

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



“*In situ* Hybridisierung an Hanf (*Cannabis sativa* L.) Chromosomen”

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

vorgelegt von

Diplomagraringenieur
Marko Riedel

Halle/Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009884

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009884>]

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



“*In situ* Hybridisierung an Hanf (*Cannabis sativa* L.) Chromosomen”

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

vorgelegt von

Diplomagraringenieur

Marko Riedel

geb. am 01.12.1973

in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: Prof. Dr. habil W. E. Weber
Prof. Dr. habil W. Diepenbrock
Dr. habil V. Schubert

Verteidigung am: 29.11.2005

Halle / Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009884

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009884>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand des Wissens	3
2.1	Grundlagen der Geschlechtsbestimmung	3
2.1.1	Geschlechtsbestimmungsmechanismen allgemein	3
2.1.1.1	Entwicklung der Geschlechtschromosomen	4
2.1.2	Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen	6
2.1.2.1	Sexuell monomorphe Pflanzen	7
2.1.2.2	Sexuell polymorphe Pflanzen	9
2.2	Hanf	11
2.2.1	Botanik	11
2.2.2	Cytologie	13
2.2.3	Molekulargenetik	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Pflanzenmaterial	15
2.1.2	Bakterien und Vektoren	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	DNA-Isolierung	15
2.2.1.1	Pflanzliche Gesamt-DNA	15
2.2.1.2	Bakterien Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Prep.)	15
2.2.2	Hanfpollenisolierung	16
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden	16
2.2.3.1	Standard PCR	16
2.2.3.2	RAPD (random amplified polymorphic DNA)	17
2.2.3.3	DOP-PCR (degenerated oligonucleotid primed-PCR)	17
2.2.3.4	I-PEP-PCR (improved primer extension preamplification-PCR)	17
2.2.3.5	PCR Walking	18
2.2.3.6	AFLP (amplified fragment length polymorphism)	19
2.2.3.7	Touchdown-PCR	20
2.2.4	DNA-Sequenzierung	20
2.2.5	Elektrophorese	21
2.2.6	Fragmentisolierung aus Elektrophoresegelen	21
2.2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	21
2.2.8	Bakterielle Dauerkulturen	22

Inhaltsverzeichnis

2.2.9	Sondenherstellung	22
2.2.10	Southern Blot	23
2.2.11	Blotten von Bakterienkolonien	23
2.2.12	DNA-DNA Hybridisierung	24
2.2.13	Chomosomenpräparation	24
2.2.14	FISH (Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung)	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Entwicklung männlich-spezifischer SCAR-Marker	28
3.1.1	Isolierung von männlich-spezifischen PCR-Fragmenten	28
3.1.2	Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer	29
3.1.3	Test der SCAR-Primer an männlichen und weiblichen Hanfpflanzen	31
3.2	Entwicklung PAR-spezifischer SCAR-Marker	32
3.2.1	Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer	34
3.2.2	Test der SCAR-Primer an Hanfpflanzen	37
3.3	Differenzielles Screening einer Hanf-DNA-Bank nach repetitiven geschlechtsspezifischen Klonen	41
3.4	Amplifikation von Pollen-DNA mit degenerierten Primern	43
3.5	PCR Walking	45
3.6	Southern-Blot Analyse	47
3.6.1	Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente	48
3.6.2	Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente	48
3.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	53
3.7.1	Chromosomenpräparation für die FISH	53
3.7.2	Etablierung der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung bei Hanf	54
3.7.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit geschlechtsspezifischen Sonden	55
3.7.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit PAR-spezifischen Sonden	56
4	Diskussion	64
4.1	Entwicklung geschlechtsspezifischer Sonden	64
4.1.1	Entwicklung von geschlechts- und PAR-spezifischen SCAR-Markern	64
4.1.1.1	Konvertierung von geschlechtsspezifischen RAPD-Markern in SCAR-Marker	66
4.1.1.2	Konvertierung von PAR-spezifischen AFLP-Markern in SCAR-Marker	67
4.1.2	Southern-Blot Analyse molekularer Marker	70
4.1.3	Screening von DNA-Banken nach geschlechtsspezifischen Klonen	74
4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	77

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Etablierung der FISH bei Hanf	78
4.2.2	FISH mit geschlechtsspezifischen Sonden	81
4.2.3	FISH mit PAR-spezifischen Sonden	84
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Anhang	103
	Abbildungsverzeichnis	103
	Tabellenverzeichnis	104
	Tabellen	105
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109

1. Einleitung

Hanf (*Cannabis sativa* L.) gehört aufgrund seines umfangreichen Anwendungsspektrums zu den bedeutendsten Nutzpflanzen in der Menschheitsgeschichte. Verwendung finden vor allem die Hanffasern (Textil- und Papierherstellung), die Hanfsamen (Nahrungsmittel und Ölproduktion) sowie die rausch-erzeugenden Blüten weiblicher Hanfpflanzen (für pharmazeutische sowie spirituelle Zwecke und als Genußmittel).

Da wichtige Eigenschaften des Hanfes wie Faserqualität und -quantität sowie der Rauschmittelgehalt stark vom Geschlecht der ursprünglich zweihäusigen (diözisch) Pflanze beeinflusst werden, wurde versucht einhäusige (monözisch) Hanfsorten zu züchten. Bei solchen einhäusigen Sorten spalten allerdings immer wieder rein männliche Pflanzen heraus (**Hoffmann, 1947; Bocsa et al., 1997**).

Umfassende Studien zur Aufklärung der komplizierten Vorgänge der Geschlechtsvererbung des Hanfes sind nötig.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe von molekularen und cytologischen Methoden das Wissen über die Struktur und die Organisation von geschlechtsgekoppelten DNA-Bereichen zu erweitern, um damit Einblick in die Geschlechtsvererbung diözischer Hanfformen zu erhalten. Die durch diese Arbeit entwickelten Methoden sollen zukünftig auch zur Klärung der Natur monözischer Hanfformen genutzt werden.

Der experimentelle Teil der Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Dabei liegt der Schwerpunkt im ersten Teil in der Identifizierung und molekularen Charakterisierung geschlechtsspezifischer DNA-Bereiche. Im zweiten Teil sollen diese DNA-Bereiche als Sonden genutzt werden, um ihre Position auf den Chromosomen des Hanfes mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) sichtbar zu machen. Die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist eine Kombination cytogenetischer und molekulargenetischer Methoden mit dem Ziel, mikroskopische Präparate mit markierten DNA-Sonden zu hybridisieren. Das Einsatzspektrum dieser Technik umfasst u. a. die physikalische Kartierung von DNA-Sequenzen, die Identifizierung und Charakterisierung von Chromosomen bzw. Chromosomensegmenten sowie die Identifikation chromosomaler Umbauten durch rezente evolutionäre Prozesse (**Schwarzacher und Heslop-Harrison, 2000**).

Um geschlechtsspezifische DNA-Fragmente zu identifizieren, wurden mehrere Strategien verfolgt. Zum einen sollten PCR-Techniken genutzt werden, um geschlechtsspezifische Marker zu entwickeln deren DNA-Fragmente als Sonde einsetzen werden können.

Zum anderen wurde getestet, ob geschlechtsspezifische Klone einer anderen diözischen Pflanzenart (*Silene latifolia*) als Sonde bei Hanf einsetzbar sind. Eine andere Strategie bestand in der Suche nach repetitiven geschlechtsspezifischen Klonen in einer Hanf-DNA-Bibliothek. Die Klone einer Hanf-DNA-Bibliothek sollten dazu mit männlichen bzw. weiblichen Sonden hybridisiert werden. Klone, die nur mit einer der Sonden hybridisieren, sollten für das entsprechende Geschlecht spezifisch sein. Als Sonden sollte gesamte DNA männlicher und weiblicher Hanfpflanzen verwendet werden. Hiermit wäre es möglich, männlich-spezifische Klone zu identifizieren. Weibliche Klone sind mit diesen Sonden nicht identifizierbar, da sowohl männliche als auch weibliche Hanf-DNA ein X-Chromatin enthält, dessen Hybridisierungssignale sich überlagern. Um dennoch weiblich-spezifische Klone identifizieren zu können, sollten Sonden aus dem haploiden Genom einzelner Hanfpollen hergestellt werden. Ausgegangen von der Annahme, dass Hanf X- und Y-Chromosomen besitzt, weisen die drei Kerne des Hanfpollens neben neun Autosomen jeweils nur je ein Geschlechtschromosom (X oder Y) auf. Durch eine Amplifikation der DNA einzelner Hanfpollen mit degenerierten Primern sollte genügend DNA für die Sondenherstellung erzeugt werden. Mit solchen Sonden kann eine Überlagerung der Hybridisierungssignale verhindert werden.

2 Stand des Wissens

2.1 Grundlagen der Geschlechtsbestimmung

2.1.1 Geschlechtsbestimmungsmechanismen allgemein

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

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

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

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

2.1.1.1 Entwicklung der Geschlechtschromosomen

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.2 Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen

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

2.1.2.1 Sexuell monomorphe Pflanzen

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

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

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

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

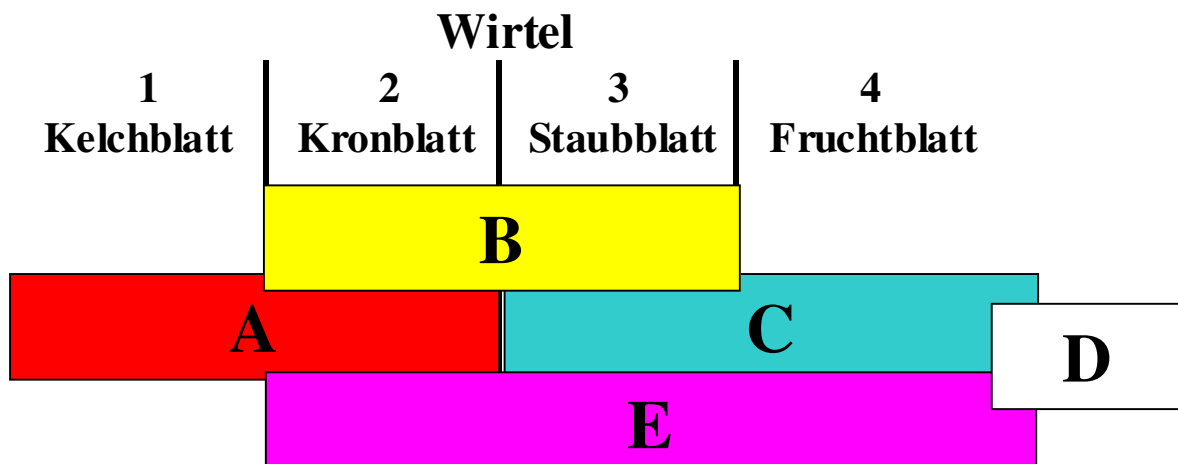


Abbildung 1.1: Modell der Steuerung der Blütenorganidentität

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

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

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

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

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

2.1.2.2 Sexuell polymorphe Pflanzen

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

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

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

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

Bei den diözischen bedecktsamigen Blütenpflanzen ist die Lichtnelke *Silene latifolia* L. am besten untersucht. Dort wird die Bildung unisexueller Blüten, ähnlich wie die Blüten monözischer Pflanzen, durch eine Einstellung der Entwicklung ursprünglich angelegter Androecien bzw. Gynoecien erreicht (Grant et al., 1994). Auch bei *Silene latifolia* wird die Geschlechtsdetermination durch Geschlechtschromosomen gesteuert. Das Y-Chromosom ist hier das größte Chromosom. Männliche Pflanzen sind heterogametisch (XY) und weibliche Pflanzen homogametisch vom Typ XX. Frühe Untersuchungen an Deletionsmutanten mit Deletionen am Y-Chromosom (Westergaard, 1958) führten zu der Erkenntnis, dass das Y-Chromosom über drei für die Geschlechtsexpression wichtige Regionen verfügt. Die erste Region wird als Su^F Region bezeichnet. Diese Region dient als Suppressor der Entwicklung weiblicher Organe. Im Gegensatz dazu kontrollieren die beiden anderen Regionen die Entwicklung der Antheren. Spätere Arbeiten von Farbos et al. (1999), Lardon et al. (1999) und Lebel-Hardenack et al. (2002) konnten diese Erkenntnisse bestätigen. Bisher war es möglich, vier Gene zu identifizieren, welche auf dem Y-Chromosom liegen. Bei diesen Genen handelt es sich um *SLY-1* (Delichere et al., 1999), *SLY-4* (Atanassov et al., 2001), *MROS3_Y^a* (Matsunaga et al., 1996; Guttman und Charlesworth, 1998) und *DD44Y* (Moore et al., 2003). Jedes dieser Gene besitzt ein homologes Gen auf dem X-Chromosom. Zusätzlich dazu scheint *MROS3_Y^a* zu einer Familie von low copy Genen zu gehören, deren Mitglieder auch auf den Autosomen verteilt sind (Kejnovsky et al., 2001). Männlich-spezifische Expression zeigten nur die Gene *SLY-1* und *MROS3_Y^a*. Diese Gene scheinen aber nicht die geschlechtskontrollierenden Orte zu sein, sondern werden eher geschlechtsabhängig kontrolliert (Charlesworth, 2002).

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

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

2.2 Hanf

2.2.1 Botanik

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

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

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

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

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

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

2.2.2 Cytologie

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

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

2.2.3 Molekulargenetik

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

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

Bei den Untersuchungen zur molekularen Geschlechtsdetermination konnten einige mit dem männlichen Geschlecht gekoppelte AFLP- und RAPD-Marker identifiziert werden. **Sakamoto et al. (1995)** fanden zwei RAPD-Primer, die 500bp bzw. 730bp große DNA-Fragmente nur mit DNA männlicher Pflanzen ein Fragment erzeugten. Die Umwandlung des männlich-spezifischen RAPD-Markers OPA₈₄₀₀ gelang **Mandolino et al., 1999**. Mit Hilfe der AFLP-Technologie gelang es **Flachowsky (2003)** eine Vielzahl von männlich-spezifischen Marker zu identifizieren. Dabei konnte die erfolgreiche Umwandlung von zwei männlich-spezifischen AFLP-Markern in SCAR-Marker demonstriert werden.

Ebenfalls bei AFLP-Markeranalysen an Hanf (**Flachowsky, 2003; Peil et al., 2003**) zeigten die mit dem Y-Chromosom des Vaters gekoppelten Marker AGA_AAT_330 und AGA_GAA_510 bei den Nachkommen eine Rekombinationsrate von $r=0,25$. Es wird angenommen, dass sich diese Marker auf einer Region des Y-Chromosom des männlichen Elters befinden, die Homologien zum X-Chromosom besitzt. Diese Marker weisen auf eine PAR (Pseudo Autosomale Region) auf den Geschlechtschromosomen des Hanfes hin.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die cytologischen Untersuchungen wurden Hanfpflanzen der diözischen Abstammung CAN 18 (Genbank, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben) sowie der diözischen ungarischen Faserhanfsorte `Kompolti` und Kreuzungen von `Kompolti` mit der diözischen Sorte `Skunk 1` verwendet.

Für die molekulare Markeranalyse sowie für die anderen molekularen Untersuchungen wurde DNA der diözischen Hanfpopulation A2 verwendet. Es handelt sich hierbei um 81 F₁-Nachkommen einer Kreuzung zweier Pflanzen der diözischen Abstammung CAN 18. Diese Population ist erstellt von **Flachowsky et al. (2001)**

2.1.2 Bakterien und Vektoren

Für Transformationen wurden kompetente One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* Zellen des Stammes TOP10F⁺ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. DNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.1.1 Pflanzliche Gesamt-DNA

Zur DNA-Isolierung wurde ein Protokoll nach **Saghai Maroof et al. (1984)** verwendet. Das Protokoll wurde wie bei **Flachowsky (2003)** modifiziert.

2.2.1.2 Bakterien Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Prep.)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien über Nacht (37°C, 200 rpm) in 2 ml LB-Medium mit 2 µl Amp₁₀₀ angezogen. Die Bakterien der Suspension wurden in einer

Zentrifuge 5 min bei 10000 rpm pelletiert und anschließend in 100 µl Plasmidlösung I resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation (auf Eis) zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl Plasmidlösung II dazu gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, mit 150 µl Plasmidlösung III versetzt, 5 min auf Eis gelagert und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ethanol bei -20°C gefällt und anschließend pelletiert. Die Plasmide wurden nach der Pelletierung 2 mal mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, im Vakuum getrocknet, in 40 µl 1 x TE/RNase-Puffer gelöst und 15 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Hanfpollenisolierung

Mit einer Präpariernadel wurden getrocknete Hanfpollen auf einen Objektträger mit 20 – 40 µl destilliertem Wasser gegeben. Mit Hilfe einer Glaskapillare, deren Öffnung 20 µm betrug, wurden unter dem Mikroskop aus dieser Pollensuspension einzelne Pollen isoliert und in 0,2 µl Tubes mit 10 µl destilliertem Wasser überführt.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden

2.2.3.1 Standard PCR

Die Standard PCR wurde in 1x PCR-Puffer Y (mit 15 mM MgCl_2 , PeqLab, Erlangen) mit 0,2 mM dNTP's, 0,25 µM forward Primer, 0,25 µM reverse Primer und 1 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) in den Thermocyclern T-Gradient (Biometra) bzw. TC480 (Perkin Elmer) durchgeführt. Standard PCR-Bedingungen beinhalteten:

Zyklenzahl	Schritt
1	5 min bei 94°C , initiale Denaturierungsphase
25 bis 35	1 min bei 94°C , Denaturierung
	1 min bei $37 - 60^{\circ}\text{C}$, Annealingphase
	1 – 5 min bei 72°C , Synthesephase
1	10 min bei 72°C , finaler Elongationsschritt

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend auf 4°C gekühlt. Die Annealingtemperaturen und Länge der Synthesephase sind abhängig von PCR-Methode, Primereigenschaften und DNA-Fragmentgröße.

2.2.3.2 RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Bei der RAPD-Technik wurden zur Amplifikation 0,25 µM Oligonucleotidprimer (10 Basenpaare) mit zufälligen Sequenzen verwendet. Es wurde eine Annealingtemperatur von 37°C und eine Synthesezeit von 2 min realisiert.

2.2.3.3 DOP-PCR (degenerated oligonucleotid primed-PCR)

DOP-PCR wurde mit dem DOP-PCR Master Kit (Roche, Mannheim) entsprechend der Anleitung durchgeführt. Amplifikationsbedingungen:

Zyklenzahl	Schritt
1	1 min bei 94°C, initiale Denaturierungsphase
5	1,5 min bei 30°C, Primerannealing
	3 min bei 30°C, Annealingphase mit Temperatursteigerung von 3,5°C/15 sec auf 72°C
	3 min bei 72°C, Synthesephase
35	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 62°C, Annealingphase
	2 min bei 72°C, Synthesephase (14 sec Synthesezeitverlängerung bei jedem folgenden Zyklus)
1	7 min bei 72°C finaler Elongationsschritt

2.2.3.4 I-PEP-PCR (improved primer extension preamplification-PCR)

Bei der I-PEP-PCR wurde der total degenerierte 15N Primer mit einer Sequenz von zufälligen 15 Nucleotiden verwendet. Amplifikationsbedingungen der I-PEP-PCR:

Zyklenzahl	Schritt
1	1 min bei 92°C Denaturierung
50	2 min bei 37°C Annealing, mit Temperatursteigerung von 0,1°C/sec auf 55°C und anschließenden 30 sec bei 68°C

Dabei wurden 16 μM 15N Primer, 0,1 mM dNTP, 2,5 mM MgCl_2 , 1 x High Fidelity PCR Puffer (Roche, Mannheim) und 3,6 U Expand High Fidelity Polymerase (Roche, Mannheim) eingesetzt.

2.2.3.5 PCR Walking

Beim PCR Walking wurden je 2,5 μg DNA mit verschiedenen blunt-ends produzierenden Restriktionsenzymen (je 80 U: *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI*, *SmaI* und *SspI*) geschnitten. An die Enden der entstandenen Fragmente wurde in einem Ansatz aus Ligationspuffer, 10 U T4 Ligase und 5 μM Adapter mit bekannter Sequenz (Adaptersequenz siehe **Tabelle 7.2** im Anhang) über Nacht bei 15°C ligiert.

Anschließend wurde eine PCR mit adapter- bzw. fragmentspezifischen Primerpaaren (je 10 μM , Länge: 27 bis 30 bp) unter Verwendung von 1 μl geschnittener DNA, 6 U Advantage Genomic Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg), 1 x PCR-Puffer (Clontech, Heidelberg), 0,2 mM dNTP's sowie mit 5,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ durchgeführt. Die PCR wurde als 2-Schritt-Amplifikation zuerst mit einem außen und anschließend mit einem innen liegenden Primerpaar (nested PCR) gestaltet.

1. Amplifikation:

Zyklenzahl	Schritt
7	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 72°C, Annealing/Primer Extension
32	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 67°C, Annealing/Primer Extension
1	7 min bei 67°C, finale Extension

Die Amplifikationsprodukte der ersten PCR wurden 1:50 verdünnt und in einer zweiten PCR mit dem innen liegenden adapter- bzw. fragmentspezifischen Primerpaar eingesetzt.

2. Amplifikation:

Zyklenzahl	Schritt
5	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 72°C, Annealing/Primer Extension
20	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 67°C, Annealing/Primer Extension
1	7 min bei 67°C, finale Extension

2.2.3.6 AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Die AFLP-Technik wurde nach einem modifiziertem Protokoll von Vos et al. (1995) durchgeführt. Dabei wurden 2 µg Gesamt-DNA mit den Restriktionsenzymen *MseI* und *HindIII* geschnitten. An die Enden der entstandenen DNA-Fragmente wurden schnittstellen-spezifische Adapter ligiert. Der Ligationsansatz bestand aus 0,25 U T4 Ligase, 1 x RL Puffer, 1,2 mM ATP sowie je 2,5 mmol *MseI* und *HindIII*-Adapter. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15°C.

In der sich daran anschließenden Preamplifikation wurden 5 µl Ligationsansatz zusammen mit 1 x PCR-Puffer Y (PeqLab, Erlangen), 1 x Enhancer-Solution (PeqLab, Erlangen), 200 µM dNTP's, 75 ng Preamplifikationsprimer (*HindIII*+A und *MseI*+A) und 5 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) in einem 50 µl Amplifikationsansatz unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Zyklenzahl	Schritt
20	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 60°C, Annealingphase
	2 min bei 72°C, Synthesephase
1	10 min bei 72°C, finale Elongation

Die Preamplifikationsprodukte wurden 1:20 mit Wasser verdünnt und 2,5 µl davon in einem weiteren Amplifikationsschritt mit Primern mit drei selektiven Basen eingesetzt. Der 20 µl Amplifikationsansatz bestand aus 1 x PCR-Puffer (PeqLab, Erlangen), 1 x Enhancer-Solution (PeqLab, Erlangen), 10 ng *HindIII*+ANN Primer (Cy3-markiert), 60 ng *MseI*+ANN Primer, 200 µM dNTP's und 0,1 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen). Die Amplifikationsbedingungen waren folgendermaßen gestaltet:

Zyklenzahl	Schritt
9	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 65°C, Annealingphase
	1,5 min bei 72°C, Synthesephase, nach jedem Zyklus: Senkung der Annealingtemperatur um 1°C
23	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 56°C, Annealingphase
	1 min bei 72°C, Synthesephase

2.2.3.7 Touchdown-PCR

Zur Erhöhung der Produktspezifität wurde ein Touchdown Protokoll durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ausgangsreagenzien entsprach der einer Standard PCR. Die Amplifikationsbedingungen gestalteten sich dabei folgendermaßen:

Zyklenzahl	Schritt
1	5 min bei 94°C, initiale Denaturierungsphase
7	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 64°C, Annealingphase, Reduzierung der Annealingtemperatur um 1°C je Zyklus
	1 min bei 72°C, Synthesephase
25	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 54°C, Annealingphase
	1 min bei 72°C, Synthesephase
1	10 min bei 72°C, finaler Elongationsschritt

2.2.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend der Anleitung durchgeführt und mit einem ALFexpress™ DNA-Sequencer (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet.

2.2.5 Elektrophorese

AFLP- und Sequenzierungsreaktionen wurden auf 0,5 mm dicken denaturierenden PAA-Gelen (7 M Urea, 6% PAA, 1 x TBE) mit 0,5 x TBE als Laufpuffer in einem ALFexpress™ DNA-Sequencer (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetrennt. Dabei wurden 3-6 µl Amplifikationsprodukte mit der gleichen Menge AFLP-Ladepuffer versetzt, denaturiert (90 sec bei 70-90°C) und für 540 min bei 1500 V, 38 mA, 34 W, 50°C und einem Samplingintervall von 2 sec elektrophoretisch getrennt.

Die Auswertung der Gele erfolgte mittels der Software: ALFwin™ Version 1.00, ALFwin™ Sequence Analyser 2.00 bzw. ALFwin™ Fragment Analyser (Amersham Biosciences, Freiburg).

Zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde Agarose in 1 x TAE auf eine Endkonzentration von 0,7 bis 1,5% gelöst und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid dazugegeben. Die DNA wurde mit 1 x Ladepuffer (B oder Y) versetzt und in 1 x TAE bei 10-100V 1-16 h lang aufgetrennt und unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage ausgewertet.

2.2.6 Fragmentisolierung aus Elektrophoresegelen

AFLP-Fragmente wurden nach **Flachowsky et al. (2001)** aus PAA-Gelen isoliert. Das Eluieren des Fragments aus dem Gel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß der Anleitung.

PCR-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit der freeze-squeeze Methode eluiert. Das Fragment wurde auf dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde das ausgeschnittene Gelstück in ein 0,5 ml Tube überführt, dessen Boden vorher mit einem Viskosewollestück und drei kleinen Löchern versehen wurde. Das Tube mit dem Gelstück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend wieder aufgetaut, in ein 1,5 ml Tube gesetzt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform gereinigt, mit Ethanol gefällt, pelletiert und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Kalsruhe) kloniert. Dazu wurden in einem Ligationsansatz 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl,

0,06 M MgCl₂) und 1 µl pCR[®]2.1-TOPO[®] Vector vereinigt. In Abhängigkeit von der Größe der zu ligierenden Fragmente wurden nach 5 bis 30 min Inkubation bei Raumtemperatur 2 µl dieses Ligationsansatzes in ein 2 ml Tube mit 50 µl One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C und einer weiteren Lagerung auf Eis wurden zu den Zellen 250 µl SOC-Medium gegeben und diese für 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 50 und 200 µl davon auf LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 0,1 mM IPTG, 40 µg/ml X-GAL) ausplattiert und im Inkubator über Nacht bei 37°C angezogen.

DNA-Fragmente ohne A-Überhänge (z. B. PCR Walking Fragmente) wurden vor der Ligation in einem 10 µl Ansatz mit 1 x PCR-Puffer (PeqLab, Erlangen), 0,1 mM dNTP's und 2-5 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) für 10 min bei 72°C inkubiert.

2.2.8 Bakterielle Dauerkulturen

Einzelne *E. coli* Kolonien wurden in 2 ml LB_{Amp100} Flüssigmedium bei 37°C und 200 rpm über Nacht angezogen. 800 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 800 µl Glycerin gemischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.9 Sondenherstellung

DNA-Fragmente wurden durch Markierung mit Biotin, Digoxigenin (DIG) oder radioaktiven Isotopen (³²P) in Sonden umgewandelt.

Die Biotin-Markierung erfolgte mittels PCR. Dabei wurde ein Nukleotidmix eingesetzt, welcher Biotin-markiertes dUTP enthielt.

Die DIG-Markierung mittels PCR erfolgte analog durch den Einsatz des PCR DIG Labeling Mixes (Roche, Mannheim).

Große Fragmente (>1000 bp) und klonierte Fragmente, für die keine Primer zur Verfügung standen, wurden mit dem DIG-Nick Translation Mix (Roche, Mannheim) markiert. Dazu wurden in einem 16 µl Ansatz 1 µg DNA mit 4 µl DIG-Nick Translation Mix gemischt und bei 15°C für 90 min inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und 10-minütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

Radioaktiv markierte Sonden wurden für das Screening einer DNA-Bank eingesetzt. Die Sonden-DNA wurde dazu mit den Restriktionsenzymen *HindIII* geschnitten und anschließend mit dem Rediprime™II Random Prime Labellin System (Amersham Biosciences, Freiburg) radioaktiv (^{32}P) markiert. Dazu wurden 16 μl (25-45 ng) Sonden-DNA zusammen mit dem Labeling Mix und 50 μCi ^{32}P dCTP in ein Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 100°C gestoppt.

2.2.10 Southern Blot

Für das Southern Blotting wurden 10 mg Gesamt-DNA mit je 40 U Restriktionsenzym (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*) in 1 x Reaktionspuffer bei 37°C über Nacht verdaut. Der 200 μl Restriktionsansatz wurde mittels Ethanol gefällt, pelletiert und in 20 μl TE-Puffer gelöst. Die gelöste DNA wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und bei 15 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel zum Denaturieren 2 mal 15 Minuten in Denaturierungspuffer und anschließend für 2 mal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Die DNA wurden daraufhin auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) geblottet (**Southern, 1975**), in 2 x SSC gewaschen und mittels UV-Licht 10 Minuten unter einem Crosslinker auf der Membran fixiert.

2.2.11 Blotten von Bakterienkolonien

In 384er Platten angezogene Bakterienkolonien wurden mit Hilfe eines 384er Stempels auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) gestempelt. Jede Kolonie wurde auf der selben Membran diagonal zum ersten Stempelabdruck ein zweites Mal gestempelt, um Artefakte bei der Hybridisierung zu erkennen.

Die Membranen mit den aufgestempelten Kolonien wurden über Nacht bei 37°C zum Wachsen auf LB-Medium gelegt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Auflegen für 3 min auf mit 10% SDS getränktes 3MM Whatmann Papier. Anschließend wurden die Membranen 3 min lang auf mit Denaturierungspuffer getränktem Whatmann Papier aufgelegt. Zur Neutralisierung wurden die Membranen 2 mal 3 min auf mit Neutralisierungspuffer getränktem Whatmann Papier gelegt. Anschließend wurden die Membranen in 2 x SSC gewaschen und 1 h bei 80°C gebacken. Nach einer einstündigen Behandlung mit 1 ml Proteinase K (1 mg/ml) bei 37°C wurden die Filter zwischen 2 Lagen H₂O getränktes 3MM Whatman Papier gelegt.

Zum Entfernen der Proteine wurde die obere Lage Whatmanpapier mit Druck auf die Membran gepresst. Dieser Vorgang wurde mit jeweils neuen Lagen Whatman Papier mehrfach wiederholt. Die von den Proteinen gereinigten Membranen wurden abschließend in 2 x SSC eingeschweißt und bei 7°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.12 DNA-DNA Hybridisierung

Nylon-Membranen mit geblotteter DNA wurden in einer Hybridisierungsröhre für eine Stunde in 15-20 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C im Drehofen vorhybridisiert.

Die DIG-markierte Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gelagert und zusammen mit 15-20 ml frischem Hybridisierungspuffer und 100 mg/ml Heringssperma-DNA in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 65°C über Nacht im Drehofen.

Anschließend folgten die stringenten Waschungen 2 x 15 min in 2 x SSC und 0,1% SDS bei Raumtemperatur bzw. in 0,1 x SSC und 0,1% SDS bei 65°C. Nach fünfminütigem Waschen in Waschpuffer folgte eine Inkubation in 1 x Blockierungspuffer bei 37°C für 30 Minuten. Danach wurde die Membran 30 min mit Anti-DIG AP und Blockierungspuffer (1:10000) behandelt. Nach 5 min im Waschpuffer wurden die Nylon-Membran 5 min mit Detektionspuffer behandelt. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei PE-Folien gelegt und 5 min in Detektionspuffer und CSPD (100:1) inkubiert. Die Membran wurde in eine neue Folie einschweißt und 15 min bei 37°C im Dunkeln gelagert. Ein Chemilumineszenzfilm wurde anschließend zusammen mit der Membran in einer Belichtungsbox 2 bis 24 Stunden exponiert. Radioaktiv markierte Sonden wurden zusammen mit den Nylon-Membranen über Nacht in ³²P Hybridisierungspuffer bei 65°C hybridisiert. Nach den stringenten Waschungen (analog zur DIG-Detektion) erfolgte die Exposition auf Röntgenfilm oder K-Screen (BioRad).

2.2.13 Chromosomenpräparation

Zur Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde meristematisches Gewebe von Hanfwurzelspitzen bzw. männlichen Hanfblüten verwendet.

Wurzelspitzenpräparate wurden hergestellt, indem Hanfsamen im Dunkeln bei 24°C auf mit destilliertem Wasser angefeuchtetem Filterpapier zum keimen gebracht wurden, bis die Keimwurzeln eine Länge von 1 bis 2 Zentimeter erreichten. Zur Synchronisation der Zellen wurden

die Wurzelspitzen 8 bis 17 Stunden auf mit 1,25 mM Hydroxyharnstofflösung getränkten Filterpapier inkubiert. Um die Meristemzellen der Wurzelspitzen im Stadium der mitotischen Metaphase anzureichern, wurden die vom Samen abgetrennten Keimwurzelspitzen einer 19- bis 21stündigen Eiswasserbehandlung unterzogen oder für vier bis sechs Stunden mit 0,05% iger Kolchizinlösung behandelt. Zur Fixierung der Wurzelspitzen wurde eine Lösung aus 3 Teilen 98% Ethanol und 1 Teil Eisessig verwendet. Diese Lösung wurde auch zur Fixierung und Aufbewahrung männlicher Hanfblütenstände verwendet.

Vor der Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde das fixierte Gewebe einem enzymatischen Verdau unterzogen. Dazu wurde das Gewebe 3 x 10 min in 1 x Enzympuffer (40 mM Zitronensäure, 60 mM Natriumcitrat, pH 4,8) gewaschen, um den Alkohol aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde das Pflanzengewebe in einem Enzymgemisch inkubiert, welches Zellwände und Proteine abbaut. Dazu wurde Wurzelspitzengewebe für 1 bis 2 Stunden bei 37°C in einem Gemisch aus 2% Cellulase, 20% Pektinase und 1% Pectolyase 1x Enzympuffer inkubiert. Beim enzymatischen Verdau von Hanfblüten wurde diesem Enzymgemisch 1%ige Cytohelikase beigefügt.

Von den Wurzelspitzen wurde anschließend der vorderste, das meristematische Gewebe enthaltende Teil entfernt, auf einen Objektträger überführt, in 60%iger Essigsäure zerkleinert und anschließend mit einem Deckgläschen gequetscht.

Einzelne Hanfblüten wurden nach der Enzymbehandlung in 60%iger Essigsäure auf dem Objektträger zerkleinert. Anschließend wurde der Objektträger auf eine 50°C heiße Heizplatte gelegt. Mit kreisenden Bewegungen einer Präpariernadel wurde diese Gewebesuspension ca. 60 Sekunden lang verteilt. Danach wurden die Objektträger mit 3:1 Fixierlösung überspült und getrocknet.

Fertiggestellte Präparate wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht, um Zellteilungsstadium und Präparatqualität festzustellen.

Geeignete Präparate wurden in einer Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol) entwässert und anschließend luftgetrocknet. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20°C.

2.2.14 FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde als Multicolor FISH durchgeführt, dabei konnten gleichzeitig zwei unterschiedlich markierte DNA-Sonden (Biotin- bzw. Digoxigenin Markierung) für die Hybridisierung eingesetzt werden.

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit Auflicht-Fluoreszenzmikroskopen (Zeiss Axioskop).

Das Protokoll für die Durchführung der FISH ist in **Tabelle 2.1** angegeben

Tabelle 2.1

Präparatvorbehandlungen	- spülen der Chromosomenpräparate für 10 min in 2 x SSC
	- RNase-Behandlung (RNaseA 100 ng/μl für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer)
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Proteinverdau (Proteinase K 1 ng/μl) 15 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Nachfixierung der Präparate für 10 min bei Raumtemperatur in 4%iger Paraformaldehydlösung (in 2 x PBS gelöst)
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Dehydrierung der Präparate in Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol)
	- Lufttrocknung der Präparate
Sondenvorbereitung	- 70-100 ng Sonden-DNA mit 9 μg Heringssperma-DNA mischen
	- Fällung der DNA mit 98% Ethanol und Pelletierung
	- pelletierte Sonden in 10-11 μl deionisiertem Formamid (Stringenz 77-80%) und 10 μl Hybridisierungsmix bei 200 rpm 45 min lang lösen
	- Denaturierung der Sonde für 7 min bei 80°C
Hybridisierung	- Auftropfen von 20 μl Hybridisierungsprobe auf den Objektträger des Chromosomenpräparates
	- abdecken mit Deckglas (21x26 mm) und Versiegelung mit Fixogum
	- Denaturierung für 7 min bei 80°C auf einer Heizplatte
	- Hybridisierung über Nacht bei 37°C in der Feuchtekammer
stringente Waschungen	- 3 x 5 min in 2 x SSC bei 37°C
	- 3 x 5 min in 0,1 x SSC bei 42°C
	- 2 x 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur
Blockierung unspezifischer Sondenbindstellen	- Zugabe von 30 μl Blockierungslösung und Inkubation für 30 min in der Feuchtekammer
Immunologische Detektion der Biotin-markierten Sonden mit Primärantikörpern	- auftropfen von 30 μl Detektionspuffer mit 198 ng Cy3-Streptavidin (Camon, Wiesbaden)
	- Inkubation für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C

Fortsetzung Tabelle 2.1

Amplifikation der Biotinmarkierten Sonden bzw. Detektion der DIG-markierten Sonden mit Primärantikörper	- auftropfen von 30 µl Detektionspuffer mit 6 ng/µl biotinyliertes Anti-Streptavidin (Camon, Wiesbaden) und 6 ng/µl Schaf Anti-DIG-FITC (Roche, Mannheim)
	- Inkubation für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C
Signalverstärkers mit sekundären Antikörpern	- auftropfen von 25 µl Detektionspuffer mit 6 ng/µl Cy3-Streptavidin (Camon, Wiesbaden) und 6 ng/µl Anti-Schaf-FITC (Dianova, Hamburg)
	- Inkubation für 30 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C
Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI	- auftropfen von 25 µl Detektionspuffer (25 ng DAPI)
	- Inkubation für 4 min im Dunkeln
	- Färbungsabbruch durch kurzes Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei Raumtemperatur
	- Einbettung der Präparate in 15 µl Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingham) sowie Abdeckung mit Deckgläschen
Entfernung der Sonden von den Objektträgern (für erneute Hybridisierungen)	- Erwärmung des Objektträgers bei 37°C für 10 min zur Reduzierung der Viskosität der Antifadinglösung (Vectashield®)
	- Entfernung des Deckglases
	- 5 min waschen der Objektträger in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei RT
	- 2 x 30 min waschen der Objektträger in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei RT
	- 2 x 5 min Inkubation der Objektträger in 2 x SSC bei RT
	- Dehydrierung mit einer Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol)

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung männlich-spezifischer SCAR-Marker

3.1.1 Isolierung von männlich-spezifischen PCR-Fragmenten

Zwei im Rahmen einer Diplomarbeit (Riedel, 2000) entwickelte männlich-spezifische RAPD-Marker OPC-11₂₇₀₀ (Abb. 3.1 A) und OPE-11₃₀₀ sollten in sequenzspezifische SCAR-Marker umgewandelt werden. Die männlich-spezifischen Banden der RAPD-Amplifikationsprodukte wurden aus einem Agarosegel ausgeschnitten, eluiert und kloniert.

Vom Fragment OPC-11₂₇₀₀ wurden 96 positive Klone (weiße Kolonien) selektiert und in LB-Flüssigmedium angezogen. Parallel dazu wurde die Insertgröße der positiven Kolonien in einer PCR mit plasmidspezifischen Primern (M13) überprüft. (Abb. 3.1 B). Zwei Klone (Klone 4 und 87) wiesen die erwartete Fragmentgröße von ca. 2900 bp auf (2700 bp Fragment + 200 bp Plasmidsequenz). Von beiden Klonen wurden Dauerkulturen angelegt. Das Fragment OPE-11₃₀₀ konnte nicht erfolgreich kloniert werden.

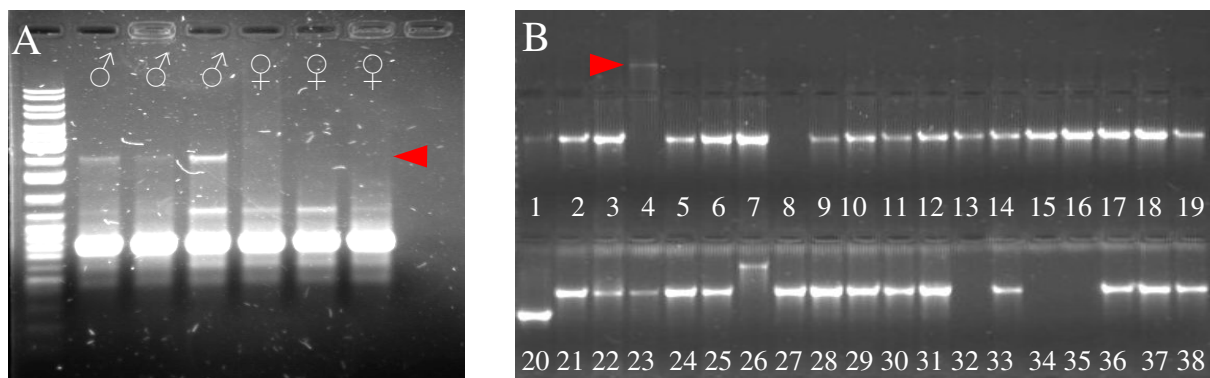


Abb. 3.1: Isolierung und Klonierung des RAPD-Markers OPC-11₂₇₀₀

A: RAPD-PCR mit dem Primer OPC-11 an drei männlichen (A2/9, A2/37 und A2/39) und drei weiblichen Pflanzen (A2/3, A2/13 und A2/15). Der Pfeil markiert das männlich-spezifische Fragment (ca. 2,7 kb).

B: Überprüfung der Insertgröße: Ausschnitt aus einem Agarosegel mit herausamplifizierten Inserts der Klone. Der Pfeil markiert den Klon 4 mit der korrekten Insertgröße von 2900 bp.

3.1.2 Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer

Die Klone 4 und 87 des RAPD-Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ wurden zur Überprüfung ihrer Sequenz und zur Herleitung von spezifischen Primern mit universen bzw. reversen Sequenzierungsprimern von beiden Seiten ansequenziert. Beide Klone wiesen identische Sequenzen auf. An beiden Enden des Fragmentes konnten die Primingsites des RAPD-Primers OPC-11 aufgefunden werden. Ein Sequenzvergleich der Daten des Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ mit der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Sequenzdatenbank (blastn) brachte keine signifikanten Sequenzhomologien. Ein blastx Vergleich zeigte Homologien ($e = 2^{-79}$) zu einem gag / pol Vorläuferprotein des *Gret1* Retrotransposons bei *Vitis vinifera*. (**Abb. 3.2**). Weiterhin bestanden Homologien zu gag / pol Vorläuferproteinen von Retroelementen bei Reis und *Beta vulgaris*.

```
GAG-POL precursor [Vitis vinifera]
Length = 1027
Score = 224 bits (571), Expect (2) = 2e-79
Identities = 109/244 (44%), Positives = 152/244 (62%), Gaps = 4/244 (1%)
Frame = +2

Query: 2      KLRQRAARYVIYDGRLYRGSFSQPLKCIDGEDCDYVLEVVHGGICGNHTGVNSLALKIM 181
             K+R +AAR+ + G LY+ SF+ P L+C+ + YVL E+H GI GNH+G SLA +
Sbjct: 639    KVRVQAARFTLIGGHLYKRSFTGPYLRLCLGHSEAQYVLAELHEGIYGNHSGGRSLAHRAH 698

Query: 182    RQRYWPTLRQDTFTFAKKCDKQCRIATYAHQPLSQLQSITSPWPFVAVCGID*IGKLPKG 361
             Q YYWPT++++ + K+CDKQCQR A H P + L+SI+ PWPFA G+D + LP
Sbjct: 699    SQGYWPTMKKEAAAYVKRCDKQRYAP IPHMPSTTLKSI SGPWPFQWGM DIVRPLPTA 758

Query: 362    KGGVKYIAVAVDYFTKWTEAKALATITSTKFRFVYNSIIFRFGVPYKLISDNGKQFDC- 538
             K++ VA DYF+KW EA+A A+ +FV+ +II RFG+P +I+DNG QFD
Sbjct: 759    PAQKKFLLVATDYFSKWVEAEAYASTKDKDVTKFVWKNLICRFGIPQTI IADNGPQFDSI 818

Query: 539    ---QLCDNLGIKKAFAVAYPQSNQTEAVNKI IKHTIKGKLIERKGLLPDELSQVL*SY 709
             C L I+ ++S YPQSNQ EA NK + +K +L + KG +EL VL +Y
Sbjct: 819    AFRNFCSELNIRNSYSTPRYPQSNQAEATNKTLITALKKRLEQAKGKWEELPGVLWAY 878

Query: 710    NTTP 721
             TTP
Sbjct: 879    RTTP 882
```

Abb 3.2: Blastx Vergleich der Sequenz des RAPD-Fragmentes OPC-11₂₇₀₀

Vergleich der translatierten Nukleinsäuresequenz des Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ (rot) mit der NCBI-Proteindatenbank (blastx). 44% Homologie zum gag / pol Vorläuferprotein (blau) eines Retrotransposons bei Wein.

Die Sequenz enthält drei offene Leseraster (open reading frame, ORF). Davon zeigte ein 120 Aminosäuren langes ORF Homologien zu der Integrase Kerndomäne von retroviralen Elementen.

Um das Fragment in einer spezifischen PCR zu amplifizieren, wurde das SCAR-Primerpaar C11Komp_L + C11Komp_R abgeleitet (**Abb. 3.3**). Da das RAPD-Fragment OPC-11₂₇₀₀ aufgrund seiner Größe nicht in einem Zug durchsequenziert werden konnte, wurde für eine weitere Sequenzierung der weiter innerhalb der Sequenz liegender Primer C11Seq_L abgeleitet (Sequenzen der Primer: siehe **Tabelle 7.2 Anhang**).

1	<u>AAAGCTGCGG</u>	CAACGGGCTG	CCCGATATGT	CATATATGAT	GGAAGATTAT
	<u>CGTGGAAG</u>	<u>CTTCAGTCAA</u>	CC	▶	
51	ATCGTGGAAG	CTTCAGTCAA	CCGTTACTTA	AATGTATCGA	CGGGGAAGAT
101	TGCGACTACG	TACTCCGTGA	GGTGCACGGA	GGTATTTGTG	GGAATCATA
151	TGGTGTTAAT	TCCCTTGCCC	TAAAAATCAT	GCGACAACGG	TATTACTGGC
201	CTACCTTGCG	ACAAGACACT	TTCACCTTCG	CAAAAAAATG	CGACAAATGT
251	CAGCGGATAG	CCACATATGC	CCACCAACCT	CTGAGCCAGT	TGCAGTCCAT
301	CACAAGCCCT	TGGCCCTTTG	CAGTTTGCGG	CATCGACTAG	ATAGGTAAAT
			<u>CAAGTATA</u>	<u>TTGCAGTCGC</u>	<u>GG</u> ▶
351	TACCCAAAGG	AAAAGGCGGA	GTCAAGTATA	TTGCAGTCGC	GGTCGACTAC
401	TTCACGAAAT	GGACTGAGGC	CAAAGCACTA	GCAACCATCA	CATCGACTAA
451	GTTTCGTGAG	TTTGTCTACA	ACTCCATAAT	CTTTCGATTT	GCGTCCCTT
			.		
			.		
			.		
101	TGTACGCTAT	ACAATGGACT	ACAACCAGCT	CTTCAAACGA	ACCTCTCCGC
51	AAACAGATAG	GCGATAACAA	CAAAGAGTCT	ACCGAGGAAC	ATGTAACCGA
1	GAGAGACTTC	CGAGCGTAAG	AGACCTTAGT	TGAACACAAG	<u>GCGTTCGAAA</u>
	▶ <u>AGACTTC</u>	<u>CGAGCGTAAG</u>			

Abb. 3.3: Sequenz der beiden Enden des Fragmentes OPC-11₂₇₀₀

Abgebildet ist die Sequenz der Enden des Fragmentes OPC-11₂₇₀₀ aus Klon 4. Die Bindestellen des RAPD-Primers OPC-11 sind grün markiert. Die blau markierten Sequenzen stellen die Primer C11Komp_L bzw. C11Komp_R dar. Die rote Sequenz markiert den Primer C11Seq_L.

3.1.3 Test der SCAR-Primer an männlichen und weiblichen Hanfpflanzen

Zum Test der Spezifität der abgeleiteten SCAR-Primer wurden diese zunächst in PCRs mit DNA von je 10 männlichen bzw. weiblichen Hanfpflanzen der Population A2 eingesetzt. Dabei wurden die optimalen PCR-Bedingungen für die entsprechenden Primer mittels Gradienten-PCR ermittelt.

Mit den Primern C11komp_L und C11komp_R wurden bei Annealingtemperaturen bis 60°C vier Banden amplifiziert. Durch Erhöhung der Annealingtemperatur bis 68°C ließ sich die Bandenzahl auf nur eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 2500 bp verringern. Diese Bande konnte bei allen männlichen aber auch bei einigen weiblichen Pflanzen amplifiziert werden. Mit der Primerkombination C11Seq_L und C11Komp_R dagegen konnte bei einer Temperatur von 65°C neben zwei bis drei unspezifischen Banden (deutlich in **Abb. 3.5** zu sehen) ein ca. 2,2 kb großes Fragment amplifiziert werden, das nur bei männlichen Pflanzen auftrat (**Abb. 3.4**).

