

Robert Fleischer

**Analyse der genetischen Variabilität
im Tettnanger Hopfen
mit Hilfe von AFLP-Fingerabdrücken**



Cuvillier Verlag Göttingen

Aus dem Institut für
Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
der Universität Hohenheim
Fachgebiet: Pflanzenzüchtung und Biotechnologie
Prof. Dr. G. Weber
(Betreuer)

**Analyse der genetischen Variabilität
im Tettninger Hopfen
mit Hilfe von AFLP-Fingerabdrücken**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät Naturwissenschaften
der Universität Hohenheim

von
Dipl. Biol. Robert Fleischer
aus Winz-Niederwenigern (Hattingen)

2003

Die vorliegende Arbeit wurde am 25. Juli 2002 von der Fakultät II - Biologie (jetzt: Fakultät Naturwissenschaften) der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften" angenommen.

D 100

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2002

Dekan: Prof. Dr. K. Bosch

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. G. Weber

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. A. Pfitzner

3. Prüfer: PD Dr. W. Staiber

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Glossar	vi
1 Einleitung	1
2 Material	8
2.1 Chemikalien	8
2.2 Feinchemikalien für die Gewebekultur	9
2.3 Nukleinsäuren	9
2.4 Enzyme	10
2.5 Reaktionssysteme, gebrauchsfertig (Kit's)	10
2.6 Verbrauchsmaterial	12
2.7 Geräte	12
2.8 Fotomaterial	13
2.9 Software	13
2.10 Gewächshausbedarf	14
2.11 Pflanzenmaterial	14
3 Methoden	17
3.1 Probenahme und Materialanzucht	17
3.1.1 Tettninger Material	17
3.1.1.1 Auswahl von Pflanzen für eine repräsentative Stichprobe	17
3.1.1.2 Pflanzenanzucht im Gewächshaus	18
3.1.1.3 Klone aus Straß	20
3.1.2 Probenahme Spalt	20
3.1.3 Pflanzenanzucht in steriler Gewebekultur	20
3.2 DNA-Extraktion	22
3.2.1 DNA-Extraktion aus Blattmaterial	22

3.2.1.1	DNA-Extraktion aus frischem Blattmaterial	22
3.2.1.2	DNA-Extraktion aus gefriergetrocknetem Blattmaterial	23
3.2.2	DNA-Extraktion aus Hopfendolden	23
3.2.3	DNA-Extraktion aus Pellets	23
3.3	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der DNA-Extraktionen	24
3.4	Standardtechniken	24
3.4.1	Restriktionsverdau der DNA	24
3.4.2	Agarosegelelektrophorese	24
3.5	AFLP-Analyse (Amplified Fragment Length Polymorphism)	25
3.5.1	Restriktionsverdau und Ligation	25
3.5.2	Präamplifikation	25
3.5.3	Primer-Markierung	26
3.5.4	Selektive Hauptamplifikation	26
3.5.5	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen bei der PCR	27
3.6	Markierung des AFLP-Längenstandards	27
3.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	28
3.8	EDV-gestützte Datenanalyse	29
3.9	Bilddokumentation	30
3.10	Kontrollierte Scherung von DNA	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Probenahme und Materialanzucht	31
4.1.1	Probenahme und Anzucht der Stecklinge im Gewächshaus	31
4.1.2	Adaptierung eines Kulturmediums für die sterile Gewebekultur von Hopfen	33
4.2	Einfluss der DNA-Extraktions-Methode auf die Quantität und Qualität der DNA	34
4.2.1	Quantität der DNA aus Blattmaterial	34
4.2.2	Quantität der DNA aus Hopfendolden	34
4.2.3	Quantität der DNA aus Pellets	35
4.2.4	Qualität der extrahierten DNAs	35
4.3	Etablierung der AFLP-Technik für Hopfen	37
4.3.1	Optimierung der PCR-Bedingungen für die Hauptamplifikation	38

4.3.2	Bestimmung der optimalen Primerselektivität für Hopfen	38
4.3.3	Differenzierbarkeit von Hopfensorten mittels AFLP	40
4.3.4	Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen	40
4.3.5	Auswirkung verschiedener DNA-Quellen auf die Ausprägung von AFLP- Bandenmustern	42
4.3.5.1	Einfluss unterschiedlicher entwicklungsphysiologischer Stadien .	42
4.3.5.2	Einfluss unterschiedlicher Pflanzenorgane und deren Verarbeitungs- form	42
4.3.5.3	Analyse der Gründe für die Abweichungen der AFLP-Fingerab- drücke aus Pellet-DNA	45
4.4	Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb des Tettninger Hopfen	48
4.4.1	Identifizierung des Klons 'K15-211'	48
4.4.2	Identifizierung von polymorphen Klonen in einer Stichprobe von 279 Tettninger Hopfenpflanzen	48
4.4.3	Identifizierung weiterer polymorpher Pflanzen innerhalb des Klon 15 .	50
4.5	Klassifizierung des Tettninger Materials in Relation zu anderen Hopfen- sorten	53
4.5.1	Grad der Polymorphie	53
4.5.2	Bestimmung der Genetischen Ähnlichkeit	55
5	Diskussion	59
5.1	Wahl der Methode zur Extraktion qualitativ hochwertiger DNA	59
5.1.1	Anpassung der Extraktionsmethode auf große Probenzahlen	60
5.1.2	Anpassung der Extraktionsmethode auf Doldenmaterial	60
5.1.3	Vergleich der DNA-Qualität der Extrakte aus verschiedenen Pflanzen- materialien	61
5.2	Etablierung der AFLP-Technik für Hopfen	62
5.2.1	Wahl der Restriktionsenzyme und Bestimmung der Primerselektivität	62
5.2.2	Differenzierbarkeit von Hopfensorten	63
5.2.3	Einfluss verschiedener DNA-Quellen auf die Ausprägung von AFLP- Bandenmustern	63
5.3	Grad der genetischen Variabilität im Tettninger Hopfen	67

5.4 Vergleich des 'Tettnanger' mit anderen Hopfensorten und Klassifizierung der untersuchten Sorten	69
5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	76
6 Zusammenfassung	79
7 Literatur	82
8 Anhang	92
Anhang 1: Lage der beprobten Hopfengärten im Tettnanger Anbaugebiet	92
Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettnanger Stichprobe	93
Danksagung	100
<i>Curriculum vitae</i>	102

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ALLB	Amt für Landwirtschaft, Landschafts- und Bodenkultur
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat
E.S.B.S.	Ecole Supérieur de Biotechnologie Strasbourg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
GS	Genetic Similarity (Genetische Ähnlichkeit)
IBA	Indol-3-Buttersäure
kb	Kilobasenpaare (= 10^3 bp)
LAP	Landesanstalt für Pflanzenbau
LBP	Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau
Mb	Megabasenpaare (= 10^6 bp)
MS	Murashige & Skoog-Medium
PABA	<i>p</i> -Aminobenzoessäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
STS	Sequence Tagged Sites
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, internationale Einheit der Enzymaktivität

Glossar

Hopfentypische Begriffe:

α -Säuren: Humulone; wichtigster Bestandteil der Bitterstoffe.

Anflug: Blühbeginn des Hopfens.

Anleiten: Pro Pflanze werden zwei bis sechs kräftige Triebe ausgewählt und im Uhrzeigersinn an den Aufleitdraht angedreht.

Ausputzen: Abschneiden der nicht angeleiteten, überzähligen Triebe.

Darren: Trocknung der Hopfendolden auf einen Wassergehalt von ca. 10 bis 12 %.

Dolden: Auch Zapfen genannt; weibliche Blütenstände, bestehen aus 20 bis 60 Einzelblüten.

Einzelblüte: Bestehend aus zwei Deckblättern (Schutzorgane), vier Vorblättern (Flugorgane der Samen) und dem Fruchtknoten, der bei Nichtbefruchtung verkümmert, bei Befruchtung den Samen bildet.

Fach: Bereich des Hopfengartens, der zwischen zwei Fahrgassen liegt (meist 5 bis 7 Reihen).

Fechser: Setzling, Pflänzling; wird i.d.R. beim Schneiden aus unterirdischen Teilen der im Vorjahr aufgeleiteten Reben gewonnen.

Hopfenreben: Angeleitete Haupttriebe der Hopfenpflanze.

Internodium: Stängelglied; Teil der Rebe zwischen den Knoten, der keine Blätter trägt.

Lupulin(körner): Auch Hopfenmehl genannt; enthält die brautechnisch wichtigen Bitterstoffe und ätherischen Hopfenöle.

Lupulindrüsen: Drüsen an der Basis der Vorblätter, in denen das Lupulin gebildet wird.

Nodium: Knoten; Stelle am Stängel, an der die Blätter und Seitentriebe entspringen.

Pellets: Gemahlenes und gepresstes Doldenmaterial. Man unterscheidet zwischen Pellets vom sog. "Typ 90" und "Typ 45", die sich v.a. im Gehalt der Bittersäuren und der ätherischen Öle unterscheiden.

Pellets Typ 90: Bestehen im wesentlichen aus gemahlenen und grob gesäuberten Rohhopfen (aus 100 kg Hopfen erhält man ca. 90 kg Pellets).

Pellets Typ 45: Durch Aussieben werden Spindeln und Doldenblätter entfernt und die Lupulinkörner angereichert (aus 100 kg Rohhopfen werden ca. 45 kg Pellets erzeugt).

Reben: Triebe, Sprosse der Hopfenpflanze; unterteilen sich in Nodien und Internodien.

Schneiden: Entfernen der am Wurzelstock verbliebenen Stängelreste vom Vorjahr, meist im Frühjahr.

Spindel: Blütenstandsachse, an der die Einzelblüten sitzen.

Wurzelstock: Ausdauernder Teil der Hopfenpflanze aus dem der jährliche Austrieb erfolgt.

Weitere Begriffe:

Anemophilie: Windbestäubung; Übertragung der Pollen durch den Wind.

Cluster: Gruppe von Individuen mit sehr ähnlichen Fingerabdrücken.

Cophenetischer Wert: Gibt die Güte der Übereinstimmung zwischen dem Dendrogramm und der zugrundeliegenden GS-Ausgangsmatrix an. Hierzu wird aus dem Dendrogramm wieder eine GS-Matrix (Cophenetische Matrix) errechnet und diese mit den Ausgangsdaten verglichen. Die Korrelation zwischen der Ausgangsmatrix und der Cophenetischen Matrix wird durch den Wert "r" angegeben.

Für "r" gilt:	0,9	r	sehr gute Übereinstimmung
	0,8	r < 0,9	gute Übereinstimmung
	0,7	r < 0,8	schlechte Übereinstimmung
		r < 0,7	sehr schlechte Übereinstimmung.

diözisch: Zweihäusig; männliche und weibliche Blüten kommen auf verschiedenen, getrenntgeschlechtigen Individuen vor.

perennierend: Ausdauernd; langlebige Pflanze, deren oberirdische Teile im Herbst absterben.

1 Einleitung

Hopfen (*Humulus*) bildet zusammen mit Hanf (*Cannabis*) die Familie der *Cannabaceae* (Hanfgewächse), die mit den *Ulmaceae* (Ulmengewächse), *Moraceae* (Maulbeergewächse) und *Urticaceae* (Brennesselgewächse) zur Ordnung der *Urticales* (Nesselgewächse) gezählt wird.

Die Gattung *Humulus* (Hopfen) besteht nach NEVE (1991) aus drei Arten. Bei der wohl bekanntesten Art, dem Kulturhopfen (*Humulus lupulus* L.), handelt es sich um eine perennierende Kletterpflanze, die vorwiegend in der nördlichen Hemisphäre (etwa zwischen 35° und 70° nördlicher Breite) angebaut wird. Der jährliche Austrieb der Reben erfolgt aus Sprossknospen am Wurzelstock.

Der einjährige japanische Hopfen (*Humulus japonicus* Sieb. et Zucc.) ist vorwiegend in Japan und China verbreitet (NEVE, 1991). Über die dritte Art, *Humulus yunnanensis*, ist nur sehr wenig bekannt, da es von ihm nur wenige Pflanzen in Herbarien gibt (SMALL, 1978). Es wird angenommen, dass der Hopfen seinen Ursprung in Zentralasien hatte (FROST, 1983), da hier alle drei Arten des Hopfen zu finden sind. Von dort soll er sich nach Europa und Amerika ausgebreitet haben.

Humulus lupulus ist getrenntgeschlechtlich, diözisch, d.h. männliche und weibliche Blüten befinden sich auf getrennten Pflanzen. Die Pollenübertragung erfolgt durch Windbestäubung (Anemophilie). Er besitzt einen diploiden Chromosomensatz von $2n = 20$ (WINGE, 1914), der aus 9 Paaren Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen (X-, Y-Chromosomen) besteht. Die Geschlechtsausprägung wird durch das Verhältnis von X-Chromosomen zur Anzahl der Autosomensätze bestimmt (NEVE, 1961; PARKER UND CLARK, 1991; DELLAPORTA UND CALDERON-URREA, 1993), während das Y-Chromosom zur Erzeugung von fertilem Pollen erforderlich ist.

Ursprung und Beginn des Hopfenbaus in Deutschland können bis heute nicht sicher belegt werden. Nach ersten urkundlichen Belegen soll im Jahre 736 erstmals in Geisenfeld (Hallertau) ein Hopfengarten angelegt worden sein (MOIR, 2000). Während im Mittelalter der Hopfenbau über ganz Deutschland verteilt war, verlagerte er sich nach dem Dreißigjährigen Krieg (1618-1648) in den Süden (BARTH, 1994). Lange Zeit

dominierte der sog. "Streuhopfenanbau", der auf die lokalen Einzugsgebiete der Brauereien beschränkt war; geschlossene Hopfenanbauggebiete gab es zu dieser Zeit noch nicht (KOHLMANN UND KASTNER, 1975). Erst mit der Erfindung der Eisenbahn setzte der Hopfenhandel ein. Dabei wurde der Hopfen nach der Region benannt, in der er erzeugt wurde. So entstanden Sortenbezeichnungen wie 'Hallertauer', 'Hersbrucker', 'Spalter' und 'Tettninger'. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts bildete sich die Hallertau zum größten deutschen Hopfenanbaugebiet heraus (BARTH, 1994). Heutzutage verteilt sich der Hopfenbau in Deutschland auf sechs Gebiete: Hallertau, Tettngang, Hersbrucker Gebirge, Spalt, Elbe-Saale und Einzelbetriebe in Baden, der Rheinpfalz und bei Bitburg (Abbildung 1).



