP's in PCR-Marker notwendig ist, die abgeleiteten Primer über die kompletten Schnittstellen der flankierenden Restriktionsenzyme zu legen. Dagegen sprechen die Ergebnisse von **Meksem et al. (2001)**. Wenn es eine Anzahl unterschiedlicher AFLP-Fragmente gibt, die in ihrer Größe, der Sequenz der Schnittstellen, den selektiven Basen und den angrenzenden Bereichen übereinstimmen, scheint es erfolgsversprechender interne Sequenzbereiche für die Erstellung spezifischer Primer zu verwenden. Durch die Erstellung der Primerpaare HK50mu/mr, HK50wu/wr und HK50ku/kr wurden beide Strategien berücksichtigt.

Bei der Überprüfung der drei Primerpaare an den 80 Einzelpflanzen der Kartierungspopulation und den 30 Einzelpflanzen von CAN17 zeigten lediglich die Paare HK50mu/mr und HK50ku/kr geschlechtsspezifische Banden. Dabei wurde für das Primerpaar HK50mu/mr ein Hot-start Touch-down PCR-Protokoll verwendet. Die von **Don et al. (1991)** erstmals beschriebene Touch-down PCR ermöglicht durch eine hohe Startannealingtemperatur die korrekte Paarung von Primer und Template. Im Anschluss wird die Annealingtemperatur von Zyklus zu Zyklus erniedrigt. Dadurch wird die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte stark vermindert (**Sloop and Rhodes, 2000**). Weitere kritische Faktoren bei der Amplifikation schwieriger Templates sind ein unspezifisches Annealing und die Primerverlängerung vor dem ersten Denaturierungsschritt. Um dies zu umgehen, setzt man häufig den so genannten Hot-start (Heißer Start) ein (**Schuster et al., 1998; Sloop und Rhodes, 2000**). Da es bei ersten Amplifikationen mit dem Primerpaar HK50mu/mr vermehrt zur Bildung zusätzlicher unspezifischer Produkte kam, wurde ein, wie bei **Sloop und Rhodes (2000)** beschriebenes, kombiniertes Hot-start Touch-down Protokoll verwendet.

Auf diese Art und Weise wurde die Spezifität der Primer so erhöht, dass bei der Überprüfung

der 80 F₁-Einzelpflanzen der Kartierungspopulation nur ein einzelnes Fragment amplifiziert wurde. Dieses tritt ausschließlich bei männlichen Pflanzen auf (**Flachowsky, 2001**). An den Einzelpflanzen von CAN17 konnte dieses Ergebnis nicht eindeutig bestätigt werden. Hier tritt die Bande in beiden Geschlechtern gleichermaßen auf. Jedoch ist sie in männlichen Pflanzen deutlich stärker ausgeprägt. Des Weiteren wird in einigen weiblichen Pflanzen eine zusätzlich Bande amplifiziert, was ein Hinweis auf einen kodominanten Marker sein könnte. In diesem Fall würde das bedeuten, dass eine Bande des Markers männlich spezifisch ist, die andere liegt auf dem X-Chromosom. Solche Marker sind ideal zur Unterscheidung von homozygoten (YY) und heterozygoten (XY) Männchen. Das Vorkommen von Kodominanz bei AFLP-Markern ist in der Regel erst nach Konvertierung von AFLP-Markern in PCR-Marker bzw. nach Hybridisierung von AFLP-Gelen mit DNA von isolierten Banden zu finden. Ein Grund dafür ist, dass diese Banden auf dem AFLP-Gel aufgrund der Menge an Information leicht übersehen werden. Ein zweiter Grund ist darin zu sehen, dass kodominante Banden von anderen Banden überlagert werden.

Solche kodominanten AFLP-Marker sind bereits aus zahlreichen anderen Publikationen bekannt. So fanden **Wong et al. (2001)** bei Untersuchungen an Damselfliegen *Nehalennia irene* (Hagen) einen Anteil kodominanter AFLP-Marker von über 75%. Elf Marker wurden analysiert. Davon waren zwei monomorph und neun polymorph. Zwei der polymorphen Marker waren dominante Marker. Sieben Marker zeigten mehrere Allele. Die Anzahl der Allele pro Marker schwankte zwischen zwei und 10. Weitere Kartierungsstudien bestätigen das Auftreten von Kodominanz bei AFLP-Markern. So fanden beispielsweise **Maheswaran et al. (1997)** 10,6% kodominante AFLP-Marker bei der Kartierung von Reis. Ähnliche Ergebnisse (19,2% und 17%) fanden **Alonso-Blanco et al. (1998)** und **Saliba-Colombani et al. (2000)** bei *Arabidopsis* und Tomate. Andere Autoren berichten von 4-15 Prozent Kodominanz innerhalb der polymorphen Banden (**Mueller und Wolfenbarger, 1999**).

Eine andere Erklärung für das Auftreten einer solchen Bande ist die Tatsache, dass ein Großteil der AFLP-Marker in repetitiven Sequenzen lokalisiert ist (**Reamon-Büttner et al., 1999; Meksem et al., 1995**). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass abgeleitete Primer an mehrere Templates binden können. Um jedoch genauere Aussagen über die Herkunft dieser zweiten Bande treffen zu können, müssen weiterführende Analysen erfolgen.

Bei Überprüfung der kompletten Primer (HK50ku/kr) an den 80 Einzelpflanzen der Kartierungspopulation und den 30 Pflanzen von CAN17 konnte eine Bande amplifiziert werden, die in Männchen wesentlich stärker amplifiziert wird als in Weibchen. Eine zweite etwas kleinere Bande wird in CAN18 (Kartierungspopulation) bei beiden Geschlechtern gleichmäßig amplifiziert. Bei CAN17 tritt diese Bande vorwiegend in Weibchen auf. Auch hier ist es notwendig, noch weitere Untersuchungen durchzuführen, um genauere Aussagen über diesen Marker treffen zu können.

5.4. Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern

Um hanfspezifische Mikrosatelliten entwickeln zu können, wurde eine genomische Hanf-DNA Bank erstellt. Für die Erstellung solcher spezieller Banken werden in der Regel Insertgrößen zwischen 250 bp und 900 bp kloniert (**Cipriani et al., 1999; Rivera et al., 1999; Uzunova und Ecke, 1999; Rae et al., 2000**). Die Verwendung von relativ kurzen Inserts hat den Vorteil, dass diese in einem Schritt vollständig sequenziert werden können. Im Gegensatz zu Banken, die ausschließlich zur Entwicklung von Mikrosatelliten gedacht sind, sollte die in dieser Arbeit angelegte Bank auch für weiterführende Arbeiten, wie die Isolierung großer männlich-spezifischer DNA-Fragmente, geeignet sein. Deshalb wurde hier ein wesentlich größerer Fragmentgrößenbereich (0,5-10kb) gewählt. Aus diesem Grund liegt die Anzahl positiver Klone weit über dem, was aus anderen Arbeiten bekannt ist (**Dumas et al., 1998; Rivera et al., 1999**). Insgesamt umfasst die Bank rund 15.460 positive Klone. Diese Größenordnung entspricht in etwa den von **Weising et al. (1996)** erhaltenen Ergebnissen bei der Erstellung einer Bank von genomischer Gesamt-DNA.

Um erste Informationen über das Vorkommen von Mikrosatelliten in Hanf zu bekommen, wurde ein genomischer Southern Blot mit dem Di-Nukleotidmotiv AC 15 hybridisiert. Da am Institut keine Arbeiten mit Radioisotopen, wie z.B. ³²P möglich sind, wurde auf das erstmals von **Neuhaus-Url und Neuhaus (1993)** an Pflanzen beschriebene nichtradioaktive DIG-Markierungssystem ausgewichen. Obwohl die Detektion sehr schwach war, konnten mehrere Banden unterschiedlicher Größe detektiert werden. Im Anschluss daran wurden alle 15.460

Klone auf Hybond-N⁺ Filter gestempelt und rund die Hälfte mit den aus der Literatur bekannten Mikrosatellitenmotiven AG 15, CG 15, AT 15, CAA 10, CAC 10, CAG 10, CGA 10, CCG 10 und GATA 7 analysiert (**Kaemmer et al., 1995; Weising et al., 1992, 1995; Tozaki et al., 2000**).

Dabei konnten 19 positive Klone identifiziert werden. Diese wurden in einem zweiten Schritt mittels Southern Blot überprüft. Keiner dieser 19 Klone konnte bestätigt werden. Trotzdem wurden 8 Klone sequenziert. Auch anhand der Sequenzdaten konnte kein Mikrosatellitenmotiv gefunden werden. Obwohl nichtradioaktive Protokolle unter Verwendung von Digoxigenin bereits in vielfältigen Anwendungen erfolgreich verwendet wurden (**Neuhaus-Url und Neuhaus, 1993; D'Ovidio et al., 1994; Fladung und Rai Ahuja, 1995; Lahaye et al., 1996**) war eine Entwicklung von Mikrosatelliten bei Hanf nicht möglich. Da es sich in anderen Versuchen gezeigt hat, dass für einige Anwendungen radioaktive Protokolle aufgrund höherer Sensitivität Vorteile haben (**Bierwerth et al., 1992**), wurde eine Kooperation mit der italienischen Arbeitsgruppe um Dr. G. Mandolino vom "Istituto Sperimentale per le Colture Industriali" in Bologna (Italien) angestrebt. Dazu wurden erneut alle Klone auf Hybond-N⁺ Membranen gestempelt und zur Hybridisierung abgegeben. Die Ergebnisse stehen noch aus. Andere Möglichkeiten zur schnellen und effizienten Isolierung von Mikrosatelliten wären zum einen die Erstellung von Phagenbanken. **Saal und Wricke (1999)** konnten aus 1000 analysierten Plasmidklonen lediglich zwei SSR-Marker isolieren. Im Vergleich dazu gelang es ihnen, durch das Screening von zwei Phagenbanken, 74 Mikrosatelliten zu identifizieren.

Zum anderen könnte versucht werden, Banken zu erstellen, die mit Mikrosatelliten angereichert sind. Solche angereicherten Banken wurden bereits mehrfach publiziert (**Fischer und Bachmann, 1998; Cipriani et al., 1999; Scott et al., 1999; Rae et al., 2000; Tozaki et al., 2000; Jakše und Javornik, 2001**). Die Aussicht auf die erfolgreiche Isolierung von SSR's scheint dabei ungleich höher. **Jakše und Javornik (2001)** erhielten eine Anreicherung von positiven Klonen bei der Erstellung GA- und GT-reicher Banken bei Hopfen von 37 und 35 Prozent. Alle positiven Klone enthielten Mikrosatelliten. **Fischer und Bachmann (1998)** konnten ihre Bank bei *Allium cepa* L. auf über 60% positive Klone anreichern. Die besten Ergebnisse erzielten **Scott et al. (1999)**. Sie erhielten eine Anreicherung bei Banken von *Pinus elliottii* und *Araucaria cunninghamii* von 0 auf 100 Prozent bzw. 1,5 auf 98 Prozent.

5.5. Erstellung einer genetischen Karte

5.5.1. Generelle Karte

Für die Erstellung einer genetischen Karte bei CAN18 wurden 22 AFLP-Primerkombinationen an den Einzelpflanzen der Kartierungspopulation getestet. Um die Anzahl Banden und damit den Informationsgehalt pro Kombination zu erhöhen, wurde die Laufzeit des Gels von 420min (Bulkanalyse) auf 540min erhöht. Mit diesen 22 Primerpaaren konnten insgesamt 1.523 Banden amplifiziert werden. Das entspricht 69 Banden pro Kombination. Demzufolge liegt die Anzahl amplifizierter Banden um 15 Banden je Kombination höher als in der Bulkanalyse.

Von diesen 1.523 Banden waren 202 Banden informativ (polymorph). Das heißt, der Anteil polymorpher Banden lag mit 13 Prozent knapp 1 Prozent unter dem der Bulkanalyse. Vergleicht man den Anteil polymorpher Banden mit den Bulks, so erhält man je Kombination ca. eine polymorphe Bande mehr. In einem theoretischen Vergleich der beiden Varianten würde sich folgendes Bild ergeben: bei einer Laufzeit von 420min, mit einer Vorbereitungszeit von einer Stunde pro Gel, könnten maximal drei AFLP-Gele pro Tag laufen. Das entspricht einer Ausbeute von rund 19 informativen Banden. Bei einer Laufzeit von 540min wären es maximal zwei Gele pro Tag. Die Ausbeute an polymorphen Banden bei den langen Gelen liegt mit ca. 15 Banden deutlich niedriger als bei der kürzeren Laufzeit. Dabei muss noch erwähnt werden, das durch die Bildung von Bulks ein Teil an Information überdeckt wird. Damit würde der Informationsgehalt auf Seiten der kürzeren Laufzeit voraussichtlich noch ansteigen. Um bei maximaler Nutzung eine optimale Ausbeute an Information zu erhalten, wäre es wahrscheinlich besser, auf eine kürzere Laufzeit (420min) zurückzugreifen. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass die Bandendichte zwischen 100min und 350min (ca. 50-300 bp) am größten ist. Mit zunehmender Laufzeit nimmt die Anzahl an Banden ab. Weiterhin ist auffällig, das mit ansteigender Fragmentgröße immer weniger polymorphe Banden auftreten. Die meisten großen Fragmente treten gleichmäßig in allen Pflanzen auf und scheinen repetitiven Charakter zu besitzen.

Neben diesen 202 polymorphen AFLP-Markern und dem SEX-Marker (Geschlechtsbonitur) wurden die SCAR-Marker HK50M (HK50mu/mr), HK18 (HK18u/r) und SCAR08 (**Mandoli-**

no et al., 1999) in eine erste Kartierung einbezogen. In dieser ersten Kartierung konnten 198 Marker insgesamt 12 Kopplungsgruppen zugeordnet werden. 11 Marker zeigten überhaupt keine Kopplung. Zwei Marker waren miteinander gekoppelt, zeigten aber keine Kopplung zu einer der 12 Gruppen. 66 Marker zeigten eine Kopplung zum Geschlecht.