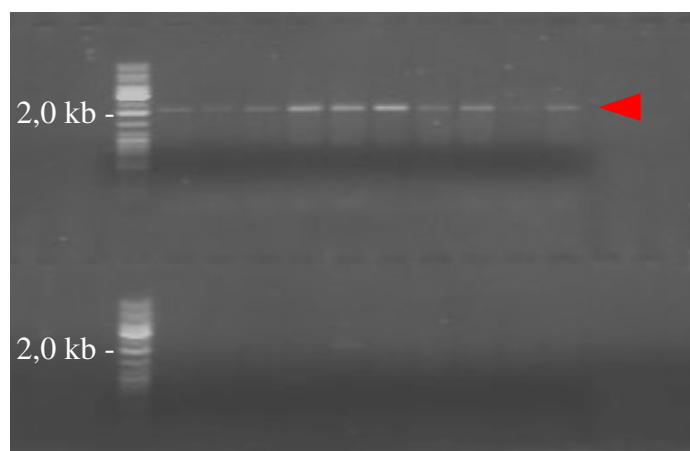


Abb. 3.4: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare

Test des Primerpaares C11Seq_L und C11Komp_R an je 10 männlichen (oben) und weiblichen (unten) Pflanzen. Der Pfeil markiert das männlich-spezifische Fragment.

Die Überprüfung der Spezifität der Primerkombination C11Seq_L + C11Komp_R wurde an 74 Pflanzen der Population A2 durchgeführt. Das geschlechtsspezifische Spaltungsverhalten der Kombination der Primer C11Seq_L + C11Komp_R konnte durch die Amplifikation des ca. 2,2 kb großen Fragmentes bei allen 29 männlichen Pflanzen bestätigt werden (**Abb. 3.5**). In **Tabelle 7.1** (Anhang) sind die Daten des Markers für die einzelnen Pflanzen dargestellt.

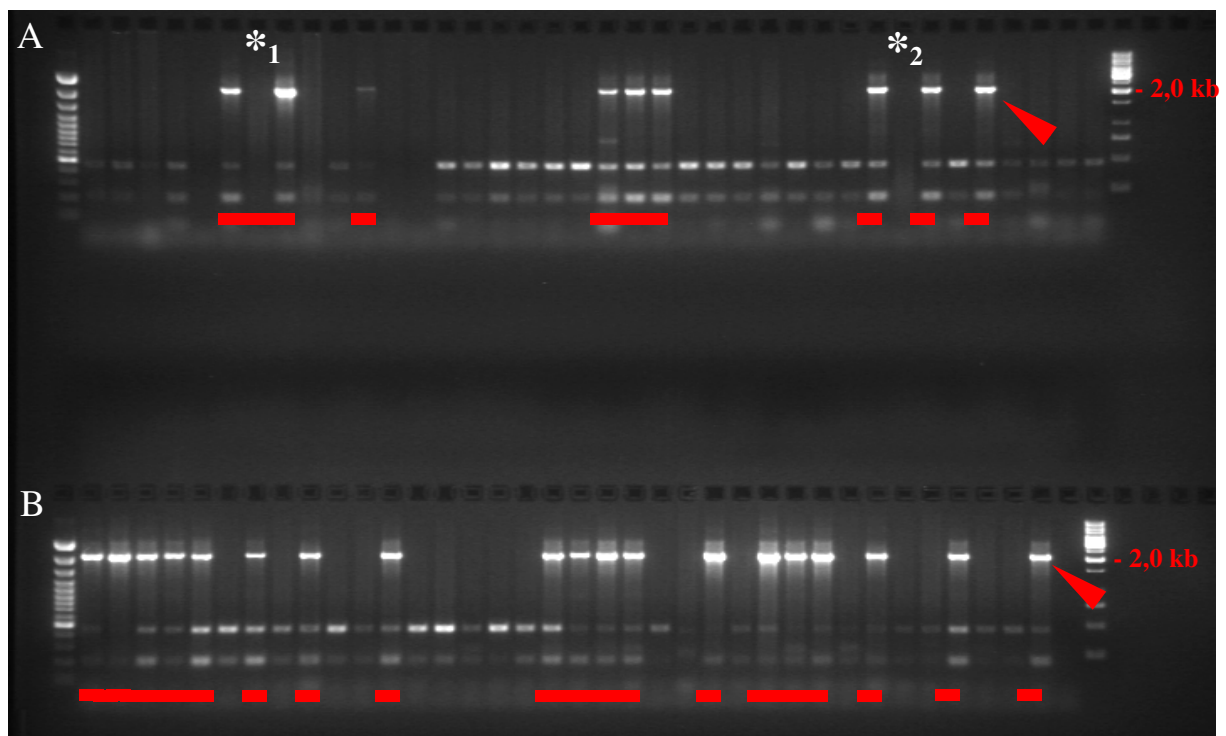


Abb. 3.5: Test des männlich-spezifischen SCAR-Primers C11Seq_L + C11Komp_R an 74 Einzelpflanzen der Population A2.

Amplifikation von DNA der 74 Pflanzen der Population A2 mit der Primerkombination C11Seq_R und C11Komp_L. Spuren mit DNA männlicher Pflanzen sind durch rote Balken gekennzeichnet. Das männlich-spezifische Fragment von ca. 2,2 kb Größe ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

A: 100 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/1 bis A2/45, 1 kb Ladder (Fermentas);

B: 100 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/46 bis A2/100, Negativkontrolle (H₂O), 1 kb Ladder (Fermentas). Anordnung der Pflanzen: siehe **Tabelle 7.1**

*₁ A2/11 fehlendes Fragment bei wiederholter PCR nachweisbar

*₂ A2/38 kein Amplifikationsprodukt erzeugbar (DNA Degradierung)

3.2 Entwicklung PAR-spezifischer SCAR-Marker

In vorausgegangenen Untersuchungen (Flachowsky, 2003; Peil et al., 2003) wurden für die Pseudo Autosomale Region (PAR) der Geschlechtschromosomen des Hanfes spezifische AFLP-Marker gefunden. Die PAR-spezifischen Fragmente der AFLP-Marker AGA_AAT_330 (Abb. 3.6) und AGA_GAA_510 sollten aus PAA-Gelen isoliert und in SCAR-Marker umgewandelt werden. Dazu wurde DNA der Pflanze A2/11 mit der Primer-

kombination *Mse*I+AAT und *Hind*III+AGA amplifiziert, auf ein PAA-Gel geladen, um anschließend das PAR-spezifische Fragment AGA_AAT_330 zu isolieren. Analog dazu wurde bei dem Marker AGA_GAA_510 vorgegangen. Hier wurde das PAR-spezifische Fragment aus DNA der Pflanze A2/9 amplifiziert. Nach Eluierung, Reamplifikation und Klonierung (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen) der isolierten Fragmente wurden je 96 positive Klone selektiert. Anschließend wurden 50 positive Klone mit den selektiven AFLP-Primern *Mse*I+AAT und *Hind*III+AGA (Marker AGA_AAT_330) bzw. *Mse*I+GAA und *Hind*III+AGA (Marker AGA_GAA_510) amplifiziert und auf ein PAA-Gel geladen. Zur Überprüfung der korrekten Insertgröße wurden die Amplifikationsprodukte der AFLP-PCR der Pflanzen A2/8 und A2/11 für den Marker AGA_AAT_330 bzw. A2/9 für den Marker AGA_GAA_510 mit auf das Gel aufgetragen (**Abb. 3.7**).

Abb. 3.6: AFLP-Gel mit dem Marker AGA_AAT_330.

Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Primerkombination *Mse*I+AAT und *Hind*III+AGA. Abgebildet sind die Pflanzen A2/14; A2/15; A2/16; A2/17 und A2/19. Die PAR-spezifischen Peaks bei 330 Minuten sind mit Pfeilen markiert.

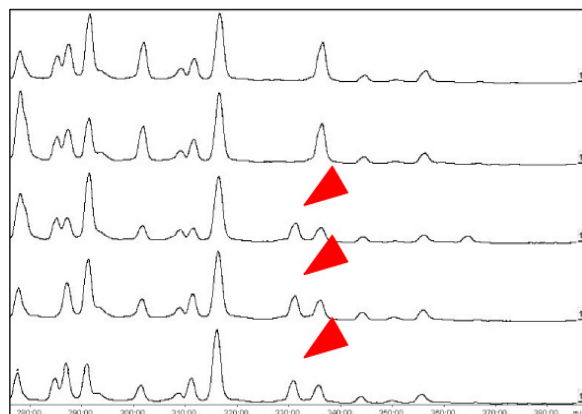
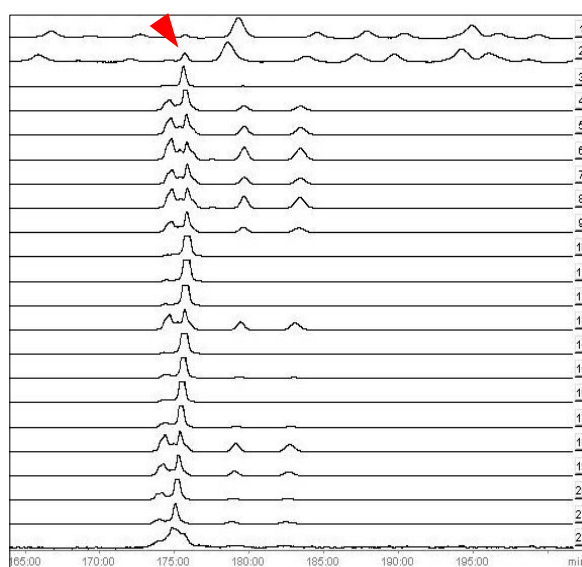


Abb. 3.7: Überprüfung der Klone des Fragmentes AGA_AAT_330.

Zur Überprüfung der Insertgröße wurden 20 Klone mit der Primerkombination *Mse*I+AAT und *Hind*III+AGA auf ein AFLP-Gel geladen. In den ersten zwei Slots wurden als Kontrolle die Pflanzen A2/8 (ohne PAR-Bande) und A2/11 (mit PAR-Bande) aufgetragen. Der Pfeil markiert das PAR-spezifische Fragment.



Fünf Klone (Klone: 330_1, 330_2, 330_3, 330_4 und 330_5) des AFLP-Fragmentes AGA_AAT_330 sowie vier Klone (Klone: 510_A10, 510_B3, 510_B4 und 510_B9) des AFLP-Fragmentes AGA_GAA_510 wurden zur weiteren Bearbeitung selektiert.

3.2.1 Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer

Die fünf (Marker AGA_AAT_330) bzw. vier (Marker AGA_GAA_510) positiven Klone der PAR-spezifischen AFLP-Fragmente wurden zur Überprüfung ihrer Sequenz und zur Herleitung von spezifischen Primern mit Sequenzierungsprimern von beiden Seiten ansequenziert. Die mit den universe bzw. reverse Primern erstellten Sequenzen überlappten sich, so dass die kompletten Sequenzen der Fragmente erstellt werden konnten.

Aus den Sequenzdaten der fünf Klone des AFLP-Markers AGA_AAT_330 konnte eine Konsensussequenz für das gesamte Fragment erstellt werden (**Abb. 3.8**). Bei der Auswertung der Sequenzen konnten die Primerbindestellen der *HindIII*- und *MseI*-Primer bei allen Klonen gefunden werden. Die Konsensussequenz des Fragmentes AGA_AAT_330 wies eine Länge von 280 Basenpaaren sowie einen GC-Gehalt von 39% auf. Weiterhin konnte bei der Sequenzanalyse dieses AFLP-Fragmentes ein kleiner CA-Mikrosatellit mit sieben Wiederholungen gefunden werden.

Bei der Sequenzierung der vier Klone des Fragmentes AGA_GAA_510 wurden drei verschiedene Sequenzen erhalten. Bei dem Klon 510_A10 wurde an beiden Enden eine Bindestelle für den *MseI*-Primer gefunden. Die übrigen Klone dieses Markers konnten zwei verschiedenen Sequenzen mit je einer *HindIII*- bzw. *MseI*-Primerbindestellen aber unterschiedlicher Länge zugeordnet werden. Dabei wiesen die Klone 510_B3 und 510_B4 eine identische Sequenz von 479 bp und einen GC-Gehalt von 50% auf (**Abb. 3.9 oben**). Der Klon 510_B9 wies bei einer Länge von 464 bp einen GC-Gehalt von 39% auf (**Abb. 3.9 unten**). Bei einem Abgleich der Sequenzdaten der PAR-spezifischen Fragmente mit der NCBI Sequenzdatenbank (blastn / blastx) konnten keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen festgestellt werden. Mit Hilfe der Sequenzdaten wurden spezifische Primerpaare für die jeweiligen Fragmente abgeleitet (**Abb. 3.8 und 3.9**). Das Primerpaar AAT330Komp (AAT330Komp_L + AAT330Komp_R) sollte dabei ein Fragment von 258 bp Länge erzeugen. Die Länge der durch die Primerpaare GAA510_B3 (GAA510B3_L + GAA510B3_R) bzw. GAA510_B9 (GAA510B9_L + GAA510B9_R) amplifizierbaren Fragmente sollte 457 bzw. 443 bp betragen. Neben den 330Komp genannten Primern für das gesamte Fragment AGA_AAT_330 wurde für den Mi-

krosatelliten des 330er Fragmentes ein zusätzliches Primerpaar (AAT330CA_L + AAT330CA_R) erstellt (Amplikonlänge 117 bp). Bei den Primerpaaren 330Komp, GAA510_B3 und GAA510_B9 wurden die für die AFLP-Polymorphismen verantwortlichen Restriktionsschnittstellen in die Primersequenzen einbezogen. Die Sequenzen der Primer sind in **Tabelle 7.2 (Anhang)** zusammengefasst.

1	GATGAGTCCT	<u>GAGTAAAA</u> T	CAGATTGTGT	CGTGTATGT	CATAAAAAA
		TAAAATA	CAGATTGTGT	CGTGTATG	▶
51	TACGATATTT	GTATCGTGCA	ATAATTTTAC	AGGGTATGCC	CGACACGGCC
101	CGCAAGTCTA	ATAATTTTGT	ATCGTGCTCA	GATTCATGAT	CAGGGCGGCC
	AAAGTATGC	TCGGACCCAG	A	▶	
151	AAAAGTATGC	TCGGACCCAG	ACTCTAACTT	ATATAAACCC	TTTTACCCCT
				◀	CAACCCG
201	TCACACACAC	ACACA	AAAGA	AAACGAGAAA	AACTTATAA
				◀	ACCCCG
251	ATAAAATACT	C <u>TCTAAGCTG</u>	G <u>TACGCAGTC</u>		
	TATTTTATGA	GAGATTCGAA			
	TATTTTATGA	GAGATTCG			

Abb. 3.8: Konsensussequenz des Fragmentes AGA_AAT_330

Abgebildet ist die aus 4 Klonen des AFLP-Fragmentes AGA_AAT_330 erstellte Konsensussequenz. Die Bindestellen der AFLP-Primer sind farbig markiert (*Mse*I-Primer: rot, *Hind*III-Primer: blau). Die selektiven Basen der AFLP-Primer sind unterstrichen dargestellt. Die grün bzw. violett markierten Sequenzen stellen die Primer AAT330Komp_L und AAT330Komp_R bzw. AAT330CA_L und AAT330CA_R dar. Grau unterlegte Basen stellen die Vervollständigung der AFLP-Restriktionsschnittstellen dar. Der violett unterlegte Bereich markiert den CA_{7n} Mikrosatelliten.


```

1  GATGAGTCCT GAGTAAGAAC AGAGGATGGC ATGCGATTAA CACATCCTCT
      TTAAGAAC AGAGGATGGC ATGC ▶
51  GATAGTAGCT CACTTGCCAA TTGTCCAATG CATACTCCTT TTAACAATGA
101 CTAAGTATGG TGCACCCCTC GGGATGAAGG TTCATAAACC AACCATACCC
151 AACGACACCT ACAGAACACG CTTCCACTGA AGCCAAGTCC CTCCGGACAA
201 GTCCCTTCGA AAAC TTCACA CGCCAAC TCC ATGGCACACC ATCCTCCTAA
251 TGGCAATCGA GCAAGACACT CCTATCGTAG GGTAATAATTT GATGTGTTC
301 CCCTAGACGA GGCTCGAAAG CCAACTGCAC CCAATGCAGC ATCAAGTGCA
351 TTCCTTACA AAATCTCTTC GCGAAGTACT CAACATATTG GCCCTCCAGC
401 CCTACCGCAC ACCCAGGACT TCATGCAAAA GGCCCTCTG ACCCACTGCA
      ◀ TGCA
451 TACGTGCTCC TCTAAGCTGG TACGCAGTC
      TACGTGCTCC TCTAAGCTT

```

```

1  GATGAGTCCT GAGTAAGAAC ATTCTAATCT CACTAGGAAG GATTAGATTG
      TTAAGAAC ATTCTAATCT CACTAGGAA ▶
51  AACATTCTAA CCCCTACATT ACAACCTCA TGATTCTCCT CTCTCTTTCT
101 TTTTCTCTCT CTTTTCTTCT GATCTTGGTC TGAATTGTGT GTGTAGCTCG
151 AGTAGAATGA GGGCCTATTT ATAGACATAG GCAAGGATAG AGTGGCATAA
201 CTGTCATAAC AGAATATTAG GTAATTCTGT TATGACATGG CACTAGGACT
251 TGACCGAGCT AAGCATAGAC TTAGATCTCA AAAAAAGTTG CTCAAATGTA
301 ACCAAACATA ACAAGCTACA ATTCTGGTAG CCAAAAAAAT GTTGCTCAAA
351 TGTGTAGCTG AACAGATGTG GAAAAGCAAC AATAGAAGAA GGAGAATAAA
401 AGATGGTGTT AGCTAGTCTG GTAGTGGTGA TGTATTGATC AGTTGGTCTA
      ◀ GA TGTATTGATC AGTTGGTCTA
451 AGCTGGTACG CAGTC
      AGCTT

```

Abb. 3.9 Sequenz der Klone AGA_GAA_510_B3 und AGA_GAA_510_B9

Sequenz der Klone B3 (**oben**) und B9 (**unten**) des AFLP-Fragmentes AGA_GAA_510. Die Bindestellen der AFLP-Primer sind farbig markiert (*Mse*I-Primer: rot, *Hind*III-Primer: blau). Die selektiven Basen der AFLP-Primer sind unterstrichen dargestellt. Die grün markierten Sequenzen stellen die Sequenzen der Primerpaare GAA510_B3 bzw. GAA510_B9 dar. Grau unterlegte Basen stellen die Vervollständigung der AFLP-Restriktionsschnittstellen dar.

3.2.2 Test der SCAR-Primer an Hanfpflanzen

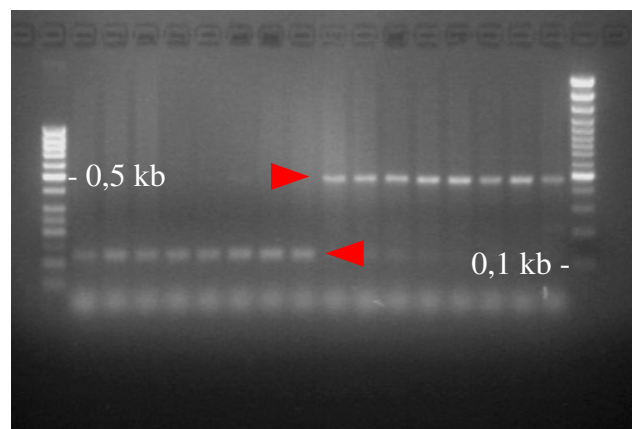
Die abgeleiteten SCAR-Primer wurden zunächst in PCR Testreihen mit DNA ausgewählter Hanfpflanzen der Population A2 eingesetzt. Die optimalen PCR-Bedingungen für die entsprechenden Primer wurden dabei mittels Gradienten-PCR bzw. Touchdown-PCR ermittelt.

Beim Test des Primerpaares AAT330Komp an 20 Pflanzen wurde bei einer Annealingtemperatur von 66,5°C ein ca. 250 bp großes Fragment bei 11 Pflanzen erzeugt. Ein Vergleich der Spaltung des AFLP-Markers AGA_AAT_330 mit der des Primerpaares AAT330Komp zeigte, dass beide Marker bei allen 20 Pflanzen vollständig kosegregierten. Von den untersuchten Pflanzen waren je 10 Pflanzen männlich bzw. weiblich. Das Fragment wurde bei 9 männlichen und 2 weiblichen Pflanzen amplifiziert.

Die Primer AAT330CA für den Mikrosatelliten CA_{7N} erzeugten in einer Touchdown-PCR bei 58°C zwei verschiedene Banden. Dabei zeigt eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 120 bp die gleiche Aufspaltung wie der AFLP-Marker AGA_AAT_330. Die andere ca. 490 bp große Bande spaltet reziprok zu dem AFLP-Marker AGA_AAT_330 (**Abb. 3.10**).

Abb. 3.10: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare

Test des Primerpaares AAT330CA an 16 Hanfpflanzen. Die ersten 8 Pflanzen sind positiv für den AFLP-Marker AGA_AAT_330. Bei diesen Pflanzen wird das erwartete Fragment (120 bp) mit dem Mikrosatelliten amplifiziert. Kosegregierend dazu zeigen die anderen 8 Pflanzen ein ca. 490 bp großes Fragment.



Eine Sequenzierung des ca. 120 bp großen Fragmentes bestätigte dessen Herkunft vom AFLP-Fragment AGA_AAT_330.

Zur anschließenden Überprüfung der Spezifität der Primer 330Komp und 330CA an einer größeren Anzahl von Pflanzen wurden diese an 74 Pflanzen der Population A2 getestet. Mit den AAT330Komp Primern konnte bei 33 Pflanzen ein Fragment von ca. 250 bp Länge erzeugt werden. Dieses Fragment wurde nur bei den Pflanzen amplifiziert, welche auch den AFLP-

Marker AGA_AAT_330 zeigten (**Abb. 3.11**). Beim Einsatz des Primerpaars AAT330CA in einer Touchdown-PCR konnte bei 33 Pflanzen das ca. 120 bp große Fragment mit dem Mikrosatelliten amplifiziert werden. Bei den übrigen 41 Pflanzen war das 490 bp große Fragment nachweisbar (**Abb. 3.12**).

Beim Testen des Primers GAA510_B3 an 20 Pflanzen der Population A2 konnte auch bei niedrigen Annealingtemperaturen bei keiner der Pflanzen ein Fragment amplifiziert werden. Dagegen konnte mit dem Primerpaar GAA510_B9 bei einer Annealingtemperatur von 59°C ein 450 bp großes Fragment erzeugt werden. In Gradienten-PCRs zur Ermittlung spezifischer Reaktionsbedingungen wurden je vier DNAs von Pflanzen, die den AFLP-Marker AGA_GAA_510 zeigten bzw. nicht zeigten, eingesetzt. Die Spaltung des Primers GAA510_B9 entsprach dabei nicht der des AFLP-Markers AGA_GAA_510. Von den vier Pflanzen, die den AFLP-Marker zeigten, konnte nur bei zwei Pflanzen ein Fragment amplifiziert werden. Dagegen wiesen drei von vier für den AFLP-Marker negative Pflanzen ein Fragment auf.

Um mögliche Polymorphismen innerhalb des Amplifikats des Primers GAA510_B9 zu ermitteln, wurde eine CAPS- (cleaved amplified polymorphic sequences) Analyse durchgeführt. Das Vorhandensein sowie die Anzahl entsprechender Schnittstellen für Restriktionsenzyme konnte bei der Analyse der Sequenz des AFLP-Fragmentes AGA_GAA_B9 ermittelt werden. Bei der CAPS-Analyse wurden jeweils Amplifikate des Primerpaars GAA510_B9 einer Pflanze, die den AFLP-Marker AGA_GAA_510 zeigte bzw. nicht zeigte (A2/4 bzw. A2/1), mit den Restriktionsenzymen *AluI*, *BglII*, *RsaI*, *Sau3AI*, *SspI*, *TaqI* bzw. *XhoI* geschnitten. Bei der Analyse der Restriktionsprodukte auf einem Agarosegel konnte bei keinem Enzym ein Polymorphismus festgestellt werden. Bei einer SSCP- (single strand conformation polymorphism) Analyse der beiden Fragmente konnten ebenfalls keine Unterschiede festgestellt werden.

