

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Herkünfte und Sorten vom Hanf sind in der Tab. 6 zusammengestellt und nach dem Geschlechtstyp (monözisch - diözisch) und der Herkunft (Akzession - Sorte) aufgelistet. Alle CAN-Nummern sind Akzessionen aus der Genbank des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben.

Das Pflanzenmaterial wurde in 2 m² Parzellen mit 2 Wiederholungen angebaut. Die Parzellen bestanden aus 4 Reihen mit einem Reihenabstand von 50 cm.

Bei der Mehrheit der Sorten und Herkünfte wurden der Fasergehalt und der Stängeldurchmesser erfasst. Von drei Faserhanfsorten (‚Kompolti‘, ‚Fasamo‘ und ‚Felina 34‘) und 4 Genbankabstammungen (CAN 16, CAN 17, CAN 19 und CAN 22) wurde in einem ersten Vorversuch der Ölgehalt im Samen und z. T. in den Stängeln bestimmt. Die beiden Faserhanfsorten ‚Fasamo‘ und ‚Kompolti‘ wurden molekulargenetisch mit Hilfe der RAPD-Analyse untersucht. Nach dem **Blatt für Sortenwesen (1999)** wird ‚Fasamo‘ wie folgt beschrieben: eine monözische und THC-arme Sorte, geprüft in Fasernutzung, Blühbeginn früh, Pflanzenlänge kurz, Strohtrockenmasseertrag niedrig bis mittel, Gesamtfaserertrag sehr niedrig, Fasergehalt niedrig, gezüchtet von Lothar Loch. Nach **Bocsa und Karus (1997)** ist ‚Kompolti‘ die älteste, bekannteste freiabblühende diözische Sorte in Europa (zugelassen 1954 in Ungarn, während von anderen Autoren wie z.B. **Breitfeld (1995)** 1957 als Jahr der Zulassung angegeben wird). Der Fasergehalt beträgt gegenwärtig 35-38 %. Die Stängelertragsfähigkeit ist sehr gut, die Samenertragsfähigkeit ist mittelmäßig. Bei Verwendung als Faserhanf wird ‚Kompolti‘ Anfang August grün geschnitten und benötigt – zum südlichen Formenkreis mit einer langen Vegetationsperiode gehörend – eine Vegetationszeit von 110 bis 115 Tagen. Der THC-Gehalt ist mit 0,1 – 0,15 % sehr niedrig. Die Züchter von ‚Kompolti‘ sind I. Bocsa und J. Schmidt.

Tabelle 6: Sorten und Hanfherkünfte, die in den Jahren 1996-1999 angebaut und in die Untersuchung einbezogen wurden

Nr.	Hanfherkunft/ Sorte	Herkunftsland	Häufigkeit
1	B-7	Ungarn	diözisch
2	CAN 16	Slowakei	diözisch
3	CAN 17	Ungarn	diözisch
4	CAN 18	DDR	diözisch
5	CAN 20	Korea	diözisch
6	CAN 21	Rumänien	diözisch
7	CAN 22	Georgien	diözisch
8	CAN 23	Ungarn	diözisch
9	CAN 24	Italien	diözisch
10	CAN 25	unbekannt	diözisch
11	CAN 26	Türkei	diözisch
12	CAN 27	unbekannt	diözisch
13	CAN 29	Rumänien	diözisch
14	CAN 31	Rumänien	diözisch
15	CAN 32	Rumänien	diözisch
16	CAN 33	Rumänien	diözisch
17	CAN 34	Rumänien	diözisch
18	CAN 36	unbekannt	diözisch
19	CAN 38	Rumänien	diözisch
20	(CHN)	China	diözisch
21	Eletta Campana	Italien	diözisch
22	Fibramulta 151	Rumänien	diözisch
23	H09	Türkei	diözisch
24	Kompolti	Ungarn	diözisch
25	Kompolti Hybrid TC	Ungarn	diözisch
26	Krasnodarskaya	Sowjetunion	diözisch
27	Krasnodarskaya 35	Sowjetunion	diözisch
28	LKCSD	Polen	diözisch
29	Rastislavicke	Slowakei	diözisch
30	Rjaf 1	Afghanistan	diözisch