Etwas andere Ergebnisse erhielten **Mandolino und Ranalli (2002)** bei der Untersuchung einer Kreuzungsnachkommenschaft von Hanf mit RAPD-Markern. Grundlage für die Erstellung der von Mandolino und Ranalli verwendeten Kreuzung war die Untersuchung der Vererbung der Monözie. Aus diesem Grund wurde eine weibliche Pflanze der diözischen Sorte 'Carmagnola' mit einer monözischen Pflanze gekreuzt. Im Anschluss wurden beide Eltern sowie die resultierenden Nachkommen mit 674 RAPD-Primern untersucht. Bei der Kartierung der 269 polymorphen Marker wurden zwei Karten angefertigt, eine Karte für den 'Carmagnola' Elter und eine zweite Karte für die monözische Herkunft. Die Karte des 'Carmagnola' Elters umfasst 66 Marker, welche auf insgesamt 11 Kopplungsgruppen liegen. Die Karte des monözischen Elters umfasst 43 Marker auf neun Kopplungsgruppen. Bei beiden Karten ist die Anzahl der Marker noch sehr gering.

5.5.2. Kartierung der Geschlechtschromosomen

Marker, die dem Geschlecht (X- bzw. Y-Chromosom) zuzuordnen sind, können bei vollständiger Dominanz 5 Markerklassen (Tabelle 5, Seite 70) zugeordnet werden (**Flachowsky, 2001; Peil et al., 2003**). Die 66 Marker, die in der ersten Kartierung eine Kopplung zum Geschlecht zeigten, sowie vier weitere Marker wurden anhand ihrer Spaltungsverhältnisse den entsprechenden Klassen zugeordnet. Dabei konnten Marker für die Klassen A (7 Marker), B (8 Marker), D (5 Marker) und E (50 Marker) identifiziert werden. Lediglich für Klasse C war es nicht möglich, innerhalb des untersuchten Materials Marker zu finden. Nach dieser Zuordnung wurden die Marker erneut kartiert.

Diese resultierende Karte beinhaltet 198 Marker, die einen Bereich von 345,2 cM umspannen. Das entspricht in etwa den Ergebnissen von **Porceddu et al. (2002)** und **Dettoni et al. (2001)** bei der Kartierung von *Poa pratensis* und *Prunus pesica* (L.). Auch die von **Mandolino und**

Ranalli (2002) erstellte Karte des 'Carmagnola' Eltern entspricht mit rund 312 cM in etwa dieser Größe. Wesentlich größere Karten erhielten **Maliepaard et al. (1998)**, **Wu et al. (2000)**, **Saliba-Colombani et al. (2000)**, **Lin et al. (2001)** und **Lashermes et al. (2001)** bei Kartierungsarbeiten an Apfel, Pappeln, Tomate, Tabak und Kaffee. Am besten vergleichbar sind die Ergebnisse mit denen von **Lashermes et al. (2001)** bei Kaffee (*Coffea canephora*). Bei etwa gleicher Genomgröße von Kaffee (800 Mbp) und Hanf (830 Mbp) und etwa gleicher Anzahl an Chromosomen (11 bei Kaffee und 10 bei Hanf im haploiden Satz) ist die Kopplungskarte von Kaffee mit 1400 cM etwa viermal so groß. Bei Hanf entspricht 1 cM Kartenabstand in etwa einem physikalischen Abstand von 2,4 Mbp, bei Kaffee hingegen etwa 570 kbp. Vergleicht man den durchschnittlichen Abstand zwischen zwei Markern von 3,0 cM bei Hanf mit denen von Pappel (23,3 cM), Tomate (8,3 cM), Tabak (6,2 cM) und Pfirsich (4,8 cM), so liegt er niedriger (**Wu et al., 2000; Saliba-Colombani et al., 2000; Lin et al., 2001; Dettori et al., 2001**). Betrachtet man jedoch die Verteilung der Marker innerhalb der Karte, so wird deutlich, dass diese ungleichmäßig verteilt sind. Insgesamt 109 Marker liegen in Clustern vor, in denen keine Rekombination beobachtet wurde. Der Abstand zwischen zwei Markern schwankt in einem Bereich von 0 cM (keine Rekombination) und 31,7 cM. Möglichkeiten zur besseren Abdeckung des Genoms und zum Auffüllen der Bereiche mit großen Abständen wären sowohl die Nutzung größerer Kartierungspopulationen als auch die Verwendung anderer Markersysteme (**van Heusden et al., 2000**). Beispiele für die erfolgreiche Erstellung kombinierter Karten sind in den Arbeiten von **Costa et al. (2000)**, **Price et al. (2000)** und **Sebastian et al. (2000)** bei *Pinus pinaster*, *Oryza sativa* und *Brassica oleracea* gegeben.

Vergleicht man die Differenz zwischen Kopplungsgruppe 1 (Y-) und Kopplungsgruppe 2 (X-Chromosom), so beträgt diese 11,2 cM. Bei 2,4 Mbp pro 1 cM Kartenabstand entspricht diese Differenz einer physikalischen Länge von ca. 27 Mbp. Diese Zahl liegt unter der von **Sakamoto et al. (1998)** ermittelten Differenz von 47 Mbp.

Insgesamt 55 Marker wurden auf dem Y-Chromosom kartiert. Davon zeigten 49 Marker keine Rekombination mit dem männlichen Geschlecht. Zu diesen 49 Markern gehören auch die 16 männlich-spezifischen Marker von CAN18 aus der Bulkanalyse. Das zeigt, dass es möglich ist, mittels Bulkanalyse männlich-spezifische Marker zu identifizieren. Von den 21 X-

gekoppelten Markern konnten 13 Marker mit den Ergebnissen der Bulkanalyse verglichen werden. Lediglich drei Marker (AGA/AAG_220, AGA/ACC_142 und AGA/ATG_122) zeigten eine weiblich- spezifische Bande in den Bulks. Einen solchen Polymorphismus würde man hier lediglich für den Marker AGA/ACC_142 erwarten. Dieser Marker gehört zur Klasse A, das heißt, er ist in allen männlichen Nachkommen (starke Bande) und in der Hälfte der Weibchen (schwache Bande) vorhanden. Die anderen beiden Marker gehören zur Klasse B. Marker dieser Klasse spalten in beiden Geschlechtern 1:1. Weiterhin würde man weibliche Polymorphismen in den Bulks für Marker der Klasse C erwarten. Marker dieser Klasse spalten in den weiblichen Nachkommen 1:0 (starke Bande) und in den männlichen Nachkommen 0:1 (keine Bande). Für diese Klasse konnte in unseren Untersuchungen kein Marker gefunden werden. Auch für Klasse D sollte es möglich sein, Polymorphismen in den Bulks zu finden. Diese Marker spalten in den resultierenden Männchen 1:0 (starke Bande) und in den Weibchen 1:1 (schwache Bande). Für diese Marker war es ebenso nicht möglich, die entsprechenden Polymorphismen in den Bulks wiederzufinden. Hauptgrund dafür ist, dass bei den hier durchgeführten Untersuchungen keine Pflanzen einer definierten Kreuzungspopulation sondern Pflanzen aus freier Abblüte für die Bildung der Bulks benutzt wurden. An solchen Pflanzen kann die Aufspaltung weiblicher Marker nicht sicher vorhergesagt werden. Damit wird deutlich, dass die Auswahl der Pflanzen für eine Bulkanalyse von entscheidender Bedeutung für das Auffinden von weiblichen Markern ist. Die einzigen Marker, für die man keinen Polymorphismus in den Bulks erwarten würde, sind die Marker der Klasse B. Diese spalten in den Nachkommen beider Geschlechter 1:1. Jedoch können Marker dieser Klasse aufgrund der Kopplung zu den Markern der Klassen A, C und D gefunden werden.

Bei näherer Betrachtung der einzelnen Markerklassen ist Klasse D von besonderem Interesse. Während bei den Klassen A, B und C Fragmente ausschließlich auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, müssen bei der Klasse D Fragmente sowohl auf X als auch auf Y bei den zur Kreuzung verwendeten Eltern liegen (siehe Tabelle 5, Seite 70). Darüber hinaus gibt es drei Marker (AGA_AAT330, AGA_GAA510 und ACC_ATC245) mit abweichenden Spaltungsverhältnissen. Die gefundenen Frequenzen bei den männlichen und weiblichen Nachkommen lassen vermuten, dass bei den Eltern nur das Y-Chromosom ein Fragment zeigte, was durch die Analyse der Eltern insofern bestätigt wurde, als nur die männlichen Pflanze ein Fragment

zeigte. Hier gibt es Rekombination zwischen beiden Geschlechtern. Solche Rekombinationen zwischen den Geschlechtschromosomen (X und Y) wurden bereits von **Westergard (1953)** bei zytologischen Studien an *Melandrium album* gefunden. Diese Bereiche, in denen Rekombination stattfindet, verhalten sich wie die Bereiche autosomaler Gene und werden deshalb als PAR-Region (pseudoautosomal region) bezeichnet (**Westergard, 1953**). Den ersten molekularen Nachweis einer pseudoautosomalen Region pflanzlicher Geschlechtschromosomen fanden **Di Stilio et al. (1998)** bei *Silene dioica* (L.). In einer RAPD-Analyse wurden mit dem Primer OPA-09 zwei geschlechtsgebundene Banden (590 bp und 810 bp) detektiert. Während die 810 bp große Bande auf dem X-Chromosom liegt, ist die 510 bp Bande männlich spezifisch. Sie ist damit auf dem Y-Chromosom lokalisiert. Anhand von Rückkreuzungsversuchen konnten 15% rekombinante Nachkommen gefunden werden.

Ein weiteres Indiz für Rekombinationsereignisse zwischen X und Y bzw. Geschlechtschromosomen und Autosomen liefern die Arbeiten von **Matsunaga et al. (1996, 1997)**, **Kejnovský et al. (2001)** und **Guttman und Charlesworth (1998)**. Bei molekularen Untersuchungen zur Geschlechtsbestimmung von *Silene latifolia* (syn. *Melandrium album*) konnte eine Gruppe so genannter *MROS* (*male reproductive organ-specific*) Gene identifiziert werden. Diese Gene werden ausschließlich in männlich reproduktiven Organen exprimiert (**Matsunaga et al. 1996, 1997**). Während *MROS1*, *MROS2* und *MROS4* autosomal lokalisiert sind, befinden sich zwei tandemartig wiederholte Kopien von *MROS3* auf dem X-Chromosom und zusätzliche Kopien auf den Autosomen (**Kejnovský et al., 2001**). Eine weitere pseudogene Kopie von *MROS3* wurde von **Guttman und Charlesworth (1998)** für das Y-Chromosom beschrieben. **Charlesworth (2002)** sieht diese pseudogene Kopie von *MROS3* als einen Beweis dafür an, dass im Laufe der Evolution das Y-Chromosom degeneriert ist. Auch bei Tieren und Menschen sind solche Paarungsereignisse bereits gut studiert. So wiesen **Mekada et al. (2001)** die Ausbildung eines synaptonemalen Komplexes zwischen X- und Y-Chromosomen bei der Feldmaus (*Microtus kikuchii*) nach. Die Paarung beider Geschlechtschromosomen erfolgt vorwiegend im Pachytän. Sie erstreckt sich über eine Länge von 2,5- 32,9 % des X- und 5,2- 40,5 % des Y-Chromosoms. In der später folgenden Diakinese bis hin zur Metaphase I gibt es lediglich noch eine lockere End- zu- End-Paarung. **Stitou et al. (2001)** konnten bei zytologischen Studien an der Kleinen Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) Paarung zwischen X- und Y-

Chromosomen nachweisen. Diese Paarung erstreckt sich ausschließlich über heterochromatische Bereiche beider Chromosomen. In anschließenden differenziellen Färbungen (C-Banding) von Metaphase II-Zellen wurde festgestellt, dass die aufgrund der Paarung stattgefundenene Rekombination jeweils nur eine Chromatide je Geschlechtschromosom betrifft. **Marec et al. (2001)** fanden bei Untersuchungen an der Mehlmotte (*Ephesia kuehniella*) mit einem Z/W-System zur Geschlechtsausprägung neben der Paarung der Geschlechtschromosomen auch Rekombination eines Z-chromosomenspezifischen Bereichs mit Autosomen. Die Kenntnis über das Vorhandensein und die Lokalisierung pseudoautosomaler Regionen auf den menschlichen Geschlechtschromosomen sowie deren Struktur sind bereits weit fortgeschritten. So konnten beispielsweise **Kühl et al. (2001)** zwei pseudoautosomale Regionen auf dem menschlichen Y-Chromosom mittels Fluoreszenz-*In situ*-Hybridisierung (FISH) nachweisen. Weiterhin sind detaillierte Karten des Y-Chromosoms bei **Lahn und Page (1999)** und **Lahn et al. (2001)** beschrieben. Vergleicht man diese Karten mit den von **Westergard (1953)** und **Charlesworth (2002)** erstellten Karten von *Silene* so fällt auf, dass es große Übereinstimmungen sowohl in strukturellen als auch in funktionellen Bereichen gibt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bei in der Arbeit vorliegenden Ergebnissen an Hanf, so stellt sich die Frage, ob es ebensolche pseudoautosomale Regionen bei Hanf gibt. Des Weiteren wäre es interessant zu klären, ob es eine oder zwei solcher Regionen gibt und wo diese lokalisiert sind. Letztlich stellt sich die Frage, inwieweit der Aufbau der geschlechtsvererbenden Hanfchromosomen mit denen von *Silene* bzw. den menschlichen Geschlechtschromosomen übereinstimmt. Um diese Fragen beantworten zu können, sind neben weiterführenden molekularen Studien auch zytologische Arbeiten notwendig.

6. Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines effizienten Markersystems an Hanf (*Cannabis sativa* L.). Dieses Markersystem sollte im Folgenden zur Identifizierung geschlechtsspezifischer Marker und zur Erstellung einer ersten genetischen Hanfkarte benutzt werden. Hierzu wurde eine spaltende Population von 80 Pflanzen aus der Kreuzung einer männlichen und einer weiblichen Pflanze der diözischen Hanfabstammung CAN18 erstellt. Zur sicheren Geschlechtsbestimmung wurden die Pflanzen dieser Population und 30 Pflanzen der diözischen Abstammung CAN17 im Gewächshaus angezogen und bonitiert, da sich gezeigt hatte, dass eine Freilandbonitur zur Geschlechtsbestimmung schwierig ist. Darüber hinaus bildete die spaltende Nachkommenschaft die Grundlage zur Erstellung der genetischen Karte.

Es ist gelungen, die AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Methode erfolgreich an Hanf zu adaptieren. Für die Analyse geschlechtsspezifischer Marker wurde die BSA (bulked segregant analysis)-Technik benutzt. Für die Abstammung CAN17 konnten insgesamt 17 und für die Abstammung CAN18 insgesamt 16 männlich-spezifische Marker, für die die Größe bestimmt wurde, detektiert werden.

Mit 22 AFLP-Primerkombinationen konnten 202 polymorphe AFLP-Marker bestimmt werden, die mit Joinmap 1.3 für die Bildung der genetischen Karte verrechnet wurden. Von diesen 202 Markern ließen sich 193 zwölf Kopplungsgruppen zuordnen. Aus der Spaltungsanalyse der geschlechtsgekoppelten, dominanten AFLP-Marker ließen sich fünf verschiedene Markerklassen unterscheiden. Durch die Einordnung der Marker in diese Klassen konnten die geschlechtsspezifischen Fragmente dem X- bzw. Y-Chromosom zugeordnet werden. Neben Markern, die nur auf einem Geschlechtschromosom vorkommen, wurden vier AFLP-Fragmente gefunden, die sowohl auf dem X- als auch auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind.

Da die Anwendung von AFLP-Markern sehr aufwändig ist, wurde eine Methode zur Eluierung spezifischer Fragmente aus ALF-Gelen entwickelt, um sie in einfach zu handhabende SCAR (sequence characterized amplified region)-Marker zu konvertieren. So konnten zwei Y-Chromosom-spezifische AFLP-Marker erfolgreich in SCAR-Marker umgewandelt werden.

6. Summary

The objectives of this work were the development of an efficient system for marker development in hemp (*Cannabis sativa* L.), the detection of sex-linked markers and the construction of a preliminary genetic linkage map in hemp.

For that purpose a segregating progeny of 80 plants were produced from a cross between a female and a male plant of hemp accession CAN18. Plants of this population were raised in the greenhouse as well as 30 plants of accession CAN17 where the sex was surely determined. Scoring of field grown plants is not so safe regarding sex in hemp. The segregating progeny was used to establish a genetic linkage map of hemp.

An AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique was successfully adapted to hemp. Applying the bulked segregant analysis (BSA) 17 and 16 sex-linked markers for the accessions CAN17 and CAN18, respectively, were found and their size was determined.

From 22 AFLP primer combinations 202 polymorphic AFLP markers were obtained which were mapped with Joinmap 1.3. 193 out of 202 polymorphic AFLP markers were assigned to 12 linkage groups. Based on the segregation of the sex-linked dominant AFLP-markers in the male and female progenies five marker classes can be distinguished. All sex-specific markers were grouped into four of these classes and were correlated with the X- and Y- chromosome, respectively. Some markers were found on only one of the sex chromosomes but four markers could be localized on X and on Y.

Since the AFLP analysis requires a lot of laboratory effort, a method was developed to extract specific fragments from ALF-gels to convert them into SCAR (sequence characterized amplified regions) markers which are more easily to handle. Two sex-linked AFLP markers were successfully converted into SCAR markers.

7. Literaturverzeichnis

- Ali, S., C. R. Müller and J. T. Epplen, 1986: DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.* 74, 239-243.
- Alonso-Blanco, C., A. J. M. Peeters, M. Kornef, C. Lister, C. Dean, N. van den Bosch, J. Pot and M. T. R. Kuiper, 1998: Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.* 14, 259 - 271.
- Bachem, C. W. B., R. S. van der Hoeven, S. M. de Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau and R. G. F. Visser, 1996: Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753.
- Bai, G., F. L. Kolb, G. Shaner and L. L. Domier, 1999: Amplified Fragment Length Polymorphism Markers Linked to a Major Quantitative Trait Locus Controlling Scab Resistance in Wheat. *Phytopathology* 89, 343-348.
- Barcaccia, G., E. Albertini, S. Tavoletti, M. Falcinelli and F. Veronesi, 1999: AFLP fingerprinting in *Medicago* spp.: its development and application in linkage mapping. *Plant Breeding* 118, 335-340.
- Bell, C. J. and J. R. Ecker, 1994: Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19, 137-144.
- Bennett, M. D. and I. J. Leitch, 1995: Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Annales of Botany* 76, 113-176.
- Bierwerth, S., G. Kahl, F. Weigand and K. Weising, 1992: Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes: a comparison of radioactive, colorigenic and chemiluminescent detection methods. *Electrophoresis* 13, 115-122.
- Bilcescu, O., 1965: Beiträge zur Bestimmung des Fasergehaltes bei Massenuntersuchungen von Hanf bei der Züchtung auf Fasergehalt. *Z. für Pflanzenzüchtg.* 54, 206-224.
- Bócsa, I., 1958: Beiträge zur Züchtung eines ungarischen monözischen Hanfes und zur Kenntnis der Inzuchterscheinungen beim Hanf (*Cannabis sativa* L.). *Z. für Pflanzenzüchtg.* 39, 11-34.

- Bócsa, I., 1995: Die Hanfzüchtung in Ungarn; Zielsetzungen, Methoden und Ergebnisse. In: Tagungsband 1. Biorohstoff Hanf Symposium, Frankfurt/Main, 200-211.
- Bócsa, I. und M. Karus, 1997: Der Hanfanbau: Botanik, Sorten, Anbau und Ernte. 1. Auflage, C. F. Müller Verlag Heidelberg.
- Boerwinkle, E., W. J. Xiong, E. Fourest and L. Chan, 1989: Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 212-216.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davies, 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32, 314-331.
- Bracale, M., E. Caporali, M. G. Galli, C. Longo, G. Marziani-Longo, G. Rossi, A. Spada, C. Soave, A. Falavigna, F. Raffaldi, E. Maestri, F. M. Restivo and F. Tassi, 1991: Sex determination and differentiation I. *Asparagus officinalis* L.. Plant Science 80, 67-77.
- Brady, J. M., N. S. Scott and M. R. Thomas, 1996: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). Euphytica 91, 277-284.
- Bredemann, G., 1922a: Die Bestimmung des Fasergehaltes in Bastfaserpflanzen bei züchterischen Untersuchungen. Faserforschung 2, 239-259.
- Bredemann, G., 1922b: Über Faserausbeutebestimmungen bei Hanfzüchtung. Angew. Botanik 4, 223-233.
- Bredemann, G., 1924: Beiträge zur Hanfzüchtung: Auslese faserreicher Männchen zur Befruchtung durch Faserbestimmung an der lebenden Pflanze vor der Blüte. Angew. Botanik 6, 348-360.
- Bredemann, G., 1927: Beiträge zur Hanfzüchtung. III. Weitere Versuche zur Züchtung auf Fasergehalt. Z. für Pflanzenzüchtg. 12, 259-268.
- Bredemann, G., 1940: Fasergehalt und Faseausbeute beim Hanf in verschiedener Stengelhöhe. Forschungsdienst 10, 57-67.
- Bredemann, G., 1942a: Die Bestimmung des Fasergehaltes bei Massenuntersuchungen von Hanf, Flachs, Fasernesseln und anderen Bastfaserpflanzen. Faserforschung 16, 14-39.

- Bredemann, G., 1942b: Züchtung auf Fasergehalt bei Hanf (*Cannabis sativa* L.). Der Züchter 14, 201-213.
- Bredemann, G., 1952: Weitere Beobachtungen bei Züchtung des Hanfes auf Fasergehalt. Der Züchter 22, 257-269.
- Bredemann, G., K. Garber, P. Harteck and K. A. Suhr, 1947: Die Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer von Blütenpollen. Die Naturwissenschaften 9, 279-280.
- Bredemann, G., K. Garber, W. Huhnke, und R. von Sengbusch, 1961: Die Züchtung von monözischen und diözischen, faserertragsreichen Hanfsorten Fibrimon und Fibridia. Z. für Pflanzenzüch. 46, 235-245.
- Breslavetz, L., 1928: Polyploide Mitosen bei *Cannabis sativa* L.. I. Ber. dtsh. bot. Ges., 644-649.
- Breslavetz, L., 1932: Polyploide Mitosen bei *Cannabis sativa* L. II. Planta 17, 644-649.
- Bruford, M. W. and R. K. Wayne, 1993: Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr. Biol. 3, 939-943.
- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam and P. M. Gresshoff, 1991: High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9, 553-557.
- Charlesworth, D., 2002: Plant sex determination and sex chromosomes. Heredity 88, 94-101.
- Charmet, G., P. F. Bert and F. Balfourier, 2000: A computerised algorithm for selecting a subset of multiplex molecular markers and optimising linkage map construction Theor. Appl. Genet. 101, 90-94.
- Cipriani, G., G. Lot, W.-G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger and R. Testolin, 1999: AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. Theor. Appl. Genet. 99, 65-72.
- Cnops, G., B. den Boer, A. Gerats, M. Van Montagu and M. Van Lijsebettens, 1996: Chromosome landing at the *Arabidopsis* *TORNADO1* locus using an AFLP-based strategy. Mol. Gen. Genet. 253, 32-41.
- Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz, 1991: The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature 353, 31-37.

- Collevatti, R. G., R. V. Brondani and D. Grattapaglia, 1999: Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered species *Caryocar brasiliens*. *Heredity* 83, 748-756.
- Costa, P., D. Pot, C. Dubos, J. M. Frigerio, C. Pionneau, C. Bodénés, E. Bertocchi, M.-T. Cervera, D. L. Remington and C. Plomion, 2000: A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 39-48.
- Crescini, F., 1940: Formen von Hanf (*Cannabis sativa* L.). *Der Züchter* 12, 105-115.
- Debener, T. and L. Mattiesch, 1999: Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99, 891-899.
- Debruyne, D., M. Moulin, M.-C. Bigot and R. Camsonne, 1981: Identification and differentiation of resinous *cannabis* and textile *cannabis*: combined use of HPLC and high-resolution GLC. *Bulletin on Narcotics* 2, 49-58.
- Decousset, L., S. Griffiths, R. P. Dunford, N. Pratchett and D. A. Laurie, 2000: Development of STS markers closely linked to the *Ppd-H1* photoperiod response gene of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101, 1202-1206.
- Dellaporta, S. L. and A. Calderon-Urrea, 1993: Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5, 1241-1251.
- de Meijer, E. P. M., H. J. van der Kamp and F. A. van Eeuwijk, 1992: Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* 62, 187-200.
- Dettori, M. T., R. Quarta and I. Verde, 2001: A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome* 44, 783-790.
- Di Stilio, V. S., R. V. Kesseli and D. L. Mulcahy, 1998: A Pseudautosomal Random Amplified Polymorphic DNA Marker for the Sex Chromosomes of *Silene dioica*. *Genetics* 149, 2057-2062.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker and J. S. Mattick, 1991: "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nuc. Ac. Res.* 19, 4008.
- D'Ovidio, R., O. A. Tanzarella, A. Cenci, E. Iacono and E. Porceddu, 1994: RFLP analysis in wheat. Isolation and chromosomal assignment of digoxigenin-labelled clones. *J. Genet. Breed.* 48, 73-80.
- Dumas, V., S. Herder, A. Bebbia, C. Cadoux-Barnabé, C. Bellec and G. Cuny, 1998: Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum* s.l. and their use for differentiating two savannah populations: implications for epidemiological studies. *Genome* 41: 154-161.