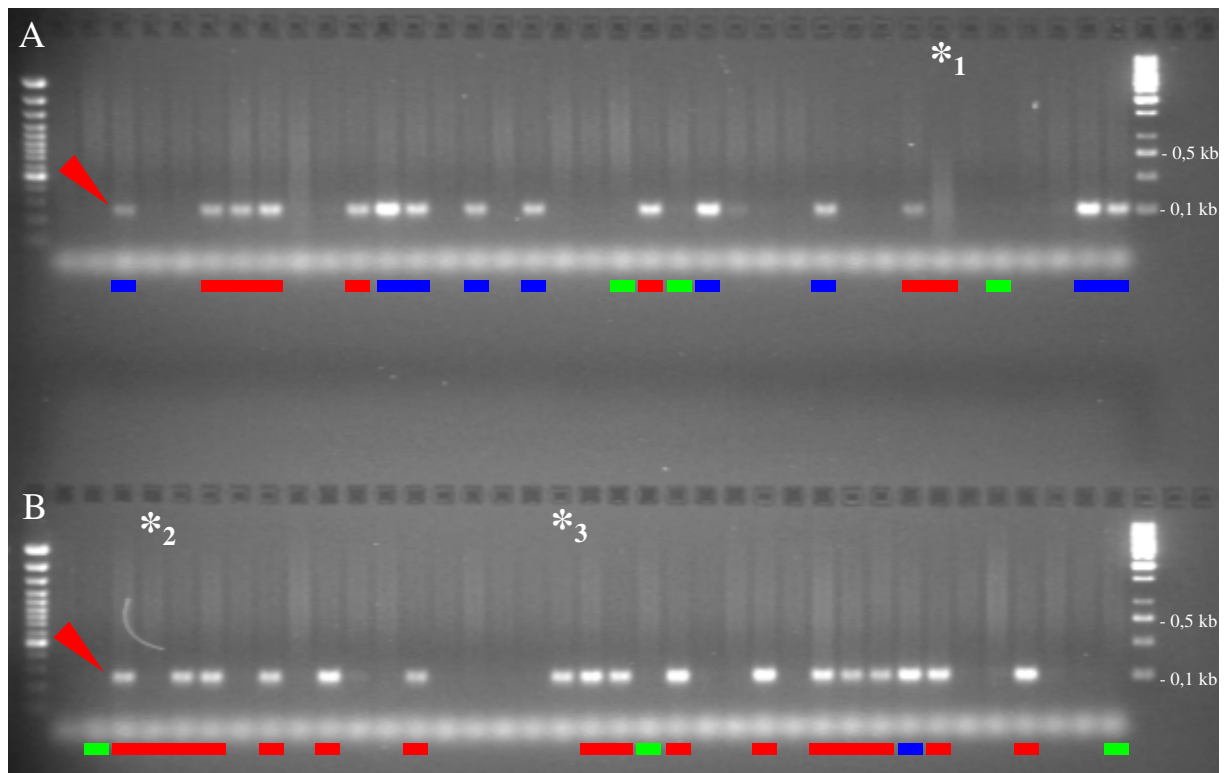


Abb. 3.11: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330Komp an 74 Einzelpflanzen der Population A2.

Männliche Pflanzen sind durch rote Balken markiert. Pflanzen mit vom Geschlecht abweichender Spaltung sind durch grüne bzw. blaue Balken gekennzeichnet (männlich grün, weiblich blau). Die Pfeil markiert das ca. 250 bp große PAR-spezifische Fragment.

A: 100 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/1 bis A2/44, 1 kb Ladder (Fermentas)

B: 100 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/45 bis A2/100, Blindprobe (H₂O), 1 kb Ladder (Fermentas). Anordnung der Pflanzen: siehe **Tabelle 7.1 (Anhang)**

*₁ A2/38 kein Amplifikationsprodukt erzeugbar (DNA Degradierung)

*₂ A2/49 fehlendes Fragment bei wiederholter PCR nachweisbar

*₃ A2/71 keine AFLP-Daten verfügbar

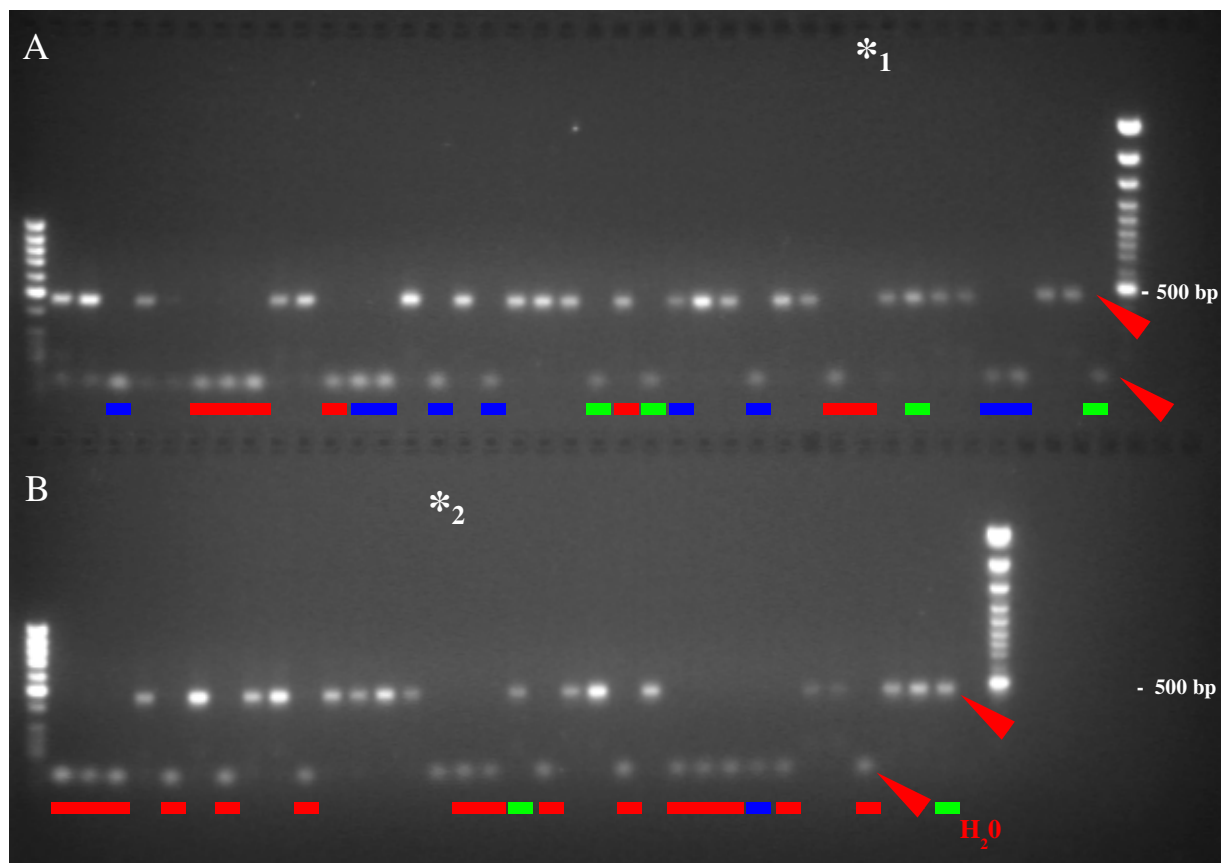


Abb. 3.12: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330CA an 74 Einzelpflanzen der Population A2.

Männliche Pflanzen sind durch rote Balken markiert. Pflanzen mit vom Geschlecht abweichender Spaltung sind durch grüne bzw. blaue Balken gekennzeichnet (männlich grün, weiblich blau). Die Pfeile markieren die Position der PAR-spezifischen Fragmente bei 117 bp und 490 bp.

oben: 50 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/1 bis A2/47, 100 bp Ladder (Fermentas)

unten: 50 bp Ladder (Fermentas), Pflanzen A2/49 bis A2/100, Blindprobe (H₂O), 100 bp Ladder (Fermentas). Anordnung der Pflanzen: siehe **Tabelle 7.1 (Anhang)**

*₁ A2/38 kein Amplifikationsprodukt erzeugbar (DNA Degradierung)

*₂ A2/71 keine AFLP Daten verfügbar

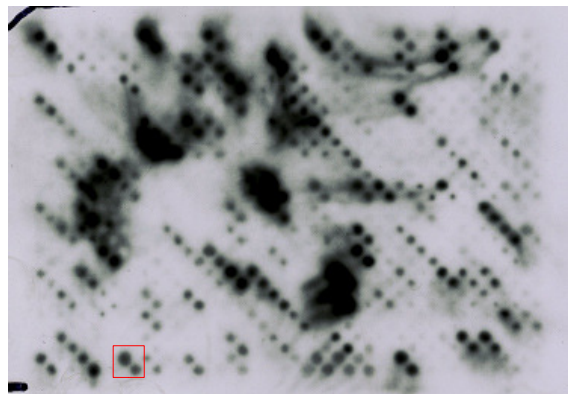
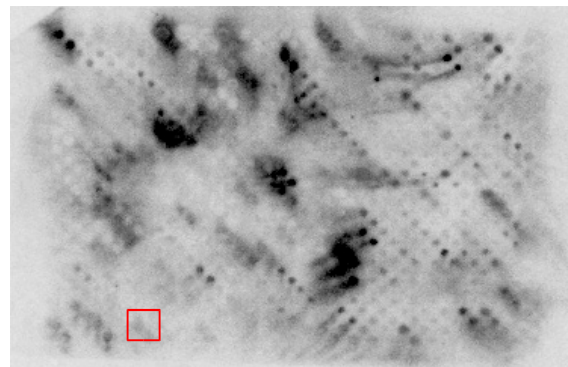
3.3 Differenzielles Screening einer Hanf-DNA-Bank nach repetitiven geschlechtsspezifischen Klonen

Eine Phagemid-Bank (ca. 15700 Klone), erstellt durch **Flachowsky (2003)**, wurde für das Screening nach repetitiven geschlechtsspezifischen Klonen genutzt. Zum Auffinden geschlechtsspezifischer Klone wurden insgesamt 41 Membranen (je 384 Klone) differenziell mit genomischer DNA einer männlichen (A2/11) bzw. weiblichen (A2/4) Pflanze als Sonde hybridisiert (**Abb. 3.13**). Dabei zeigten ungefähr 15% der Klone repetitive Hybridisierungssignale.

Abb. 3.13: Screening der Hanf-DNA-Bank

Ein Blot von 384 *E. coli* Kolonien wurde mit DNA weiblicher (oben) und männlicher (unten) Hanf-Pflanzen als Sonde hybridisiert.

Klone mit vermuteten männlich-spezifischen Fragmenten sind mit farbigen Rahmen dargestellt.



Beim Vergleich der Hybridisierungsmuster der männlichen bzw. weiblichen Sondensignale wurden 13 Klone (Klone: 2''08 J01, 1''04 J10, 2''07 K02, 1''01 A13, 1''10 I24, 2''05 F15, 2''06 G24, 2''06 M23, 2''08 A18, 2''08 C08, 2''08 C10, 2''12 B10, 2''13 E13) gefunden, welche nur ein Signal bei Hybridisierung mit der männlichen Sonde zeigten. Des weiteren konnten 3 Klone selektiert werden (Klone: 2''15 E08, 2''08 B02, 1''02 K10), die nur bei der Hybridisierung mit der weiblichen Sonde ein Signal zeigten (**Tabelle 3.2**).

Tabelle 3.2 Insertgrößen und Geschlecht selektierter Klone der Hanf-DNA-Bank

Klon	Insertgröße in bp	Sex
1''04 J10	750	♂
2''07 K02	500	♂
2''08 J01	550	♂
1''01 A13	480	♂
2''15 E08	800	♀
2''08 B02	520	♀
1''02 K10	580	♀
1''10 I24	600	♂
2''05 F15	1500	♂
2''06 G24	600	♂
2''06 M23	900	♂
2''08 A18	550	♂
2''08 C08	550	♂
2''08 C10	1500	♂
2''12 B10	700	♂
2''13 E13	550	♂

Die Klone 2''08 J01, 1''04 J10 und 2''07 K02 wurden zur Überprüfung ihrer Spezifität mit einem Southern Blot hybridisiert (siehe **Kapitel 3.6**). Um den Arbeitsaufwand bei der Hybridisierung zu reduzieren, wurde die Spezifität der übrigen Klone mittels einer Dot-Blot Analyse überprüft. Dazu wurden die mit M13-Primern herausamplifizierten Inserts der Plasmide der selektierten Klone auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblotet und nochmals differenziell mit Sonden aus männlicher DNA (A2/83) bzw. weiblicher DNA (A2/77) hybridisiert (**Abb. 3.14**). Dabei zeigte ein Klon (Klon 1''01 A13) ein Signal bei der Hybridisierung mit männlicher DNA aber kein Signal bei der Hybridisierung mit weiblicher Sonde. Drei Klone (Klone: 2''15 E08, 2''08 B02, 1''02 K10) zeigten nur Signale bei der Hybridisierung mit der weiblichen Sonde, kein Signal aber bei der Hybridisierung mit der männlichen Sonde. Diese Klone wurden anschließend als Sonden für Southern-Blot Hybridisierungen (siehe **Kapitel 3.6**) verwendet. Um mehr Information zu erhalten wurden die Inserts der Klone 1''01 A13, 2''08 B02 und 1''02 K10 sequenziert. Bei einem Abgleich der Insertsequenzen mit der NCBI Sequenzdatenbank (blastn / blastx) konnten keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen festgestellt werden.

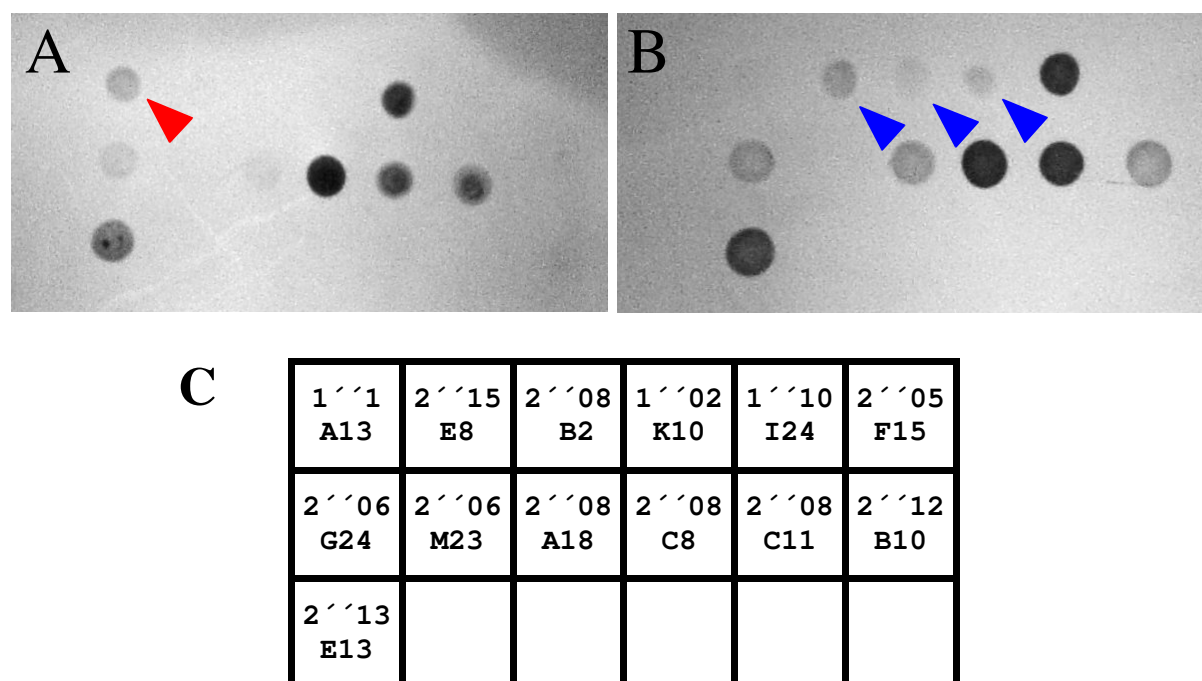


Abb. 3.14: Dot-Blot Hybridisierung

Hybridisierung ausgewählter Klone der Hanf-DNA-Bank mit genomischer DNA einer **A:** männlichen (A2/83) bzw. **B:** weiblichen (A2/77) Pflanze als Sonde. **C:** schematische Darstellung der Anordnung der Klone des Dot-Blots. Der rote Pfeil markiert den Klon 1''01 A13, der nur bei Hybridisierung mit der männlichen Sonde ein Signal zeigt. Die mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Klone (2''15 E08, 02''08 B02, 1''02 K10) zeigen Hybridisierungssignale nur bei weiblichen Sonden.

3.4 Amplifikation von Pollen-DNA mit degenerierten Primern

Für die Amplifikation der Pollen-DNA wurde die Eignung von DOP- und I-PEP-PCR getestet. Zehn einzelne Pollenkörner von Hanf wurden am inversen Mikroskop aus einer Wasser-Pollen-Suspension mit einer Glaskapillare isoliert und jeweils in ein Tube mit 10 µl Wasser überführt. In ein Tube wurde zur Kontrolle nur Wasser gegeben. Den Tubes mit den einzelnen Pollen wurde anschließend ein entsprechender DOP- bzw. I-PEP-PCR-Ansatz zugegeben. Nach der Amplifikation wurden 16 µl PCR-Produkt auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Mit der DOP-PCR konnten keine sichtbaren Amplifikationsprodukte hergestellt werden. Dagegen konnten die Amplifikationsprodukte der I-PEP-PCR als Schmier von hauptsächlich kleinen (<500 bp) DNA-Fragmenten sichtbar gemacht werden (**Abb. 3.15**).

Um festzustellen, ob es sich um X- bzw. Y-Pollen handelte, wurde die hochamplifizierte Pollen-DNA aus der I-PEP-PCR mit einem geschlechtsspezifischen SCAR-Primer getestet. Das 10fach verdünnte I-PEP-PCR-Produkt wurde dazu mit dem männlich-spezifischen Primer SCAR_{OPA08} von **Mandolino et al. (1999)** amplifiziert. Neben den 10 verschiedenen Amplifikationsprodukten der Pollen sowie zwei Blindproben wurden zur Kontrolle je eine Probe mit DNA männlicher bzw. weiblicher Pflanzen eingesetzt. Der Primer SCAR_{OPA08} erzeugte bei der männlichen Pflanze die erwartete 390 bp große Bande. Bei der weiblichen Pflanze wurde eine ca. 500 bp große Bande erzeugt. Von den 10 Pollen-DNAs konnte bei 5 Proben eine ca. 390 bp große Bande amplifiziert werden (**Abb. 3.16**). Da die Bande auch in einer der Blindproben feststellbar war, wurde die PCR dreimal wiederholt. Dabei konnten die Resultate der jeweils vorherigen PCR nur bei den Proben 2, 4 und 8 reproduziert werden. In allen Versuchen konnte bei den Proben 2 und 4 keine Banden, in der Probe 8 eine Bande amplifiziert werden

Abb. 3.15: Amplifikation von Pollen-DNA mittels I-PEP PCR

Durch I-PEP-PCR hochamplifizierte DNA von 10 einzelnen Hanf-Pollen mit Fragmentgrößen < 500 bp. **Proben:** (von links) Ladder-Mix, Pollenamplifikate 1 bis 10

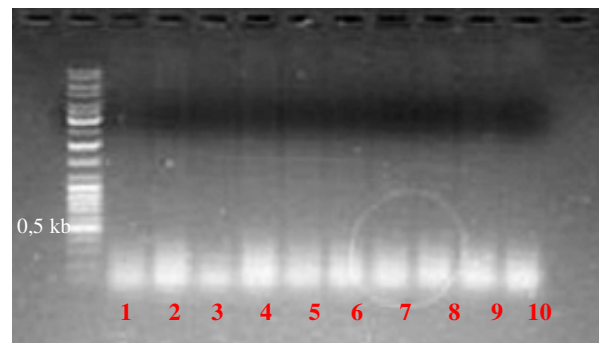
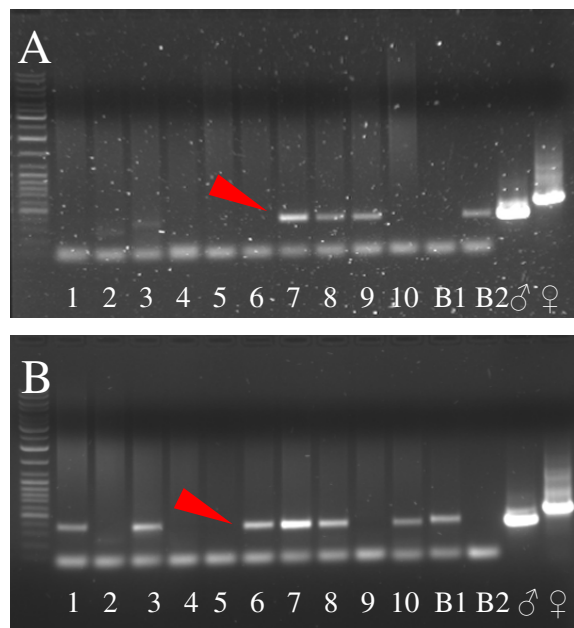


Abb. 3.16: Test der I-PEP Amplifikate

Geschlechtsbestimmung hochamplifizierter Pollen-DNA mittels männlich-spezifischen SCAR-Marker SCAR_{OPA08}

A: erste Wiederholung **B:** zweite Wiederholung; **Proben:** v. l. Ladder-Mix Fermentas, Pollenamplifikate 1 bis 10, Blindprobe 1 bzw. 2 (B1 bzw. B2), Kontroll-DNA männlich und weiblich. Der Pfeil markiert das männlich-spezifische Fragment.



Die I-PEP Fragmente der Probe 8, die bei der Amplifikation mit dem männlich-spezifischen Primer reproduzierbare Ergebnisse zeigte, wurden mit dem Sure Clone Ligation Kit (Amersham) in den Phagemid Vektor pBluescript SK⁺ (Invitrogen) ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in XL1 Blue (Invitrogen) chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Nach Ausplattierung der transformierten Zellen konnten keine positiven Transformanten festgestellt werden. Durch eine Transformation der Plasmide mittels Elektroporation in XL2 elektrokompente *E. coli* Zellen (Invitrogen) konnten ebenfalls keine positiven Klone erzeugt werden.

3.5 PCR Walking

Um längere und spezifischere Sonden für die *in situ* Hybridisierung zu erzeugen wurde mittels PCR Walking aus dem geschlechtsspezifischen Fragment AAT330 zu beiden Seiten in die flankierenden DNA-Bereiche amplifiziert. Dazu wurden ein Adapter sowie hintereinander (nested) liegende Primer für diesen Adapter (AP_1 und AP_2) hergestellt. Weiterhin wurden ebenfalls hintereinander (nested) liegende Primer für das Fragment AAT330 entwickelt, welche in die flankierenden DNA-Bereiche gerichtet sind (links: 330iL_1 und 330iL_2 bzw. rechts: 330iR_1 und 330iR_2). Die Sequenzen der verwendeten Primer und Adapter sind in der **Tabelle 7.2 (Anhang)** aufgelistet. Von der männlichen Pflanze A2/72 wurden je 2,5 µg genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI*, *SmaI* und *SspI* geschnitten. Nach der Ligation des Adapters an die Enden der entstandenen Fragmente wurden Amplifikationen (nested PCR) mit den adapter-(AP)- und sequenzspezifischen (330iL bzw. 330iR) Primern durchgeführt. Das Prinzip des PCR Walkings ist in **Abb. 3.17** schematisch dargestellt. Von den Produkten der ersten Amplifikation wurden 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung der DNA konnte bei allen Proben ein Schmier verschieden großer Fragmente festgestellt werden. Bei den Proben mit *EcoRV* bzw. *ScaI* verdauter DNA konnten zudem einzelne schwache Banden detektiert werden (**Abb. 3.18 A**). Nach der nested PCR mit den hintereinander liegenden Primerpaaren konnten auf einem Agarosegel 1 bis 11 Banden je Probe nachgewiesen werden. Bei der Amplifikation mit dem Primerpaar AP_2 und 330iL_2 wurden starke Hauptbanden bei den Proben von *EcoRV* (ca. 4 kb), bei *PvuII* (ca. 1,1 kb) und bei *SspI* (ca. 1 kb) detektiert (**Abb. 3.18 B**). Die Amplifikation mit dem Primerpaar AP_2 und 330iR_2 erzeugte ebenfalls bei den Proben *EcoRV* (ca. 4 kb), bei *PvuII* (ca. 0,5 kb) und bei *SspI* (ca. 1,5 kb) deutliche Hauptbanden (**Abb. 3.19**).

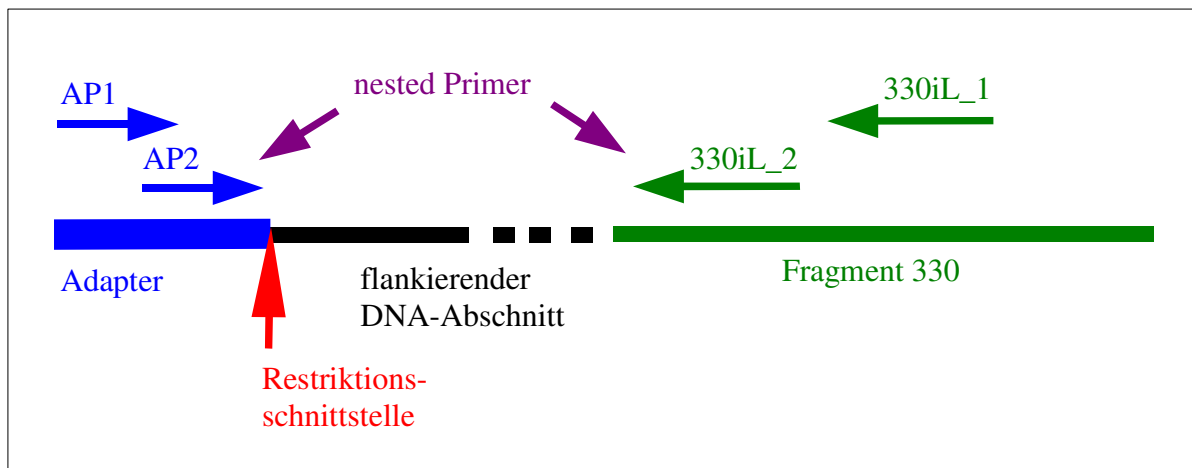


Abb. 3.17: Schematische Darstellung des PCR Walkings

Amplifikation der linken flankierenden Sequenz des PAR-spezifischen Fragmentes AAT330.