Abbildung 1: Hopfenanbauggebiete in Deutschland. 1: Hallertau, 2: Tettngang, 3: Hersbrucker Gebirge, 4: Spalt, 5: Elbe-Saale, 6: Baden, Bitburg, Rheinpfalz (verändert nach BARTH *et al.*, 1994).

Hopfen wird fast ausschließlich zur Nutzung in der Brauindustrie angebaut. Hierfür sind die Inhaltsstoffe, das Lupulin, der unbefruchteten, weiblichen Blütenstände von kommerziellem Wert. Es wird überwiegend an der Basis der Vorblätter der Einzelblüten in speziellen Drüsen gebildet. Die Einzelblüten entwickeln sich nach der Blüte zu zapfenförmigen Fruchtständen (Dolden, Abbildung 2). Bei einer Befruchtung kommt es durch die Ausbildung von Samen zu morphologischen Veränderungen der Dolden, die mit einer Verarmung der brautechnisch wertvollen Inhaltsstoffe einhergeht (ZATTLER, 1961; ZATTLER UND KRAUß, 1970). Dies erkannte schon FLATAU (1866) und empfahl, dass eine Befruchtung der weiblichen Blüten verhindert werden sollte, was gegenwärtig durch den Anbau von ausschließlich weiblichen Hopfenpflanzen in deutschen Hopfenanbaugebieten erreicht wird. Männliche Pflanzen müssen hier gemäß der "Verordnung über die Bekämpfung des männlichen Hopfens" vernichtet werden (KOHLMANN UND KASTNER, 1975). Die Vermehrung der Hopfenpflanzen erfolgt daher vegetativ über Wurzelstecklinge, die Fehser genannt werden.



Abbildung 2: Hopfendolde im Längsschnitt. An der Basis der Vorblätter wird von den Lupulin-drüsen das gelbe Lupulin ausgeschieden (Balken entspricht 1 cm).

Die Lupulinkörner der Dolden enthalten Harze und ätherische Öle, die dem Bier die herbwürzige Bittere und das hopfenblumige Aroma verleihen. Die wichtigsten Sub-

stanzen der Harze sind die α -Säuren, da sie die Hauptbestandteile der Bitterstoffe sind. Außerdem tragen sie aufgrund ihrer antiseptischen Wirkung zur Konservierung des Bieres bei (MIZOBUCHI UND SATO, 1985; HAAS UND BARSOUMIAN, 1994). Die aromagebenden ätherischen Hopfenöle bestehen aus einem komplexen Gemisch von rund 300 verschiedenen, meist flüchtigen Einzelkomponenten (FORSTER, 1993; GRANT, 1995). Als weitere Hopfeninhaltsstoffe bewirken Gerbstoffe (Tannine) durch ihr eiweiß-fällendes Potential eine Klärung des Bieres und erhöhen die Schaumstabilität (BAMFORTH, 1985). Je nach Zusammensetzung der Hopfeninhaltsstoffe unterscheidet man zwischen "Aromahopfen", "Bitterhopfen" und "Hochalpha-Hopfen" (DE COOMAN *et al.*, 1998).

Der Tettninger Hopfen wird wegen seiner Qualität und seines außerordentlich feinen Aromas weltweit besonders geschätzt und wird zusammen mit dem 'Spalter' und dem 'Saazer' zur Gruppe der "Edlen Aromahopfen" gezählt. Er wird seit etwa 150 Jahren am Bodensee in der Region um Tettning in kommerziellem Maßstab angebaut (HEIDTMANN, 1994). Über seine Geschichte, seine Herkunft und seine genetische Zusammensetzung ist nur wenig bekannt. Spekulationen über seine Herkunft sind vielfältig, teils widersprüchlich.

Am wahrscheinlichsten erscheint die Vermutung von HEIDTMANN (1994), dass sich die Tettninger Hopfenpflanze in der anfänglichen Aufschwungzeit des Tettninger Hopfenbaus (1854 betrug die Tettninger Hopfenanbaufläche noch 3 ha, wuchs bis 1864 auf 91 ha und expandierte bis 1874 auf 400 ha) ihre Fechser aus Rottenburg beschafft haben dürften. Die Rottenburger Fechser sollen ihrerseits aus Spalt stammen (ZABELWITTOCH, 1977), während der Spalter Hopfen wiederum vom Saazer Hopfen abstammen soll (PINCKERT, 1861; FRUWIRTH, 1888). Dies würde bedeuten, dass der 'Tettninger' als Abkömmling des 'Saazer' anzusehen wäre.

Bisher wurde ferner angenommen, dass es sich beim 'Tettninger' um eine alte Landsorte handelt (SCHMIDT, 1958; HAUNOLD, 1990), die zwar durch zielbewusste Erzeugung von Pflanzgut teilweise vereinheitlicht wurde (HEIDTMANN, 1993), aber ansonsten keinen wesentlichen züchterischen Veränderungen unterlag. Es existieren im Tettninger Anbaugebiet sogar heute noch Hopfengärten, die um die Jahrhundertwende (19. zu 20. Jh.) angelegt wurden und in denen immer noch das ursprüngliche Material kultiviert wird.

Grundlegende Probleme im Hopfenanbau stellen Ernteauffälle dar, die durch Krankheits- oder Schädlingsbefall verursacht werden. Bedeutende Pilzkrankheiten sind *Pseudoperonospora humuli* (Falscher Mehltau), *Sphaerotheca humuli* (Echter Mehltau), verschiedene *Verticilium*-Stämme (Hopfenwelke) und *Botrytis cinerea* (Botrytis). Je früher die Pflanzen befallen werden, desto schwerwiegender sind die Schädigungen. Es kann sogar zum Absterben der ganzen Pflanze kommen. Zu den tierischen Schädlingen zählen insbesondere die Hopfenblattlaus (*Phorodon humuli*), die gemeine Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*) sowie die Larven einiger Schmetterlinge und Käfer. Derzeit können die meisten Infektionen und Schädlinge nur mit Pflanzenschutzmitteln bekämpft werden (KOHLMANN UND KASTNER, 1975), die meist präventiv ausgebracht werden, um einen Befall gar nicht erst aufkommen zu lassen. Wegen der Größe der Hopfenpflanzen ist der Einsatz spezieller Turbinen-Spritzmaschinen erforderlich. Hierbei kommt es zur Abdrift von Spritzmitteln, was eine erhebliche Belastung für die angrenzenden Gebiete darstellt. Man ist daher daran interessiert, den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in Hopfengärten zu reduzieren. Dies kann z.B. bei der Hopfenperonospora durch die Prognose von Pilzsporen erreicht werden, wodurch ein gezielter und somit effektiverer und sparsamerer Spritzmitteleinsatz ermöglicht wird (ENGELHARD *et al.*, 1999). Jedoch erscheint der Anbau von resistenten Hopfenpflanzen ökologisch und ökonomisch am sinnvollsten zu sein.

Generell wären zwei Ansätze denkbar, um zu resistenten Hopfenpflanzen zu gelangen:

1. Einkreuzung von Resistenzen

Gewöhnlich können Resistenzeigenschaften in eine bestimmte Sorte durch Kreuzungen mit solchen Genotypen eingebracht werden, welche die gewünschten Resistenzgene tragen. So konnten z.B. die Neuzüchtungen 'Hüller Bitterer' und 'Hallerlauer Gold' hergestellt werden, die neben guten Aromaeigenschaften auch eine erhöhte Toleranz gegenüber *Peronospora* aufweisen (KOHLMANN UND KASTNER, 1975). Dieser Ansatz ist jedoch für bereits etablierte Sorten wie den Tettlinger Hopfen nicht geeignet, denn eine wesentliche Schwierigkeit nach einer Kreuzung wäre hier z.B. die Erhaltung der hochgeschätzten Aromaeigenschaften des 'Tettlinger'. Da vom 'Tettlinger' keine männlichen Hopfenpflanzen zur Verfügung stehen, müsste zudem auf andere Sorten oder auf Wildtypen zurückgegriffen werden. Dieses würde aufwendige Rückkreuzungsprogramme erforderlich machen und die vollständige Wiederherstellung

des Tettninger Aromas aufgrund des hohen Grades der Heterozygotie im Hopfen deutlich erschweren.

2. Selektion resistenter Klone aus einer Population mit genetischer Vielfalt

Ein anderer Lösungsansatz wäre der, dass in einer vorhandenen, genetisch heterogenen Ausgangspopulation auf natürlich vorkommende, resistente Individuen hin selektiert wird. Hierfür ist jedoch eine genügend große genetische Variabilität erforderlich. Aufgrund morphologischer Heterogenität, die in Tettninger Hopfengärten zu beobachten ist, wurde eine gewisse genetische Variabilität innerhalb des 'Tettninger' vermutet. Die Auslese von resistenten Klonen aus dem Tettninger Material könnte somit eine sinnvolle Alternative zur Kreuzung darstellen. Hierfür ist allerdings die Bestimmung der genetischen Variabilität in Tettninger Hopfen erforderlich.

Bis vor wenigen Jahren wurden hauptsächlich morphologische Parameter wie z.B. die Wuchsform der Pflanze, die Form der Blätter oder die Größe und Form der Dolden (WAGNER, 1905; SCHMIDT, 1958; KOHLMANN UND KASTNER, 1975) zur Bestimmung der Hopfensorten verwendet. Später wurden diese durch Analysen der chemischen Eigenschaften ergänzt (MAIER, 1978; GREEN, 1986; WACKERBAUER UND BALZER, 1988; PEACOCK UND MCCARTY, 1992; ERI *et al.*, 2000). Der Nachteil morphologischer Marker besteht aber v.a. darin, dass sie durch Umweltfaktoren und das Wachstumsstadium der Pflanze beeinflusst werden können. Obwohl auch die Zusammensetzung der Hopfenöle und der Bitterstoffe umweltbedingten Schwankungen unterliegen kann, ist jedoch das relative Verhältnis der Komponenten zueinander meist sortenspezifisch und kann zur Sortendifferenzierung herangezogen werden (HAUTKE UND PETRICEK, 1967; NICKERSON *et al.*, 1986; FORSTER UND SCHMIDT, 1993).

Mit der Etablierung neuer, PCR-basierter Markertechniken wie RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA; WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH UND MCCLELLAND, 1990), Mikrosatelliten (LITT UND LUTY, 1989; MORGANTE UND OLIVIERI, 1993) und AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism; ZABEAU UND VOS, 1993; VOS *et al.*, 1995) stehen jetzt auch Markersysteme zur Verfügung, die auf der Analyse der DNA basieren, und somit direkte Aussagen über den Genotyp einer Pflanze zulassen, ohne von Umweltbedingungen beeinflusst zu werden.

Unter diesen Techniken stellt die AFLP-Technik den momentan wohl effektivsten Typ der molekularen Marker zur Differenzierung auch von sehr nah verwandten Individuen dar (LIN *et al.*, 1996b; Powell *et al.*, 1996; RUSSEL *et al.*, 1997; GARCIA-MAS *et al.*, 2000). Ihr großes Potential liegt v.a. darin, dass simultan eine große Anzahl an Polymorphismen detektiert werden kann, ohne dass Sequenzinformationen erforderlich sind (ZABEAU UND VOS, 1993; VOS *et al.*, 1995). Sie wurde bisher u.a. zur Bestimmung der genetischen Verwandtschaft und zur Identifizierung von Sorten eingesetzt (HILL *et al.*, 1996; SENSI *et al.*, 1996; ELLIS *et al.*, 1997; CERVERA *et al.*, 1998; ANGIOLILLO *et al.*, 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die AFLP-Technik zur Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb des Tettninger Hopfens eingesetzt. Bei genügend hoher genetischer Variabilität könnte eine Selektion von resistenten Pflanzen durchgeführt werden. Es sollte daher festgestellt werden, ob die genetische Variabilität im Tettninger Hopfen für eine Selektion innerhalb der Sorte, basierend auf genetischen Polymorphismen, ausreichend groß ist. Dieses erfolgte anhand einer repräsentativen Stichprobe von Einzelpflanzen aus dem gesamten Tettninger Anbaugebiet.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehungen des 'Tettninger' zu anderen Hopfensorten dar. Hierzu wurde der 'Tettninger' durch den Vergleich seines genetischen Fingerabdrucks mit denen von anderen Hopfensorten näher charakterisiert.

Typischerweise wird die DNA für die Erzeugung molekularer Fingerabdrücke aus Blattmaterial extrahiert. Da von einigen der untersuchten Hopfensorten aber kein Blattmaterial zur Verfügung stand, wurden andere DNA-Quellen auf ihre Eignung zur Erzeugung von AFLP-Fingerabdrücken hin untersucht. Die Erschließung zusätzlicher DNA-Quellen, wie z.B. aus Dolden, würde eine Erweiterung des Anwendungsbereichs der AFLP-Technik ermöglichen. Die Untersuchung von kommerziellen Doldenproben wäre insofern erstrebenswert, da dadurch z.B. die Bestimmung der Herkunft von Proben oder die Untersuchung ihrer Sortenreinheit ermöglicht werden könnte.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Bezugsquelle
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose, SeaKem® LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Life Technologies, Eggenstein
Borsäure (99,8 %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CTAB (Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid)	Sigma, Deisenhofen
Dichlordimethylsilan	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Formamid (99 %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Gel-Mix 6	Life Technologies, Eggenstein
Harnstoff (>99,5 %)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
SequaGel-6	National Diagnostics, Atlanta, Ga., USA
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma, Deisenhofen
Tris (99,7 %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

2.2 Feinchemikalien für die Gewebekultur

Chemikalie	Hersteller / Bezugsquelle
Murashige & Skoog Plant Salt Mix	ICN Biochemicals, Eschwege
<i>p</i> -Aminobenzoessäure (PABA)	Sigma, Deisenhofen
6-Benzylaminopurin (BAP)	Sigma, Deisenhofen
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Calcium-Pantothenat	Serva, Heidelberg
Folsäure	Serva, Heidelberg
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Indol-3-Buttersäure (IBA)	Sigma, Deisenhofen
<i>myo</i> -Inosit	Sigma, Deisenhofen
Kinetin	Sigma, Deisenhofen
Nicotinsäure	Sigma, Deisenhofen
Oxoid Purified Agar	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Pyridoxin-HCl	Sigma, Deisenhofen
Riboflavin	Serva, Heidelberg
Thiamin-HCl	Sigma, Deisenhofen

Zum Ansetzen aller Lösungen und Medien wurde grundsätzlich zweimal destilliertes Wasser verwendet.