- Dusabenyagasani, M., N. Lecours and R. C. Hamelin, 1998: Sequence-tagged sites (STS) for studies of molecular epidemiology of scleroderris canker of conifers. *Theor. Appl. Genet.* 97, 789-796.
- El-Ghany, M. E. A., 2001: Molekulargenetische Diversität einer monözischen und einer diözischen Hanfsorte und Analyse des Fasergehaltes von verschiedenen Hanfformen (*Cannabis sativa* L.). Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Faeti, V., G. Mandolino and P. Ranalli, 1996: Genetic diversity of *Cannabis sativa* germplasm based on RAPD markers. *Plant Breeding* 115, 367-370.
- Fischer, D. and K. Bachmann, 1998: Microsatellite Enrichment in Organisms with Large Genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24, 796-802.
- Flachowsky, H. 2001: Entwicklung und Kartierung geschlechtsspezifischer Marker bei Hanf (*Cannabis sativa* L.). *Vortr. Pflanzenzüchtung* 52: 121-124.
- Flachowsky, H., E. Schumann, W. E. Weber and A. Peil, 2001: Application of AFLP for the detection of sex specific markers in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Breeding* 120: 305-309.
- Fladung, M. and M. Rai Ahuja, 1995: Sandwich method for nonradioactive hybridization. *BioTechniques* 18, 254-256.
- Forapani, S., A. Carboni, C. Paoletti, V. M. C. Moliterni, P. Ranalli and G. Mandolino, 2001: Comparison of Hemp Varieties Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Crop Sci.* 41, 1682-1689.
- Fruwirth, C., 1922: Zur Hanfzüchtung. *Z. für Pflanzenzüchtg.* 8, 340-401.
- Gasser, R. B., X. Zhu and W. Woods, 1999: Genotyping *Taenia* tapeworms by single-strand confirmation polymorphism of mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 20, 2834-2837.
- Gigliano, G. S., 1999: Preliminary Data on the usefulness of internal transcribed spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. identification. *J. Forensic Sci.* 44, 475-477.
- Gu Cho, Y., M. W. Blair, O. Panaud and S. R. McCouch, 1996: Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome* 39, 373-378.
- Guillemaut, P. and L. Maréchal-Drouard, 1992: Plant DNA isolation: a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 60-65.
- Guttman, D. S. and D. Charlesworth, 1998: An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature* 393, 263-266.
- Handke, S., 1995: Die Züchtung von monözischen und diözischen faserreichen Hanfsorten. In: *Tagungsband 1. Biorohstoff Hanf Symposium, Frankfurt/Main, 188-1999.*

- Hanf, C.-H., 1997: Hanf. Teil 2: Wissenschaftliche Untersuchung zum Thema "Anbau, Ernte und Aufbereitung sowie Verwendung von Hanf". Landwirtschaftsverlag Münster.
- Hartl, L. and S. Seefelder, 1998: Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLP's. *Theor. Appl. Genet.* 96, 112-116.
- Harvey, C. F., G. P. Gill, L. G. Fraser and M. A. McNeilage, 1997: Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sexual Plant Reproduction* 10, 149-154.
- Harvey, S. C. and M. E. Viney, 2001: Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics* 158, 1527-1533.
- Hawthorne, D. J., 2001: AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. *Genetics* 158, 695-700.
- Herich, R., 1961: Geschlechtsausprägung und Größe der Zellkerne sowie Polkörner bei monözischem Hanf verschiedener Formen. *Der Züchter* 31, 48-51.
- Heslop-Harrison, J., 1956: Auxin and Sexuality in *Cannabis sativa*. *Physiol. Plant.* 9, 588-597.
- Heuser, O. 1924: Der deutsche Hanf. Verlag Hirzel, Leipzig.
- Heuser, O., 1927: Hanf- und Hartfasern. In: *Technologie der Textilfasern*, Band 5 (Teil 2), Axel Springer-Verlag, Berlin.
- Hirata, K., 1929: Sex determination in hemp *Cannabis sativa* L. *J. Genet.* 19, 65- 69.
- Hitzemann, W., 1941: Untersuchungen auf "Haschisch" bei verschiedenen Hanfsorten eigenen Anbaus in Deutschland. *Arch. Pharmazie* 279, 353-387.
- Hoffmann, W., 1938: Das Geschlechtsproblem des Hanfes in der Züchtung. *Z. für Pflanzenzüchtg.* 22, 453-461.
- Hoffmann, W., 1941: Gleichzeitig reifender Hanf. *Der Züchter* 13, 277-283.
- Hoffmann, W., 1947a: Die Vererbung der Geschlechtsformen des Hanfes (*Cannabis sativa* L.). *Der Züchter* 17/18, 257-277.
- Hoffmann, W., 1947b: Helle Stengel - eine wertvolle Mutation des Hanfes (*Cannabis sativa* L.). *Der Züchter* 17/18, 56-59.
- Hoffmann, W. and E. Knapp, 1940: Röntgenstrahlungen beim Hanf. *Der Züchter* 12, 1-9.
- Hoffmann, W., A. Mudra, und W. Plarre, 1970: *Lehrbuch der Züchtung Landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*, Band 2, Spezieller Teil, Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg, 415-430. Hoffmann, W., A. Mudra und W. Plarre, 1985: *Lehrbuch der Züchtung Landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*, Band 2, Spezieller Teil, Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg, 344-349.

- Höppner, F. und U. Menge-Hartmann, 1996: Organspezifische Entwicklung der Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)- und Cannabidiol (CBD)-Konzentration während der Vegetationsperiode zweier Faserhanfsorten. *Landbauforschung Völkenrode* 2, 55-64.
- Hornig, J. M. and M. C. Huang, 2000: Male-Specific Band in Random Amplified Microsatellite Polymorphism Fingerprints of Holstein Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 24, 41-46.
- Huhnke, W., Ch. Jordan, H. Neuer und R. von Sengbusch, 1951: Grundlagen für die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Z. für Pflanzenzüchtg.* 29, 55-75.
- Imai G., 1938: Sex linked mutant characters in the hemp (*Cannabis sativa*). *Journal of Genetics* 35, 431-432.
- Jagdish, V., J. Robertson and A. Gibbs, 1996: RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. *Forensic Sci. Int.* 79, 113-121.
- Jakše, J. and B. Javornik, 2001: High Throughput Isolation of Microsatellite in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 217-226.
- Jakše, J., K. Kindlhofer and B. Javornik, 2001: Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. *Genome* 44, 773-782.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson and S. L. Thein, 1985: Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.
- Jeffreys, A. J., A. MacLeod, K. Tamaki, D. L. Neil and D. G. Monckton, 1991: Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354, 204-209.
- Jeppsson, N., I. V. Bartish and H. A. Persson, 1999: DNA Analysis as a Tool in Sea Buckthorn Breeding. Reprinted from: *Perspectives on new crops and new uses*, J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.
- Jiang, C. and K. C. Sink, 1997: RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in *asparagus*. *Euphytica* 94, 329-333.
- Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sale, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevshi, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp, 1997: Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3, 381-390.
- Kaemmer, D., K. Weising, G. Kahl, B. Beyermann, T. Börner and J. T. Epplen, 1995: Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breeding* 114, 12-17.

- Kaneko, T., H. Kotani, Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, N. Miyajima and S. Tabata, 1998: Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. V. Sequence features of the regions of 1,381,565 bp covered by twenty one physically assigned P1 and TAC clones. *DNA Res.* 5, 131-45.
- Karp, A., K. J. Edwards, M. Bruford, B. Vosman, M. Morgante, O. Seberg, A. Kremer, P. Boursot, P. Arctander, D. Tautz and G. Hewitt, 1997: Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature Biotechnol.* 15, 625-628.
- Kater, M. M., J. Franken, K. J. Carney, L. Colombo and G. C. Angenent, 2001: Sex determination in the monoecious species cucumber is confined to specific floral whorls. *Plant Cell* 13, 481-493.
- Keijnovský, E., J. Vrána, S. Matsunaga, P. Souček, J. Šíroky, J. Doležel and B. Vyskot, 2001: Localization of Male-Specifically Expressed *MROS* Genes of *Silene latifolia* by PCR on Flow-Sorted Sex Chromosomes and Autosomes. *Genetics* 158, 1269-1277.
- Kim, E. S. and P. G. Mahlberg, 1997: Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (*Cannabaceae*). *Amer. J. Bot.* 83, 336-342.
- Köhler, D., 1958: Zur Vererbung der Monözie beim Hanf. *Zeitschrift für Vererbungslehre* 89, 437-447.
- Köhler, D., 1961: Ein Beitrag zur Physiologie und Genetik der Geschlechtsausprägung von *Cannabis sativa*. *Planta* 56, 150-173.
- Konieczny, A. and F. M. Ausubel, 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4, 403-410.
- Kotoda, N., M. Wada, S. Komori, S. Kidou, K. Abe, T. Masuda and J. Soejima, 2000: Expression pattern of homologues of floral meristem identity gene *LFY* and *API* during flower development in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125, 398-403.
- Kovács, B., S. Egedi, R. Bártfai and L. Orbán, 2001: Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110, 267-276.
- Kühl, H., S. Röttger, H. Heilbronner, H. Enders and W. Schempp, 2001: Loss of the Y chromosomal PAR2 region in four familial cases of satellited Y chromosomes Yqs. *Chromosome Research* 9, 215-222.
- Kumar, L. S. S. and S. Vishveshwaralah, 1952: Sex mechanism in *Coccinea indica*. *Nature* 170, 330-331.

- Lahaye, T., B. Rueger, S. Toepsch, J. Thalhammer and P. Schulze-Lefert, 1996: Detection of single-copy sequences with Digoxigenin-labeled probes in a complex plant genome after separation on pulsed-field gels. *BioTechniques* 21, 1067-1072.
- Lahn, B. T. and D. C. Page, 1999: Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome. *Science* 286, 964-967.
- Lahn, B. T., N. M. Pearson and K. Jegalian, 2001: The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nature Genet. Reviews* 2, 207-216.
- Lander, E. S. and N. J. Schork, 1994: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2048.
- Lashermes, P., M. C. Combes, N. S. Prakash, P. Trouslot, M. Lorieux and A. Charrier, 2001: Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome* 44, 589-596.
- Lebel-Hardenack, S., E. Hauser, T. Law, J. Schmid and S. R. Grant, 2002: Mapping of Sex Determination Loci on the White Campion (*Silene latifolia*) Y Chromosome Using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Genetics* 160: 717-725.
- Lemmetyinen, J., T. Pennanen, M. Lännenpää and T. Sopenan, 2001: Prevention of flower formation in dicotyledonous. *Mol. Breed.* 7, 341-350.
- Lespinasse, D., M. Rodier-Goud, L. Grivet, A. Leconte, H. Legnate and M. Seguin, 2000: A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 127-138.
- Liang, P. and A. B. Pardee, 1992: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lin, T. Y., Y. Y. Kao, S. Lin, R. F. Lin, C. M. Chen, C. H. Huang, C. K. Wang, Y. Z. Lin and C. C. Chen, 2001: A genetic linkage map of *Nicotiana plumbaginifolia*/*Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 103, 905-911.
- Linacre, A. and J. Thorpe, 1998: Detection and identification of *Cannabis* by DNA. *Forensic Sci. Int.* 91, 71-76.
- Linn, S. and S. Arber, 1968: A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 1300.
- Linnert, G., 1991: Geschlechtschromosomen bei Pflanzen. *Lehrbuch der Allgemeinen Cytogenetik*. Paul Paray Verlag, Hamburg, 78-80.
- Litt, M. and J. A. Luty, 1989: A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.

- Loch, L., 1995: Erfahrungen bei der Züchtung eines einhäusigen Hanfes. In: Tagungsband 1. Biorohstoff Hanf Symposium, Frankfurt/Main, 170-187.
- Lotti, C., S. Salvi, A. Pasqualone, R. Tuberosa and A. Blanco, 2000: Integration of AFLP markers into an RFLP-based map of durum wheat. *Plant Breeding* 119, 393-401.
- Loxdale, H. D. and G. Lushai, 1998: Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomol. Research* 88, 577-600.
- Lu, Z. X., K. Sossey-Alaoui, G. L. Reighard, W. V. Baird and A. G. Abbott, 1999: Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet.* 99, 115-122.
- Mackay, E. L., 1939: Sex chromosomes of *Cannabis sativa*. *Amer. J. Bot.* 26, 707-708.
- Magome, H., N. Yoshikawa and T. Takahashi, 1999: Single-Strand Confirmation Polymorphism Analysis of Apple Stem Grooving Capillovirus Sequence Variants. *Phytopathology* 89, 136-140.
- Maheswaran, M., P. K. Subudhi, S. Nandi, J. C. Xu, A. Parco, D. C. Yang and N. Huang, 1997: Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 94, 39-45.
- Maliepaard, C., F. H. Alston, G. van Arkel, L. M. Brown, E. Chevreau, F. Dunemann, K. M. Evans, S. Gardiner, P. Guilford, A. W. van Heusden, J. Janse, F. Laurens, J. R. Lynn, A. G. Manganaris, A. P. M. den Nijs, N. Periam, E. Rikkerink, P. Roche, C. Ryder, S. Sansavini, H. Schmidt, S. Tartarini, J. J. Verhaegh, M. Vrielink-van Ginkel and G. J. King, 1998: Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 97, 60-73.
- Mandel, M. A. and M. F. Yanofsky, 1995: A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377, 522-524.
- Mandolino, G. and P. Ranalli, 2002: The Applications of Molecular Markers in Genetics and Breeding of Hemp. *Journal of Industrial Hemp* 7, 7-24.
- Mandolino, G., A. Carboni, S. Forapani, V. Faeti and P. Ranalli, 1999: Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98, 86-92.
- Mansfeld, R., 1986: Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen). 2 Aufl., Axel Springer Verlag, Berlin.
- Marec, F., A. Tothová, K. Sahara and W. Traut, 2001: Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephesia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). *Heredity* 87, 659-671.