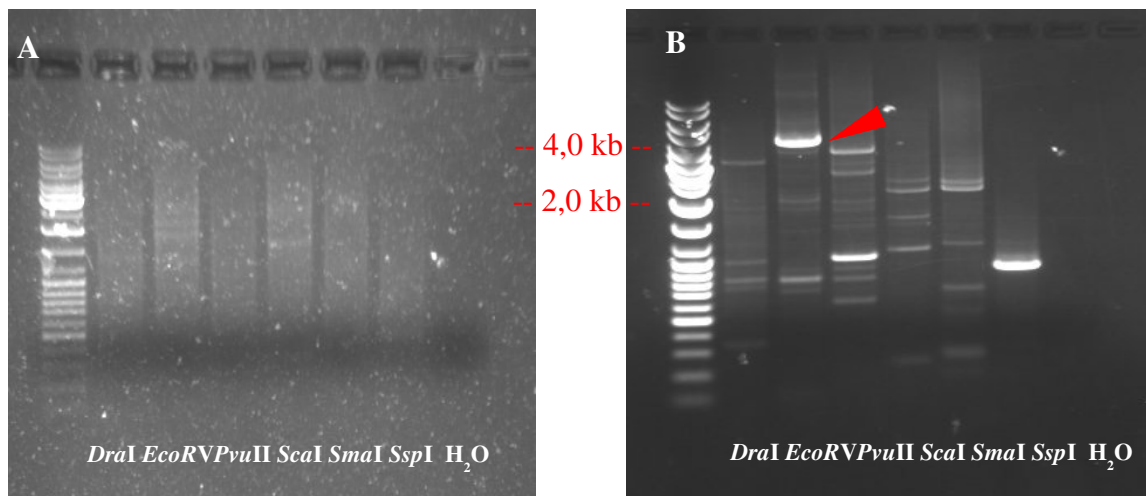


Abb. 3.18: PCR Walking PCR I

A: deutlicher Schmier mit einzelnen schwachen Banden als Produkt der ersten Amplifikation mit den Primern **AP_1** und **330iL_1**, **B:** Bandenmuster der zweiten Amplifikation (Primer: **AP_2** und **330iL_2**) mit drei deutlich sichtbaren Hauptbanden und Nebenbanden. **jeweils links:** Größenmarker (Ladder Mix, Fermentas). Das durch den Pfeil markierte Fragment wurde zur weiteren Verwendung eluiert und kloniert.

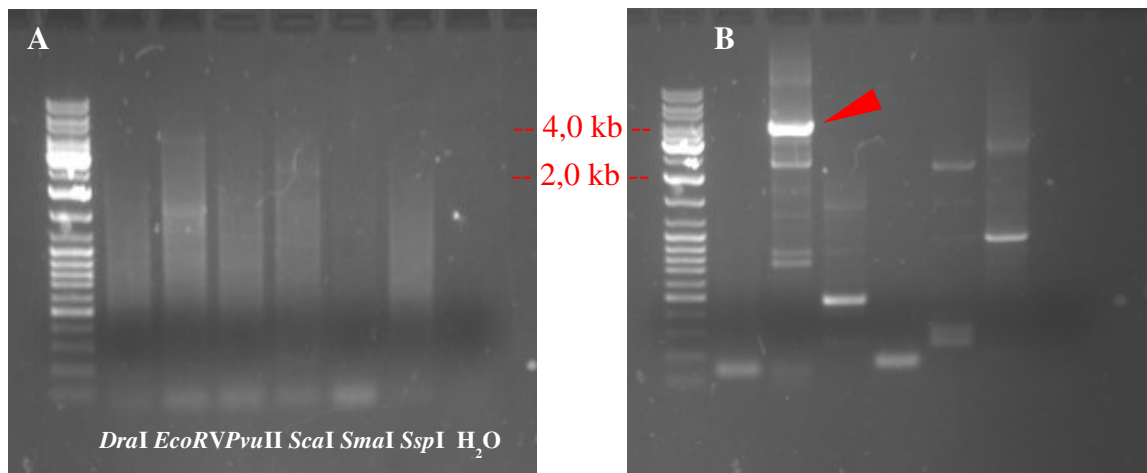


Abb. 3.19: PCR Walking PCR II

A: deutlicher Schmier mit einzelnen schwachen Banden als Produkt der ersten Amplifikation mit den Primern **AP_1** und **330iR_1**, **B:** Bandenmuster der zweiten Amplifikation (Primer: **AP_2** und **330iR_2**) mit drei deutlich sichtbaren Hauptbanden und Nebenbanden. **links:** Größenmarker (Ladder Mix, Fermentas). Das durch den Pfeil markierte Fragment wurde zur weiteren Verwendung eluiert und kloniert.

Die ca. 4 kb großen *EcoRV* Hauptbanden (siehe Pfeil **Abb. 3.18** und **3.19**) beider Primerkombinationen wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels freeze-squeeze eluiert. Den eluierten DNA-Fragmenten wurden A-Überhänge angefügt. Anschließend wurden sie in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert. Die Klone wurden mit 330GW_L bzw. 330GW_R bezeichnet. Für die weitere Verwendung als Sonde für Southern-Blot Analysen und die FISH wurden die Inserts der Klone herausamplifiziert.

3.6 Southern-Blot Analyse

3.6.1 Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente

Für die Untersuchung geschlechtsspezifischer Fragmente wurde ein Southern Blot mit DNA der männlichen Pflanze A2/39 und der weiblichen Pflanze A2/20 hergestellt. Die DNA der Pflanzen wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* bzw. *BamHI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet.

Die verwendeten geschlechtsspezifischen Sonden sind in **Tabelle 3.3** dargestellt. Als Sonden wurden neben den geschlechtsspezifischen SCAR-Markern des Hanfes (C11Komp_L und

C11Komp_R, siehe **Kap. 3.1**) zwei geschlechtsspezifische Fragmente von *Silene latifolia* Sly1 (**Delichere et al., 1999**) und Sly4 (**Atanassov et al., 2001**) für die Southern Blot-Analyse verwendet. Weiterhin wurden sieben bei der differenziellen Analyse der Hanf-DNA-Bank (**Kap. 3.3**) selektierte geschlechtsspezifische Klone (2''08 J01, 1''04 J10, 2''07 K02, 1''01 A13, 1''10 I24, 2''15 E08, 02''08 B02 und 1''02 K10) als Sonde eingesetzt.

Die Hybridisierung des Southern Blots mit der Sonde C11Komp (Primerkombination: C11Komp_L + C11Komp_R) erzeugte neben starken schmierartigen Signalen eine Vielzahl von deutlich differenzierbaren Einzelbanden. Dabei konnten je nach Restriktionsenzym 4 bis 7 deutlich unterscheidbare Einzelbanden detektiert werden (**Abb. 3.20**). Starke unspezifische repetitive Signale, bei denen einzelne Banden nicht mehr unterscheidbar waren (Schmiers), konnten vor allem im höhermolekularen Bereich festgestellt werden. Ein geschlechtsabhängiger Größenpolymorphismus trat bei einer Bande (<500 bp) in den Spuren mit *Hind*III verdauter DNA auf (**siehe Pfeil in Abb. 3.20 A**).

Die von *Silene latifolia* stammenden männlich-spezifischen Sonden Sly1 und Sly4 erzeugten keine Hybridisierungssignale. Auch durch eine Hybridisierung unter weniger stringenten Bedingungen konnten keine Hybridisierungssignale nachgewiesen werden.

Bei der Verwendung der sieben ausgewählten Klone aus der Hanf-DNA-Bank (**Kap. 3.3**) als Sonde konnten keine geschlechtsspezifischen Signale detektiert werden. Die Klone 1''01 A13 (**Abb. 3.20 B**), 2''08 J01, 1''04 J10 und 2''07 K02 zeigten dabei neben repetitiven Signalen (Schmiers), bei denen keine Einzelbanden unterscheidbar waren, auch einige einzelne Banden. Bei den restlichen Klonen konnten nur repetitive Signale in Form von Schmiers detektiert werden.

Anzahl und Größe der Hybridisierungssignale der eingesetzten Sonden sind in **Tabelle 3.4** dargestellt.

3.6.2 Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente

Zur Analyse der PAR-spezifischen Fragmente wurde jeweils DNA von Pflanzen geblottet, die die PAR-spezifischen AFLP-Marker AGA_AAT330 und AGA_GAA510 zeigten (A2/83 ♂ und A2/77 ♀) bzw. nicht zeigten (A2/64 ♀ und A2/87 ♀). Die DNA der Pflanzen wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI, *Hind*III bzw. *Bam*HI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf positiv geladenen Nylon-Membranen geblottet.

Als Sonden kamen die AFLP-basierenden Fragmente AAT330Komp und GAA510_B3 bzw. GAA510_B9 sowie die durch PCR Walking entwickelten Fragmente 330GW_L und 330GW_R zum Einsatz. Die verwendeten Sonden sowie deren Eigenschaften sind in **Tabelle 3.3** aufgeführt.

Die Sonde AAT330Komp erzeugte bei allen DNAs in Abhängigkeit vom Restriktionsenzym 2 bis 4 deutlich sichtbare Signale (**Abb. 3.21**). Neben diesen deutlichen Banden sind einige schwache Banden erkennbar. Bei den *EcoRI*-verdauten DNAs waren im Bereich von Fragmentgrößen unter 2000 bp viele untereinander liegende repetitive Banden zu beobachten. Im Bereich über 5 kb konnten starke repetitive Hintergrundsignale festgestellt werden. PAR-spezifische Hybridisierungsmuster konnten dabei nicht beobachtet werden.

Die Sonden GAA510_B3 und GAA510_B9 erzeugten bei allen Pflanzen jeweils nur ein Signal.

Die durch PCR Walking hergestellte Flankensequenz 330GW_L des PAR-spezifischen AFLP-Markers AGA_AAT330 erzeugte je Restriktion ein bis drei deutliche Hybridisierungssignale bei der Southern-Blot Analyse (**Abb. 3.21**). DNA der Pflanze A2/77 zeigte, verdaut mit den Enzymen *HindIII* bzw. *BamHI*, eine einzelne Bande bei 1,6 bzw. 1,3 kb. Auch hier wurden im Bereich von Restriktionsfragmenten mit Größen von mehr als 15 kb starke repetitive Signale in Form von Schmiern beobachtet. Auch die Sonde 330GW_L erzeugte unspezifische repetitive Signale im Bereich von Restriktionsfragmenten mit Größen von mehr als 12 kb. PAR-spezifische Signale konnten nicht festgestellt werden. Größe und Anzahl der Hybridisierungssignale der eingesetzten Sonden sind in **Tabelle 3.4** dargestellt.

Tabelle 3.3:

Als Sonden für die Southern-Blot Hybridisierung eingesetzte DNA-Fragmente, deren Größe, Geschlecht, Herkunft und Markierungsmethoden.

Sonde	Größe (bp)	Geschlecht	Herkunft	Markierungsart
geschlechtsspezifische Sonden				
C11Komp	2500	♂	RAPD-PCR	DIG-PCR
Sly1	2000	♂	<i>Silene latifolia</i>	DIG-Nick Translation
Sly4	2000	♂	<i>Silene latifolia</i>	DIG-Nick Translation
Klon 1''04 J10	750	♂	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 2''07 K02	500	♂	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 2''08 J01	550	♂	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 1''01 A13	480	♂	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 2''15 E08	800	♀	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 2''08 B02	520	♀	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
Klon 1''02 K10	580	♀	Hanf-DNA-Bank	DIG-PCR
PAR-spezifische Sonden				
AAT330Komp	250		AFLP	DIG-PCR
330GW_L	4000		AFLP/PCR Walking	DIG-Nick Translation
330GW_R	4000		AFLP/PCR Walking	DIG-Nick Translation
GAA510_B3	500		AFLP	DIG-Nick Translation
GAA510_B9	500		AFLP	DIG-Nick Translation

Tabelle 3.4:

Southern-Blot Analyse mit geschlechtsspezifischen Sonden. Größen der detektierten Hybridisierungssignale. Mit einem Stern gekennzeichnete Signale zeigen geschlechtsabhängige Unterschiede.

Sonde	Bandengröße bei <i>EcoRI</i> verdauter DNA	Bandengröße bei <i>HindIII</i> verdauter DNA	Bandengröße bei <i>BamHI</i> verdauter DNA
AAT 330Komp	4 kb; 1 kb; 1,3 kb; 1 kb	15 kb; 4,2 kb	8 kb; 4,2 kb; 3,8 kb
330GW_L	20 kb; 18 kb; 12 kb	3 kb	12 kb
330GW_R	>12 kb Schmier	>12 kb Schmier	>12 kb Schmier
C11Komp	1,5 kb; 2 kb; 3 kb; 4 kb; 5 kb; 6 kb; 7,5 kb	<0,5 kb *; 5 kb; 7 kb; 8 kb	2 kb; 2,5 kb; 4,5 kb; 5,5 kb; >10
GAA 510_B3	>10 kb Schmier	2,2 kb	>10 kb Schmier
GAA 510_B9	>10 kb Schmier	2,2 kb	>10 kb Schmier
Klon 1''04 J10	3 kb	8 kb	7 kb
Klon 2''07 K02	2 kb; >6 kb Schmier	1 kb; >2 kb Schmier	>3 kb Schmier
Klon 2''08 J01	0,8 kb; 1 kb; 1,8 kb; >6 kb Schmier	0,6 kb; >6 kb Schmier	8 kb; 3 – 15 kb Schmier
Klon 1''1 A13	2 kb; 2,5 kb	9 kb	5 kb; 4 kb

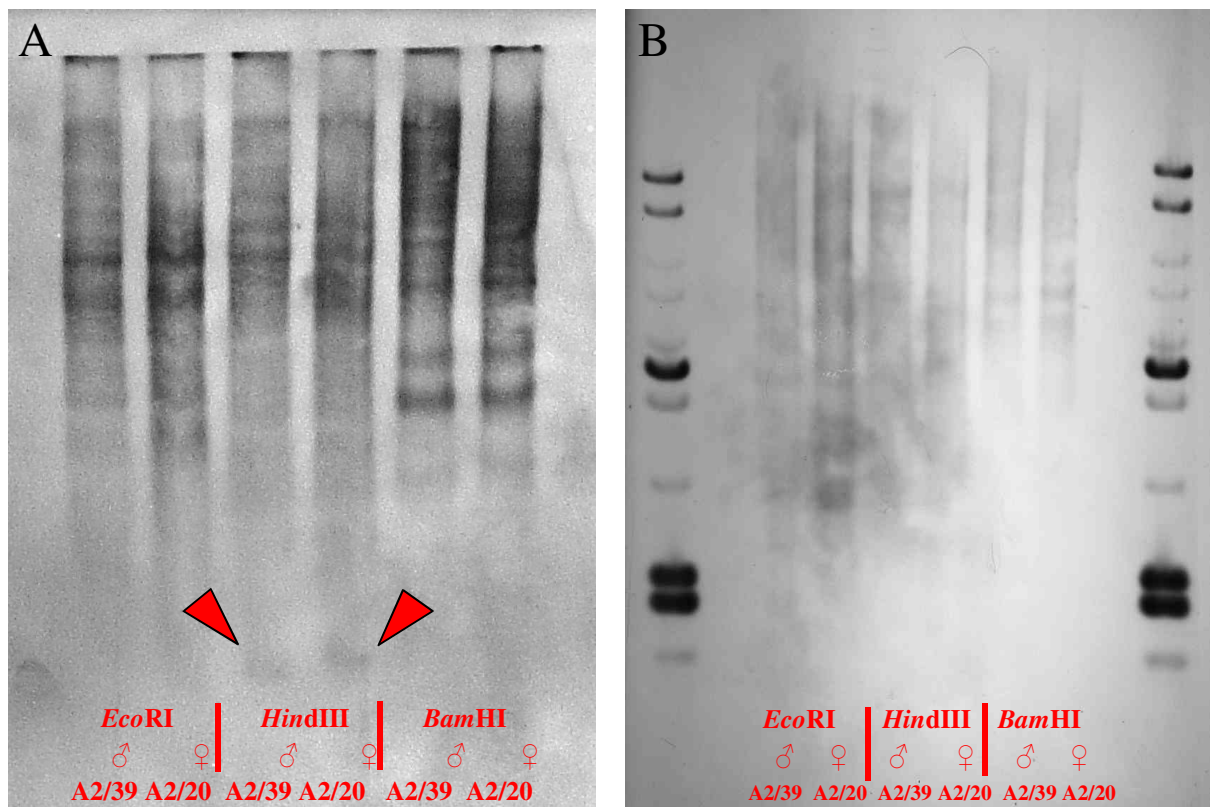


Abbildung. 3.20: Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente

A: Southern Blot hybridisiert mit der männlich-spezifischen Sonde **C11komp**. Stark repetitive Hybridisierungsmuster bei DNA der männlichen Pflanze A2/39 sowie bei der weiblichen Pflanze A2/20. Die DNA wurde verdaut mit *EcoRI*, *HindIII* bzw. *BamHI*. Die Pfeile markieren polymorphen Banden bei ca. 500 bp.

B: Southern-Blot Hybridisierung mit dem männlich-spezifischen **Klon 1'01 A13**

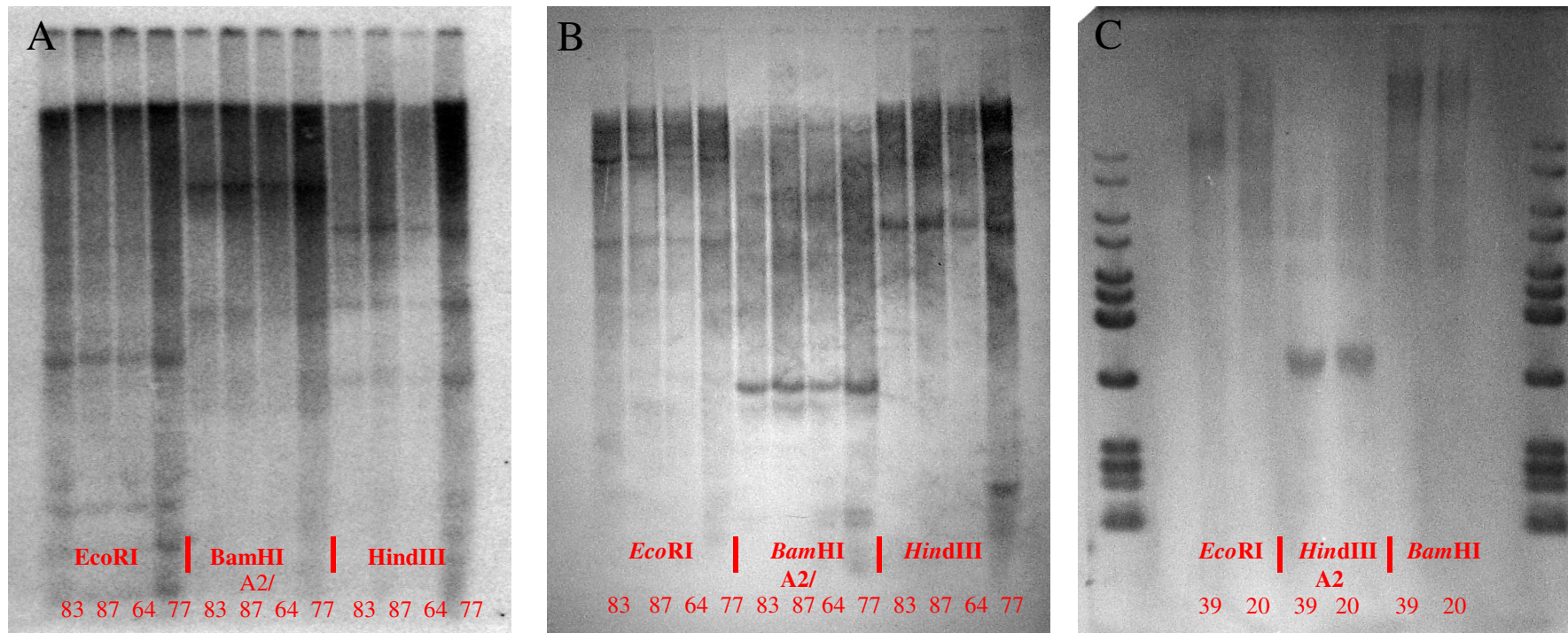


Abb. 3.21: Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente

A: Repetitive Signale der Southern-Blot Hybridisierung mit der PAR-spezifischen Sonde AAT330Komp. In den Spuren wurde DNA von einer männlichen Pflanze (A2/83, PAR-Marker positiv) sowie von drei weiblichen Pflanzen (A2/87, PAR-Marker positiv, A2/64 und A2/77 beide PAR-Marker negativ) aufgetragen. Die DNA wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* bzw. *BamHI* verdaut. **B:** Repetitive Signale der Hybridisierung des selben Southern Blots mit der Sonde 330iLEcoRV. **C:** Hybridisierungsmuster der Sonde GAA510_B9 mit je einem Signal bei >10 kb in den Spuren *EcoRI*- und *BamHI*-verdauter DNA sowie einem deutlichen Signal bei ca. 2,2 kb (mit *HindIII* verdauter DNA).

3.7 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

3.7.1 Chromosomenpräparation für die FISH

Wurzelspitzen von Hanfkeimlingen der diözischen Sorte 'Kompolti' wurden zur Anreicherung von Chromosomen im Stadium der Metaphase mit Kolchicin bzw. mit Eiswasser behandelt.

Die Behandlung der Wurzelspitzen für 6 Stunden mit 0,05%iger Kolchizinlösung bei Zimmertemperatur führte zu einer Anreicherung stark kondensierter Chromosomen. Durch eine Verkürzung der Behandlungsdauer konnte der Kondensationsgrad der Chromosomen nicht verringert werden. Die mit Eiswasser behandelten Wurzelspitzen wiesen Chromosomen auf, die etwas größer und gestreckter waren als die stark kondensierten Chromosomen der mit Kolchizin behandelten Wurzelspitzen. Dabei konnte der Kondensationsgrad der Chromosomen durch Variation der Eiswasserbehandlungsdauer (19 bis 24) Stunden beeinflusst werden. Eine Behandlung der Wurzelspitzen mit Hydroxyharnstoff nach **Lee et al. (1997)** bzw. die Verwendung von Hydroxychinolin als Spindelgift zeigte keine Erhöhung der Anzahl von Metaphasechromosomen.

Zur Bestimmung des Geschlechtes der zur Präparatherstellung verwendeten Keimlinge wurden diese nach dem Entfernen der Wurzelspitze in Multitopfplatten ausgepflanzt und ins Gewächshaus überführt. Durch das Entfernen der Wurzelspitze waren die Keimlinge meist so geschwächt, dass sie nicht anwachsen bzw. noch im Keimblattstadium abstarben. Eine Geschlechtsbestimmung aufgrund morphologischer Merkmale war dadurch nicht mehr möglich. Auch für den Einsatz molekularer Marker zur Geschlechtsbestimmung war durch das zeitige Absterben der Keimlinge nicht ausreichend Pflanzenmaterial vorhanden, um mit der bei Hanf etablierten DNA-Extraktionsmethode (CTAB) genügend DNA zu erhalten.

Um Chromosomenpräparate mit determiniertem Geschlecht zu erhalten, wurden männliche Hanfblüten zur Präparatherstellung verwendet. Hierzu wurden Blütenrispen männlicher Hanfpflanzen der Kreuzung 'Kompolti' x 'Skunk 1', 'Skunk 1' x 'Kompolti' sowie der Herkunft CAN 18 vor der Blüte abgenommen und fixiert. Einzelne Blüten wurden dann zu Präparaten verarbeitet und unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Zellen (vermutlich zum Archospor gehörend) sehr junger Blüten befanden sich im Stadium der mitotischen Metaphase. Pollenmutterzellen von Blüten der nächst tieferen Spindelstufen innerhalb der Rispe befanden sich in den Stadien Pachytän und Metaphase I. Innerhalb der Antheren konnte eine weite

Streuung der Zellteilungsstadien beobachtet werden konnte. Für die FISH wurden hauptsächlich Präparate von Zellen verwendet, welche sich im Metaphasestadium der Mitose befanden.