2.3 Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, allgemein	Hersteller / Bezugsquelle
Lambda-DNA (aus λ cl857, geschnitten mit <i>Sam</i> 7)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Tomaten-DNA	Life Technologies, Eggenstein
DNA-Längenstandards:	
Marker III	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
1 kb-ladder	Life Technologies, Eggenstein

Nukleinsäuren, allgemein**Hersteller / Bezugsquelle**

AFLP-Längenstandard:

30-330 bp AFLP DNA ladder

Life Technologies, Eggenstein

Nukleotide[γ -³³P]-ATP (3000 Ci/mM)

ICN Biochemicals, Eschwege

Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies, Eggenstein, bezogen. Sie waren entweder Bestandteil der AFLP-Reaktionssysteme oder wurden auf Anforderung synthetisiert. Die Sequenzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

2.4 Enzyme**DNA / RNA-modifizierende Enzyme****Hersteller / Bezugsquelle***EcoR* I

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

RNase A

Serva, Heidelberg

Taq-Polymerase

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

T4-Polynukleotid-Kinase

Life Technologies, Eggenstein

T4-DNA-Ligase

Life Technologies, Eggenstein

2.5 Reaktionssysteme, gebrauchsfertig (Kit's)**Reaktionssystem****Hersteller / Bezugsquelle**

AFLP Analysis System I

Life Technologies, Eggenstein

AFLP Starter Primer Kit

Life Technologies, Eggenstein

DNeasy Plant Maxi Kit

Qiagen, Hilden

Tabelle 1: Sequenzen der für die AFLP-Analysen eingesetzten Adapter und Primer.

Name	Abkürzung	Sequenz
<i>Eco</i> RI-Adapter (doppelsträngig)		5' - CTCGTAGACTGCGTACC CTGACGCATGGTTAA - 5'
<i>Mse</i> I-Adapter (doppelsträngig)		5' - GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT - 5'
<i>Eco</i> RI +1 Primer	E-A	5' - GACTGCGTACCAATTC A - 3'
<i>Eco</i> RI +2 Primer	E-AC	5' - GACTGCGTACCAATTC AC - 3'
<i>Eco</i> RI +3 Primer	E-AAC	5' - GACTGCGTACCAATTC AAC - 3'
	E-AAG	5' - GACTGCGTACCAATTC AAG - 3'
	E-ACA	5' - GACTGCGTACCAATTC ACA - 3'
	E-ACC	5' - GACTGCGTACCAATTC ACC - 3'
	E-ACG	5' - GACTGCGTACCAATTC ACG - 3'
	E-ACT	5' - GACTGCGTACCAATTC ACT - 3'
	E-AGC	5' - GACTGCGTACCAATTC AGC - 3'
	E-AGG	5' - GACTGCGTACCAATTC AGG - 3'
	<i>Eco</i> RI +4 Primer	E-ACTA
E-ACTC		5' - GACTGCGTACCAATTC ACTC - 3'
E-ACTG		5' - GACTGCGTACCAATTC ACTG - 3'
E-ACTT		5' - GACTGCGTACCAATTC ACTT - 3'
<i>Mse</i> I +1 Primer	M-C	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC - 3'
<i>Mse</i> I +3 Primer	M-CAA	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CAA - 3'
	M-CAC	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CAC - 3'
	M-CAG	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CAG - 3'
	M-CAT	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CAT - 3'
	M-CTA	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CTA - 3'
	M-CTC	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CTC - 3'
	M-CTG	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CTG - 3'
	M-CTT	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC CTT - 3'

2.6 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller / Bezugsquelle
Cryo-Röhrchen (5 ml)	Roth, Karlsruhe
Gel-Blotting Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Reaktionsgefäße (dünnwandig)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Greiner, Göppingen
¾ l Weck-Rundrand-Gläser	Weck, Wehr

Alle weiteren Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner und Roth bezogen.

2.7 Geräte

Neben der Standardausrüstung eines molekularbiologischen Labors wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
Digitalkamera, Olympus D300L	Olympus, Tokyo, Japan
Gefriertrocknung (Alpha 1-2)	Christ, Osterode
Geltrockner, Modell 583	Bio-Rad, Hercules, Cal., USA
Pflanzenzuchtschrank (I-35LLVL)	Percival Scientific, Boone, Ia., USA
Röntgen-Entwicklungs-Maschine, Modell Curix 60	Agfa, Leverkusen
S 2 Gelkammer mit Power Supply PS 9009	Life Technologies, Eggenstein
Schwingmühle (MM2)	Life Technologies, Eggenstein
Sonifier 400	Retsch, Haan
Sterilbank (<i>Lamin Air</i> ® HV-mini)	Branson, Danbury, Conn., USA
Sterilbank (Typ UVF 6.12 S)	Heraeus, Osterode
	BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Gerät

Thermocycler PTC 200
 Thermostat (Modell 1012)
 UV-Kammer ($\lambda=260$ nm, 6 x 15 W)
 UV-Transilluminator,
 Chroma 41 ($\lambda=254$ nm)
 Videodokumentationsanlage

Hersteller / Bezugsquelle

MJ Research, Watertown, Mass., USA
 GLF, Burgwedel
 Eigenbau MPI Zellbiologie, Ladenburg
 Vetter GmbH, Wiesloch

 S+L Mikrotest, Jena

2.8 Fotomaterial**Fotomaterial**

Farbpositivfilme, Kodak Elitechrom 100
 Röntgenfilme:
 Fuji X-Ray Film
 Hyperfilm-MP
 Entwickler G153
 Schnellfixierer G354
 Videoprinterpapier (UPP-110HD)

Hersteller / Bezugsquelle

Kodak, Stuttgart

 Fuji, Tokyo, Japan
 Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
 Agfa, Leverkusen
 Agfa, Leverkusen
 Sony Corp., Tokyo, Japan

2.9 Software**Programm**

NTSYS-pc, Version 2.0
 WinCam, Version 2.2
 Adobe PhotoDeluxe, Version 1.0

Hersteller / Bezugsquelle

ROHLF (1998)
 Cybertech, Berlin
 Adobe Systems Inc., Seattle, Wash., USA

2.10 Gewächshausbedarf

Material	Hersteller / Bezugsquelle
Komposterde	eigene Herstellung
Düngekalk	Hessler, Wiesloch
Fluss-Sand	Baustoff Lutz, Bernhausen
Frusdorfer Einheitserde (Null)	Archut, Lauterbach-Wallenrod
Dünger:	
Osmocote (N-P-K: 14-14-14)	Scotts, Nordhorn
Azolon Fluid (26% N-Stickstoff total)	Aglukon, Düsseldorf
WUXAL (N+P+K+Spurenelemente)	Aglukon, Düsseldorf
Gewächshausbeleuchtung:	
SON-T AGRO 400	Philips, Eindhoven, Niederlande
Pflanzenschutzmittel:	
Bladafum	Bayer, Leverkusen
Confidor	Bayer, Leverkusen
Metasystox	Bayer, Leverkusen
Saprol	Cyamid Agrar, Ingelheim
Vertimec	MSD Agvet, Grünwald

2.11 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit mehreren Hopfensorten durchgeführt, von denen unterschiedliches Pflanzenmaterial zur Verfügung stand. Tabelle 2 gibt Aufschluss über Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials.

Kommerzielle Muster von Doldengemischen und Pellets (Typ 45) der Sorten 'Tettnanger', 'Hallertauer mfr.', 'Hersbrucker' und 'Northern Brewer' der Hopfenernte 1998 aus dem Tettnanger Anbaugebiet und der Hallertau wurden von der Firma Joh. Barth & Sohn, Nürnberg, bereitgestellt. Entsprechendes Material der Sorten 'Hallertauer mfr.', 'Hersbrucker', 'Spalter', 'Spalter Select' und 'Perle' aus der Anbauregion um Spalt (Ernte 1998) wurde von der Hopfenverwertungsgenossenschaft Spalt zur Verfügung

Tabelle 2: Aufstellung des eingesetzten Pflanzenmaterials.

Sorte	Herkunft	Abkürzung	Quelle	Material für die DNA-Extraktion
Tettnanger	Tettnang	TeT	Stichprobe von Einzelpflanzen 1996/97 Fa. Joh. Barth & Sohn, Nürnberg	B, DE DM, P
Hallertauer mfr.	Tettnang	HaT	Fa. Joh. Barth & Sohn, Nürnberg	DM, P
	Hallertau	HaH	Fa. Joh. Barth & Sohn, Nürnberg	DM, P
	Spalt	HaS	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	DM, P
Hersbrucker	Hallertau	HeH	Fa. Joh. Barth & Sohn, Nürnberg	DM, P
	Spalt	HeS	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	
Northern Brewer	Hallertau	NBH	Fa. Joh. Barth & Sohn, Nürnberg Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau, Hüll	DM, P B (TC)
Spalter (A-Klon)	Spalt	SpS-A	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	B, DE, DM*, P*
(B-Klon)		SpS-B	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	B, DE, DM*, P*
Spalter Select	Spalt	SeS	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	B, DE, DM, P
Perle	Spalt	PeS	Hopfenverwertungsanstalt Spalt e.V., Roth	B, DE, DM, P
US-Tettnanger				
	USA / Idaho	US-Tet/Id	Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau, Hüll	DM (befruchtet)
	USA / Oregon	US-Tet/Or	Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau, Hüll	DM (befruchtet)
	USA / Washington	US-Tet/Wa	Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau, Hüll	DM (befruchtet)
US-Hallertauer	USA	US-Hal	Bayer. Landesanstalt f. Bodenkultur u. Pflanzenbau, Hüll	DM (befruchtet)
Oswald 31	Saaz	Os 31	Hop Research Institute, Saaz	B
Oswald 72	Saaz	Os 72	Hop Research Institute, Saaz	B
Oswald 114	Saaz	Os 114	Hop Research Institute, Saaz	B
Oswald 126	Saaz	Os 126	Hop Research Institute, Saaz	B
Original Saazer	Saaz	orgS	Hop Research Institute, Saaz	B
Fuggle	Saaz	Fug	Hop Research Institute, Saaz	B
Backa	Neusatz	Bac	Institute of Vegetable Crops, Neusatz	B
Strisselspalter	Frankreich	SSp	Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, Illkirch	DNA (B)

B: Blätter von Einzelpflanzen, DE: Dolden von Einzelpflanzen, DM: Doldengemisch von Pflanzen einer Sorte (kommerzielles Muster), P: Pellets (kommerzielles Muster), DNA (B): extrahierte DNA aus Blattmaterial, B (TC): Blattmaterial von Pflanzen aus der sterilen Gewebekultur.

* Bei der kommerziellen Herstellung von Doldengemischen und Pellets wird Pflanzenmaterial der gesamten Spalter Region verarbeitet. Eine Differenzierung zwischen A-Klon und B-Klon war somit nicht möglich.

gestellt. Blätter und Dolden von Einzelpflanzen aus dieser Region wurden im August 1998 als frisches Material gesammelt. Hopfenproben aus den USA wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP), Hüll, als Gemische von befruchteten Dolden erhalten, sowie sterile Stecklingskulturen der Sorte 'Northern Brewer'. Alle Hopfensorten aus der Tschechischen Republik (Osvald Klone 'Os 31', 'Os 72', 'Os 114' und 'Os 126', 'Original Saazer' und 'Fuggle') wurden vom Hop Research Institute, Zatec (Saaz), als gefriergetrocknetes Blattmaterial zur Verfügung gestellt. 'Backa' Hopfen aus Jugoslawien wurde als Fehser vom Institute of Vegetable Crops, Novi Sad (Neusatz), erhalten. Von der Sorte 'Strisselspalter' wurde extrahierte DNA von der Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, (E.S.B.S.), Illkirch, bereitgestellt.

Für die Bestimmung der genetischen Variabilität des Tettlinger Hopfen wurde im Mai 1997 von einer randomisierten Stichprobe in Hohenheim Stecklinge hergestellt (siehe 3.1.1.2). Bereits im August 1996 wurden von zwölf adulten Einzelpflanzen von der Versuchsstation in Straß (ebenfalls Tettlinger Anbaugebiet) Blattmaterial und Doldenproben gesammelt.

3 Methoden

3.1 Probenahme und Materialanzucht

3.1.1 Tettninger Material

3.1.1.1 Auswahl von Pflanzen für eine repräsentative Stichprobe

Die Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb der Sorte 'Tettninger' erfolgte anhand einer repräsentativen Stichprobe von 288 Einzelpflanzen aus 28 Hopfengärten, die sich über das gesamte Tettninger Anbauggebiet verteilten (siehe Anhang 1). Es wurden nur solche Gärten für die Probenahme ausgewählt, in denen nach Angaben der jeweiligen Hopfenpflanzler ausschließlich die Sorte 'Tettninger' angebaut wurde. Die Positionen aller ausgewählten Pflanzen wurden kartiert (siehe Anhang 2), um ein späteres Wiederfinden der Einzelpflanzen zu ermöglichen. Anhand eines hierfür entwickelten Probenschlüssels wurde jeder Probenpflanze eine Proben-Nummer und ein dreiteiliger Zahlencode zugeordnet, der die genaue Position der Pflanze im Hopfengarten beschreibt. Hierzu wurden die Nordseiten der Hopfengärten bestimmt indem die Seite, deren Senkrechte zwischen 315° und 45° lag, als Nordseite definiert wurde (Abbildung 3).

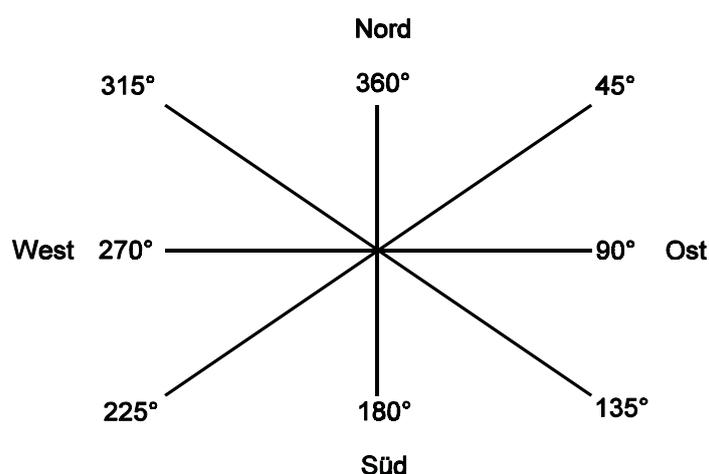


Abbildung 3: Gradeinteilung zum Norden der Hopfengärten.