Nr.	Hanfherkunft/ Sorte	Herkunftsland	Häufigkeit
31	Skunk 1	USA	diözisch
32	H08 (Spontan FAL)	BRD	diözisch
33	Superfibra	Italien	diözisch
34	Unico B	Ungarn	diözisch
35	Beniko	Polen	monözisch
36	Bialobrzeskie	Polen	monözisch
37	CAN 28	unbekannt	monözisch
38	CAN 30	BRD	monözisch
39	Fasamo	BRD	monözisch
40	Fedora 19	Frankreich	monözisch
41	Fedrina 74	Frankreich	monözisch
42	Felina 34	Frankreich	monözisch
43	Ferimon	Frankreich	monözisch
44	Ferimon 21	Frankreich	monözisch
45	Fibrimon	Ungarn	monözisch
46	Fibrimon 24	Frankreich	monözisch
47	Fibrimon 56	Frankreich	monözisch
48	Futura 77	Frankreich	monözisch
49	Irene	Rumänien	monözisch
50	Gluchowskaja 33	GUS	monözisch
51	Krasnodarskaya 56	Sowjetunion	monözisch
52	Juso 14	Ukraine	monözisch
53	Juso 31	Ukraine	monözisch
54	Solotonoschka 15	GUS	monözisch
55	USO 11	Sowjetunion	monözisch
56	USO 13	Sowjetunion	monözisch
57	USO 31	Sowjetunion	monözisch
58	CAN 19	Italien	subdiözisch
59	(YUG)	Jugoslawien	subdiözisch

3.1.2. Chemikalien und Lösungen

Für die molekulargenetischen Untersuchungen sowie die Bestimmung des Fasergehaltes wurden die folgenden aufgelisteten Chemikalien eingesetzt:

- CTAB - Extraktionspuffer 2:
 - 2 x 2 % CTAB
 - 100 mM Tris
 - 10 mM EDTA
 - 0,7 M NaCl
 - 1% β - Mercaptoethanol
 - pH 7.5

- Waschpuffer 1
 - 76 % Äthanol,
 - 0,2 M Na-Acetat

- Waschpuffer 2
 - 76 % Äthanol,
 - 10 mM NH_4 -Acetat

- Waschpuffer 3
 - 70 % Äthanol

- Filler
 - 0,25 % Bromphenolblau,
 - 40 % Saccharose

- Ladder- Mix
 - 0,5 mg DNA/ml
 - (MBI Fermentas, St..Leon-Rot)

- TAE
 - 0.001 M EDTA
 - 1 x: 0.04 Tris-Acetat
 - 50 x: 242 g Tris-Puffer
 - 57,1 ml Essigsäure
 - 100 ml 0,5 M EDTA
 - pH 8.0

- TE- Puffer: 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 8.0
- Ethidiumbromid 10 mg/20 ml Wasser (autoklaviert)
- Kongorot 1 g /100 ml Äthanol

3.2. Methoden

3.2.1. Molekulargenetische Untersuchungen

Für diese Analyse wurden zunächst von den Pflanzen der beiden Faserhanfsorten ‚Fasamo‘ und ‚Kompolti‘ des Anbaujahres 1997 die oberen Blätter entnommen, für die DNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die weiteren Schritte waren die DNA-Isolierung, eine PCR-Analyse mit RAPD-Primern, die Auftrennung mittels Gelelektrophorese und die statistische Analyse der sichtbaren Banden.