3.7.2 Etablierung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bei Hanf

Zur methodischen Etablierung der FISH bei Hanf wurden Chromosomenpräparate aus Hanfwurzelspitzen hergestellt und mit 5S-rDNA und 25S-rDNA Sonden hybridisiert (**Abb. 3.22**). Die Amplifikation der 5S-rDNA-Gene wurde mit für diese Region spezifischen Primerpaaren (**Gottlob-McHugh et al., 1990**) und genomischer Hanf-DNA durchgeführt. Das dabei amplifizierte Fragment hatte eine Größe von ca. 120 bp. Die 25S-rDNA Sonden wurden ebenfalls durch Amplifikation von genomischer Hanf-DNA mit genspezifischen Primern (**Yokota et al., 1989**) erzeugt.

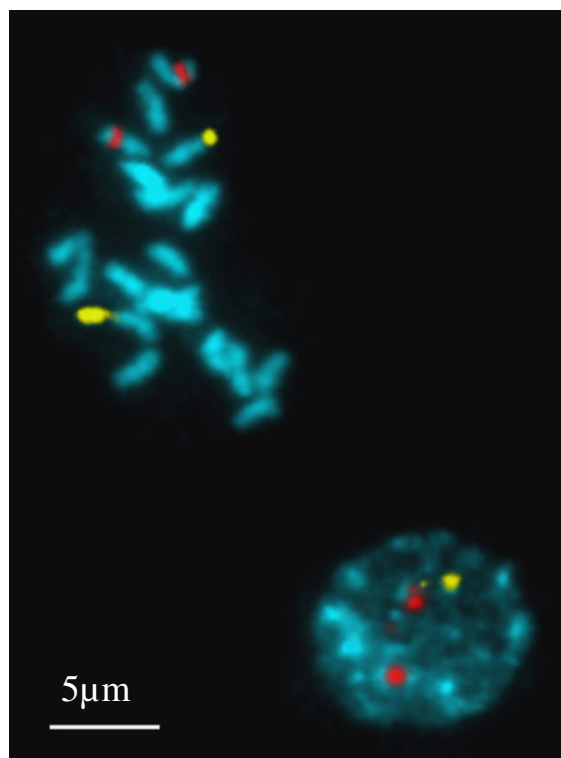


Abb.3.22: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit rDNA-Sonden

Mit DAPI gegengefärbte Chromosomen eines Wurzelspitzenpräparates (blau), FITC-Signale (gelb) der DIG-markierten 5S-rDNA-Sonden, Cy3 Signale (rot) der Biotin-markierten 25S-rDNA Sonden (computergeneriertes Kompositionsbild).

Das Amplifikationsprodukt wies hierbei eine Größe von ca. 250 bp auf. Die 5S- bzw. 25S-rDNA Sonden mit DIG bzw. Biotin markiert und mit FITC-markierten bzw. Cy3-markierten Antikörpern detektiert. Bei der Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop konnten bei diploiden Zellen je Sonde zwei Signale beobachtet werden. Die Signale der 5S-rDNA Sonden waren im Telomerbereich eines Chromosomenpaares lokalisiert, während die Signale der 25S-rDNA Sonden im Zentromerbereich zu lokalisieren waren. Bei den in Wurzelspitzenpräparaten oft zu beobachtenden tetraploiden Zellen (**Breslavetz, 1932**) konnten entsprechend 8 Signale beobachtet werden. Signale von 5S- und 25S-rDNA Sonden wurden auch bei Interphasezellen beobachtet.

3.7.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit geschlechtsspezifischen Sonden

Die männlich-spezifischen Fragmente der SCAR-Marker SCAR_{OPA08} (**Mandolino et al., 1999**), HK18, HK50 (**Flachowsky, 2003**) C11Komp und C11Seq wurden DIG-markiert und als Sonden für die Hybridisierung mit Chromosomenpräparaten von Hanf eingesetzt.

Als Ausgangswerte für die Stringenz während der Hybridisierung wurden in der Hybridisierungslösung ca. 80% eingestellt. Die anschließenden Waschungen fanden bei Stringenzen von ca. 46% und 73% statt. Durch Wiederholung der Hybridisierungen mit jeweils neu hergestellten Sonden sollte das Auftreten von Artefakten ausgeschlossen werden.

Bei der Hybridisierung mit der Sonde SCAR_{OPA08} unter den oben beschriebenen stringenten Bedingungen konnten bei allen Präparaten stark repetitive Signale beobachtet werden. Dabei waren die Signale dispers über alle Chromosomen verteilt (**Abb. 3.23**). Allgemein waren die Signale auf den heterochromatischen Bereich der Chromosomen lokalisiert. Die durch die Lage der Schwesterchromatiden hervorgerufene paarweise Anordnung der Signale konnte in vielen Fällen vor allem bei stärkeren in Klustern auftretenden Signalen beobachtet werden. Im Zentromerbereich gab es teilweise Abschwächungen der Signale. Insbesondere bei Pachytän-Präparaten traten Bereiche mit geringen bzw. fehlenden Signalen auf. Zum Abdecken unspezifischer Bindestellen und somit zur Erhöhung der Spezifität der Sonde wurde fragmentierte Gesamt-DNA (Größe: 100 bis 300 bp) weiblicher Hanfpflanzen in 50 bis 100 facher Konzentration der Sonde zum Hybridisierungsmix gegeben. Dadurch konnte lediglich eine leichte Verringerung der Signalstärke erreicht werden. Spezifischere Signale waren nicht festzustellen.

Die Sonde C11Komp erzeugte bei der Hybridisierung mit Chromosomenpräparaten von Pflanzen der Kreuzung `Kompolti´ x `Skunk 1´ ebenfalls stark repetitive Signale. Dabei konnten neben den diffus über den gesamten Bereich der Chromosomen verteilten schwachen Signalen auch stärker leuchtende Signale festgestellt werden (**Abb. 3.24**). Diese Signale kamen auf den einzelnen Chromosomen in Form von paarig auf den Schwesterchromatiden angeordneten klusterartigen Spots vor. Der Einsatz von Blockierungs-DNA (50 bis 100 fache Konzentration der Sonde) zur Abdeckung unspezifischer Sondenbindestellen führte zu keinen spezifischeren Hybridisierungsergebnissen.

Bei der Hybridisierung der Sonde C11Seq mit Präparaten der Kreuzung `Kompolti´ x `Skunk 1´ konnte ebenfalls ein repetitives Hybridisierungsmuster beobachtet werden. Dabei wiesen die Signale im Vergleich zu C11Komp eine noch stärker geklusterte Anordnung auf. Das Hybridisierungsmuster entsprach dabei an Lokalisierung und Intensität in etwa dem der stärksten Signale der Sonde C11Komp. Hier konnten pro Chromosom zwei bis neun starke Signale detektiert werden (**Abb. 3.25**).

Die Signalstärke der Sonde C11Seq bei der Hybridisierung mit Präparaten von Antherenzellen der Hanfherkunft CAN 18 war weniger intensiv ausgeprägt als bei den Präparaten, die den Pflanzen der Kreuzungen der Sorten `Kompolti´ und `Skunk 1´ entstammten. Hier konnten Zellen gefunden werden, die zwei detektierbare Hybridisierungssignale aufwiesen. Ein Signal war auf einem großen Chromosom distal auf dessen kürzerem Arm lokalisiert. Das andere Signal befand sich auf einem etwas kleineren Chromosom in einer Position nahe dem Zentromer (**Abb. 3.26**). Auch bei Interphasenzellen konnten zwei Hybridisierungssignale festgestellt werden. Bei Wiederholung der Hybridisierungen mit neu hergestellten Präparaten und Sonden konnten vergleichbare Resultate erzielt werden.

Keine Signale konnten bei der Verwendung der aus AFLP-Fragmenten entwickelten männlich-spezifischen Sonden HK18 und HK50 detektiert werden. Auch durch weniger stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen gelang es nicht, Hybridisierungssignale zu erzeugen.

3.7.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit PAR-spezifischen Sonden

Als PAR-spezifische Sonden wurden das Fragment des SCAR-Markers AAT330Komp, dessen flankierende DNA-Regionen (330GW_L und 330GW_R) sowie das Fragment des SCAR-Markers GAA_510_B9 eingesetzt. Der verwendete Hybridisierungsmix hatte Stringen-

zen von 82 bis 87%. Bei den anschließenden Waschungen wurden Stringenzen von ca. 46% und 73% eingestellt.

Nach der Hybridisierung mit dem PAR-spezifischen SCAR-Marker AAT330Komp als Sonde konnten gleichmäßig über alle Chromosomen verteilte diffuse Signale von geringer Stärke detektiert werden. Daneben konnten auf einigen Chromosomen etwas stärkere Signale festgestellt werden (**Abb. 3.27**). Auf den einzelnen Chromosomen war die Position dieser Signale jeweils unterschiedlich.

Der Einsatz der durch PCR Walking hergestellten flankierenden Bereiche des AFLP-Fragmentes AAT330Komp als Sonden führte ebenfalls zur Erzeugung repetitiver Hybridisierungssignale. Hier wurden die Fragmente 330iLEcoRV und 330iREcoRV gleichzeitig in einem Hybridisierungsansatz verwendet. Die Signale beider Sonden stellten sich als diffuse, hauptsächlich den Heterochromatinbereich aller Chromosomen markierende Leuchtfläche dar (**Abb. 3.28**). Deutlich weniger Signal ist im Zentromerbereich der Chromosomen zu beobachten. Im Bereich der Telomere aller Chromosomen konnte ein Fehlen von Sondersignalen festgestellt werden. Um die Spezifität der Sonden zu erhöhen, wurde dem Hybridisierungsansatz in weiteren Versuchen Blockierungs-DNA in 10, 50 bzw. 100facher Konzentration der Sonde zugegeben. Der Einsatz dieser Blockierungs-DNA führte bei keiner Konzentration zu einer Erhöhung der Spezifität der verwendeten Sonde.

Die PAR-spezifische Sonde GAA510_B9 zeigte bei der Hybridisierung mit Chromosomenpräparaten keine Signale.

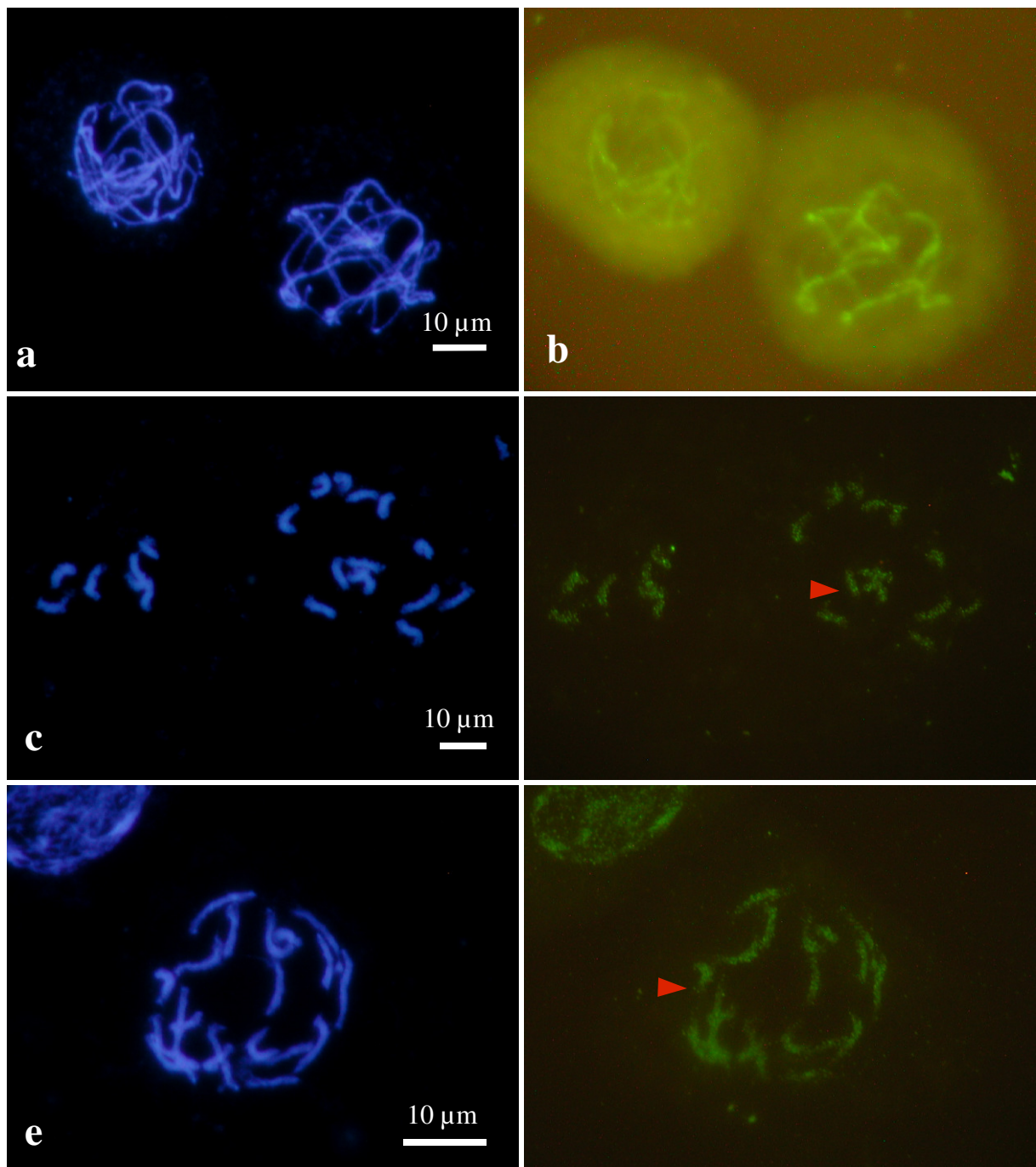


Abb. 3.23: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde SCAR_{OPA08}

Hybridisierung von Pollenmutterzellen im Pachytän (**a, b**) bzw. Metaphase, Mitose (**c** bis **f**) mit der Sonde SCAR_{OPA08}

a, c, e: mit DAPI gegengefärbte Chromosomen, **b, d, f:** repetitive FITC-Signale der DIG-markierten Sonde SCAR_{OPA08}. Stärkere paarig angeordnete Signale sind durch Pfeile hervorgehoben.

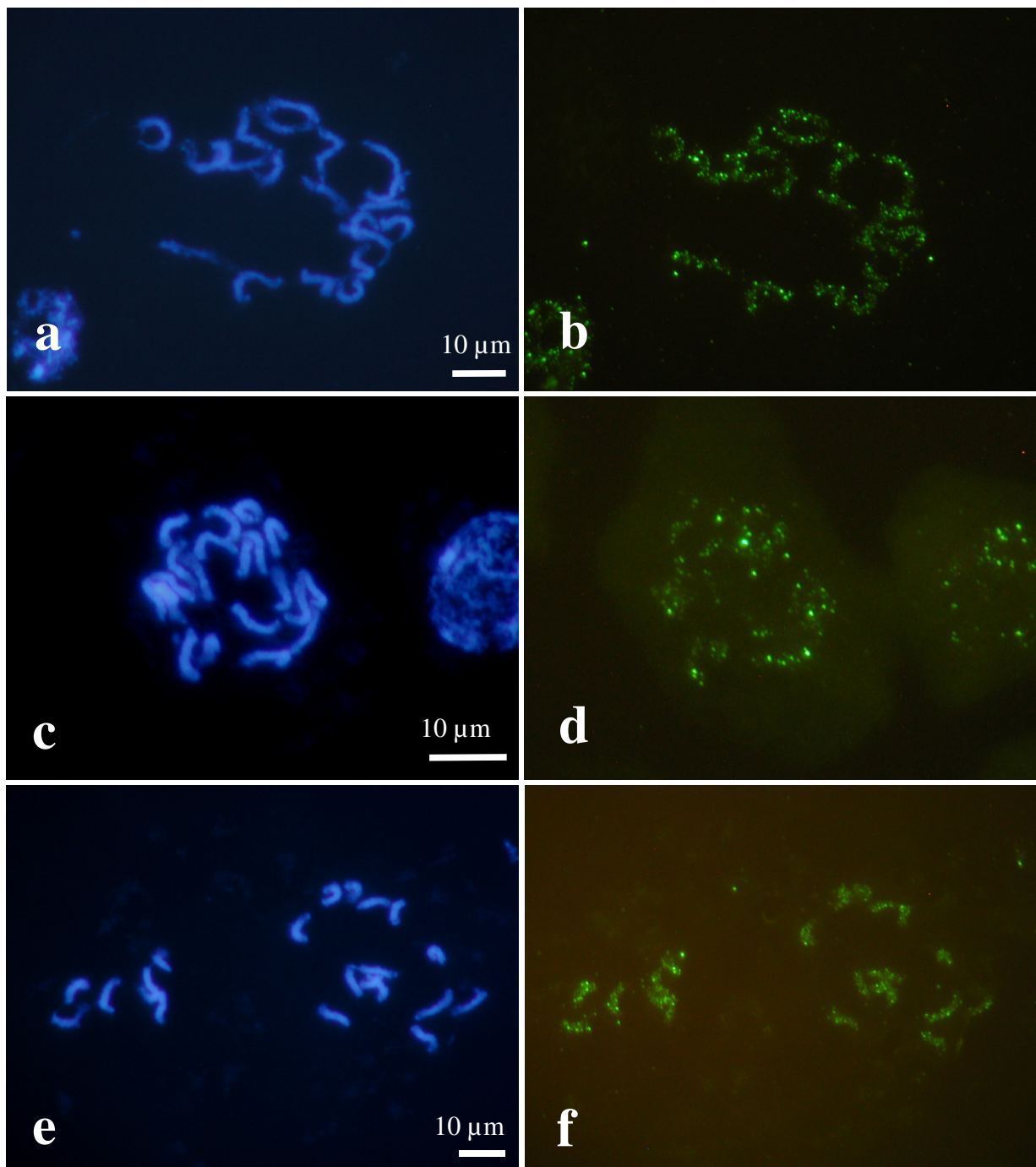


Abb. 3.24: FISH mit Sonde C11Komp

Hybridisierung von Antherenzellen im Stadium der mitotischen Metaphase mit der Sonde C11Komp.

a, c, e: mit DAPI gegengefärbte Chromosomen, **b, d, f:** repetitive FITC-Signale der DIG-markierten Sonde C11Komp.

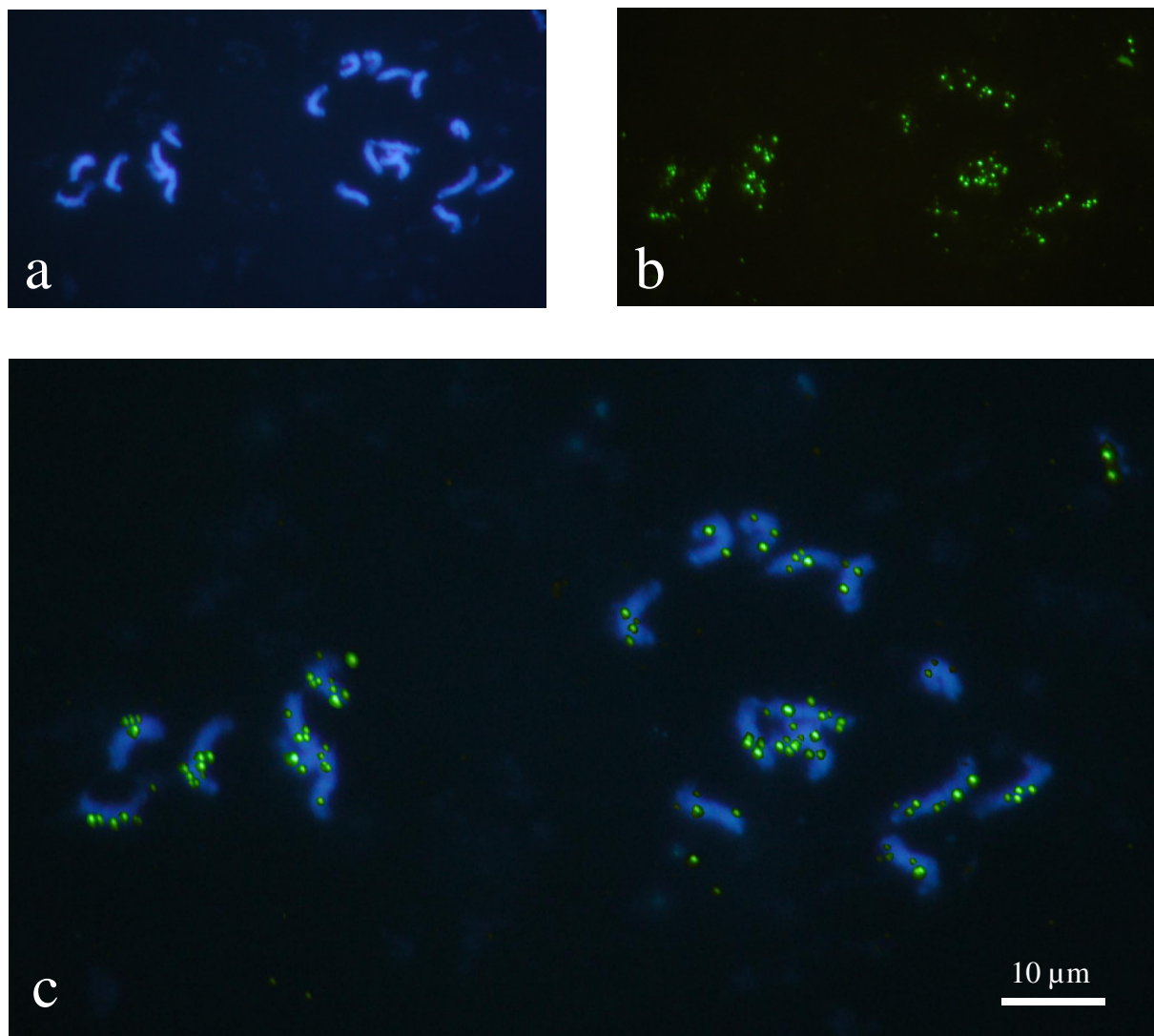


Abb. 3.25: FISH mit Sonde C11Seq der Kreuzungsnachkommen der Sorten `Kompolti` und `Skunk 1`

Hybridisierung einer Antherenzelle im Stadium der mitotischen Metaphase mit der Sonde C11Seq.

a: mit DAPI gegengefärbte Chromosomen, **b:** repetitive FITC-Signale der DIG-markierten Sonde C11Seq. **c:** kombinierte Darstellung der DAPI (a) und FITC (b) Signale durch Überlagerung der Bilder.

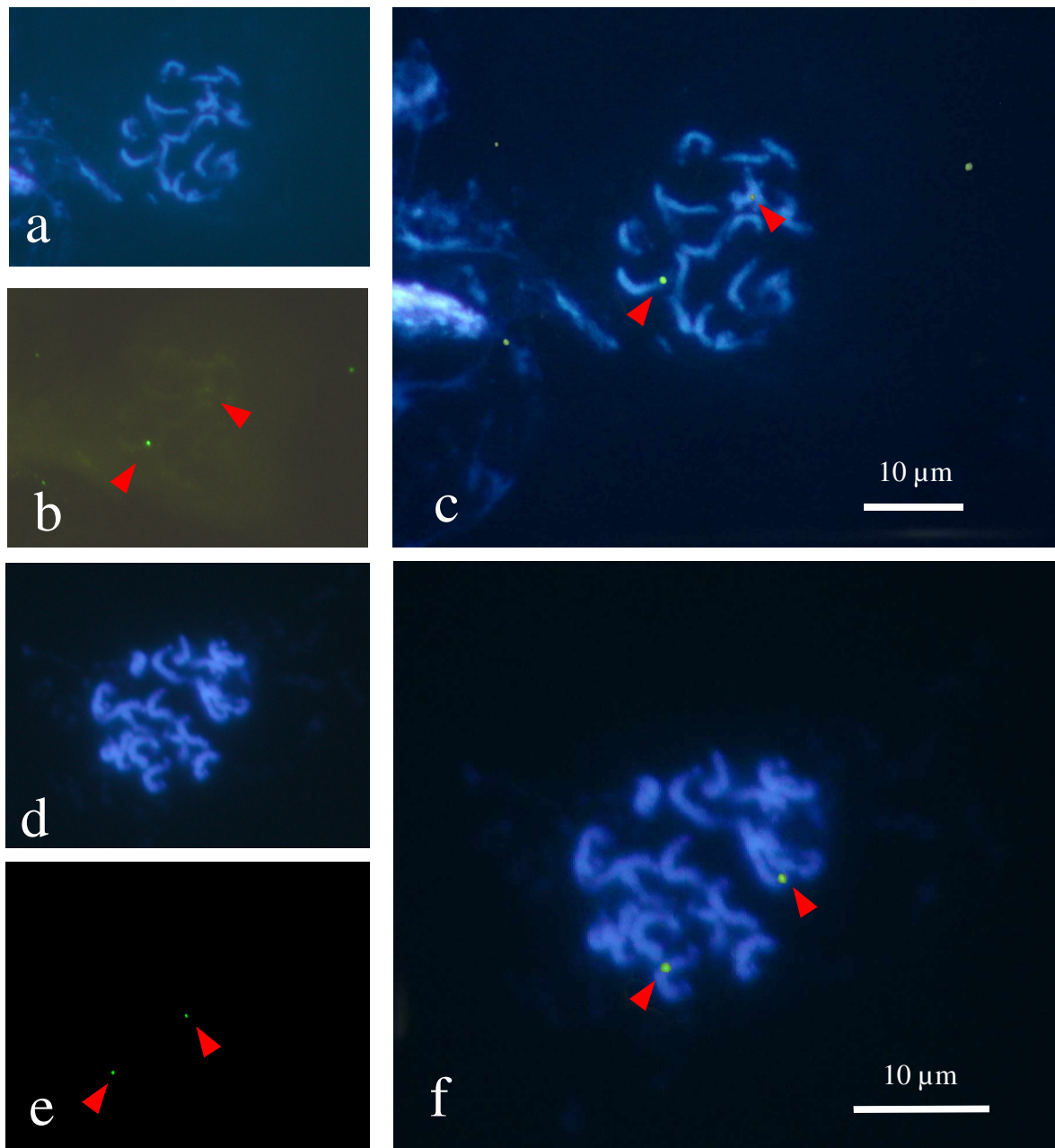


Abb. 3.26: FISH mit geschlechtsspezifischer der Hanfherkunft CAN 18 mit der Sonde C11Seq

a, d: DAPI gefärbte Metaphase (Mitose) Chromosomen, **b, e:** FITC Signale der DIG-markierten Sonde C11Seq, **c, f:** kombinierte Darstellung der DAPI (a) und FITC (b) Signale. Die Signale der Sonde sind durch einen Pfeil markiert.