An der Nord-West-Ecke beginnend wurden die Fächer (erste Zahl), in den Fächern die Pflanzenreihen (zweite Zahl) und in der entsprechenden Reihe die Stöcke (dritte Zahl) nummeriert. Erfolgte der Zugang zu den Reihen von Süden her, wurden die Stocknummern mit negativen Vorzeichen versehen.

Die Probenahme untergliederte sich in zwei Abschnitte: 1) 1996 wurden vom Amt für Landwirtschaft, Landschafts- und Bodenkultur, Markdorf (ALLB, Außenstelle Tettang) 151 Pflanzen mit "typisch" Tettninger Habitus ausgewählt und 2) die Probenahme 1997, bei der 137 Pflanzen randomisiert ausgesucht wurden. Die Pflanzen der zweiten Probenahme stammten jeweils aus den gleichen Gärten wie die im Vorjahr ausgewählten Pflanzen. Zur Auswahl der 1997 beprobten Pflanzen wurde willkürlich eine Reihe ausgewählt, aus der nicht schon im Vorjahr Proben entnommen wurden. In Abhängigkeit von der Größe des Gartens wurden in möglichst gleichen Abständen Pflanzen abgezählt, von denen Proben genommen wurden. Von den ausgezählten Pflanzen wurden entweder überzählige Triebe, die nicht für das Anleiten an den Draht verwendet wurden (Abbildung 4 A, S. 32), oder Teile des Wurzelstocks entnommen. Nur wenn die durch das Abzählen bestimmte Pflanze zu schwach war, wurde auf die nächste Pflanze der Reihe ausgewichen. Der Garten Nummer 25 (Schmid, Kerlenmoos) wurde im Winter 1996/97 gerodet, so dass kein weiteres Material bei der Probenahme 1997 entnommen werden konnte.

3.1.1.2 Pflanzenanzucht im Gewächshaus

Von den bei der Probenahme entnommenen Trieben wurden im Gewächshaus Stecklinge hergestellt. Die Stecklingsvermehrung erfolgte nach WILLIAMS UND SYKES (1959) und HOWARD (1965) mit Modifikationen von A. HAUNOLD (pers. Mitteilung):

Hierzu wurden die Triebe in Stücke geschnitten, die jeweils ein Blattpaar mit Achselknospen enthielten. Zur Stimulation der Wurzelbildung wurden die Stecklinge in eine Wurzelinduktionslösung (0,1 % IBA [Methanol-gelöst]; 0,1 % Borsäure) getaucht und in Anzuchtbeeten in Hopfen-Erde (48 Schaufeln Fluss-Sand; 12 Schaufeln gedämpfte Komposterde; 50 l Nullerde; 300 ml Osmocote; 200 ml Düngekalk) gesteckt, Wurzelstücke wurden direkt eingelegt. Die Bewurzelung erfolgte unter Anzuchtleuchten (25 bis 28 kLux; Tag / Nacht: 16 Stunden / 8 Stunden; Tagestemperatur: 20 bis 40°C). Um eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit (90 bis 100 %) zu gewährleisten, wurden die Anzuchtbeete mit Doppelstegplatten abgedeckt und die Stecklinge 3 bis 4 mal

täglich bewässert. Nach der Bewurzelung und dem Austrieb der Achselknospen wurden die Stecklinge einer Mutterpflanze eingetopft (jeweils zwei bis vier Pflänzchen in einen 9 × 9 cm Plastiktopf), angeleitet und unter den in Tabelle 3 angegebenen Bedingungen weiter kultiviert. Nach weiteren zwei bis drei Wochen wurde der Bestand auf die jeweils kräftigste Pflanze pro Mutterpflanze reduziert. Von den vom ALLB 1996 ausgewählten Pflanzen wurden im Winter 1996/97 an der Landesanstalt für Pflanzenbau, Forchheim (LAP, Außenstelle Saatbauamt Donaueschingen) Stecklinge hergestellt, von denen je Mutterpflanze ein Pflänzchen zur Verfügung gestellt und direkt in 9 × 9 cm Plastiktopfe umgetopft wurde.

Ab sechs Wochen nach dem Umtopfen erfolgte eine wöchentliche Düngergabe mit einer 2 %-igen Dungelosung (WUXAL bzw. Azolon Fluid). Je nach Schädlingsbefall wurden die Pflanzen mit handelsüblichen Pflanzenschutzmitteln behandelt. Nach drei Monaten wurden junge Blätter zur DNA-Extraktion entnommen (Punkt 3.2.1.1) und Rückstellproben angelegt, wozu Blattmaterial in Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Zur Verjüngung des Bestands wurden im etwa halbjährigen Rhythmus die alternden Reben bis auf den Wurzelstock zurückgeschnitten, um die Bildung junger Triebe zu induzieren.

Tabelle 3: Anzuchtbedingungen im Gewächshaus.

mittlere Temperatur (Tag / Nacht):	ca. 22°C / ca. 16°C
relative Luftfeuchte:	30 bis 60 %
Tag / Nacht-Rhythmus:	16 Stunden / 8 Stunden
Lichtstärke:	22 bis 28 kLux

3.1.1.3 Klone aus Straß

Bereits im August 1996 wurden von adulten Einzelpflanzen von 12 Klonen der Versuchstation Straß Blattmaterial geerntet. Hierbei wurden möglichst junge Blätter entnommen und gekühlt nach Hohenheim gebracht. Hier wurden sie sofort gewaschen, getrocknet, nach Entfernen der Stiele sowie beschädigter Teile in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Auch die Positionen dieser Pflanzen wurden kartiert. Da zu diesem Zeitpunkt der einheitliche Positionscode noch nicht entwickelt war, weicht der Code der Strasser Pflanzen von denen der repräsentativen Stichprobe aus den kommerziellen Hopfengärten ab. In Straß wurde vom ALLB jeweils ein Klon in einem Fach (bestehend aus 6 Reihen) angepflanzt. Der Strasser Positionscode gibt in der ersten Ziffer den Block an (Block: Pflanzen eines Fachs zwischen den Gerüstpfosten; von Osten her ab dem ersten senkrechten Pfosten gezählt), in der zweiten Ziffer die Reihe (von Süden her beginnend) und in der dritten Ziffer die Pflanze in dieser Reihe (von Osten her gezählt). Von einer Einzelpflanze (Klon 1-147) wurden außerdem Dolden geerntet.

3.1.2 Probenahme Spalt

Die Probenahme in Spalt erfolgte im August 1998 kurz vor der Hopfenernte. Somit konnten von Einzelpflanzen sowohl Blätter als auch Dolden geerntet werden. Das Pflanzenmaterial wurde wie in Punkt 3.1.1.3 beschrieben geerntet und weiter verarbeitet.

3.1.3 Pflanzenanzucht in steriler Gewebekultur

Von der Sorte 'Northern Brewer' standen zur Gewinnung von Blattmaterial sterile Stecklinge zur Verfügung, die weiterhin in Sterilkultur erhalten und vermehrt wurden (Temperatur: 25°C ; Tag / Nacht: 16 Stunden / 8 Stunden). Zur Kultivierung diente ein MS-Basismedium (MS Plant Salt Mix, ICN Biochemicals) nach MURASHIGE UND SKOOG (1962) mit Zusatz von Vitaminen (WETMORE UND SOROKIN, 1995) und Glukose. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 4 dargestellt. In etwa drei- bis vierwöchigem Rhythmus wurden von den Pflänzchen die Blätter entfernt und gefriergetrocknet. Die verbliebenen Stiele wurden in Stücke mit je einem Paar Achselknospen geschnitten und in frisches Medium überführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Hopfen-Kultur-Mediums.

Murashige-Skoog Salze	Konzentration [mg × l ⁻¹]
NH ₃ NO ₃	1650,00
H ₃ BO ₃	6,20
CaCl ₂ × 2H ₂ O	439,90
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
FeNa EDTA	36,70
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370,60
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22,30
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25
KI	0,83
KNO ₃	1900,00
KH ₂ PO ₄	170,00
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,60
Wetmore-Sorokin Vitamine	
Thiamin	1,00
Pyridoxin-HCl	1,00
Nicotinsäure	5,00
PABA	0,50
Folsäure	0,10
Riboflavin	0,50
Ca-Pantothenat	1,00
Biotin	0,01
IBA	2,00
Kinetin	0,50
Zucker	[g × l⁻¹]
<i>myo</i> -Inosit	0,01
Glucose	20,0
Geliermittel	[g × l⁻¹]
Oxoid Purified Agar	6,0
pH-Wert (vor Autoklavieren)	6,1 (etwa 5,8 nach Autoklavieren)

3.2 DNA-Extraktion

Für AFLP-Analysen wird hochmolekulare genomische DNA benötigt. Diese wurde aus frischem oder gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial isoliert. Hierbei wurden für Blätter, Dolden und Pellets verschiedene Extraktions-Protokolle verwendet. Die Extraktionen erfolgten in Anlehnung an SAGHAI-MAROOF *et al.* (1984) in Kombination mit der Methode von JUNGHANS UND METZLAFF (1990). Um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurde bei der Blattentnahme für die DNA-Extraktion der Gewächshauspflanzen gesundes, nicht von Schädlingen befallenes Material verwendet, da diese zu verfälschten AFLP-Fingerabdrücken führen könnten (DYER UND LEONARD, 2000).

3.2.1 DNA-Extraktion aus Blattmaterial

3.2.1.1 DNA-Extraktion aus frischem Blattmaterial

Junge Hopfenblätter (ca. 350 mg) wurden in Streifen geschnitten und locker in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß zwischen zwei Stahlkugeln gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 1 Minute in einer Schwingmühle gemahlen. Sofort wurde 1 ml CTAB-Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,8 M NaCl; 50 mM EDTA, pH 8,0; 1 % CTAB; 0,1 % 2-Mercaptoethanol) zugegeben, vorsichtig homogenisiert bei 65°C für 30 Minuten inkubiert, wobei alle 5 Minuten durch Invertieren gemischt wurde. Nach Entfernung der Stahlkugeln wurde der Ansatz mit 670 µl Chloroform/Oktanol (24 : 1) unter Schwenken extrahiert. Der Extraktionsansatz wurde zentrifugiert (5200 × *g*, 20°C, 10 Minuten) und der Überstand nach Volumenbestimmung mit RNase A (Endkonzentration: 50 µg × ml⁻¹, 37°C, 30 Minuten) inkubiert. Durch Überschichten und langsames Mischen mit 0,6 Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt bis in der Lösung keine Schlieren mehr sichtbar waren. Die DNA wurde mit Hilfe eines Glashakens aus der Lösung gefischt, 20 Minuten in Waschpuffer (10 mM Ammonium-Acetat; 76 % Ethanol) gewaschen und nach gründlichem Abtropfen in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert (Raumtemperatur, mindestens 12 Stunden).

3.2.1.2 DNA-Extraktion aus gefriergetrocknetem Blattmaterial

Neben der DNA-Extraktion aus frischen Blättern wurde DNA auch aus getrockneten Blättern extrahiert. Hierzu wurden die im Vakuum gefriergetrockneten (ca. 90 Stunden) Blätter in einer Schwingmühle zu einem feinen Pulver gemahlen. Zu ca. 50 mg Blattpulver wurden 900 µl CTAB-Extraktionspuffer gegeben. Die weitere Extraktion erfolgte wie unter Punkt 3.2.1.1 beschrieben.

3.2.2 DNA-Extraktion aus Hopfendolden

Für die DNA-Extraktion aus Hopfendolden standen frische Dolden sowie getrocknete kommerzielle Proben zur Verfügung (Tabelle 2). Frisches Material wurde gefriergetrocknet (ca. 90 Stunden). Die kommerziellen Proben des US-Materials enthielten zum Teil zahlreiche Samen, die manuell entfernt wurden. Alle Doldenproben wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver gemahlen. Die DNA-Extraktion erfolgte aus ca. 450 mg gemahlene Dolden mit 15 ml CTAB-Extraktionspuffer wie unter Punkt 3.2.1.1 beschrieben. Abweichend dazu wurde die RNase-Behandlung auf 60 Minuten (bei 37°C) ausgedehnt, die DNA mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (absolut) präzipitiert und mit einer Pipette mit großer Öffnung vorsichtig abgesaugt. Nach kurzer Zentrifugation und Trocknung wurde die DNA in 250 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.2.3 DNA-Extraktion aus Pellets

Doldenpellets wurden im Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen. Die weitere DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des DNeasy Plant Maxi Kits (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Abweichend hiervon wurden ca. 800 mg Pelletpulver eingesetzt und die Volumina aller Puffer bis zum Prozess-Schritt der DNA-Bindung an die Säule (Qiagen) verdoppelt. Zusätzlich wurde die eluierte DNA durch erneute Fällung (0,3 M Natriumacetat; 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol, absolut) aufgereinigt und in 150 µl TE-Puffer resuspendiert (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der DNA-Extraktionen

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Vergleich mit definierten Mengen nativer Lambda-DNA im Agarosegel (Punkt 3.4.2). Außerdem wurde die Verdaubarkeit der DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen überprüft (Punkt 3.4.1). Die DNA-Lösungen wurden auf eine Konzentration von $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt und die Endkonzentration erneut durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.4 Standardtechniken

3.4.1 Restriktionsverdau der DNA

Alle Reaktionsansätze wurden, wenn nicht anders angegeben, gemäß Herstellerangaben der verwendeten Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Restriktionsverdaue von genomischer DNA wurden mit 1,5 U Enzym pro Reaktion durchgeführt.