- Matsunaga, S. and S. Kawano S., 2001: Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biology* 3, 1-8.
- Matsunaga, S., S. Kawano and T. Kuroiwa, 1997: A male stamen-specific gene in the dioecious campion *Silene latifolia* expressed in mature pollen. *Plant Cell Physiol.* 38, 499-502.
- Matsunaga, S., S. Kawano, H. Takano, H. Uchida and A. Sakai, 1996: Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). *Plant J.* 10, 679-689.
- Matthäus, B., L. Brühl, U. Krise, E. Schumann and A. Peil, 2001: Hanföl: Ein "Highlight" für die Küche? *Forschungsreport* 2, 22-25.
- Mc Phee, H., 1925: The genetics of sex in hemp. *J. Agric. Res.* 31, 935-943.
- Mekada, K., M. Harada, L. K. Lin, K. Koyasu, P. M. Borodin and S. I. Oda, 2001: Pattern of X-Y chromosome pairing in the Taiwan vole, *Microtus kikuchii*. *Genome* 44, 27-31.
- Meksem, K., D. Leister, J. Peleman, M. Zabeau, S. F. and C. Gebhardt, 1995: A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249, 74-81.
- Meksem, K., E. Ruben, D. Hyten, K. Triwitayakorn and A. D. Lightfoot, 2001: Conversion of AFLP bands to high-throughput DNA markers. *Mol. Gen. Genomics* 265, 207-214.
- Mendel, G., 1865: Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* 4, 3-44.
- Meyerowitz, E. M., 1995: Die Genetik der Blütenentwicklung. *Spektrum der Wissenschaft*, 42-49.
- Michelmore, R., I. Paran and R. V. Kesseli, 1991: Identification of marker linked to disease resistance gene by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9828-9832.
- Mohan Ram, H. Y. and V. S. Jaiswal, 1972: Induction of Male Flowers on Female Plants of *Cannabis sativa* by Gibberellins and its Inhibition by Abscisic Acid. *Planta* 105, 263-266.
- Morgan, T. H., C. B. Bridges and A. H. Sturtevant, 1925: Genetics of *Drosophila*. *Bibliogr. Genetica* 2, 1-262.
- Mueller, U. G., L. La. R. Wolfenbarger, 1999: AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* 14, 389-394.
- Mullis, K. and F. Faloona, F., 1987: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

- Mullis, K. B., F. A. Faloona, S. J. Scharf, R. K. Saiki, G. T. Horn and H. A. Ehrlich, 1986: Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- Nakao, S., S. Matsunaga, A. Sakai, T. Kuroiwa and S. Kawano, 2002: RAPD isolation of a Y chromosome specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*. Genome 45, 413-20.
- Negi, M. S., M. Devic, M. Delseny and M. Lakshmikumaran, 2000: Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Theor. Appl. Genet. 101, 146-152.
- Neuer, H. und R. von Sengbusch, 1943: Die Geschlechtsvererbung bei Hanf und die Züchtung eines monözischen Hanfes. Der Züchter 15, 49-62.
- Neuer, H., E. Prieger und R. von Sengbuch, 1946: Hanfzüchtung. I. Die Steigerung des Faserertrages von Hanf. Der Züchter 17/18, 33-39.
- Neuhaus-Url, G. and G. Neuhaus, 1993: The use of the nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. Transgenic Research 2, 115-120.
- Nishina, Y., Y. Sinoto and D. Sato, 1940: Effects of fast neutrons upon plants. 3. cytological observations on the abnormal forms of *Fagopyrum* and *Cannabis*. Cytology (Tokyo) 10, 458-466.
- Nishiyama, I., 1940: Studien über künstlich erzeugte polyploide Pflanzen. III. Meiosis in tetraploidem Hanf. (japanisch), Bot. and Zool. 8, 47-52.
- Nishiyama, I., 1941: Studien über künstlich erzeugte polyploide Pflanzen. V. Die Züchtung von langfasrigen Sorten durch Verdopplung der Chromosomenzahl bei Hanf. (japanisch), Bot. and Zool. 9, 173-179.
- Nishiyama, I., I. Yamada and M. Mezaki, 1947: Studien über künstlich erzeugte polyploide Pflanzen. XI. Wechsel im Geschlechtsverhältnis in einer Nachkommenschaft von tetraploiden Hanf. (japanisch), Seihen Ziho 3, 144-151.
- Nova, 2002: Nachwachsende Rohstoffe, Statistiken und Grafiken. Das Internet-Dienstleistungszentrum für die Naturfaserwirtschaft und nachwachsende Rohstoffe. www.nova-institut.de
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein, 1989: A common language for physical mapping of the human genome. Science 245, 1434-1435.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya, 1989: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2766-2770.

- Ovesná, J., K. Poláková and L. Leišová, 2002: DNA Analysis and their Application in Plant Breeding. Czech. J. Genet. Plant. Breed. 38, 29-40.
- Paran, I. and R. W. Michelmore, 1993: Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85, 985-993.
- Patzak, J., P. Vejl, S. Skupinová and V. Nesvadba, 2002: Identifikation of sex in F₁ progenies of Hop (*Humulus lupulus* L.) by molecular marker. Rostilinná Výroba 48, 318-321.
- Peil, A., V. Korzun, V. Schubert, E. Schumann, W. E. Weber und M. Röder, 1998: The application of wheat microsatellites to identify disomic *Triticum aestivum*- *Aegilops markgrafii* addition lines. Theor. Appl. Genet. 96, 138-146.
- Peil, A., H. Flachowsky, E. Schumann and W. E. Weber, 2003: Sex-linked AFLP markers indicate a pseudo autosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). Theor. Appl. Genet. in press.
- Petri, G., P. Veszki, P. Oroszlán and G. Turiák, 1996: Cannabinoid content of foreign and domestic fibre hemp varieties cultivated in hungary. Acta Agronomica Hungarica 42, 133-140.
- Polley, A., E. Seigner and M. W. Ganai, 1997: Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. Genome 40, 357-361.
- Porceddu, A., E. Albertini, G. Barcaccia, E. Falistocco and M. Falcinelli, 2002: Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. Theor. Appl. Genet. 104, 273-280.
- Postma, W. P., 1946: Mitosis, meiosis en allopolloidie bij *Cannabis sativa* en *Spinacia oleracea*. H. D. Tjenk, Willink & Co., Amsterdam.
- Price, A. H., K. A. Steele, B. J. Moore, P. B. Barraclough and L. J. Clark, 2000: A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. Theor. Appl. Genet. 100, 49-56.
- Qu, L.-J., T. N. Foote, M. A. Roberts, T. A. Money, L. Aragón-Alcaide, J. W. Snape and G. Moore, 1998: A simple PCR-based method for scoring the ph1b deletion in wheat. Theor. Appl. Genet. 96, 371-375.
- Rae, S. J., C. Aldam, I. Dominguez, M. Hoebrechts, S. R. Barnes and K. J. Edwards, 2000: Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp.). Theor. Appl. Genet. 100, 1240-1248.
- Rath, L., 1967: Heterosisversuche mit Hanf. Techn. Textilien 10, 247-260.
- Reamon-Büttner, S. M. and C. Jung, 2000: AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L.. Theor. Appl. Genet. 100, 432-438.

- Reamon-Büttner, S. M., T. Schmidt and C. Jung, 1999: AFLP's represent highly repetitive sequences in *Asparagus officinalis* L.. Chromosome Research 7, 297-304.
- Reamon-Büttner, S. M., J. Schondelmaier and C. Jung, 1998: AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L.. Mol. Breed. 4, 91-98.
- Reddy, K. D., E. G. Abraham and J. Nagaraju, 1999: Microsatellites of the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism and strain characterization. Genome 42, 1057-1065.
- Reddy, O. U. K., E. A. Siddiq, N. P. Sarma, J. Ali, A. J. Hussain, P. Nimmakayala, P. Ramasamy, S. Pammi and A. S. Reddy, 2000: Genetic analysis of temperature-sensitive male sterility in rice. Theor. Appl. Genet. 100 (5), 794-801.
- Réjon, C. R., M. Jamilena, M. G. Ramos, J. S. Parker und M. R. Réjon, 1994: Cytogenetic and molecular analysis of the multiple sex-chromosome system of *Rumex acetosa*. Heredity 72, 209-215.
- Ren, N. and M. P. Timko, 2001: AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. Genome 44, 559-571.
- Reuter, K., 1987: Anbau und Verwendung von Hanf (*Cannabis sativa*) als Lieferant von Fasern, Samen und Rauschdrogen. Diplomarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn.
- Riedel, M., 2000: Zytologische und molekularbiologische Untersuchungen beim Hanf. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rivera, R., K. J. Edwards, J. H. A. Barker, G. M. Arnold, G. Ayad, T. Hodgkin and A. Karp, 1999: Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L.. Genome 42, 668-675.
- Rizet, G., 1946: Sexualité et polyploidie chez *Cannabis sativa*. C. r. Soc. Biol. Paris 140, 284-285.
- Ross, R., X. L. Ross, B. Rueger, T. Laengin and A. B. Reske-Kunz, 1999: Nonradioactive Detection of Differentially Expressed Genes Using Complex RNA or DNA Hybridization Probes. BioTechniques 26, 150-155.
- Ruiz Rejón, C., M. Jamilena, M. Garrido Ramos, J. Parker and M. Ruiz Rejón, 1994: A cytogenetic and molecular analysis of the multiple sex chromosome system of *Rumex acetosa*. Heredity. 79, 209-215.
- Saal, B. and G. Wricke, 1999: Development of simple sequece repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). Genome 42, 964-972.

- Saghai Maroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard, 1984: Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 8014-8018.
- Sakamoto, K., Y. Akiyama, K. Fukui, H. Kamada and A. S. Satoh, 1998: Characterization, Genom Size and Morphologie of Sex Chromosomes in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Cytologia* 63, 459-464.
- Sakamoto, K., N. Ohmido, K. Fukui, H. Kamada and S. Satoh, 2000: Site-specific accumulation of a LINE-like retrotransposon in a sex chromosom of the dioecious plant *Cannabis sativa*. *Plant Mol. Biol.* 44, 723-732.
- Sakamoto, K., K. Shimomura, Y. Komeda, H. Kamada and A. S. Satoh, 1995: A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L.. *Plant Cell Physiol.* 36, 1549-1554.
- Saliba-Colombani, V., M. Causse, L. Gervais and J. Philouze, 2000: Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome* 43, 29-40.
- Savelkoul, P. M., H. M. Aarts, J. de Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. W. Rademaker, L. Schouls and J. A. Lenstra, 1999: Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J. Clinical Microbiol.* 37, 3083-3091.
- Schneider, K., 1942: Die Anatomie als Ursache des ungleichmäßigen chemischen Aufschlusses bei Hanf, Beeinflussung durch Ernährung, zugleich ein Beitrag zur Frage des Gummihanfes. *Faserforschung* 4, 141-165.
- Schneider, K., D. Borchardt, R. Schäfer-Pregl, N. Nagl, C. Glass, A. Jeppson, C. Gebhardt and F. Salamini, 1999: PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 515-524.
- Schumacher, K., J. Schondelmaier, E. Barzen, G. Steinrücken, D. Borchardt, W. E. Weber, C. Jung and F. Salamini, 1997: Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant Breeding* 116, 23-38.
- Schumann, E., A. Peil and W. E. Weber, 1999: Preliminary results of a German field trial with different hemp (*Cannabis sativa* L.) accessions. *Genet. Res. Crop Evol.* 46: 399-407.
- Schuster, D. M., M. Darfler, J. E. Lee and A. Rashtchian, 1998: Improved Sensitivity and Specificity of RT-PCR. *Focus* 20, 34-35.
- Schuster, W., 1986: Ölpflanzen in Europa. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 108-111.

- Schwarz, G., W. Michalek, V. Mohler, G. Wenzel and A. Jahoor, 1999: Chromosome landing at the *Mla* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.) by means of high-resolution mapping with AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98, 521-530.
- Scott, L. J., M. Cross, M. Shepherd, T. Maguire and R. J. Henry, 1999: Increasing the Efficiency of Microsatellite Discovery from Poorly Enriched Libraries in Coniferous Forest Species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17, 351-354.
- Sebastian, R. L., E. C. Howell, G. J. King, D. F. Marshall and M. J. Kearsey, 2000: An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* linkage map from two morphologically distinct doubled-haploid mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 100, 75-81.
- Sefc, K. M., F. Regner, E. Turetschek, J. Glossl and H. Steinkellner, 1999: Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42, 1-7.
- Shan, X., T. K. Blake and L. E. Talbert, 1999: Conversion of AFLP to sequence-specific PCR markers. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1072-1078.
- Sharked, H., K. Kashkush, H. Ozkan, M. Feldman and A. A. Levy, 2001: Sequence Elimination and Cytosine Methylation Are Rapid and Reproducible Responses of the Genome to Wide Hybridization and Allopolyploidy in Wheat. *Plant Cell* 13, 1749-1759.
- Sharma, A., R. Sharma and H. Machii, 2000: Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1049-1055.
- Sharma, P. C., B. Hüttel, P. Winter, G. Kahl, R. C. Gardner and K. Weising, 1995a: The potential of microsatellites for hybridization- and PCR-based fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and related species. *Electrophoresis* 16, 1755-1761.
- Sharma, P.C., P. Winter, T. Büniger, B. Hüttel, F. Weigand, K. Weising and G. Kahl, 1995b: Abundance and polymorphism of di-, tri- and tetranucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90, 90-96.
- Shirkot P., D. R. Sharma and T. Mohapatra, 2002: Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* by RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 94, 33-99.
- Shure, M., S. Wessler and N. V. Fedoroff, 1983: Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35, 225-233.
- Sinoto, Y., 1929: Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia* 1, 109-191.
- Sloop, K. W. and S. J. Rhodes, 2000: Combined Hot start and Touchdown PCR Protocols Optimize Amplification of Difficult Targets. *Biochemica* 1, 35-36.

- Small, E., 1979: The species problem in *Cannabis* (science and semantics). Cropus-Verlag, Toronto.
- Southern, E. M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stam, P., 1993: Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package JOINMAP. *Plant J.* 3, 739-744.
- Staub, J. E., F. C. Serquen and M. Gupta, 1996: Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience* 31, 729-741.
- Stavolone, L., D. Alioto, A. Ragozzino and J.-F. Laliberté, 1998: Variability Among Turnip Mosaic Potyvirus Isolates. *Phytopathology* 88, 1200-1204.
- Stirling, B., G. Newcombe, J. Vrebalov, I. Bosdet and H. D. Bradshaw Jr., 2001: Suppressed recombination around the *MXC3* locus, a major gene for resistance to poplar leaf rust. *Theor. Appl. Genet.* 103, 1129-1137.
- Stitou, S., R. Jiménez, D. de la Guardia and M. Burgos, 2001: Silent ribosomal cistrons are located at the pairing segment of the postreductional sex chromosomes of *Apodemus sylvaticus* (Rodentia, Muridae). *Heredity* 86, 128-133.
- Sung, S.-K., G.-H. Yu, J. Nam, D.-H. Jeong and G. An, 1999: Developmentally regulated expression of two MADS-box genes, *MdMADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta* 210, 519-528.
- Suzuki, Y., T. Sekiya and K. Hayashi, 1991: Allele-specific PCR: A method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal. Biochem.* 192, 82-84.
- Takenaka, Y., 1951: Studies on sex-differentiation in higher plants. *Jahresbericht Nat. Inst. der Genetik (Japan 1949-1950)* 53, 32-33.
- Taramino, G. and S. V. Tingey, 1996: Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39, 277-287.
- Taura, F., S. Morimoto and Y. Shoyama, 1996: Purification and Characterisation of Cannabidiolic-acid Synthase from *Cannabis sativa* L.. *J. Biol. Chemistry.* 271, 17411-17416.
- Taura, F., H. Matsushita, S. Morimoto and Y. Masayama, 2000: Tetrahydrocannabinolic acid synthase gene. Patent: JP 2000078979-A 13, Taishopharmaceut co Ltd.
- Tautz, D., 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA. *Nuc. Ac. Res.* 17, 6463
- Taylor, B. and A. Powell, 1985: Isolation of plant DNA and RNA. *Focus* 4, 4-6.