3.2.1.1. DNA-Isolierung

300 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pulver wurde mit 9 ml CTAB-Extraktionspuffer geschüttelt, und für 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben mit 4,5 ml Chloroform/Octanol (24:1) gemischt und 5 min geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3.000 Umdrehungen/ min. Die wässrige Lösung wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 ml Äthanol (-20°C) zugegeben, für 30 min bei -20°C im Kühlschrank gekühlt und anschließend 10 min bei 8.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 76 % Äthanol/ 0,2 M Na-Acetat geschüttelt, anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 8.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in 1 ml 76 % Äthanol/10 mM NH₄-Acetat für 1 min stehen gelassen, 10 min bei 8.000 Umdrehungen/min zentrifugiert, abschließend mit 1 ml 70 % Äthanol für 1 min

bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 8.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA wurde unter Vakuum getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 0,5 ml 1x TE-Puffer gelöst und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.2.1.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Die RAPD-Analysen wurden mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) in 25 μl Reaktionsvolumen nach **Peil et al. (1997)** durchgeführt. Neben den Puffern 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl_2 und 50 mM KCl wurden 0,2 mM dNTPs, 1 U Taq polymerase (AGS, Heidelberg), 0,2 μm primer (10-mers der Firma Operon Technologies Inc., Alameda, und Roth, Karlsruhe) und 10 ng DNA zugegeben. Da keine PCR-Maschine mit beheizbarem Deckel zur Verfügung stand, musste das Reaktionsgemisch mit 25 μl Paraffin Öl (Roth, Karlsruhe) bedeckt werden. Die Amplifikation erfolgte nach einer anfänglichen Denaturierung von 3 min bei 94°C für 45 Zyklen mit 2 min bei 94°C , 2 min bei 38°C und 2 min bei 72°C . Anschließend erfolgte für 10 min bei 72°C ein Verlängerungsschritt.

3.2.1.3. Elektrophorese

Das Auftrennen der DNA-Fragmente erfolgte mittels Elektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel, dem 1 % Ethidiumbromid zur Färbung der DNA-Banden zugegeben worden war. Nach der Herstellung wurde das Agarosegel in die Gelträger gegossen, wobei die Probenaschen durch einen Teflonkamm im polymerisierenden Gel entstehen. Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/5 μl Filler vermischt. Neben den Proben werden zusätzlich DNA-Längen- (Ladder Mix) oder Mengenstandards aufgetragen, die eine Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung der DNA-Proben erlauben. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld je nach Anforderung an die Auflösung. Das Gel wurde mit Hilfe eines Transilluminators ausgewertet und photographisch dokumentiert.

3.2.1.4. Auswertung des RAPD-Bandenmuster

In die Auswertung der RAPD-Bandenmuster wurden alle produzierten Banden einbezogen. Dazu wurde das Vorhandensein der Banden mit 1 und das Nicht-Vorhandensein mit 0 gekennzeichnet.

Für die Bestimmung der Ähnlichkeit von zwei Genotypen wurde der Ähnlichkeitsindex (Similarity Index - SI) nach **Sneath und Sokal (1973)** benutzt. Bei diesem Index wird die Anzahl gemeinsamer Banden für jedes Pflanzenpaar ins Verhältnis zur Gesamtzahl analysierter Pflanzen gesetzt:

$$\text{Similarity Index (SI)} = \frac{\text{Anzahl gemeinsamer Banden} \times 100 \%}{\text{Anzahl verschiedener Banden} + \text{Anzahl gemeinsamer Banden}}$$

Bei Gleichheit ist SI = 100 % und bei vollständiger Verschiedenheit ist SI = 0 %.

3.2.2. Bestimmung des Fasergehaltes

Der Fasergehalt wurde nach **Bredemann (1942a, b)** bestimmt. Je Abstammung bzw. Sorte gab es je nach Verfügbarkeit eine unterschiedliche Anzahl an Einzelpflanzen, von denen für diese Untersuchung typische Pflanzen analysiert wurden. In Abhängigkeit von der Länge und dem Stängeldurchmesser der Einzelpflanzen wurden im Normalfall Doppel-, aber auch Mehrfachbestimmungen durchgeführt (Summe dieser Fasergehaltsbestimmungen aller untersuchter Pflanzen einer Hanfform = Anzahl Wiederholungen). Danach erfolgten sowohl die Berechnung des mittleren Fasergehaltes der Einzelpflanzen als auch die Ermittlung des mittleren Fasergehaltes der entsprechenden Hanfherkunft.