3.4.2 Agarosegelelektrophorese

DNA wurde mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK *et al.*, 1989) analysiert ($10 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$; 1,0 bis 1,5 % Agarose; $1 \times \text{TAE}$ [$50 \times \text{TAE}$ -Puffer: 2 M Tris; 5,7 % (v/v) Essigsäure; 50 mM EDTA]). Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden 1,0 %-ige Gele (für die Analyse genomischer DNA) oder 1,5 %-ige Gele (zur Kontrolle der Präamplifikationen) verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromid-Bad [$5 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$] für 5 bis 10 Minuten gefärbt, 15 bis 30 Minuten in Wasser entfärbt und anschließend unter Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) dokumentiert.

3.5 AFLP-Analyse (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Zur Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb des Tettlinger Hopfen und zur Sortendifferenzierung wurde die AFLP-Technik nach ZABEAU UND VOS (1993) und VOS *et al.* (1995) eingesetzt. Die AFLP Reaktionen wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem AFLP Analysis System I (Life Technologies) und mit nachfolgend beschriebenen Modifikationen durchgeführt.

3.5.1 Restriktion und Ligation

Die Volumina des Restriktionsansatzes und der Ligation wurden um die Hälfte reduziert. Als Kontrolle der Reaktion diente ein Ansatz mit Tomaten-DNA (Kontroll-DNA aus dem Kit; Positivkontrolle).

Genomische DNA (125 ng) wurde in einem Doppelverdau mit *EcoR* I und *Mse* I (je 1,25 U; einfach Restriktionspuffer; Reaktionsvolumen: 12,5 µl) bei 37°C für 2 Stunden verdaut. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (70°C für 15 Minuten) abgestoppt. Anschließend wurden 5 pmol *EcoRI*-Adapter und 50 pmol *MseI*-Adapter bei 20°C für 2 Stunden an die Enden der Restriktionsfragmente ligiert (0,5 U T4-DNA-Ligase; einfach Ligationspuffer; Reaktionsvolumen: 25,0 µl). Die Ligationsansätze wurden im Verhältnis 1 : 10 (v/v) mit TE_{0,1}-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) verdünnt.

3.5.2 Präamplifikation

Die Präamplifikation erfolgte mit je 5 µl der verdünnten Ligationsansätze unter Verwendung der *EcoRI*- und *MseI*-Primer mit jeweils einer selektiven Base am 3'-Ende (siehe Tabelle 1) in einem Endvolumen von 51 µl (Präamplifikations-Mix mit je 6 pmol Primer; je 0,2 mM dNTPs; 1 U *Taq*-Polymerase; einfach PCR-Puffer). Zur Kontrolle auf mögliche Kontaminationen, die zu unspezifischen Amplifikationen in der PCR-Reaktion führen könnten, diente ein Reaktionsansatz ohne DNA (PCR-Negativkontrolle). Das Amplifikationsprofil umfasste 20 Zyklen mit 30 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 56°C und 60 Sekunden bei 72°C. Nach der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese auf erfolgreiche Amplifikation hin überprüft (Punkt 3.4.2). Die Präamplifikationsprodukte wurden mit TE_{0,1}-Puffer im Verhältnis 1 : 50 (v/v) verdünnt.

3.5.3 Primer-Markierung

Zum Nachweis der PCR-Fragmente wurde der jeweils eingesetzte *EcoRI*-Primer durch Phosphorylierung am 5'-Ende radioaktiv markiert. Eine Markierungsreaktion (Endvolumen: 50 μ l; 500 ng *EcoRI*-Primer; einfach Kinase-Puffer [70 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$; 100 mM KCl; 1 mM 2-Mercaptoethanol]; 10 μ l [γ - ^{33}P]-ATP [3000 Ci/mM]; 20 U T4-Polynukleotid-Kinase) lieferte markierten Primer für 100 Hauptamplifikationen. Der Markierungsreaktion (37°C, 60 Minuten) folgte eine Inaktivierung der Kinase durch Erhitzen (70°C, 10 Minuten).

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden nach der Markierung die nicht eingebauten Nukleotide vom Primer abgetrennt. Dies erfolgte mit Hilfe von MicroSpin-Säulen nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech). Durch Vergleich der Strahlung der in der Säule verbliebenen Radionukleotide mit der des markierten Primers mittels Handmonitor, konnte die Einbaurrate abgeschätzt werden. Markierungen, deren Effizienzen unter 50 % lagen, wurden wiederholt.

3.5.4 Selektive Hauptamplifikation

In der Hauptamplifikation wurde jeweils ein markierter *EcoRI*-Primer (Punkt 3.5.3) mit zwei, drei oder vier selektiven Nukleotiden in Kombination mit einem unmarkierten *MseI*+3 Primer eingesetzt [Reaktionsvolumen: 20 μ l; 5 μ l verdünnte DNA aus der Präamplifikationsreaktion; 5 ng *EcoRI*-Primer; 30 ng *MseI*-Primer; je 0,2 mM dNTPs; 0,4 U *Taq*-Polymerase; einfach PCR-Puffer]. In jedem PCR-Ansatz wurden als Vergleichsreaktionen Tomaten-DNA (Positivkontrolle), DNA der Sorte 'Northern Brewer' und eine PCR-Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Die Amplifizierung erfolgte in einer "touch down"-PCR (Handbuch: AFLP Analysis System I, Life Technologies), in der nach dem ersten Zyklus (94°C für 30 Sekunden, 65°C für 30 Sekunden und 72°C für 60 Sekunden) die Annealing-Temperatur in den folgenden 12 Zyklen um jeweils 0,7°C gesenkt wurde. Dann folgten 23 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 56°C. Nach der Amplifizierung wurden die Reaktionen mit 20 μ l Ladepuffer [98 % Formamid (v/v); 10 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau (w/v); 0,1 % Xylencyanol FF (w/v)] gemischt und bei -20°C gelagert.

3.5.5 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen bei der PCR

Um mögliche Kontaminationen in der PCR zu vermeiden, wurden alle damit verbundenen Reaktionsschritte und Komponenten in einer ausschließlich hierfür reservierten sterilen Werkbank angesetzt. Diese stand in einem von allen anderen DNA-analytischen Arbeiten räumlich getrennten Labor. Das Pipetterien erfolgte mit Pipettierhilfen, die ausschließlich in dieser Werkbank verwendet wurden. Außerdem wurden nur Sicherheits-Pipettenspitzen (mit Aerosolschutz) benutzt. Alle in der PCR eingesetzten Puffer und Wasser wurden in geeignetem Volumen aliquotiert und ebenso wie alle verwendeten Reaktionsgefäße für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt ($\lambda=260$ nm, 6 x 15 W). Aliquots wurden nur zum Ansetzen eines Reaktionsansatzes verwendet, mögliche Reste wurden verworfen.

3.6 Markierung des AFLP-Längenstandards

Als Längenstandard für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) diene die 30-330 bp AFLP ladder, die zuvor radioaktiv markiert wurde. 2 μ l Längenstandard-DNA wurden mit 1 μ l [γ - 33 P]-ATP [3000 Ci/mM] und 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in einfach Austausch-Puffer (50 mM Imidazol-HCl, pH 6,4; 12 mM MgCl_2 ; 1 mM 2-Mercaptoethanol; 70 μ M ADP) bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Durch Erhitzen auf 65°C für 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Die markierte AFLP ladder wurde mit 15 μ l TE-Puffer (pH 7,5) verdünnt, mit 20 μ l Ladepuffer versetzt und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

3.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der PCR-Produkte der selektiven Hauptamplifikation erfolgte in 6 %-igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (5,7 % Acrylamid; 0,3 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 7,0 M Harnstoff; 100 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 1 mM EDTA; 3 mM TEMED). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (420 µl einer 10 %-igen Persulfat-Lösung pro 70 ml Gel-Matrix) initiiert. Alternativ wurden auch Gele mit Fertig-Lösungen (SequaGel-6; Gel-Mix 6), den Herstellerangaben entsprechend, präpariert. Es wurden 0,4 mm dicke Gele (Höhe: 39 cm, Breite: 33 cm) gegossen. Die hierfür verwendeten Glasplatten wurden zuvor mit Dichlordimethylsilan beschichtet, um nach der Elektrophorese ein leichtes Ablösen des Gels von den Glasplatten zu ermöglichen. Zum Auftragen der Proben wurden "Haifischkämme" mit 50 bzw. 98 Zähnen verwendet.

Die mit Ladepuffer versetzten PCR-Produkte wurden bei 94°C für 3 Minuten denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Jeweils 2 µl der Proben wurden auf das vorgewärmte Gel (Vorlaufzeit: 20 Minuten bei 1000 V, 250 mA, 60 W) aufgetragen. Um ein gleichmäßiges Eindringen der Proben in das Gel zu gewährleisten, wurden für 5 Minuten 1000 V, 250 mA, 60 W angelegt, dann wurde auf 1200 V, 250 mA, 60 W erhöht. Die Auftrennung wurde beendet sobald der Xylen-Farbstoff zwei Drittel des Gels durchlaufen hatte. Das Gel wurde auf Blotting-Papier übertragen und bei 80°C für 3 Stunden getrocknet. Die Exposition mit Röntgenfilmen erfolgte in Abhängigkeit von der Aktivität der Isotope bei Raumtemperatur (20 bis 25°C) für 10 bis 15 Tage.

Die gesamte AFLP-Prozedur, beginnend mit der DNA-Extraktion, wurde für alle in dieser Arbeit untersuchten Proben wenigstens einmal vollständig wiederholt.

3.8 EDV-gestützte Datenanalyse

Die Autoradiogramme der Amplifikationsprodukte wurden unabhängig voneinander von zwei Personen visuell ausgewertet. Hierbei wurde jede Bande nummeriert, beginnend mit der Bande mit dem größten Molekulargewicht, und eine 1/0-Matrix (1 = vorhandene Bande, 0 = keine Bande) erstellt. Nur eindeutige, deutlich getrennte Banden, die sich in allen Wiederholungen reproduzieren ließen und die von beiden Personen übereinstimmend identifiziert wurden, wurden gewertet. Unterschiede in der Intensität der Fragmente wurden nicht berücksichtigt. Für die folgende Datenanalyse wurden nur die polymorphen Banden berücksichtigt, Doppelbanden wurden als eine Bande gewertet. Die Stammbaum-Analysen wurden mit der Software NTSYS-pc, Version 2.0 (ROHLF, 1998) durchgeführt. Hierzu wurde die Genetische Ähnlichkeit (Genetic Similarity, GS) basierend auf dem paarweisen Vergleich nach der Formel von JACCARD (1908) berechnet. Die Genetische Ähnlichkeit (GS) zwischen zwei Genotypen i und j wurde berechnet als:

$$GS_{ij} = N_{ij} / (N_{ij} + N_i + N_j)$$

N_{ij} = Anzahl der gemeinsamen Banden der beiden verglichenen Genotypen,

N_i = Anzahl der Banden, die nur in Genotyp i vorkommen,

N_j = Anzahl der Banden, die nur in Genotyp j vorkommen.

Basierend auf den Daten der GS-Matrix wurde mit Hilfe des UPGMA Cluster-Verfahrens (unweighted pair-group method with arithmetic averages, SNEATH UND SOKAL, 1973) ein Dendrogramm erstellt. Die Güte der Übereinstimmung des Dendrogramms mit dem ursprünglichen Datensatz der GS-Berechnungen wurde durch die Berechnung des "Cophenetischen Werts" (r) bestimmt (ROHLF UND SOKAL, 1981).

3.9 Bilddokumentation

Autoradiogramme wurden eingescannt und horizontale und vertikale Verzerrungen der Bilder mit Hilfe des Programms WinCam, Version 2.2 korrigiert. Aufhellungen und Erhöhung der Kontraste wurden mit dem Programm Adobe PhotoDeluxe, Version 1.0 durchgeführt, wobei die Veränderungen jeweils auf das gesamte Bild angewandt wurden.

3.10 Kontrollierte Scherung von DNA

Zur Bestimmung, welchen Einfluss die Qualität der DNA auf die Erzeugung von AFLP Fingerabdrücken hat, wurde genomische Hopfen-DNA unter kontrollierten Bedingungen geschert. 500 μl genomischer DNA (Konzentration: $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$) wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß durch Eintauchen des Ultraschall-Fingers (Branson Sonifier 400 mit Standard-Mikrospitze [Enddurchmesser: 3 mm]; Output Control: 1 [entspricht etwa 40 Watt]; Microtip Limit: 7; Duty Cycle: constant) geschert. Es wurden Scherungsintervalle zwischen 1 und 64 Sekunden getestet, wobei die Dauer der Scherung jeweils verdoppelt wurde. Nach jedem Scherungsintervall wurde ein Aliquot von 10 μl entnommen. Zur Ermittlung des Grades der Scherung und zur Bestimmung der Verdaubarkeit der DNA wurden von den Aliquots jeweils 2 μl mit 1,5 U der Restriktionsendonuklease *EcoR* I geschnitten (Punkt 3.4.1) und mit 2 μl der jeweils ungeschnittenen DNA mittels Agarosegelelektrophorese verglichen (Punkt 3.4.2).

4 Ergebnisse

4.1 Probenahme und Materialanzucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurden genetische Fingerabdrücke sowohl von Stichproben von Hopfenpflanzen aus dem Tettninger Anbaugebiet erzeugt, wie auch von weiteren Hopfensorten unterschiedlicher Herkunft. Während von den meisten dieser Hopfensorten kommerzielle Muster von Dolden oder Pellets zur Verfügung standen, musste zur Bestimmung der genetischen Variabilität der Sorte 'Tettninger' eine Stichprobe von Einzelpflanzen gesammelt werden.

4.1.1 Probenahme und Anzucht der Stecklinge im Gewächshaus

Für die Bestimmung der genetischen Variabilität des Tettninger Materials wurde eine Stichprobe aus 288 Pflanzen verwendet, aus denen, je nach Zustand des gesammelten Materials, zwischen zehn und 50 Stecklinge pro Pflanze hergestellt werden konnten. Die Bewurzelung der Stängelstücke erfolgte innerhalb der ersten sechs bis acht Tage. Nach insgesamt zehn bis zwölf Tagen trieben die Achselknospen an den Nodien aus und wuchsen in den folgenden drei bis fünf Tagen (Tage 15 bis 17) zu jungen Trieben heran. Nach weiteren vier bis fünf Tagen (Tage 21 bis 24) konnten die Pflänzchen umgetopft und angeleitet werden (Abbildung 4 B - D).