- Terauchi, R. and G. Kahl, 1999: Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. *Genome* 42, 752-762.
- Tischler, G., 1953: Allgemeine Pflanzenkaryologie. In: Linsbauer, K.: Handbuch der Pflanzenanatomie. Band. 2, Gebr. Bornträger, Berlin.
- Tobler, F., 1940: Beitrag zur Kenntnis der Ligninbildung im Holzkörper von *Cannabis sativa*. Vortragsband - Botanisches Institut der Technischen Hochschule Dresden, 143-148.
- Tozaki, T., S. Inoue, M. Mashima, M. Ohta, N. Miura and M. Tomita, 2000: Sequence analysis of trinucleotide repeat microsatellites from an enrichment library of the equine genome. *Genome* 43, 354-365.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen and R. Terauchi, 2002: A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104, 281-285.
- Uzunova, M. I. and W. Ecke, 1999: Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* 118, 323-326.
- van de Wiel, C., P. Arens and B. Vosman, 1998: Microsatellite fingerprinting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives. *Plant Cell Reports* 17, 837-842.
- van Heusden, A. W., J. W. van Ooijen, R. V. Ginkel, W. H. J. Verbeek, W. A. Wietsma and C. Kik, 2000: A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLPTM) markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 118-126.
- Vinatzer, B. A., A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H. B. Zhang, C. Gessler and S. Sansavini, 2001: Apple (*Malus* sp.) contains receptor-like genes homologous to the *Cf* resistance gene family of tomato with a cluster of such genes co-segregating with *Vf* apple scab resistance. unpublished, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- von Sengbusch, R., 1943: Die Geschlechtsvererbung bei Hanf und die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Der Züchter* 15, 49-62.
- von Sengbusch, R., 1952: Ein weiterer Beitrag zur Vererbung des Geschlechts bei Hanf als Grundlage für die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Z. für Pflanzenzüchtg* 31, 319-338.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Ac. Res.* 23, 4407-4414.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghai-Marooof, S. M. Williams, B. P. Dancik and R. W. Allard, 1987: Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2097-2100.

- Warmke, H. E. and A. F. Blakslee, 1939: Sex mechanism in polyploids of *Melandrium*. Science 89, 391-392.
- Weber, J. L. and P. E. May, 1989: Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- Weber, W. E. and G. Wricke, 1994: Genetic Markers in Plant Breeding. Adv. Plant Breeding 18, Paul Parey, Berlin, 1-105.
- Wei, F., K. Gobelman-Werner, S. M. Morroll, J. Kurth, L. Mao, R. Wing, D. Leister, P. Schulze-Lefert and R. P. Wise, 1999: The *Mla* (Powdery Mildew) Resistance Cluster Is Associated With Three NBS-LRR Gene Families and Suppressed Recombination Within a 240-kb DNA Interval on Chromosome 5S (1HS) of Barley. Genetics 153, 1929-1948.
- Weigel, D. and E. M. Meyerowitz, 1994: The ABCs of floral homeotic genes. Cell 78, 203-209.
- Weising, K., R. G. Atkinson and R. C. Gardener, 1995: Genomic Fingerprinting by Microsatellite-primed PCR: A Critical Evaluation. Research 4, 249-255.
- Weising, K., R. W. M. Fung, D. J. Keeling, R. G. Atkinson and R. C. Gardner, 1996: Characterization of microsatellites from *Actinidia chinensis*. Mol. Breeding 2, 117-131.
- Weising, K., D. Kaemmer, F. Weigand, J. T. Epplen and G. Kahl, 1992: Oligonucleotide fingerprinting reveals probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genome 35, 436-442.
- Weising, K., D. Ramser, D. Kaemmer, G. Kahl and J. T. Epplen, 1991: Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. In: T. Burke, G. Dolf, A. J. Jeffreys, and R. Wolff (Eds.), DNA Fingerprinting Approaches and Applications, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 112-123.
- Welsh, J., K. Chada, S. S. Dalal, D. Ralph, R. Cheng and M. McClelland, 1992: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nuc. Ac. Res. 20, 4965-4970.
- Westergard, M., 1953: Über den Mechanismus der Geschlechtsbestimmung bei *Melandrium album*. Naturwissenschaften 9, 253-260.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak and J. A. Rafalski, 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Ac. Res. 18, 6531-6535.
- Wong, A., M. R. Forbes and M. L. Smith, 2001: Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. Genome 44, 677-684.

- Wu, R. L., Y. F. Han, J. J. Hu, L. Li, M. L. Li and Z.-B. Zeng, 2000: An integrated genetic map of *Populus* based on amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1249-1256.
- Wyman, A. R. and R. White, 1980: A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 6754-6758.
- Xu, M., A. E. Melchinger, X. C. Xia and T. Luebberstedt, 1999: High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 261, 574-581.
- Xu, M., X. Li and S. S. Korban, 2000: AFLP-Based Detection of DNA Methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 361-368.
- Xu, M., E. Huaracha and S. S. Korban, 2001: Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome* 44, 63-70.
- Yamada, I., 1943: Die Geschlechtschromosomen des Hanfes. *Seihen Ziho* 2, 64-68.
- Yao, L.-J., Y. H. Dong, A. Kvarnheden and B. Morris, 1999: Seven MADS-box Genes in Apple are Expressed in Different Parts of the Fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124, 8-13.
- Yap, E. P. and JO'D. McGee, 1992: Non-isotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genet.* 8, 49.
- Yu, G.-X. and R. P. Wise, 2000: An anchored AFLP-and retrotransposon-based map of diploid *Avena*. *Genome* 43, 736-749.
- Zhang H., V. S. Stilio, F. Rehman, A. Avery, D. Mulcahy and R. Kesseli, 1998: Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene* Y. *Genome* 41, 141-147.

- Anlage -

8. Anlage

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Die Blüte sexuell monomorpher Pflanzen:.....	S. 10
Abbildung 2:	Schema des ABC Modells für die Festlegung der Blütenorganidentität:.....	S. 11
Abbildung 3:	Erstellung von AFLP-Markern:.....	S. 31
Abbildung 4:	Isolierung spezifischer Fragmente aus einem AFLP-Gel:.....	S. 33
Abbildung 5:	Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Bulkanalyse:.....	S. 44
Abbildung 6:	Überprüfung der Einzelpflanzen der Bulks von CAN18 mit der Primerkombination <i>HindIII</i> +AGA/ <i>MseI</i> +ACT:.....	S. 48
Abbildung 7:	Überprüfung von AFLP-Markern an den F ₁ -Einzelpflanzen:.....	S. 49
Abbildung 8:	Isolierung und Klonierung von AFLP-Fragmenten zur Konvertierung in SCAR-Marker:.....	S. 50
Abbildung 9:	Überprüfung der Reamplifikation isolierter AFLP-Fragmente:.....	S. 51
Abbildung 10:	Vergleich klonierter Fragmente mit den Banden der Ausgangs-PCR:.....	S. 52
Abbildung 11:	Überprüfung positiver Klone auf <i>HindIII</i> -Fragmente:.....	S. 53
Abbildung 12:	Sequenzen der Hanfklone 18, 50 und 53:.....	S. 55
Abbildung 13:	Überprüfung der SCAR-Primer an männlichen und weiblichen Einzelpflanzen:.....	S. 56
Abbildung 14:	Amplifikation männlich spezifischer Fragmente mit dem SCAR- Primerpaar HK18u und HK18r:.....	S. 57
Abbildung 15:	Erstellung neuer fragmentspezifischer Primer:.....	S. 59
Abbildung 16:	Primerpaar HK50mu/mr getestet an der Kartierungspopulation:.....	S. 60
Abbildung 17:	Primerpaar HK50mu/mr getestet an den 30 Einzelpflanzen von A7:.....	S. 61
Abbildung 18:	Überprüfung der Primer HK50ku und HK50kr:.....	S. 62
Abbildung 19:	Überprüfung der Einzelpflanzen von A2 mit HK50ku/kr.....	S. 63
Abbildung 20:	Überprüfung der Gewächshauspflanzen von A7 mit HK50ku/kr:.....	S. 64
Abbildung 21:	Etablierung von Mikrosatellitenmarkern an Hanf:.....	S. 65
Abbildung 22:	Screening der Bank mit DIG-markierten Mikrosatellitenmotiven:.....	S. 67
Abbildung 23:	Ausgangssituationen und Spaltungsverhalten dominanter Marker:.....	S. 69
Abbildung 24:	Hanfkarte:.....	S. 73

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Unterschiedliche Wuchs- und Geschlechtsformen innerhalb der Gattung <i>Cannabis</i> (Hoffmann et al., 1985):.....	S. 5
Tabelle 2:	Auswertung der Bulkanalyse zur Entwicklung geschlechtsspezifischer Marker:.....	S. 42
Tabelle 3:	Überprüfung der männlich spezifischen Banden an den Einzelpflanzen zweier Abstammungen:.....	S. 46
Tabelle 4:	Untersuchung der Einzelpflanzen der Bulks mit den AFLP-Primerkombinationen der Bulkanalyse:.....	S. 47
Tabelle 5:	Fünf mögliche Klassen der Geschlechtschromosomen, Genotypen der Eltern und die erwartete Spaltung in den männlichen und weiblichen Nachkommen:.....	S. 70
Tabelle A1:	Geschlechtsbonituren aller untersuchten Einzelpflanzen:.....	Anlage
Tabelle A2:	Verwendete Primer und Oligonukleotide:.....	Anlage
Tabelle A3:	Ergebnisse der Bulkanalyse für 39 AFLP-Primerkombinationen:.....	Anlage
Tabelle A4:	Auswertung der Bulkanalyse und Zuordnung polymorpher Banden zu den Markerklassen 1 bis 6:.....	Anlage
Tabelle A5:	Zur Kartierung verwendete AFLP-Primerkombinationen:.....	Anlage
Tabelle A6:	Zuordnung geschlechtsgekoppelter Marker zu den Markerklassen A-E:.....	Anlage

Tabelle A1: Geschlechtsbonitouren aller untersuchten Einzelpflanzen

F ₁ -Einzelpflanzen CAN18/1 ♀ x CAN18/2 ♂								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
1	A2/1	♀	28	A2/31	♀	55	A2/64	♀
2	A2/2	♀	29	A2/32	♀	56	A2/65	♂
3	A2/3	♀	30	A2/33	♀	57	A2/66	♀
4	A2/4	♀	31	A2/34	♀	58	A2/67	♀
5	A2/5	♀	32	A2/35	♀	59	A2/68	♀
6	A2/6	♀	33	A2/36	♀	60	A2/70	♀
7	A2/7	♀	34	A2/37	♂	61	A2/71	♀
8	A2/8	♂	35	A2/38	♂	62	A2/72	♂
9	A2/9	♂	36	A2/39	♂	63	A2/73	♂
10	A2/11	♂	37	A2/40	♀	64	A2/74	♂
11	A2/12	♂	38	A2/41	♂	65	A2/75	♂
12	A2/13	♀	39	A2/42	♀	66	A2/76	♀
13	A2/14	♀	40	A2/43	♀	67	A2/77	♀
14	A2/15	♀	41	A2/44	♀	68	A2/78	♂
15	A2/16	♂	42	A2/45	♀	69	A2/79	♀
16	A2/17	♀	43	A2/46	♂	70	A2/80	♂
17	A2/19	♀	44	A2/47	♂	71	A2/81	♂
18	A2/20	♀	45	A2/49	♂	72	A2/82	♂
19	A2/22	♀	46	A2/50	♂	73	A2/83	♂
20	A2/23	♀	47	A2/51	♂	74	A2/84	♀
21	A2/24	♀	48	A2/54	♂	75	A2/85	♂
22	A2/25	♀	49	A2/55	♀	76	A2/87	♀
23	A2/26	♀	50	A2/57	♀	77	A2/88	♀

F₁-Einzelpflanzen CAN18/1♀ x CAN18/2♂								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
24	A2/27	♂	51	A2/59	♂	78	A2/91	♂
25	A2/28	♂	52	A2/61	♀	79	A2/98	♀
26	A2/29	♂	53	A2/62	♂	80	A2/99	♀
27	A2/30	♀	54	A2/63	♀	81	A2/100	♂
Einzelpflanzen der Abstammung CAN17 (A7)								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
1	A7/3	♀	11	A7/15	♀	21	A7/48	♀
2	A7/5	♀	12	A7/17	♀	22	A7/55	♂
3	A7/6	♂	13	A7/18	♀	23	A7/60	♀
4	A7/7	♀	14	A7/19	♀	24	A7/68	♂
5	A7/8	♂	15	A7/22	♀	25	A7/76	♀
6	A7/9	♀	16	A7/31	♀	26	A7/79	♀
7	A7/10	♀	17	A7/37	♀	27	A7/84	♀
8	A7/11	♀	18	A7/38	♀	28	A7/88	♀
9	A7/13	♀	19	A7/42	♀	29	A7/90	♀
10	A7/14	♂	20	A7/47	♀	30	A7/92	♂
Einzelpflanzen der Bulks von CAN18								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
1	CAN18/1	♀	12	CAN18/12	♂	23	CAN18/23	♀
2	CAN18/2	♂	13	CAN18/13	♂	24	CAN18/24	♀
3	CAN18/3	♂	14	CAN18/14	♂	25	CAN18/25	♀
4	CAN18/4	♂	15	CAN18/15	♂	26	CAN18/26	♀
5	CAN18/5	♂	16	CAN18/16	♂	27	CAN18/27	♀
6	CAN18/6	♂	17	CAN18/17	♂	28	CAN18/28	♀
7	CAN18/7	♂	18	CAN18/18	♀	29	CAN18/29	♀
8	CAN18/8	♂	19	CAN18/19	♀	30	CAN18/30	♀