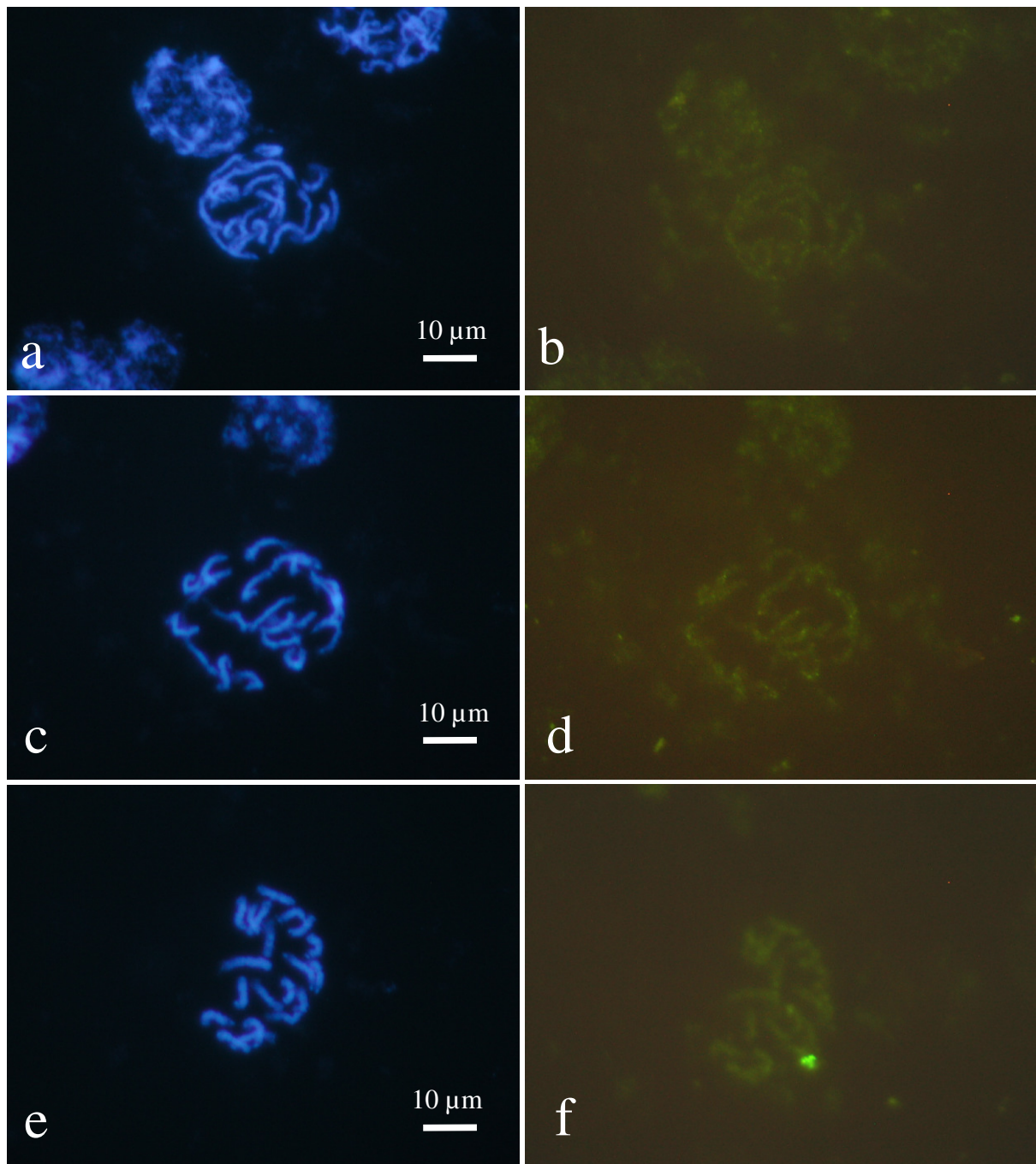


Abb. 3.27: FISH mit PAR-spezifischer Sonde AAT_330Komp

Hybridisierung von Antherenzellen im Stadium der mitotischen Metaphase mit der Sonde AAT_330Komp.

a, c, e: mit DAPI gegengefärbte Chromosomen, **b, d, f:** repetitive FITC-Signale der DIG-markierten Sonde AAT_330Komp.

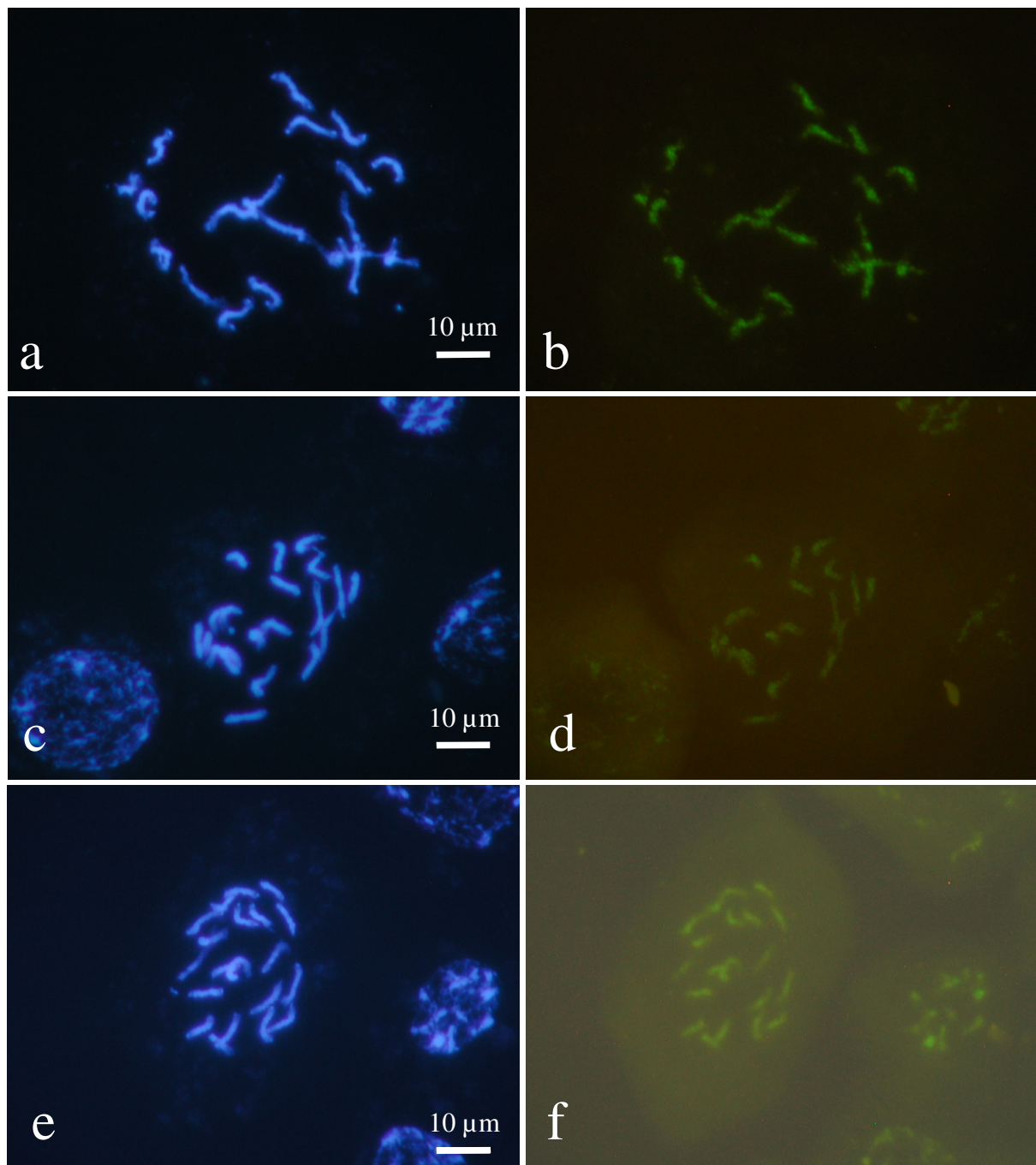


Abb. 3.28: FISH mit PAR-spezifischer Sonden 330GW_L und 330GW_R

Gleichzeitige Hybridisierung von Antherenzellen im Stadium der mitotischen Metaphase mit der Sonden 330GW_L sowie 330GW_R.

a, c, e: mit DAPI gegengefärbte Chromosomen, **b, d, f:** repetitive FITC-Signale der DIG-markierten Sonde 330GW.

4 Diskussion

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

4.1 Entwicklung geschlechtsspezifischer Sonden

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

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

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

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

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

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

4.1.1.1 Konvertierung von geschlechtsspezifischen RAPD-Markern in SCAR-Marker

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.1.2 Southern-Blot Analyse molekularer Marker

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.1.3 Screening von DNA-Banken nach geschlechtsspezifischen Klonen

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

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

einer anschließenden Southern-Blot Analyse keine geschlechtsspezifischen Hybridisierungsmuster.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

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

4.2.1 Etablierung der FISH bei Hanf

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.2 FISH mit geschlechtsspezifischen Sonden

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.3 FISH mit PAR-spezifischen Sonden

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

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

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

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

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

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten molekular- und cytogenetische Methoden genutzt werden, um Informationen über Struktur und Organisation geschlechtsgekoppelter DNA-Bereiche des Hanfes zu erlangen. Die Technik der *in situ* Hybridisierung sollte genutzt werden, um die Geschlechtschromosomen mit spezifischen Sonden zu markieren. Dazu wurden verschiedene Strategien zum Auffinden und Isolieren von geschlechtsgekoppelten DNA-Fragmenten entwickelt und angewendet. Hierbei erwies sich die Umwandlung von männlich- und PAR-spezifischen RAPD- bzw. AFLP-Markern als erfolgreichste Vorgehensweise. Es gelang, einen männlich-spezifischen RAPD-Marker (OPC-11₂₇₀₀) sowie einen PAR-spezifischen AFLP-Marker (AGA_AAT_330) in spezifische SCAR-Marker umzuwandeln. Das 2,2 kb große Fragment des von dem RAPD-Marker OPC-11₂₇₀₀ abstammenden SCAR-Markers C11Seq zeigte beim Screening von 74 Pflanzen einer Kreuzungspopulation Kopplung mit dem männlichen Geschlecht. Zum Ausgangsmarker kosegregierendes Verhalten zeigten die beiden aus dem PAR-spezifischen AFLP-Marker AGA_AAT_330 hergestellten SCAR-Primerpaare 330Komp und 330CA. Dabei wies der Marker 330CA ein kodominantes Amplifikationsmuster auf. Um aus dem 0,3 kb langen PAR-spezifischen DNA-Fragment des SCAR-Markers 330Komp eine für die *in situ* Hybridisierung geeignete Sonde herzustellen, wurden die flankierenden DNA-Bereiche links und rechts des Fragmentes mittels PCR Walking amplifiziert. Damit gelang es, das Fragment auf ca. 8,0 kb zu vergrößern.

Die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Hanfchromosomen konnte erfolgreich etabliert werden. Erstmals konnte damit die Lokalisierung der 5S- und 25S-rDNA Bereiche auf den Chromosomen des Hanfes festgestellt werden. Damit gelang es, zwei der zehn Chromosomenpaare des Hanfes eindeutig zu markieren. Mit der von dem RAPD-Marker OPC-11₂₇₀₀ abstammende Sonde C11Seq konnten bei der *in situ* Hybridisierung von Chromosomenpräparaten der Herkunft CAN 18 je ein Signal auf zwei Chromosomen erzeugt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der beiden Chromosomen kann angenommen werden, dass es sich dabei um das Geschlechtschromosomenpaar des Hanfes handelt. Die Signale der von dem AFLP-Marker AGA_AAT_330 abstammenden Sonden waren bei der *in situ* Hybridisierung repetitiv im heterochromatischen Bereich aller Chromosomen lokalisiert.

5 Summary

In the presented work information about structure and organisation of sex linked DNA regions of hemp should be obtained with help of molecular and cytogenetic methods. With specific probes the sex-chromosomes of hemp should be marked. Therefore different approaches to discover and isolate sex linked DNA fragments were developed and applied. Most successful was the transformation of male and PAR specific RAPD and AFLP markers respectively.

The male specific RAPD marker OPC-11₂₇₀₀ and the PAR specific AFLP marker AGA_AAT_330 could successfully be transformed into different SCAR markers. The SCAR marker C11Seq originating from the RAPD marker OPC-11₂₇₀₀ showed complete cosegregation with male sex when applied to 74 plants of a segregating progeny. Two PAR specific SCAR markers (330Komp and 330CA) could be developed from the AFLP marker AGA_AAT_330. The amplification pattern produced by the marker 330Komp showed cosegregation with AFLP marker AGA_AAT_330. The other SCAR marker (330CA) produced a codominant amplification pattern. To use the PAR specific fragment as probe for *in situ* hybridization, increasing of the fragment's length by amplifying the flanking regions left and right of the fragment was necessary. PCR Walking was used successfully to amplify about 4,0 kb of each side of the fragment's flanking regions.

In situ hybridization of chromosome specimens could be adapted to hemp successfully. The sites for 5S- and 25S-rDNA genes could be located for the first time. Thus two of the ten chromosome pairs of hemp could be marked. The probe C11Seq originating from the RAPD marker OPC-11₂₇₀₀ showed a clear signal on two chromosomes when hybridized to chromosomes of the hemp accession CAN 18. Due to the different size of both chromosomes it was assumed, that this signal was located on the sex chromosomes. Signals of probes developed from the AFLP marker AGA_AAT_330 were repetitively localized on the heterochromatic regions of all chromosomes.

6 Literaturverzeichnis

- Ainsworth C., J. Parker, V. Buchanan-Wollaston (1998): Sex determination in plants. *Curr Top Dev Biol* 38, 167–223.
- Alghanim, H. J., J. R. Almirall (2003): Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Anal Bioanal Chem* 376, 1225-1233.
- Atanassov, I., C. Delichère, D. A. Filatov, D. Charlesworth, I. Negrutiu, F. Monéger (2001): Analysis and Evolution of Two Functional Y-Linked Loci in a Plant Sex Chromosome System. *Molecular Biology and Evolution* 18, 2162-2168.
- Ayling, L. J., D. K. Griffin (2002): The evolution of sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 99, 125–140.
- Bócsa, I. und M. Karus, 1997: *Der Hanfanbau: Botanik, Sorten, Anbau und Ernte*. 1. Auflage, C. F. Müller Verlag Heidelberg.
- Breslavetz, L., 1928: Polyploide Mitosen bei *Cannabis sativa* L.. I. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, 644-649.
- Breslavetz, L. (1932): Polyploide Mitosen bei *Cannabis sativa* L. II. *Planta* 17, 644-649.
- Charlesworth, B. (1991): The evolution of sex chromosomes. *Science* 251, 1030–1033.
- Charlesworth, D. (2002): Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88, 94-101.
- Clark, M. S., J. S. Parker (1993): Repeated DNA and heterochromatin structure in *Rumex acetosa*. *Heredity* 70, 527-536.
- Coen, E. S., E. M., Meyerowitz (1991): The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.

-
- Colombo, L., J. Franken, E. Koetje, J. van Went, H. J. M. Dons, G. C. Angenent, A. J. van Tunen (1995): The Petunia MADS Box Gene FBPI7 Determines Ovule Identity. *The Plant Cell* 7, 1859-1868.
- Costich, D. E., T. R. Meagher, E. J. Yurkow (1991): A rapid means of sex determination in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 359-370.
- Cottage, A., A. P. Yang, H. Maunder, R. C. de Lacy, N. A. Ramsay (2001): Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 321-327.
- Dedryver, F., M. F. Jubier, J. Thouvenin, H. Goyeau (1996): Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39, 830-835.
- De Jong, W., A. Forsyth, D. Leister, C. Gebhardt, D. C. Baulcombe (1997): A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor Appl Genet* 95, 246-252.
- Delichere C., J. Veuskens, M. Hernould, N. Barbacar, A. Mouras, I. Negrutiu, F. Moneger (1999): *SLY1*, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. *EMBO J* 18, 4169-4179.
- Dellaporta, S. L., A. Calderon-Urrea (1993): Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5, 1241-1251.
- de Meijer, E. P. M. (1999): Cannabis germplasm resources. p. 133-151. In P. Ranalli (ed.) *Advances in hemp research*. The Haworth Press, New York.
- Devic, M., S. Albert, M. Delseny, T. J. Roscoe (1997): Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol Biochem* 35, 331-339.

-
- Di Stilio, V. S., R. V. Kesseli, D. L. Mulcahy (1998): A Pseudoautosomal Random Amplified Polymorphic DNA Marker for the Sex Chromosomes of *Silene dioica*. *Genetics* 149, 2057-2062.
- Dierks, W., W. von Sengbusch (1967): Studium der Vererbung des Geschlechts und des Wuchstyps beim Hanf. *Der Züchter* 37, 12-15.
- Dietmaier W., A. Hartmann, S. Wallinger, E. Heinmoller, T. Kerner, E. Endl, K. W. Jauch, F. Hofstadter, J. Ruschoff (1999): Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 154, 83-95.
- Dolezel, J., W. Göhde (1995): Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19, 103-106.
- 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.
- Ellis, N., P. Yen, K. Neiswanger, L. J. Shapiro, P. N. Goodfellow (1990): Evolution of the pseudoautosomal boundary in Old World monkeys and great apes. *Cell* 63, 977-986.
- Faeti, V., G. Mandolino, P. Ranalli (1996): Genetic diversity of *Cannabis sativa* germplasm based on RAPD markers. *Plant Breeding* 115, 367-370.
- Farbos, I., J. Veuskens, B. Vyskot, M. Oliveira, S. Hinnisdaels, A. Aghmir, A. Mouras, I. Negrutiu (1999): Sexual dimorphism in white campion: deletion on the Y chromosome results in a floral asexual phenotype. *Genetics* 151, 1187-1196.
- Flachowsky, H. (2003): Erstellung einer genetischen Karte an Hanf (*Cannabis sativa* L.) mit molekularen Markern. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Flachowsky, H., E. Schumann, W. E. Weber, A. Peil (2001): Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding* 120, 305-309.

-
- 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.
- Gill, G. P., C. F. Harvey, R. C. Gardner, L. G. Fraser (1998): Development of sex-linked PCR markers for gender identification in Actinidia. *Theor Appl Genet* 97, 439–445.
- Gottlob-McHugh S. G., M. Levesque, K. MacKenzie, M. Olson, O. Yarosh, D. A. Johnson (1990): Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33, 486-494.
- Grant, S., A. Houben, B. Vyskot, J. Siroky, and W. H. Pan (1994): Genetics of sex determination in flowering plants. *Dev Genet* 15, 214-230.
- Graves, J. A. (1995): The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes – an evolving understanding. *Bioessays* 17, 311–320.
- Graves, J. A. (1998): Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool* 28, 472–481.
- Graves, J. A., M. J. Wakefield, R. Toder (1998): The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 7, 1991-1996.
- Guerra, M. (2000): Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23, 1029-1041.
- Guttman, D. S., D. Charlesworth (1998): An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature* 393, 263-266.
- Hassold, T. J., S. L. Sherman, D. Pettay, D. C. Page, P. A. Jacobs (1991): XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J hum Genet* 49, 253–260.

-
- Herich, R. (1961): Geschlechtsausprägung und Größe der Zellkerne sowie Polkörner bei monözischem Hanf verschiedener Formen. *Der Züchter* 31, 48-51.
- Hirata, K. (1929): Cytological basis of the sex determination in *Cannabis sativa* L. *Japanese Journal of Genetics* 4, 198-201.
- Hoffmann, W. (1947): Die Vererbung der Geschlechtsformen des Hanfes (*Cannabis sativa* L.) I. *Der Züchter* 17/18, 257-277.
- Hoffmann, W., A. Mudra, W. Plarre (1970): Lehrbuch der Züchtung Landwirtschaftlicher Kulturpflanzen, Band 2, Spezieller Teil, Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg, 415-430.
- Irish, E. E. (1999): Maize sex determination. In C. Ainsworth (ed), *Sex Determination in Plants*, Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, pp. 183-188.
- Jagdish, V., J. Robertson and A. Gibbs (1996): RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. *Forensic Sci Int* 79, 113-121.
- Jamsari, A., I. Nitz, S. M. Reamon-Büttner, C. Jung (2004): BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. *Theor Appl Genet* 108, 1140–1146.
- Jiang, C., K. C. Sink (1996): RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. *Euphytica* 94, 329-333.
- Kaneko, T., H. Kotani, Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, N. Miyajima, 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.
- Karlov, G. I., T. V. Danilova, C. Horlemann, G. Weber (2003): Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica* 132, 185–190.

- Kejnovsky, E., J. Vrana, S. Matsunaga, P. Soucek, J. Siroky, J. Dolezel, 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.
- Khrustaleva L. I., C. Kirk (2001): Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J* 25, 699-707.
- Kipling, D., E. C. Salido, L. J. Shapiro, H. J. Cooke (1996): High frequency de novo alterations in the long-range genomic structure of the mouse pseudoautosomal region. *Nature Genet* 13, 78–80.
- Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto, H. Hirochika (2004): Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304 (5673), 982.
- Kojoma, M., O. Iida, Y. Makino, S. Sekita, M. Satake (2002): DNA Fingerprinting of *Cannabis sativa* Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Amplification. *Planta med* 68, 60-63.
- Kozlova S. V., N. A. Mazurok, A. V. Vershinin, S. M. Zakian (2003): Various organizations of the complex repeats in vole sex chromosome heterochromatin. *Chromosome Res* 11, 759–769.
- Krabel, D., B. Vornam, S. Herzog (1998): PCR-based random amplification of genomic DNA from single pollen grains of trees. *Angewandte Botanik* 72, 10-13.
- Lahn B. T., D. C. Page (1999): Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286, 964-967.
- Lardon, A., S. Georgiev, A. Aghmir, G. Le Merrer, I. Negrutiu (1999): Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by Y chromosome deletions. *Genetics* 151, 1173-1185.

- Lebel-Hardenack, S., E. Hauser, T. F. Law, J. Schmid, 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.
- Lee, J. H., K. Arumuganathan, Y. Yen, S. Kaeppler, H. Kaeppler, P. S. Baezinger (1997): Root tip cell cycle synchronisation and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 40, 633–638.
- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson, I. J. Leitch (1994): In situ- Hybridisierung. Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Lengerova, M., E. Kejnovsky, R. Hobza, J. Macas, S. R. Grant, B. Vyskot (2004): Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. *Theor Appl Genet* 108, 1193–1199.
- Linacre, A., J. Thorpe (1998): Detection and identification of *Cannabis* by DNA. *Forensic Sci Int* 91, 71-76.
- Lorbeer, G., (1934): Die Zytologie des Lebermooses mit besonderer Berücksichtigung allgemeiner Chromosomenfragen. *Jahrb Wiss Bot* 80, 567-817.
- Mandolino, G., A. Carboni, S. Forapani, V. Faeti, P. Ranalli (1999): Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl Genet* 98, 86–92.
- Mandolino, G., A. Carboni, M. Bagatta, V. M. C. Moliterni, P. Ranalli (2002): Occurrence and frequency of putatively Y chromosome linked DNA markers in *Cannabis sativa* L. *Euphytica* 26, 211-218.
- Matsunaga, S., S. Kawano, H. Takano, H. Uchida, 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.