Während der Kultur der Pflanzen im Anzuchtbeet war eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit erforderlich, die aber zur Verpilzung einiger Stecklinge führte. Obwohl die Abdeckungen der Anzuchtbeete nach der Bewurzelung zur Adaptation der Stecklinge an die niedrigere Temperatur und die geringere Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus leicht schräg gestellt wurden, konnte der Pilzbefall nicht verhindert werden. Aufgrund von Verpilzung gingen die Stecklinge von insgesamt 15 (5,2 %) Mutterpflanzen verloren. Im Ganzen konnten Stecklinge von 273 (94,8 %) der beprobten Pflanzen im Gewächshaus erhalten werden. Nach sechs bis sieben Wochen ab dem Umtopfen waren die Pflanzen so kräftig, dass Blattmaterial für die DNA-Extraktionen entnommen werden konnte.



Abbildung 4: Anzucht des Probenmaterials im Gewächshaus und in Sterilkultur.

A: Überzählige Triebe, die zur Herstellung der Stecklinge verwendet wurden. **B:** Austrieb der Achselknospen im Anzuchtbeet. **C:** Auswachsende Triebe. **D:** Umgetopfte und angeleitete Jungpflanze. **E:** Steckling aus dem Trieb der Pflanze 97-1263, der eine drei-zählige Symmetrie aufwies. Die Austriebe der Achselknospen zeigen wieder eine normale Morphologie. **F:** Sterile Gewebekultur vom Hopfen.

Die weitere Kultivierung der Pflanzen diente der Materialsicherung. Wenn die Blätter deutliche Alterungserscheinungen zeigten und begannen abzusterben (etwa alle vier bis sechs Monate), erfolgte ein Rückschnitt der Triebe bis auf den Wurzelstock. In den darauf folgenden Tagen trieben neue Sprosse aus. Es zeigte sich somit, dass zum Austreiben der Stöcke im Gewächshaus keine Vernalisation der Pflanzen erforderlich war. In der Wüchsigkeit der Pflanzen während der Sommer- bzw. Wintermonate wurde kein Unterschied festgestellt. Dadurch waren zwei bis drei Austriebe pro Jahr möglich, wodurch auch im Winter frisches, junges Blattmaterial für DNA-Extraktionen bereitgestellt werden konnte. Mit zunehmendem Alter der Stöcke wurden die durch das Zurückschneiden induzierten neuen Triebe zudem immer kräftiger.

Bei der Probenahme 1997 fiel eine Pflanze auf (Klon '97-1263'), die neben den normalen Trieben mit paarigen, gegenständigen Blättern einen Trieb besaß, an dessen Knoten jeweils drei Blätter standen. Auch von diesem Trieb (Klon '97-1263T') wurden Stecklinge hergestellt. Die aus den Achselknospen der Nodien austreibenden Sprosse wiesen aber wieder die normale zwei-zählige Morphologie auf (Abbildung 4 E).

4.1.2 Adaptierung eines Kulturmediums für die sterile Gewebekultur von Hopfen

Für die Sterilkultur der 'Northern Brewer'-Stecklinge wurde zunächst ein Basismedium (MS) mit Zusatz von 2 % Glukose und 2 ppm BAP bei Kulturbedingungen (Temperatur: 20°C, 16 Stunden Licht) verwendet, mit dem nach Angaben von E. SEIGNER (LBP, pers. Mitteilung) erfolgreich sterile Hopfenpflanzen kultiviert werden konnten. Mit diesen Kulturbedingungen konnte jedoch keine Stecklingskultur etabliert werden. Die Stecklinge zeigten einen sehr schwachen Wuchs mit kurzen Internodien und sehr kleinen Blättern. Auch durch den Zusatz von Vitaminen (1,0 mg \times l⁻¹ Nicotinsäure; 10,0 mg \times l⁻¹ Thiamin HCl; 1,0 mg \times l⁻¹ Pyridoxin HCl; 100,0 mg \times l⁻¹ *myo*-Inosit; GAMBORG, 1975) konnte die Wüchsigkeit der Stecklinge nicht verbessert werden. Erst mit Verwendung des in Tabelle 4 beschriebenen Hopfen-Kultur-Mediums konnte ein kräftigerer Wuchs erreicht werden. Die Pflanzen zeigten längere Internodien, größere Blätter und eine gute Bewurzelung (Abbildung 4 F). Bei einem Teil der Pflanzen war etwa drei Wochen nach dem Umsetzen an der Sprossbasis direkt unter der Oberfläche des Kulturmediums die spontane Bildung von Kallus festzustellen. Die Kalli wiesen feste grüne Strukturen auf, aus denen weitere Pflänzchen regenerierten.

4.2 Einfluss der DNA-Extraktions-Methode auf die Quantität und Qualität der DNA

Für die Erzeugung von molekularen Fingerabdrücken wird genomische DNA von besonders guter Qualität benötigt. Hierzu wurde zunächst eine Methode zur Isolierung hochmolekularer Hopfen-DNA etabliert. Nach der Prüfung verschiedener Extraktionsmethoden gelang es, basierend auf der CTAB-Methode nach SAGHAI-MAROOF *et al.* (1984), DNA von entsprechender Qualität zu isolieren. Dieses war jedoch erst möglich, nachdem die Salzkonzentration im Extraktionspuffer von 0,7 M auf 1,8 M erhöht wurde. Durch das Vorziehen der Behandlung mit RNase vor die Nukleinsäuren-Präzipitation konnte die sich anschließende Chloroform-Extraktion zur Entfernung der RNase und eine erneute DNA-Fällung eingespart werden.

4.2.1 Quantität der DNA aus Blattmaterial

Um die zeitaufwendige Gefriertrocknung des Blattmaterials aus dem Gewächshaus zu umgehen, erfolgte eine weitere Optimierung zur Extraktion von Hopfen-DNA aus frischem Blattmaterial. Von 268 (98,2 %) der 273 im Gewächshaus angezogenen Hopfenpflanzen der Tettlinger Stichprobe konnte DNA isoliert werden, von fünf Pflanzen ließ sich keine oder nicht ausreichend DNA extrahieren. Die DNA-Ausbeute lag zwischen 30 und 230 µg pro Gramm frischen Blattmaterials, die Ausbeute der Extraktionen der elf Strasser Klone lag zwischen 500 und 1100 µg DNA pro Gramm Trockenmaterial.

4.2.2 Quantität der DNA aus Hopfendolden

Aus Hopfendolden konnte mit dem reduzierten Extraktionsansatz nur eine sehr geringe DNA-Ausbeute erzielt werden, so dass die Extraktionen im 15 ml-Maßstab durchgeführt wurden. Eine Ausdehnung der RNase-Behandlung auf 60 Minuten war erforderlich, um den vollständigen Abbau der RNA sicherzustellen. Eine Präzipitation der DNA war nur mit Ethanol möglich, nicht mit Isopropanol.

Durch diese Modifikationen konnte von allen Doldenproben ausreichend DNA extrahiert werden. Die Ausbeuten lagen zwischen 25 und 115 µg DNA bezogen auf 1 g kommerziell getrocknete Doldengemische bzw. 270 bis 670 µg DNA pro Gramm gefriergetrockneter Dolden von Einzelpflanzen.

4.2.3 Quantität der DNA aus Pellets

Alle Pellet-Proben wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert, um ein Verkleben des Materials während des Mahlen zu verhindern. Eine DNA-Extraktion aus Hopfenpellets war nur mit dem DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) möglich, nicht aber mit der CTAB-Methode. Um eine ausreichend hohe DNA-Ausbeute zu erzielen, wurde abweichend von den Herstellerangaben die vierfache Einwaage an Pflanzenmaterial mit dem doppelten Puffervolumen extrahiert und auf einer Säule vereinigt. Durch diese Modifikationen konnten etwa 25 bis 30 µg DNA pro Gramm Pellet-Pulver isoliert werden.

4.2.4 Qualität der extrahierten DNAs

Nach Konzentrationsbestimmung und Test auf Verdaubarkeit der DNAs (alle DNAs ließen sich mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I schneiden), wurden sie auf eine einheitliche Konzentration von etwa $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt. Abbildung 5 zeigt die DNA-Extraktionen aus Blättern, Pellets, Dolden von Einzelpflanzen und Doldengemischen (jeweils $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$). Blattmaterial und Dolden von Einzelpflanzen lieferten DNA, die aus hochmolekularen Fragmenten mit einem geringen Anteil an gescherter DNA bestand. Es konnten keine Qualitätsunterschiede zwischen der DNA von Extraktionen aus frischem und getrocknetem Blattmaterial festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die DNA-Extraktionen der Doldengemische und der Pellets wiesen einen hohen Anteil kleinerer Fragmenten auf, die bis zu einer Fragmentgröße von etwa 200 bp reichten. Die Pellet-DNA zeigte hierbei den höchsten Grad der Degradation.

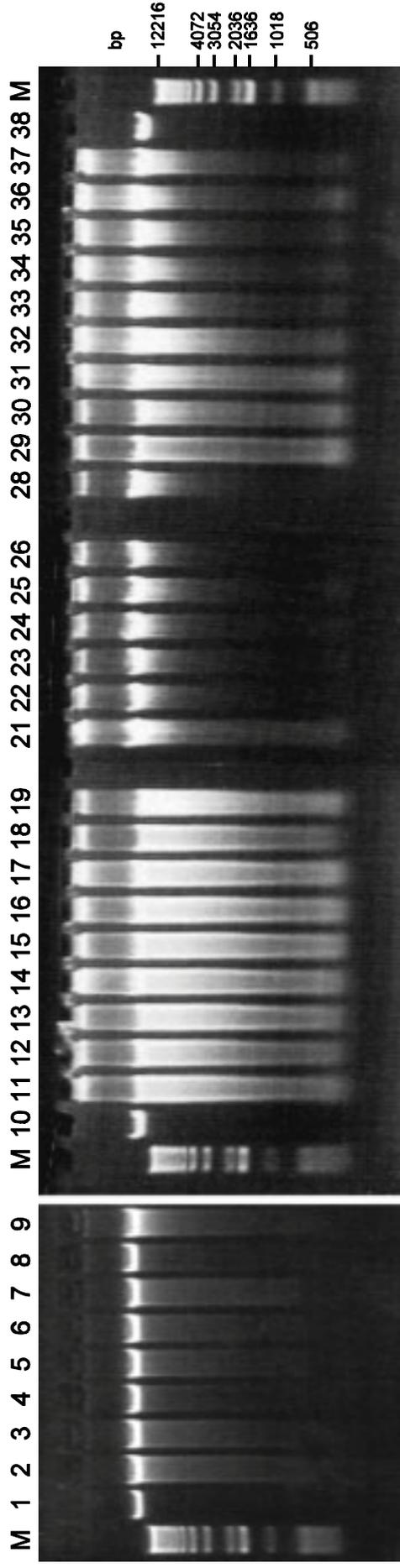


Abbildung 5: Vergleich der Qualität von DNA-Extraktionen aus verschiedenem Pflanzenmaterial.

Extraktionen aus Blättern (2 bis 9) und Dolden von Einzelpflanzen (21 bis 26) lieferten vorwiegend hochmolekulare DNA. DNA-Extraktionen aus Doldengemischen (28 bis 37) und Pellets (11 bis 19) wiesen einen hohen Anteil kleinere Fragmente auf. M: Längenstandard (1 kb-ladder); 1, 10 und 38: native Lambda-DNA (100 ng); 20 und 27: nicht belegt.

4.3 Etablierung der AFLP-Technik für Hopfen

Die Etablierung der AFLP-Technik für den Hopfen erfolgte mit den DNAs der elf Strasser Klone. Die Überprüfung der Präamplifikationen erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Amplifikationsprodukte der Hopfen-DNAs (Abbildung 6, Spuren 1 bis 10) umfassten DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 70 bis 1000 bp, wobei die durchschnittliche Fragmentgröße bei etwa 500 bp lag und eine schwache Bänderung im Fragmentgemisch zu erkennen war. Die Positivkontrolle (Spur 12) ergab ein in der Größenverteilung und Bänderung vergleichbares Amplifikationsprodukt. Die Negativkontrolle der PCR (Spur 11) zeigte keine Amplifikationsprodukte. Alle während dieser Arbeit durchgeführten Präamplifikationen wurden auf diese Weise überprüft und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

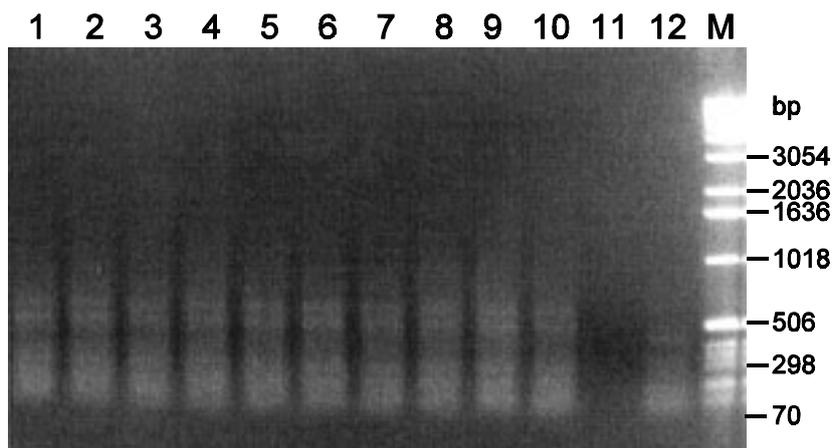


Abbildung 6: Kontrolle der Präamplifikationen.

1 bis 10: Hopfen-DNA; 11: PCR-Negativkontrolle (keine Template-DNA); 12: Positivkontrolle (Tomaten-DNA); M: Längenstandard (1 kb-ladder).

4.3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen für die Hauptamplifikation

Mit der vom Hersteller des AFLP-Reaktionssystems angegebenen Konzentration der *Taq*-Polymerase von 0,1 U pro Reaktionsansatz (20 µl) fand in der Hauptamplifikation keine nachweisbare Amplifikation statt. Die nicht eingebauten, markierten Primer verursachten an der ihrer Größe entsprechenden Position eine Schwärzung auf dem Radiogramm (Daten nicht gezeigt). Durch die Erhöhung der *Taq*-Polymerase Konzentration auf 0,4 U pro Reaktion konnte eine erfolgreiche Hauptamplifikation erreicht werden (Vos *et al.*, 1995).