Im folgenden wird die Versuchsdurchführung dargestellt. Jeder analysierte Hanfstängel wurde in ca. 10 cm lange Abschnitte unterteilt. Die Teilstücke einer Pflanzen wurden gebündelt und im Trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Anschließend wurde aus ca. 25 g der getrockneten Stängelabschnitte eine Mischprobe hergestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass diese Untersuchungsproben relativ einheitlich zusammengesetzt sind, d.h. dass in einer nicht nur Spitzenteile, in einer

anderen nur Mittelstücke oder Teile von der Stängelbasis zusammengefasst wurden. Diese Mischprobe wurde 10 min in 2 % NaOH-Lösung gekocht, mit Wasser gespült und in 1 % alkoholischer Kongorotlösung gefärbt. Die rotgefärbte Bastfaser wurde manuell abgelöst. Nach erneutem Kochen der Fasern für 10 min in 5 % NaOH-Lösung, Spülen mit Wasser und Färbung der Fasern mit Kongorotlösung wurden die gefärbten Fasern zwischen zwei Waschsieben ausgebreitet und mit Wasser gespült. Hierbei konnten alle nicht gefärbten Pflanzenbestandteile (z.B. Schäben) erkannt und entfernt werden. Die Bastfasern wurden dann im Trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach konnte der Fasergehalt bestimmt werden.

Zur Testung der Unterschiede zwischen den Typen wurde eine Varianzanalyse und anschließend der Student-Newman-Keuls-Test (SNK) aus dem Statistikpaket SAS (SAS Software Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C.) angewendet. Die Signifikanzschwelle lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0,05$. Bei den diözischen Herkünften wurden die Geschlechter getrennt ausgewertet mit Ausnahme des Anbauversuches von 1998, bei denen das Geschlecht nicht erfasst worden war.

Nach der Ernte der Einzelpflanzen für die Bestimmung des Fasergehaltes wurde ebenfalls der Stängeldurchmesser, gemessen 30 cm über dem Wurzelhals, ermittelt. Aus diesen Daten und den Fasergehalten ließen sich dann die Korrelation zwischen Fasergehalt und Stängeldurchmesser bestimmen.

Hier wurden die monözischen Sorten im Vergleich zu den diözischen Sorten, und diese soweit möglich nach Geschlechtern getrennt, betrachtet. Die Berechnung der Korrelation erfolgte mit dem Computer-Programm Sigma Plot Version 4.0 (SPSS Inc. 444 N. Michigan Avenue, Chicago, Illinois 60611).

3.2.3. Bestimmung des Öl-Gehaltes

Die Bestimmung des Ölgehaltes erfolgte mit einer SOXHLET-Apparatur (**Kent-Jones und Amos, 1957; AOCS, 1980**).

Die Samen mit den Hüllblättern wurden von den übrigen Pflanzenteilen getrennt. Die zu analysierenden Fraktionen wurden im Trockenschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, anschließend mit Hilfe einer Schlagmühle zerkleinert und bis zur Ölisolierung im Exsikkator aufbewahrt.

Ungefähr 10 g der bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Proben (Samen mit Hüllblättern oder Stängelpulver) wurden in Extraktionshülsen eingewogen.

Vor der Analyse wurde das Gewicht des trockenen Glaskolbens der Apparatur bestimmt und notiert, eine Extraktionshülse mit einer Probe eingeführt und anschließend 150 ml Chloroform eingefüllt. Die Extraktion erfolgte für 6 Stunden bei 70 bis 80°C. Zur Aufarbeitung des Extraktes wurde das Lösungsmittel Chloroform abdestilliert. Anschließend wurde der Kolben der SOXHLET-Apparatur, in dem sich der Destillationsrückstand befand, gewogen. Danach konnte die Berechnung des Ölgehaltes erfolgen:

$$\text{Öl-Gehalt (\% TM)} = \frac{\text{g Destillationsrückstand}}{\text{g Probengewicht}} \times 100 \%$$