- Anlage -

Einzelpflanzen der Bulks von CAN18								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
9	CAN18/9	♂	20	CAN18/20	♀	31	CAN18/31	♀
10	CAN18/10	♂	21	CAN18/21	♀	32	CAN18/32	♀
11	CAN18/11	♂	22	CAN18/22	♀			
Einzelpflanzen der Bulks von CAN17								
Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀	Nr.	Pflanzen-Nr.	♂/♀
1	CAN17/1	♀	7	CAN17/7	♂	13	CAN17/13	♀
2	CAN17/2	♂	8	CAN17/8	♂	14	CAN17/14	♀
3	CAN17/3	♂	9	CAN17/9	♂	15	CAN17/15	♀
4	CAN17/4	♂	10	CAN17/10	♂	16	CAN17/16	♀
5	CAN17/5	♂	11	CAN17/11	♂	17	CAN17/17	♀
6	CAN17/6	♂	12	CAN17/12	♀	18	CAN17/18	♀

Tabelle A2: Verwendete Primer und Oligonukleotide

STS-Primer		
Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	T_m- °C
HK18u	5'-TAA ACT CCA AAG CGA AAA-3'	48,25
HK18r	5'-AGC TTA GAA TAA GCA AGA TAG-3'	45,72
HK50u	5'-CTC AAG TTT TAT CCC AAT-3'	43,12
HK50r	5'-AGC TTA CCT CAA AAT TTT-3'	43,05
HK53u	5'-TAA AGA GTG TAT GCT TCC T-3'	43,31
HK53r	5'-AGC TTA CCA GAA GAG TTG-3'	42,8
HK50ku	5'-AAG CTT ACC TCA AAA TTT TG-3'	48,91
HK50kr	5'-TTA AAG ACC TAA ATA TTT TAT TTC T-3'	49,34
HK50mu	5'-GCA GTC TCT TGC GAG C-3'	47,49
HK50mr	5'-ATT TGC ACT TCC TTC CA-3'	47,02
HK50wu	5'-AAA GTC TCC TGC GAG GC-3'	51,62
HK50wr	5'-GAT CTA CAC TTC CCG ACG T-3'	50,72
Mikrosatellitenprimer		
Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	T_m- °C
H11A59L	5'-GCT TCA ACC CTC TAA TTT CTG ACC-3'	64,8
H11A59R	5'-AGA AGG GAT ACA CTC GGT TAT CC-3'	64,1
H7A82L	5'-GTG GAG GCG ACG GTG TAG AGG AA-3'	72,2
H7A82R	5'-TCA AAA TTC CTC AAC TGC GCT TAA-3'	67,3
AG 15	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG-3'	64,9
CG 15	5'-CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG-3'	56,1
AT 15	5'-ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT-3'	39,4
CAA 10	5'-CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA-3'	71,2
CAC 10	5'-CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC-3'	85,5
CAG 10	5'-CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG-3'	85,9

Mikrosatellitenprimer		
Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	T_m - °C
CGA 10	5'-CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA-3'	87,4
CCG 10	5'-CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG-3'	56,1
GATA 7	5'-GAT AGA TAG ATA GAT AGA TAG ATA GAT A-3'	49,1
AFLP-Primer		
Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	T_m - °C
<i>Hind</i> III+A	5'-AGA CTG CGT ACC AGC TTA-3'	55,9
<i>Mse</i> I+A	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'	56,7
<i>Mse</i> I+G	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AG-3'	56,3
<i>Hind</i> AdapO	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	53,8
<i>Hind</i> AdapU	5'-AGC TGG TAC GCA GTC TAC-3'	55,3
<i>Mse</i> AdapO	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'	50,9
<i>Mse</i> AdapU	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'	36,3
<i>Hind</i> III+ACC	5'-?GAC TGC GTA CCA GCT TAC C-3'	59,9
<i>Hind</i> III+ACT	5'-?GAC TGC GTA CCA GCT TAC T-3'	57,0
<i>Hind</i> III+AGA	5'-?GAC TGC GTA CCA GCT TAG A-3'	58,1
<i>Mse</i> I+AAA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAA A-3'	51,3
<i>Mse</i> I+AAC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'	50,6
<i>Mse</i> I+AAG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3'	50,8
<i>Mse</i> I+AAT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAA T-3'	50,1
<i>Mse</i> I+ACA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'	52,0
<i>Mse</i> I+ACC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC C-3'	53,2
<i>Mse</i> I+ACG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC G-3'	54,5
<i>Mse</i> I+ACT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC T-3'	50,0
<i>Mse</i> I+AGA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAG A-3'	51,2
<i>Mse</i> I+AGC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'	53,6
<i>Mse</i> I+AGG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAG G-3'	53,4

- Anlage -

AFLP-Primer		
Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	T_m - °C
<i>MseI</i> +AGT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAG T-3'	50,0
<i>MseI</i> +ATA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAT A-3'	48,4
<i>MseI</i> +ATC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAT C-3'	50,4
<i>MseI</i> +ATG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAT G-3'	51,5
<i>MseI</i> +ATT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAT T-3'	50,1
<i>MseI</i> +GAA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	51,2
<i>MseI</i> +GAC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	50,4
<i>MseI</i> +GAG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	50,6
<i>MseI</i> +GAT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	49,9
<i>MseI</i> +GCA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	55,1

Tabelle A3: Ergebnisse der Bulkanalyse für 39 AFLP-Primerkombinationen

Primer- kombination		Anzahl Banden je AFLP-Primerkombination		
<i>HindIII+</i>	<i>MseI+</i>	Anzahl amplifi- zierter Banden	Anzahl polymorpher Banden	Anteil polymorpher Banden in %
AGA	AAA	77	6	7,8
AGA	AAC	73	14	19,2
AGA	AAG	63	13	20,6
AGA	ACA	47	5	10,6
AGA	ACC	48	10	20,8
AGA	ACG	37	0	0
AGA	ACT	40	4	10
AGA	AGG	35	8	22,9
AGA	AGT	39	5	12,8
AGA	ATA	29	0	0
AGA	ATC	58	7	12,1
AGA	ATG	45	6	13,3
AGA	ATT	70	4	5,7
Summe der Banden aller Kombinationen mit HindIII+AGA		661	82	12,4
Anzahl der Banden pro Kombination		50,8	6,3	

- Anlage -

Primer- kombination		Anzahl Banden je AFLP-Primerkombination		
<i>HindIII+</i>	<i>MseI+</i>	Anzahl amplifi- zierter Banden	Anzahl polymorpher Banden	Anteil polymorpher Banden in %
ACC	AAC	46	7	15,2
ACC	AAG	39	6	15,4
ACC	ACC	33	4	12,1
ACC	ACG	46	10	21,7
ACC	ACT	32	3	9,4
ACC	AGA	45	4	8,9
ACC	AGC	29	7	24,1
ACC	AGG	40	7	17,5
ACC	AGT	52	8	15,4
ACC	ATA	58	6	10,3
ACC	ATC	40	7	17,5
ACC	ATG	35	3	8,6
ACC	ATT	50	4	8
Summe der Banden aller Kombinationen mit HindIII+ACC		545	76	13,9
Anzahl der Banden pro Kombination		41,9	5,8	

- Anlage -

Primer- kombination		Anzahl Banden je AFLP-Primerkombination		
<i>HindIII+</i>	<i>MseI+</i>	Anzahl amplifi- zierter Banden	Anzahl polymorpher Banden	Anteil polymorpher Banden in %
ACT	AAA	57	7	12,3
ACT	AAC	38	5	13,2
ACT	AAG	48	5	10,4
ACT	AAT	47	13	27,7
ACT	ACA	60	10	16,7
ACT	ACC	35	11	31,4
ACT	ACG	38	8	21
ACT	ACT	35	3	8,6
ACT	AGA	42	3	7,1
ACT	AGC	44	6	13,6
ACT	AGG	41	4	9,8
ACT	AGT	49	2	4,1
ACT	ATA	62	14	22,6
Summe der Banden aller Kombinationen mit HindIII+ACC		596	91	15,3
Anzahl der Banden pro Kombination		45,8	7	
Summe der Banden aller Kombinationen		1802	249	Gesamtdurchschnitt 13,8
Anzahl der Banden pro Kombination		46,2	6,4	

Tabelle A4: Auswertung der Bulkanalyse und Zuordnung polymorpher Banden zu den Markerklassen 1 bis 6

Primer-kombination		Markerklassen (erscheinen der Banden auf dem Monitor angegeben in min.)					
<i>HindIII</i>	<i>MseI</i>	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Klasse 6
AGA	AAA	175, 190, 215	-	245	-	180	127
AGA	AAC	130, 175, 275	127, 132, 205	120, 150, 255, 297, 330, 360	-	225	390
AGA	AAG	-	282	-	220, 222, 235, 238, 300, 315	125, 240, 380	200, 212, 260
AGA	ACA	220	-	215, 280	-	120	130
AGA	ACC	300	198	225	120, 130, 133, 148	235, 265, 273	-
AGA	ACG	-	-	-	-	-	-
AGA	ACT	115, 370	-	-	-	-	122, 150
AGA	AGG	210, 320	-	-	250	-	120, 130, 182, 223, 310
AGA	AGT	135	-	-	125	120, 175, 225	-
AGA	ATA	-	-	-	-	-	-
AGA	ATC	155, 180	95	-	-	185, 395	115, 190
AGA	ATG	172	-	150	120, 145	230	235
AGA	ATT	392	-	-	335	-	240, 350

- Anlage -

Primer- kombination		Markerklassen (erscheinen der Banden auf dem Monitor angegeben in min.)					
<i>HindIII</i>	<i>MseI</i>	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Klasse 6
ACC	AAC	-	-	275	-	145, 278	97, 99, 103, 122
ACC	AAG	275	-	280	180	300	150, 183
ACC	ACC	-	-	117	130, 142	137	-
ACC	ACG	-	-	-	-	120, 230, 235, 240, 245, 250, 260, 265, 280	160
ACC	ACT	-	-	172	-	-	105, 227
ACC	AGA	117	-	-	-	-	147, 150, 160
ACC	AGC	153, 195	-	100, 117, 130, 140, 190	-	-	-
ACC	AGG	-	165	162	150	105, 165, 250	300
ACC	AGT	215, 350	-	300, 355	297	140	130, 280
ACC	ATA	160, 165	-	200, 335	-	180, 195	-
ACC	ATC	140, 370	-	-	-	205, 345	122, 197, 317
ACC	ATG	-	-	-	120	135, 175	-
ACC	ATT	200	-	191	-	135, 280	-
ACT	AAA	-	-	182, 205	165	120,	167, 225, 307

- Anlage -

Primer- kombination		Markerklassen (erscheinen der Banden auf dem Monitor angegeben in min.)					
<i>HindIII</i>	<i>MseI</i>	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Klasse 6
ACT	AAC	-	-	-	-	128	117, 127, 135, 300
ACT	AAG	-	-	140	125, 155	-	100, 140
ACT	AAT	98, 110, 152, 200, 372	105, 220, 117	240	173	285	150, 293
ACT	ACA	175, 200	-	201, 250	223	278	185, 230, 235, 340
ACT	ACC	140	-	200	150, 175, 200, 275	97, 105, 160, 165	107
ACT	ACG	110, 185	-	126, 132	-	198, 360	150, 357
ACT	ACT	170	-	-	-	-	107, 165
ACT	AGA	-	-	275	-	240	112
ACT	AGC	-	110, 225, 283	215	-	-	200,275
ACT	AGG	-	107	165	117, 143	-	-
ACT	AGT	-	-	-	-	170	100
ACT	ATA	155, 185	-	130	-	115, 145, 171, 173, 205, 220, 230, 240, 254, 285, 300	-

Tabelle A5: Zur Kartierung verwendete AFLP-Primerkombinationen

Für die Kartierung verwendeten AFLP-Primerkombinationen und deren polymorphe Marker			
Nr.	Primer-kombination	Anzahl polym. Banden	Erscheinen der Banden auf dem Monitor nach min.
1	ACT/ACC	11	107, 120, 135, 162, 212, 260, 270, 298, 300, 347, 370
2	ACT/ACA	10	118, 122, 165, 178, 188, 211, 214, 218, 237, 365
3	AGA/AGG	8	110, 135, 160, 176, 193, 198, 257, 300
4	AGA/ACT	11	134, 136, 139, 167, 176, 237, 239, 251, 280, 362, 380
5	AGA/AAC	8	125, 132, 158, 162, 255, 262, 273, 276
6	ACC/ATC	7	130, 156, 157, 237, 245, 272, 335
7	AGA/AAA	2	127, 133
8	AGA/AAG	5	111, 138, 150, 173, 220
9	AGA/AAT	12	127, 215, 237, 239, 242, 273, 285, 312, 330, 395, 490, 497
10	AGA/ACA	11	109, 130, 152, 159, 167, 195, 200, 207, 257, 290, 233
11	AGA/ACC	21	104, 105, 106, 129, 142, 168, 171, 173, 176, 177, 179, 187, 189, 192, 193, 222, 265, 273, 290, 300, 330
12	ACC/AAG	9	92, 106, 139, 145, 155, 197, 215, 218, 352
13	ACC/AGA	8	175, 185, 222, 227, 285, 330, 365, 387
14	AGA/ACG	3	205, 248, 383
15	AGA/AGC	7	105, 115, 153, 167, 195, 217, 222

Für die Kartierung verwendeten AFLP-Primerkombinationen und deren polymorphe Marker			
Nr.	Primer-kombination	Anzahl polym. Banden	Erscheinen der Banden auf dem Monitor nach min.
16	AGA/AGA	20	109, 112, 117, 124, 125, 144, 150, 155, 182, 204, 250, 270, 290, 325, 330, 398, 420, 425, 517, 522
17	AGA/ATA	6	176, 317, 348, 353, 490, 511
18	AGA/ATG	7	118, 122, 138, 167, 216, 225, 342
19	AGA/GAA	15	112, 148, 154, 158, 169, 198, 203, 205, 248, 262, 372, 379, 430, 510, 520
20	AGA/ATC	3	110, 198, 243
21	AGA/GAC	10	58, 77, 98, 103, 250, 255, 305, 388, 398, 510
22	AGA/AGT	5	96, 128, 129, 325, 500

Tabelle A6: Zuordnung geschlechtsgekoppelter Marker zu den Markerklassen A- E

In der Tabelle sind 4 der 5 Markerklassen (A, B, D und E) sowie die dazugehörigen Marker abgebildet. Für Klasse C konnte kein Marker gefunden werden. In die Klasse E wurden lediglich 5 Marker stellvertretend für den Rest eingetragen. Die Symbole "x" stehen für die Anwesenheit und "-" für Abwesenheit des Markers bei der jeweiligen Pflanze.