4.3.2 Bestimmung der optimalen Primerselektivität für Hopfen

Die Anzahl der bei einer AFLP-Reaktion zu erwartenden Fragmente hängt direkt von der Selektivität der eingesetzten Primer ab, die gemäß der Größe des zu untersuchenden Genoms zu wählen ist (Vos *et al.*, 1995). Für Hopfen waren zu Beginn der Arbeiten noch keine Informationen über dessen Genomgröße verfügbar, so dass die Primerselektivität zunächst ermittelt werden mußte.

Zur Bestimmung der optimalen Primerselektivität wurden in der Hauptamplifikation Primer mit unterschiedlicher Anzahl selektiver Nukleotide am 3'-Ende getestet. Hierbei wurden *MseI*-Primer mit drei selektiven Basen und *EcoRI*-Primer mit zwei, drei und vier selektiven Basen kombiniert (Abbildung 7). Beim Einsatz von insgesamt fünf selektiven Nukleotiden (*EcoRI* +2 Primer/*MseI* +3 Primer) wurden so viele Fragmente amplifiziert, dass sie im Polyacrylamidgel nicht eindeutig voneinander getrennt werden konnten. Eine Auswertung dieser komplexen Bandenmuster war nicht möglich. In Kombinationen von *EcoRI* +3 Primern mit *MseI* +3 Primern konnten pro Reaktion etwa 50 bis 100 deutlich voneinander abgrenzbare Banden gezählt werden, die in einem Größenbereich zwischen 1668 und 80 bp lagen. Weniger Fragmente lieferten AFLP-Reaktionen, in denen sieben selektive Nukleotide (*EcoRI* +4 Primer/*MseI* +3 Primer) kombiniert wurden. Die resultierenden Radiogramme zeigten etwa 20 bis 30 Banden pro Reaktion, so dass die Auflösungskapazität des Systems zur Darstellung von Polymorphismen nicht ausgeschöpft war.

Für Hopfen wurde eine optimale Primerselektivität von insgesamt sechs selektiven Nukleotiden (je drei Nukleotide pro Primer) ermittelt. Alle weiteren AFLP-Analysen erfolgten daher mit Kombinationen von *EcoRI* +3 Primern mit *MseI* +3 Primern.

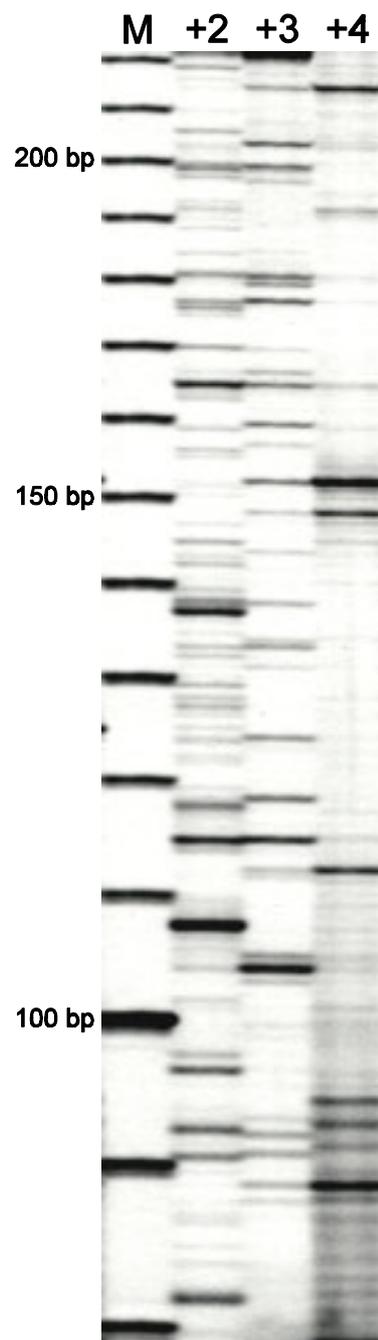


Abbildung 7: Bestimmung der optimalen Primerselektivität. (Ausschnitt)

Die AFLP-Reaktionen mit der Sorte 'Tettnanger' wurden mit dem *Mse*I-Primer M-CTC in Kombination mit *Eco*RI-Primern mit zwei (+2, E-AC), drei (+3, E-ACT) und vier (+4, E-ACTG) selektiven Nukleotiden erzeugt. M: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

4.3.3 Differenzierbarkeit von Hopfensorten mittels AFLP

Die AFLP-Fingerabdrücke der Sorten 'Tettnanger', 'Hallertauer mfr.', 'Hersbrucker', 'Spalter', 'Spalter Select', 'Perle' und 'Northern Brewer' wurden miteinander verglichen (Abbildung 8). Die Bandenmuster erstreckten sich über einen Fragmentbereich von 1668 bis 100 bp. Die Sorten ließen sich anhand zahlreicher polymorpher Fragmente unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen den beiden Aromasorten 'Tettnanger' und 'Spalter' war nicht möglich. Die beiden 'Spalter' Klone (A-Klon und B-Klon) zeigten ebenfalls identische Bandenmuster.

Von der Sorten 'Hallertauer mfr.' und 'Hersbrucker' wurden außerdem die molekularen Fingerabdrücke von Pflanzen aus verschiedenen Anbauregionen gegenübergestellt. Beim Vergleich des 'Hallertauer mfr.' aus Tettnang und aus der Spalter Region (Abbildung 8, Spuren 2 und 3 bzw. 12 und 13) sowie des 'Hersbrucker' aus der Hallertau und der Spalter Region (Abbildung 8, Spuren 4 und 5 bzw. 14 und 15) waren innerhalb dieser Paare keine Unterschiede in den Bandenmustern festzustellen. Auch mit Material der Sorte 'Hallertauer mfr.' aus der Hallertau konnten AFLP-Fingerabdrücke erzeugt werden, die mit denen der beiden anderen Herkünfte dieser Sorte identisch waren (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen

Da zwischen den AFLP-Fingerabdrücken von Pflanzen einer Sorte, die aus unterschiedlichen Regionen stammten, keine Unterschiede feststellbar waren, wurde für alle weiteren Untersuchungen jeweils nur Pflanzenmaterial aus einer der Anbauregionen eingesetzt. Entsprechend wurde auch nur einer der beiden Spalter Klone (A-Klon) für weitere Analysen verwendet.

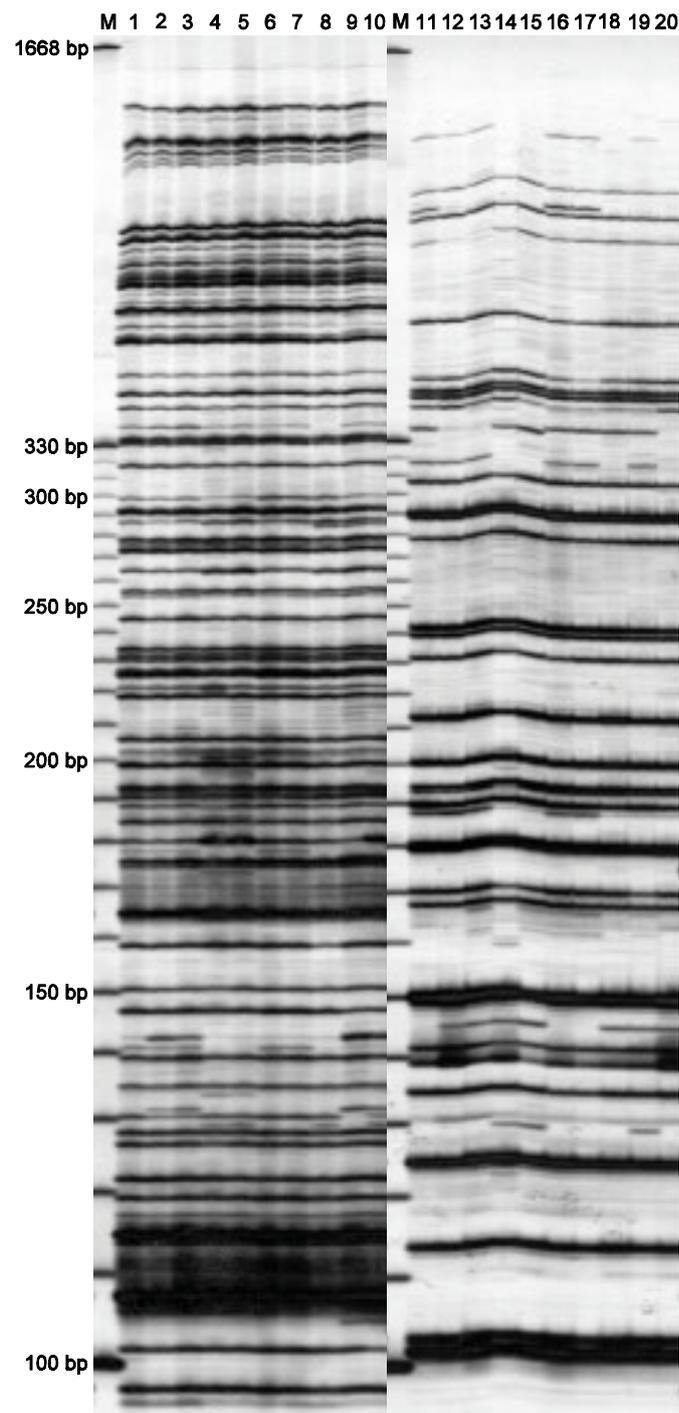


Abbildung 8: Differenzierbarkeit von Hopfsorten.

Die AFLP-Fingerabdrücke von verschiedenen Hopfsorten wurden mit den Primerkombinationen E-ACA/M-CTC (links) und E-ACC/ M-CAG (rechts) erstellt. Die Anbau-regionen der Sorten sind in Klammern angegeben. 1, 11: Tettnanger (Tettnang); 2, 12: Hallertauer mfr. (Hallertau); 3, 13: Hallertauer mfr. (Spalt); 4, 14: Hersbrucker (Hallertau); 5, 15: Hersbrucker (Spalt); 6, 16: Spalter A-Klon (Spalt); 7, 17: Spalter B-Klon (Spalt); 8, 18: Spalter Select (Spalt); 9, 19: Perle (Spalt); 10, 20: Northern Brewer (Hallertau). M: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

4.3.5 Auswirkung verschiedener DNA-Quellen auf die Ausprägung von AFLP-Bandenmustern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA aus verschiedenen Pflanzenorganen (Blätter/Dolden) sowie von Pflanzen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien (junge Pflanze/adulte Pflanze) eingesetzt. Es wurde damit überprüft, in wieweit DNA aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial die Ausprägung der AFLP Bandenmuster beeinflusste.

4.3.5.1 Einfluss unterschiedlicher entwicklungsphysiologischer Stadien

Aus Blättern einer Einzelpflanze wurde zu verschiedenen entwicklungsphysiologischen Stadien DNA extrahiert. Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt aus den AFLP-Fingerabdrücken mit vier verschiedenen DNA-Extraktionen dieser Einzelpflanze (aus frischen, jungen Blättern, Spur 1; aus jungen, getrockneten Blättern, Spur 2 und aus zwei Extraktionen von frischem Blattmaterial der adulten Pflanze kurz vor der Ernte, Spuren 3 und 4). Die AFLP-Fingerabdrücke der vier DNA-Extraktionen zeigten keine Unterschiede in ihren Bänderungsmustern, d.h. unterschiedliche Entwicklungsstadien beeinflussen die Ausprägung der AFLP-Bandenmuster nicht.

4.3.5.2 Einfluss unterschiedlicher Pflanzenorgane und deren Verarbeitungsform

Aus Blättern und Dolden von Einzelpflanzen sowie aus Doldengemischen und Pellets der Sorten 'Hallertauer mfr.', 'Hersbrucker', 'Tettnanger' und 'Spalter' wurde DNA extrahiert und damit AFLP-Fingerabdrücke erzeugt. Zwischen den Bandenmustern der DNAs aus Blättern und Dolden der Einzelpflanzen und den entsprechenden Doldengemischen waren keine Unterschiede nachweisbar (Abbildung 10, jeweils die Spuren "B", "DE" und "DM"). Polymorphe Banden, die zur Differenzierung der Sorten dienen, konnten in den Bandenmustern aller drei DNA-Extraktionen einer Sorte identifiziert werden.

Die Fingerabdrücke der aus Pellets isolierten DNAs (Abbildung 10, "P") wiesen Unterschiede zu den Fingerabdrücken der anderen drei Extraktionen auf. Ihre Bandenmuster zeigten zahlreiche zusätzliche Fragmente bzw. es fehlten Banden, die in den anderen Proben vorhanden waren, die sich über den gesamten Größenbereich verteilten. Sie wichen somit stark von den Fingerabdrücken der aus Blättern und Dolden extrahierten DNAs ab und waren nicht reproduzierbar.