- Matsunaga, S., K. Schutze, I. S. Donnison, S. R. Grant, T. Kuroiwa, S. Kawano (1999): Technical advance: single pollen typing combined with laser-mediated manipulation. *Plant J* 20(3), 371-378.
- Meksem, K., D. Leister, J. Peleman, M. Zabeau, S. F. 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.
- Moliterni V., L. Cattivelli, P. Ranalli, G. Mandolino (2004): The sexual differentiation of *Cannabis sativa* L.: A morphological and molecular study. *Euphytica* 140, 95-106.
- Moore, R. C., O. Kozyreva, S. Lebel-Hardenack, J. Siroky, R. Hobza, B. Vyskot, S. R. Grant (2003): Genetic and Functional Analysis of *DD44*, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome Evolution. *Genetics* 163, 321-334.
- Mulcahy D. L., N. F. Weeden, R. Kesseli, S. B. Carroll (1992): DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Reprod* 5, 86-88.
- Muller, H. J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* 1, 2-9.
- Nakao, S., S. Matsunaga, A. Sakai, T. Kuroiwa, S. Kawano (2002): RAPD isolation of a Y chromosome-specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Genome* 45, 413-420.
- Naseer Aziz, A., J. E. A. Seabrook, G. C.C. Tai (1999): Amplification of RAPD markers from single pollen grains of diploid ($2N=2X=24$) potato. *Amer J Potato Res* 74, 179-182.
- Negi, M. S., M. Devic, M. Delseny, 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.

- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev, F. Moneger (2001): Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiol* 127, 1418- 1424.
- Nöthiger, R. N., M. Steinmann-Zwicky (1987): In W. Hennig (ed), Results and problems in cell differentiation, structure and function of eukaryotic chromosomes, Vol 14. Springer Verlag, Heidelberg, 271–300.
- Obara, M., S. Matsunaga, S. Nakao, S. Kawano (2002): A plant Y chromosome-STS marker encoding a degenerate retrotransposon. *Genes Genet Syst* 77, 393-398.
- Okada, S., M. Fujisawa, T. Sone, S. Nakayama, R. Nishiyama, M. Takenaka, S. Yamaoka, M. Sakaida, K. Kono, M. Takahama, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Brennicke, K. Ohyama (2000): Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J* 24, 421-428.
- Okada, S., T. Sone, M. Fujisawa, S. Nakayama, M. Takenaka, K. Ishikazi, K. Kono, Y. Shimizu-Ueda, K. T. Yamato, H. Fukuzawa, A. Brennicke, K. Ohyama (2001): The Y chromosome in the liverwort *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeated sequences harboring a ring finger protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9454-9459.
- Ortega, D., M. Raynal, M. Laudie, C. Llauro, R. Cooke, M. Devic, S. Genestier, G. Picard, P. Abad, P. Contard, C. Sarrobert, L. Nussaume, N. Bechtold, C. Horlow, G. Pelletier, M. Delseny (2002): Flanking sequence tags in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines: a pilot study. *Comptes Rendus E Biologies* 325, 773-780.
- Paran, I., R. W. Michelmore (1993): Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85, 985-993.
- Parasnis, A. S., V. S. Gupta, S. A. Tamhankar, P. K. Ranjekar (2000): A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molecular Breeding* 6, 337–344.

-
- Parrish, T. L., H. P. Koelewijn, P. J. van Dijk (2004): Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (*Moraceae*). *Sex Plant Reprod* 17, 17–22.
- Peil, A., H. Flachowsky, E. Schumann, W. E. Weber (2003): Sex-linked AFLP markers indicate a pseudo autosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor Appl Genet* 107, 102–109.
- Petersen, G., B. Johansen, O. Seberg (1996): PCR and sequencing from a single pollen grain. *Plant Mol Biol* 31, 189–191.
- Polley, A., E. Seigner, M. W. Ganai (1997): Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome* 40, 357–361.
- Pritham, E. J., Y. Hi Zhang, C. Feschotte, R. V. Kesseli (2003): An Ac-like transposable element family with transcriptionally active Y-linked copies in the white campion, *Silene latifolia*. *Genetics* 165, 799–807.
- Ranalli, P. (editor) (1999): *Advances in hemp research*. Food Products Press, Binghamton, New York.
- Reamon-Büttner, S. M., 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, C. Jung (1999): AFLP's represent highly repetitive sequences in *Asparagus officinalis* L. *Chromosome Res.* 7, 297–304.
- Renner, S. S., R. E. Ricklefs (1995): Dioecy and its correlations in the flowering plants. *Am J Bot* 82, 596–606.
- Rice, W. R. (1987): Genetic Hitchhiking and the Evolution of Reduced Genetic Activity of the Y Sex Chromosome. *Genetics* 116, 161–167.

-
- Riedel, M. (2000): Zytologische und molekularbiologische Untersuchungen beim Hanf. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rode, J., K. In-Chol, B. Saal, H. Flachowsky, U. Kriese, W. E. Weber (2005): Sex-linked SSR markers in hemp. *Plant Breeding* 124, 167-170.
- Ruiz Rejon, C., M. Jamilena, M. G. Ramos, J. S. Parker, M. R. Rejon (1994): Cytogenetic and molecular analysis of the multiple sex chromosome system of *Rumex acetosa*. *Heredity* 72, 209-215.
- Sakamoto, K., K. Shimomura, H. Komeda, S. Satoh (1995): A male associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiol* 36, 1549–1554.
- Sakamoto, K., Y. Akiyama, K. Fukui, H. Kamada, A. S. Satoh (1998): Characterization, genome size and morphology of sex chromosomes in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Cytologia* 63, 459-464.
- Sakamoto, K., N. Ohmido, K. Fukui, H. Kamada, S. Satoh (2000): Site-specific accumulation of a LINE-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa*. *Plant Mol Biol* 44, 723-732.
- Sardesai, N., A. Kumar, K. Rajyashri, S. Nair, M. Mohan (2002): Identification and mapping of an AFLP marker linked to *Gm7*, a gall midge resistance gene and its conversion to a SCAR marker for its utility in marker aided selection in rice. *Theor App Genet* 105, 691-698.
- Schrader, O., H. Budahn, R. Ahne (2000): Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence in situ hybridization. *Theor App Genet* 100, 665–669.
- Schultes, R. E., W. M. Klein, T. Plowman, T. E. Lockwood (1974): *Cannabis*: An example of taxonomic neglect. *Bot Mus Leaflet* 23, 337-367.

-
- Schwarzacher, T., P. Heslop-Harrison (2000): Practical in situ hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd Oxford.
- Sengbusch, R.von (1943): Die Geschlechtsvererbung bei Hanf und die Züchtung eines monözischen Hanfes. *Der Züchter* 15, 49-62.
- Shephard, H. L., J. S. Parker, P. Darby, C. C. Ainsworth (2000): Sexual development and sex chromosomes in hop. *New Phytol* 148, 397–411.
- Shibata, F., M. Hizume, Y. Kuroki (2000): Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa*. *Chromosome Res.* 8, 229-236.
- Shirota, O., A. Watanabe, M. Yamazaki, K. Saito, K. Shibano, S. Sekita, M. Satake (1998): Random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism analyses of *Cannabis sativa*. *Natural Medicines* 52, 160-166.
- Siebert, P. D., A. Chenchick, D. E. Kellogg, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23, 1087–1088.
- Siniscalco Gigliano, G. (1999): Preliminary data on the usefulness of internal transcribed spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. *J Forensic Sci* 44, 467-469.
- Small, E., A. Cronquist (1976): A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon* 25, 405-435.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Stackelberg von, M., S. Lindemann, M. Menke, S. Riesselmann, H. J. Jacobsen (2003): Identification of AFLP and STS markers closely linked to the *def* locus in pea. *Theor Appl Genet* 106, 1293–1299.

-
- Stearn, W. T. (1970): The *Cannabis* plant: Botanical considerations. Joyce CRB & Curry SH (ed) The botany & chem of *Cannabis*. Churchill, London :1-10.
- Stehlik, I., F. R. Blattner (2004): Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (*Polygonaceae*) and implications for the evolution of sex chromosomes. *Theor Appl Genet* 108, 238–242.
- Storey, W. B. (1953): Genetics of papaya. *J Hered* 44, 70–78.
- Tanurdzig, M., J. A. Banks (2004): Sex-Determining Mechanisms in Land Plants. *Plant Cell* 16, 61-71.
- Theissen, G. (2001): Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4, 75–85.
- Törjék, O., N. Bucherna, E. Kiss, H. Homoki, Z. Finta-Korpelová, I. Bócsa, I. Nagy, L. E. Heszky (2002 a): Novel male-specific molecular markers (MADC5, MAD6) in hemp. *Euphytica* 127, 209-218.
- Törjék, O., E. Kiss, N. Bucherna, H. Homoki, Z. Finta-Korpelová, I. Bócsa, I. Nagy, L. E. Heszky (2002 b): Identification and characterization of sex-specific molecular markers in hemp. *Novenytermeles* 51, 639-655.
- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Kayano, T. Ban, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen, R. Terauchi (2002): A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor Appl Genet* 104, 281–285.
- Vagera, J., D. Paulíková, J. Dolezel (1994): The development of male and female regenerants by in vitro androgenesis in dioecious plant *Melandrium album*. *Annals of Botany* 73, 455-459.

- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc Ac Res* 23, 4407-4414.
- Weigel, D., E. M. Meyerowitz (1994): The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78, 203-209.
- Weiss, H., J. Maluszynska (2000): Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas* 133, 255-261.
- Westergaard, M. (1953): Über den Mechanismus der Geschlechtsbestimmung bei *Melandrium album*. *Naturwissenschaften* 9, 253-260.
- Westergaard, M. (1958): The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv Genet* 9, 217-281.
- Wight, C. P., L. S. O'Donoghue, J. Chong, N. A. Tinker, S. J. Molnar (2004): Discovery, localization, and sequence characterization of molecular markers for the crown rust resistance genes *Pc38*, *Pc39*, and *Pc48* in cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Molecular Breeding* 14, 349-361.
- Winter, P. C., G. I. Hickey, H. L. Fletcher (1998): *Instat motes in genetics*. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Yamada, I. (1943): The sex-chromosomes of *Cannabis sativa* L. *Seiken Zihō* 2, 64-68.
- Yokota Y, T. Kawata, Y. Iida, A. Kato, S. Tanifuji (1989): Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *J Mol Evol* 29, 294-301.
- Zhang, L, X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi, N. Arnheim (1992): Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5847-5851.

Zhang, Y. H., V. S. Stilio, F. Rehman, A. Avery, D. Mulcahy, R. Kesseli (1998): Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. *Genome* 41, 141–147.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: ABC Modell der Steuerung der Blütenorganidentität	7
Abbildung 3.1: Isolierung und Klonierung des RAPD-Markers OPC11 ₂₇₀₀	27
Abbildung 3.2: Blastx Vergleich der Sequenz des RAPD-Fragmentes OPC-11 ₂₇₀₀	28
Abbildung 3.3: Sequenz der beiden Enden des Fragmentes OPC-11 ₂₇₀₀	29
Abbildung 3.4: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare.....	30
Abbildung 3.5: Test des männlich-spezifischen SCAR-Primers C11Seq_L + C11Komp_R an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	31
Abbildung 3.6: AFLP-Gel mit dem Marker AGA_AAT_330.....	32
Abbildung 3.7: Überprüfung der Klone des Fragmentes AGA_AAT_330.....	32
Abbildung 3.8: Konsensussequenz des Fragmentes AGA_AAT_330.....	34
Abbildung 3.9: Sequenz der Klone AGA_GAA_510_B3 und AGA_GAA_510_B9.....	35
Abbildung 3.10: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare.....	36
Abbildung 3.11: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330Komp an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	38
Abbildung 3.12: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330CA an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	39
Abbildung 3.13: Screening der Hanf-DNA-Bank.....	40
Abbildung 3.14: Dot-Blot Hybridisierung.....	42
Abbildung 3.15: Amplifikation von Pollen-DNA mittels I-PEP PCR.....	43
Abbildung 3.16: Test der I-PEP Amplifikate mit männlich-spezifischem Primer SCAR _{OPA08}	43
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des PCR Walkings.....	45
Abbildung 3.18: PCR Walking PCR I.....	45
Abbildung 3.19: PCR Walking PCR II.....	46
Abbildung 3.20: Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente.....	50
Abbildung 3.21: Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente.....	51
Abbildung 3.22: Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) mit rDNA-Sonden.....	53
Abbildung 3.23: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde SCAR _{OPA08}	57
Abbildung 3.24: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Komp.....	58
Abbildung 3.25: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Seq.....	59
Abbildung 3.26: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Seq.....	60

Abbildung 3.27: FISH mit PAR-spezifischer Sonde AAT_330Komp.....	61
Abbildung 3.28: FISH mit PAR-spezifischer Sonden 330GW_L und 330GW_R.....	62

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 3.2	Insertgrößen und Geschlecht selektierter Klone der Hanf-DNA-Bank.....	41
Tabelle 3.3:	Als Sonden für die Southern-Blot Hybridisierung eingesetzte DNA Fragmente, deren Größe, Geschlecht, Herkunft und Markierungsmethoden.....	49
Tabelle 3.4:	Southern-Blot Analyse mit geschlechtsspezifischen Sonden. Größen der detektierten Hybridisierungssignale. Mit einem Stern gekennzeichnete Signale zeigen geschlechtsabhängige Unterschiede.....	49
Tabelle 7.1:	Geschlechts- und Markerdaten der 74 Pflanzen der Population A2 (die Reihenfolge der Pflanzen entspricht der Anordnung in den Abbildungen 3.5 , 3.11 und 3.12).....	106
Tabelle 7.2:	Sequenzen verwendeter Primer und Adapter.....	108
Tabelle 7.3	Chemikalien und Lösungen.....	109

Tabelle 7.1: Geschlechts- und Markerdaten der 74 Pflanzen der Population A2 (die Reihenfolge der Pflanzen entspricht der Anordnung in den Abbildungen 3.5, 3.11 und 3.12)

Nr.	Pflanze	Geschlecht	AFLP-Marker	SCAR-Marker		
			AAT330	C11Seq	330Komp	330CA
1	A2/1	♀				1
2	A2/2	♀				1
3	A2/4	♀	1		1	
4	A2/5	♀				1
5	A2/6	♀				1
6	A2/9	♂	1	1	1	
7	A2/11	♂	1	1	1	
8	A2/12	♂	1	1	1	
9	A2/14	♀				1
10	A2/15	♀				1
11	A2/16	♂	1	1	1	
12	A2/17	♀	1		1	
13	A2/19	♀	1		1	
14	A2/20	♀				1
15	A2/22	♀	1		1	
16	A2/23	♀				1
17	A2/24	♀	1		1	
18	A2/25	♀				1
19	A2/26	♀				1
20	A2/27	♂		1		1
21	A2/28	♂	1	1	1	
22	A2/29	♂		1		1
23	A2/30	♀	1		1	
24	A2/31	♀				1
25	A2/32	♀				1
26	A2/33	♀				1
27	A2/34	♀	1		1	
28	A2/35	♀				1
29	A2/36	♀				1
30	A2/37	♂	1	1	1	
31	A2/38 *	♂	1			
32	A2/39	♂		1		1
33	A2/40	♀				1
34	A2/41	♂		1		1
35	A2/42	♀				1
36	A2/43	♀	1		1	
37	A2/44	♀	1		1	
38	A2/45	♀				1

Fortsetzung Tabelle 7.1:

Nr.	Pflanze	Geschlecht	AFLP-Marker	SCAR-Marker		
			AAT330	C11Seq	330Komp	330CA
39	A2/46	♂		1		1
40	A2/47	♂	1	1	1	
41	A2/49	♂	1	1	1	
42	A2/50	♂	1	1	1	
43	A2/51	♂	1	1	1	
44	A2/55	♀				1
45	A2/54	♂	1	1	1	
46	A2/57	♀				1
47	A2/59	♂	1	1	1	
48	A2/61	♀				
49	A2/63	♀				1
50	A2/65	♂	1	1	1	
51	A2/66	♀				1
52	A2/67	♀				1
53	A2/68	♀				1
54	A2/70	♀				1
55	A2/71**	♀			1	
56	A2/72	♂	1	1	1	
57	A2/73	♂	1	1	1	
58	A2/74	♂		1		1
59	A2/75	♂	1	1	1	
60	A2/76	♀				1
61	A2/77	♀				1
62	A2/78	♂	1	1	1	
63	A2/79	♀				
64	A2/80	♂	1	1	1	
65	A2/81	♂	1	1	1	
66	A2/82	♂	1	1	1	
67	A2/84	♀	1		1	
68	A2/85	♂	1	1	1	
69	A2/87	♀				1
70	A2/88	♀				1
71	A2/91	♂	1	1	1	
72	A2/98	♀				1
73	A2/99	♀				1
74	A2/100	♂		1		1

A2/38* kein SCAR-Amplifikationsprodukt erzeugbar (DNA Degradierung)

A2/71** für diese Pflanze waren keine AFLP-Daten verfügbar

Tabelle 7.2: Sequenzen verwendeter Primer und Adapter

RAPD-Primer	
OPC-11	5'-AAA GCT GCG G-3'
OPE-11	5'-GAG TAT CAG G-3'
AFLP-Primer	
<i>Mse</i> I+AAT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA T-3'
<i>Mse</i> I+GAA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGA A-3'
<i>Hind</i> III+A	5'-GAC TGC GTA CCA GCT TA-3'
<i>Hind</i> III+AGA	5'-*GAC TGC GTA CCA GCT TAG A-3'
SCAR-Primer	
C11Komp_L	5'-CGT GGA AGC TTC AGT CAA CC-3'
C11Seq_L	5'-CAA GTA TAT TGC AGT CGC GG-3'
C11Komp_R	5'-AGA CTT CCG AGC GTA AG-3'
AAT330Komp_L	5'-TTA AAA TAC AGA TTG TGT CGT GTT ATG-3'
AAT330Komp_R	5'-CAA CCC GTA TTT TAT GAG AGA TTC GAA-3'
AAT330CA_L	5'-AAA GTA TGC TCG GAC CCA GA-3'
AAT330CA_R	5'-ACC CCG TAT TTT ATG AGA GAT TCG-3'
GAA510_B3_L	5'-TAA AGA ACA GAG GAT GGC ATG-3'
GAA510_B3_R	5'-AAG CTT AGA GGA GCA CGT ATG-3'
GAA510_B9_L	5'-TAA AGA ACA TTC TAA TCT CAC T-3'
GAA510_B9_R	5'-AAG CTT AGA CCA ACT GAT CAA-3'
PCR Walking Primer	
AP1	5'-GTA ATA CGA ATA ACT ATA GGG C-3'
AP2	5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3'
330_iL1	5'-GAA GGC CCA CAT GAA GAC ATG GAA AAG-3'
330_iL2	5'-TCA ATC AAA CCA ACA ATC GTC GAA AGG-3'
330_iR1	5'-CTT TTC CAT GTC TTC ATG TGG GCC TTC-3'
330_iR2	5'-CCG CAT TGT GTT TGT CTT CTA TCT TGC-3'
PCR Walking Adapter	
ADAP1	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT-3'
ADAP2	5'-3ACCAGCCC[3AC7]-3'

* Endmarkierung der Primer mit Cy5-Farbstoff

nächste Seite: **Tabelle 7.3** Chemikalien und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
10 x TBE	242,28 g Tris; 102,64 g Borsäure; 7,44 g EDTA auf 2 l aufgefüllt
20 x SSC	0,3 M Natriumcitrat; 3 M Natriumchlorid; pH 7,0
50 x TAE	2M Tris-Acetat; 50 mM EDTA; pH 8,0
Blockierungslösung (FISH)	4 x SSC, 3% BSA und 0,1% Tween 20
1 x Blockierungslösung	10 x Blockierungslösung 1:10 gelöst in Maleinsäurepuffer
10 x Blockierungslösung	10% Blocking Reagenz gelöst in Maleinsäurepuffer
CTAB-Extraktionspuffer	100 mM TRIS, 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% β -Mercaptoethanol
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5
Detektionspuffer (FISH)	4 x SSC, 1% BSA, 0,1% Tween 20
Hybridisierungspuffer (DIG)	5 x SSC; 0,1% (w/v) Lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS; 1% Blocking Reagenz
Hybridisierungspuffer (³² P)	6 x SSC, 5 x Denhardt's Lsg., 0,5% SDS, 20 μ g/ml Heringssperma-DNA
1 x Enzympuffer	40 mM Zitronensäure, 60 mM Natriumcitrat, pH 4,8
3:1 Fixierlösung	98% Ethanol + Eisessig (3:1)
Hybridisierungsmix (FISH)	2 x SSC, 10% Dextransulfat
IPTG	24 mg IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)/ml
5 x Ladepuffer B	0,25% Bromphenolblau; 40% (w/v) Saccharose
5 x Ladepuffer X	0,25% Xylene Cyanol FF; 40% (w/v) Saccharose
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,0
Ligationspuffer	50 mM TRIS-HCl pH 6,7, 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM ATP, 10 mM Dithioerithitol
Neutralisierungspuffer	1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5
40% PAA 19:1	76 g Polyacrylamid; 4 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid; mit dd H ₂ O auf 200 ml aufgefüllt
PAA-Gel	7 M Urea; 6% PAA (19:1); 1 x TBE-Puffer
1 x PBS	0,12 M NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Plasmidlösung I	50 mM Glucose; 25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 3 mg/ml Lysozym
Plasmidlösung II	0,2 N NaOH; 1% SDS
Plasmidlösung III	5 M Kaliumacetat; 1,8 M Eisessig
Phenol/Chloroform	Phenol + Chloroform (1:1)
Proteinase K Puffer Stock	20 mM Tris, 20 mM CaCl ₂
1 x RL-Puffer	10 mM Tris/HCl; 10 mM Mg-Acetat; 50 mM K-Acetat; 5 mM DTT; pH 7,5
SOC-Medium	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucose; pH 7,0
Strippingpuffer	0,5 M NaOH; 0,1% SDS
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
TE/RNase-Puffer	TE-Puffer, 40 mg/ml RNaseA
X-Gal 2	2,5 mg X-Gal/ml in N'N'-Dimethylformamid lösen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

³² P	radioaktives Phosphorisotop
AFLP	amplified fragment length polymorphisms
ALF	ALFexpress TM DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Amp ₁₀₀	Ampicillin (100mg/ml)
bp	Basenpaar
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences
CSPD	Substrat für Chemilumineszenzreaktion
CTAB	N-Cetyl-N, N, N,-trimethylammoniumbromid
DAPI	4,6 Diamidino-2- phenylindoledihydrochlorid
DIG	Digoxygenin
DNA	dexoxyribonucleic acid
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
I-PCR	inverse PCR
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITS	internal transcribed spacer
kb	Kilobasenpaar
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Mbp	Megabasenpaar
MROS	male reproductive organ-specific
ORF	open reading frame
PAA	Polyacrylamid
PAR	Pseudo Autosomale Regionen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNAse	RNA abbauendes Enzym
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)

SCAR	sequence characterized amplified region
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium chloride-sodium acetate-sodium citrate
SSCP	single strand confirmation polymorphisms
SSR	simple sequence repeats
STR	short tandem repeat
STS	sequence tagged sites
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDT (Puffer)
THC	Delta 9-Tetrahydrocannabinol
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit (Einheit)
w/v	weight/volume
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der in der Literatur zitierten Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 27.06.2005

Danksagung

Für die Überlassung des Themas gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. W. E. Weber, Direktor des Institutes für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Weber für die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft zur Klärung fachlicher Probleme.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. A. Peil zu großen Dank verpflichtet, dessen verständnisvolle Art bei der Diskussion sowohl fachlicher Probleme als auch darüber hinaus wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. E. Schumann für die gewährte Unterstützung und Hilfeleistung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dir. u. Prof. Dr. V. Hanke vom Institut für Obstzüchtung Dresden Pillnitz (BAZ) für die Ermöglichung abschließender Untersuchungen am dortigen Institut.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. H. Flachowky für permanente Motivation und Unterstützung sowie für die richtungsgebenden Impulse bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Pflanzenzüchtung für ihre freundliche und hilfsbereite Unterstützung und besonders Frau M. Fricke für ihre ständige und freundliche Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Vor- und Zuname: Marko Riedel
Geburtsdatum: 01.12.1973
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 09/1980 - 08/1990 zehnklassige Polytechnische Oberschule Pratau
09/1990 - 07/1992 Melancton-Gymnasium in Lutherstadt Wittenberg

Studium: 09/1992 - 03/2000 Studium der Agrarwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Diplomarbeit: Cytologische und molekulargenetische Untersuchungen bei Hanf

Promotion: 09/2000 - 01/2003 Promotionsstudent am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Thema: *In situ* Hybridisierung von Hanf (*Cannabis sativa* L.) Chromosomen

Berufstätigkeit: 02/2003 - 10/2004 wissenschaftlicher Angestellter an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Obstzüchtung in Dresden-Pillnitz
Bearbeitung des Projektes: Evaluierung gentechnisch veränderter Gehölzpflanzen (*Malus domestica* und *Rhododendron spec.*)