Klasse	Marker	Anwesenheit des Markers bei den Eltern der Population	
		Vater	Mutter
A	AGA/AAT_237	x	x
	AGA/AGA_109	x	x
	AGA/AAC_262	x	x
	AGA/ATC_157	x	x
	AGA/ACC_142	x	x
	AGA/ATA_490	x	x
	AGA/AGA_425	x	x
B	AGA/AAG_220	-	x
	AGA/AAT_239	-	x
	AGA/AGG_176	-	x
	AGA/AAT_497	-	x
	AGA/GAC_103	-	x
	AGA/ATA_317	-	x
	AGA/ATG_122	-	x
	AGA/GAA_154	-	x
D	AGA/AAC_158	x	x
	AGA/ACA_333	x	x
	AGA/ACA_109	x	-
	AGA/AGT_96	x	x
	AGA/ATA_176	x	x

- Anlage -

Klasse	Marker	Anwesenheit des Markers bei den Eltern der Population	
		Vater	Mutter
E	SEX	x	-
	AGA/AGG_193	x	-
	AGA/ATC_245	x	-
	AGA/AAT_330	x	-
	AGA/GAA_510	x	-

Fach- und Fremdwortverzeichnis

Aliquot	Teil eines Ganzen
allelomorph	von Bateson geprägter Begriff, der später in "allele" (Zustandsformen eines Gens) abgekürzt wurde
Amplifikation	Vermehrung von DNA-Abschnitten, z.B. mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)
Annealing	Anlagerung von DNA-Abschnitten an einen DNA-Einzelstrang
annuell	einjährig
Autosomen	Nicht-Geschlechtschromosomen
Bulk	DNA-Gemisch
Cluster	Komplex
<i>Dikotyledoneae</i>	zweikeimblättrige Pflanzen
diözisch	zweihäusig, es gibt sowohl männliche als auch weibliche Pflanzen
diploid	Zellen mit doppeltem Chromosomensatz
Dominanz	das Vorherrschen von so genannten dominanten Erbanlagen gegenüber verdeckten rezessiven (zurücktretenden) Erbanlagen
endogen	von innen stammend (innerhalb einer Zelle, eines Organismus)
Euchromatin	genetisch aktives Chromatin
Eukaryoten	Eukaryotische Zellen weisen einen klar erkennbaren Zellkern mit einer Zellkernhülle auf. Je nach dem, ob es sich bei den betreffenden Lebewesen um Einzeller oder Mehrzeller handelt, können Eukaryoten entsprechend einzellig oder mehrzellig sein.
exogen	von außen stammend (außerhalb einer Zelle, eines Organismus)
feminin	weiblich
Genom	Gesamtheit der Erbsubstanz einer Zelle oder eines Organismus
haploid	Zellen mit einfachem Chromosomensatz, z.B. Gameten
hermaphrodit	Bezeichnung für Zwitter; ein Individuum einer zweihäusigen Pflanzensorte, bei dem ein Geschlecht vorherrscht, aber auch die Blütenorgane des anderen Geschlechts ausgebildet werden.

- Fach- und Fremdwortverzeichnis -

Heterochromatin	genetisch inaktives Chromatin
heterogametisch	es existieren Gameten, die sich von einander unterscheiden, z.B. männliche (Y) und weibliche (X) Gameten
heterolog	Bezeichnung für Bereiche, z.B. DNA-Fragmente, die in der Gestalt und im Aufbau ungleich sind (können aber von gleicher Größe sein), zum Beispiel zwei AFLP-Fragmente gleicher Größe mit unterschiedlicher Sequenz
heteromorph	vielgestaltig
Heterosomen	Geschlechtschromosomen
heterozygot	mischerbig
homogametisch	alle Gameten sind gleich
homolog	Bezeichnung für Bereiche, z.B. Chromosomen, die sich in der Gestalt und im Aufbau gleichen, zum Beispiel die Chromosomen eines Chromosomenpaares
homöotische Gene	ursprünglich bei <i>Drosophila</i> entdeckte Gene, die in ihrem 3' Exon eine Homöobox (180bp langes homologes Fragment) besitzen. Viele dieser Gene wurden auch bei Pflanzen gefunden. Homöotische Gene spielen eine Rolle bei der DNA-Bindung innerhalb der Genregulation.
homozygot	reinerbig
Isochizomer	Bezeichnung für Restriktionsendonukleasen, welche die gleiche Erkennungssequenz auf der DNA besitzen. Die Stelle, an der die DNA gespalten wird, kann unterschiedlich sein.
Isoenzyme	unterschiedliche Proteine, welche die gleiche Reaktion katalysieren
Kodominanz	Bei einem Marker spricht man von Kodominanz, wenn zwei oder mehr Allele (an eine Eigenschaft gekoppelte Banden) im Genotyp gleichzeitig feststellbar sind.
Locus	Genort
maskulin	männlich

- Fach- und Fremdwortverzeichnis -

monomer polyallel	durch ein Gen gesteuert, welches in unterschiedlichen Formen (Allelen) existiert
monomorph	Genort mit nur einem Allel
monözisch	einhäusig, beide Geschlechter auf einer Pflanze
Pallisadenzellen	Teil des Assimilationsgewebes
polymere Vererbung	Vererbung wird durch mehrere Faktoren (Gene) gesteuert
polymorph	vielgestaltig
Primer	Jede Oligonukleotidsequenz, die nach Hybridisierung mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure einen doppelsträngigen Bereich mit freier 3'-OH Gruppe liefert und damit die DNA-Synthese durch Polymerasen ermöglicht.
subepidermal	Bezeichnung für die Lage einer Zellschicht des Assimilationsgewebes nahe der Epidermis
submetazentrisch	Metazentrische Chromosomen haben ihr Centromer nahe dem Zentrum, submetazentrische leicht davon entfernt
subtelozentrisch	Telozentrische Chromosomen haben ihr Centromer nahe den Telomerasequenzen, subtelozentrische leicht davon entfernt
tetraploid	Zellen mit vierfachem Chromosomensatz
Transkription	Um ein Protein zu synthetisieren, bedarf es zuerst einer Abschrift der DNA (Transkript), die nur noch die für das Protein tatsächlich benötigte Information enthält. Das Transkript wird als mRNA, der Vorgang als Transkription bezeichnet.
unisexuell	eingeschlechtig
<i>Urticales</i>	Nesselgewächse
Vector	Vektoren sind in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen und gemeinsam mit ihrer eigenen DNA zu vermehren.

- Abkürzungen -

Abkürzungen

AFLP	amplified fragment length polymorphisms
ALF	ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
AmpFLP	amplified fragment length polymorphisms
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences
cDNA	copy dexoxyribonucleic acid
cm	Centimeter
cM	Centimorgan
CTAB	N-Cetyl-N, N, N,-trimethyl-ammoniumbromid
Cy5	Farbstoff, der nach Anregung durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge fluoresziert
DAF	DNA amplification fingerprinting
DDRT	differential display reverse transcription
DIG	Digoxygenin
DNA	dexoxyribonucleic acid
DNA'se	DNA abbauendes Enzym
DNA-Polymerase	Enzym, welches die Synthese von DNA katalysiert
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Äthanol
F ₁	erste Tochtergeneration
F ₂	zweite Tochtergeneration
fmol	fento mol
g	Gramm

- Abkürzungen -

GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
K ₂ HPO ₄	Kalium-Hypo-Phosphat
kbp	Kilobasenpaar
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
Mbp	Megabasenpaar
MgAC	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MROS	male reproductive organ-specific
MVR-PCR	minisatellite variant repeat PCR
N ₂	flüssiger Stickstoff
Na-acetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

- Abkürzungen -

NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH ₄ -Acetat	Ammoniumacetat
OD	optische Dichte
Ω	Ohm
³² P, ³³ P	radioaktiver Phosphor
PAA	Polyacrylamid
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pg	Picogramm
pH	potentia hydrogenij
pmol	pico mol
r	reverse
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RL-Puffer	Restriktions/Ligations-Puffer
RNA	ribonucleic acid
RNA'se	RNA abbauendes Enzym
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	umschreiben von mRNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase
s	Sekunde
SCAR	sequence characterized amplified region
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	single nucleotid polymorphisms
SSC	sodium chloride-sodium acetate-sodium citrate
SSCP	single strand confirmation polymorphisms
SSR	simple sequence repeats
STS	sequence tagged sites
t	Tonne
TAE	Tris-acetate-EDTA

- Abkürzungen -

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
u	universe
u.v.m.	und viele mehr
U	Unit (Einheit der Enzymkinetik, 1U Enzym entspricht der Menge Enzym, die man benötigt, um 1 μ g Lamda-DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen)
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	weight/volume
W	Watt
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside
z.B.	zum Beispiel

- Erklärung -

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den

- Selbständigkeitserklärung -

Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich vorliegende Dissertation mit dem Thema: “Erstellung einer genetischen Karte an Hanf (*Cannabis sativa* L.) mit molekularen Markern” selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden,

Unterschrift:

- Danksagung -

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. E. Weber, Direktor des Institutes für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Bereitstellung des Themas. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Weber für seine Unterstützung bei der Bewältigung fachlicher Probleme sowie seine stets kritischen und anregenden Diskussionsbeiträge bedanken. Außerdem bedanke ich mich für seine Geduld und seinen stets motivierenden Einfluss bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. A. Peil, der mich bereits von der Diplomarbeit an betreut hat. Ihm gilt besonderer Dank für seine verständnisvolle Art, seine fachliche Beratung sowie seine große Anteilnahme bei der Bewältigung von Problemen fachlicher wie auch privater Art.

Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bedanken bei Frau Dr. E. Schumann für ihre Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung und Unterstützung dieser Arbeit.

Danken möchte ich sowohl Frau Dr. B. Leithold, Herrn Dr. W. Ilse als auch den Doktoranden des Institutes Herrn S. Bucks, Frau U. Kriese, Herrn M. Riedel und Herrn D. Hryb, die durch ihre Anteilnahme und Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus gilt mein Dank den technischen Mitarbeitern im Labor Frau B. Engel und Frau S. Herrmann. Frau S. Herrmann unterstützte mich nicht nur bei der Erfüllung fachlicher Aufgaben, sie war darüber hinaus auch ständig bestrebt ein Arbeitsklima zu schaffen, in dem man sich wohl fühlt. Gleiches gilt für unsere gärtnerischen Mitarbeiter in der Versuchsgärtnerei in Hohenthurm Frau E. Ganz, Frau G. Stryjakowski und Herrn P. Quaaßdorf. Durch ihre tatkräftige Unterstützung bei der Betreuung aller Versuchspflanzen war es letztlich erst möglich, diese Arbeit zu erstellen. Mein besonderer Dank gilt auch der Sekretärin des Institutes Frau M. Fricke für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

- Lebenslauf -

Lebenslauf

Name: Henryk Flachowsky

Anschrift: An der Schäferei 1, 01326 Dresden,
Tel.: d.: 0351/2616215
p.: 0351/4138488 e-mail: h.flachowsky@bafz.de

Geburt: 05. Oktober 1971 in Meerane

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1978 - 1988 POS "Ernst-Schneller", Waldenburg
1988 - 1991 Landwirtschaftliche Berufsschule "Albrecht Daniel Thaer", Chemnitz, Abschluss zum "Facharbeiter für Pflanzenproduktion mit Abitur"
Note: 2,3 (Abitur)
Note: 1,5 (Facharbeiter)

Wehrdienst: 1991 - 1992 2. Gebirgspanzergrenadierbataillon 242, Feldkirchen;
Fernmeldezug der Heimatschutzbrigade 39, Erfurt

Studium: 1992 - 1998 Landwirtschaftliche Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit mit dem Thema: "Entwicklung einer spezifischen DNA-Bank vom *Aegilops markgrafii* Chromosom E mittels Mikrodissektion und DOP-PCR", Abschluss zum Dipl. Ing. agr. mit der Note: 1,5

Promotion: seit 1998 Doktorand am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Thema: "Erstellung einer genetischen Karte an Hanf (*Cannabis sativa* L.) mit molekularen Markern"

Berufstätigkeit: 2000 - 2001 Sachbearbeiter bei der Firma Creditreform Halle Balles, Schurk KG
2001- heute Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Dresden