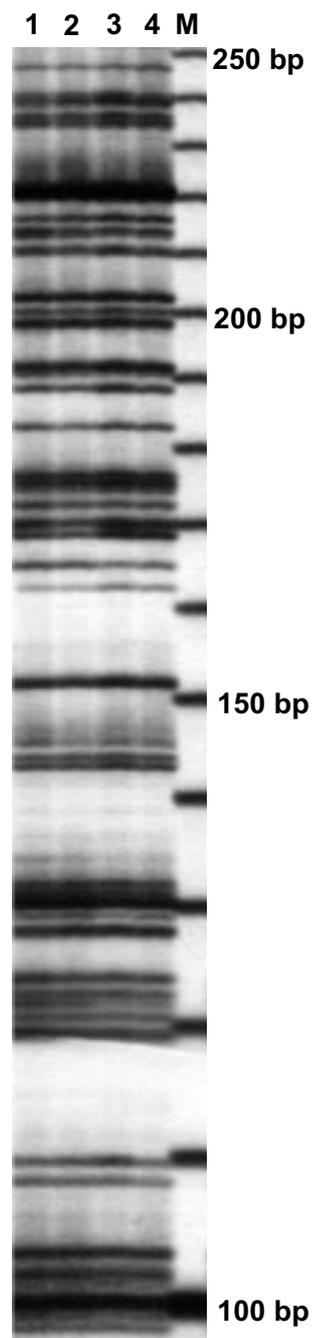


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Wachstumsstadien auf die Ausbildung von Bandenmustern. (Ausschnitt)

Vier verschiedene DNA-Extraktionen aus einer Einzelpflanze (1: junge Pflanze, frisches Blattmaterial; 2: junge Pflanze, gefriergetrocknetes Blattmaterial; 3, 4: adulte Pflanze, frische Blätter) wurden mit der Primerkombination E-ACA/M-CTA verglichen. M: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

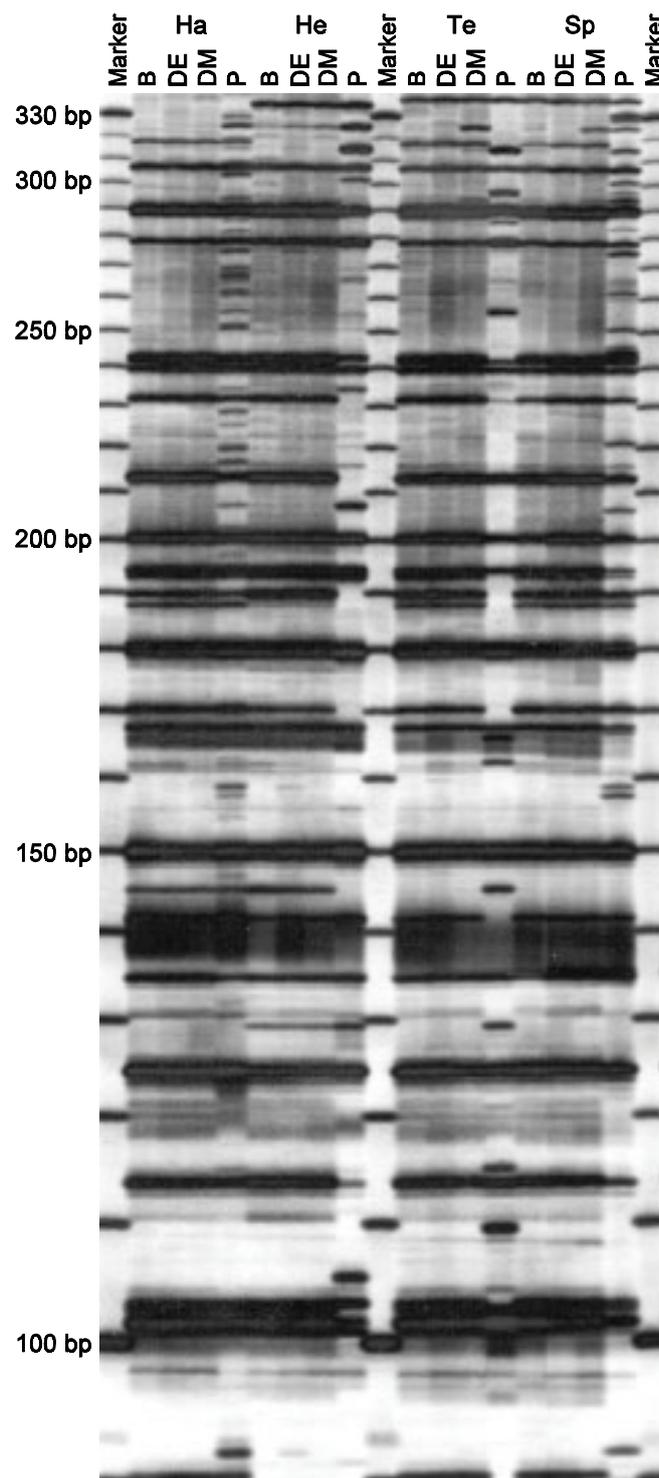


Abbildung 10: Einfluss verschiedener Pflanzenorgane bzw. Pellets auf die Ausbildung von AFLP-Bandenmustern.

Von den Sorten Hallertauer (Ha), Hersbrucker (He), Tettlinger (Te) und Spalter (Sp) wurden die AFLP-Fingerabdrücke aus Blättern (B), Dolden der Einzelpflanze (DE), Doldengemischen (DM) und Pellets (P) gegenübergestellt (Primerkombination E-ACC/M-CAG). M: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

4.3.5.3 Analyse der Gründe für die Abweichungen der AFLP-Fingerabdrücke aus Pellet-DNA

Die Unterschiede in den AFLP-Fingerabdrücken aus Pellet-DNA könnten durch eine Degradation der DNA aufgrund mechanischer Belastung während der Pellet-Herstellung bedingt sein. Um das zu überprüfen, wurde genomische Hopfen-DNA aus Doldengemischen mit Ultraschall unter kontrollierten Bedingungen geschert. Die Scherung erfolgte so lange, bis die Größenzusammensetzung der Fragmente in etwa der von Pellet-DNA entsprach (hochmolekulare DNA und kleinere Fragmente mit einer minimalen Größe von 200 bp).

Eine Scherdauer von einer Sekunde führte zu einer Zunahme von kleineren Fragmenten (bis etwa 500 bp, Abbildung 11, Spur 3), ohne dabei die hochmolekularen Fragmente vollständig zu zerstören. Die Verdaubarkeit der DNA ließ sich mittels Restriktionsverdau belegen (Abbildung 11, Spur 4). Die PCR-Produkte der Präamplifikationen der gescherten DNAs glichen denen von nicht gescherten DNAs (Daten nicht gezeigt). Ab einer Scherdauer von zwei Sekunden waren keine hochmolekularen Fragmente mehr vorhanden (Abbildung 11, Spuren 5, 7, 9). Die Restriktionsverdaue dieser DNAs ließen sich nicht von denen der ungeschnittenen DNA-Extraktionen unterscheiden (Abbildung 11, Spuren 6, 8, 10).

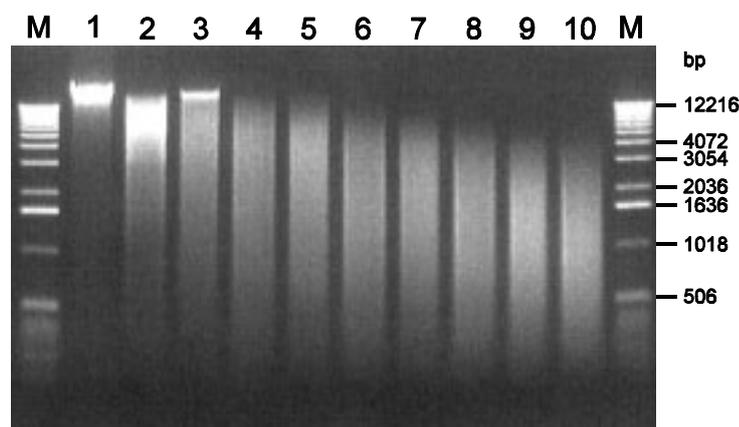


Abbildung 11: Kontrollierte Scherung von Dolden-DNA.

Genomische DNA der Sorte 'Tettnanger' wurde mittels Ultraschall geschert und anschließend mit *EcoR* I geschnitten. 1, 2: nicht gescherte DNA; 3, 4: 1 s Scherung; 5, 6: 2 s Scherung; 7, 8: 4 s Scherung; 9, 10: 8 s Scherung. 1, 3, 5, 7, 9: unverdaute DNA; 2, 4, 6, 8, 10: Restriktionsverdaue der gescherten DNAs. M: Längenstandard (1 kb-ladder).

Die AFLP-Fingerabdrücke der gescherten DNAs zeigten in ihren Bandenmustern nur geringe Unterschiede zu den entsprechenden Fingerabdrücken der nicht gescherten Doldengemische (einige Ausfälle von Fragmenten in einen Bereich größer 300 bp; Abbildung 12, gefüllte Pfeile).

In einem weiteren Ansatz wurde ein unvollständiger Verdau der Pellet-DNA als mögliche Ursache für die Anhäufung zusätzlicher Fragmente in den AFLP-Fingerabdrücken untersucht. Hierzu wurden die eingesetzte Menge der Restriktionsendonukleasen verdoppelt und die Inkubationszeit verdreifacht. Die Präamplifikationsprodukte der länger verdauten Pellet-DNAs zeigten keine Unterschiede zu den Präamplifikationen der DNA-Extraktionen aus Blättern und Dolden (Daten nicht gezeigt).

Die mit den modifizierten Bedingungen beim Restriktionsverdau erzeugten AFLP-Fingerabdrücke der Pellet-DNAs zeigten im Vergleich mit den Fingerabdrücken der jeweiligen Doldengemische nur geringe Unterschiede in ihren Bandenmustern (Abbildung 12, offene Pfeile). Mit beiden DNA-Quellen (Doldengemische und Pellets) wurden 44 bis 52 Fragmente produziert, wobei die Anzahl abweichender Fragmente zwischen den beiden unterschiedlichen DNA-Quellen zwischen einem und sechs Fragmenten pro Sorte lag. Trotzdem war eine Sortendifferenzierung mit Pellet-DNA nicht eindeutig möglich.

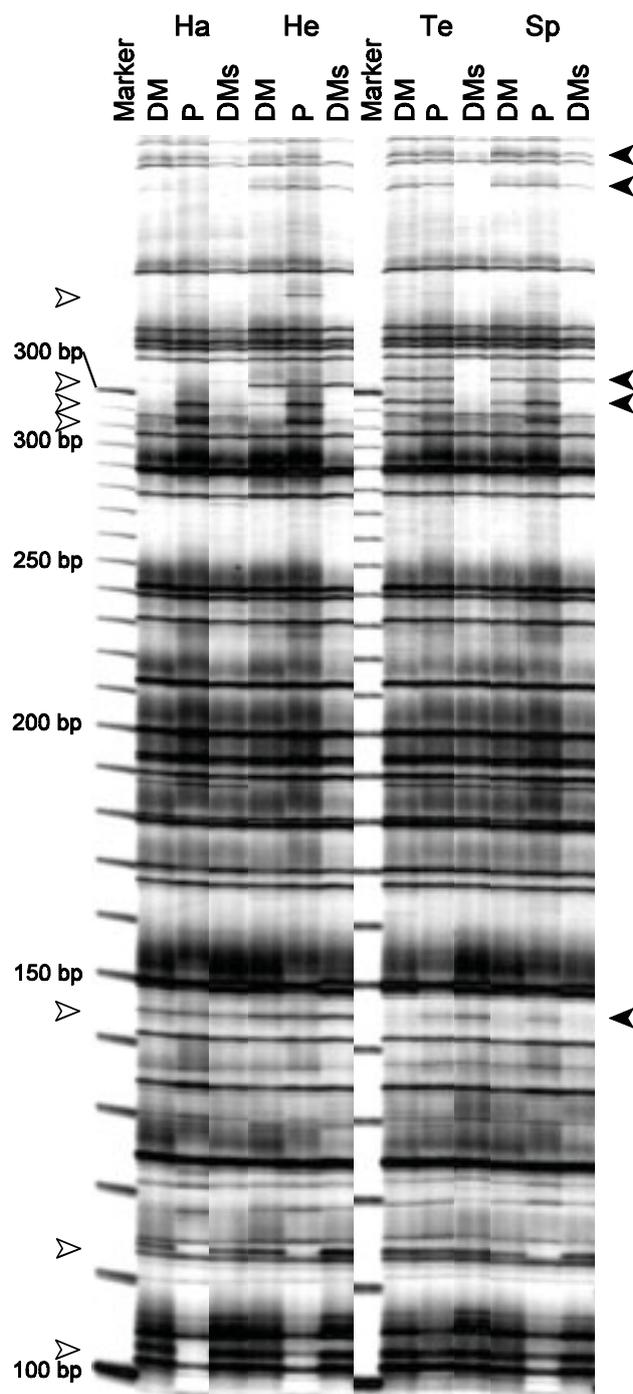


Abbildung 12: Analyse möglicher Faktoren, die zu Abweichungen in den Fingerabdrücken aus Pellet-DNA führten.

Nach der Modifizierung des Restriktionsverdau für Pellet-DNAs wiesen die Fingerabdrücke (P) geringe Unterschiede zu denen von DNA-Extraktionen aus Doldengemischen (DM) auf (offene Pfeile), die Scherung der DNA aus Doldengemischen (DMS) bewirkte geringe Veränderungen in den Bandenmustern (gefüllte Pfeile). Hallertauer mfr. (Ha); Tettlinger (Te); He: Hersbrucker; Sp: Spalter; Marker: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder). Primerkombination: E-ACC/M-CAG.

4.4 Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb des Tett- nanger Hopfen

4.4.1 Identifizierung des Klons 'K15-211'

In Punkt 4.3.2 wurde dargestellt, dass für die Erzeugung von AFLP-Fingerabdrücken beim Hopfen Primer mit je drei selektiven Nukleotiden geeignet waren. Zur Bestimmung mit welchen Kombinationen von Primern bzw. mit welchen selektiven Basen innerhalb des Tettninger Materials die meisten Polymorphismen erzeugt werden konnten, wurde eine Auswahl von acht Tettninger Klonen ('K1-147', 'K15-211', 'K30-155', '97-1080', '97-1131', '97-1140', '97-1144' und '97-1228') mit 64 Primerkombinationen getestet (alle Kombinationen, die mit den in Tabelle 1 angegebenen +3 Primern möglichen waren).

Bei diesem Screening wurde ein Klon ('K15-211') identifiziert, der durch zahlreiche Unterschiede in seinen Bandenmustern auffiel (Daten nicht gezeigt). Dieser Klon war mit 57 der 64 getesteten Primerkombinationen identifizierbar und seine Polymorphismen waren reproduzierbar. Zwischen den übrigen Pflanzen der Stichprobe konnten mit keiner der getesteten Primerkombinationen Polymorphismen nachgewiesen werden.

4.4.2 Identifizierung von polymorphen Klonen in einer Stichprobe von 279 Tett- nanger Hopfenpflanzen

Mit sechs Primerkombinationen, die im Screening die meisten Polymorphismen im Klon 15 aufzeigten (Primerkombinationen: E-ACT/M-CTC, E-ACA/M-CTC, E-ACA/M-CTA, E-ACC/M-CAG, E-ACG/M-CAT und E-ACG/M-CTT), wurde die gesamte Tettninger Stichprobe der 279 Hopfenpflanzen analysiert. Innerhalb dieser Stichprobe konnten insgesamt drei polymorphe Klone ('97-1232', 'K15-211' und '97-1242') identifiziert werden, die sich von den restlichen 276 Tettninger Hopfenpflanzen unterscheiden ließen.

Die polymorphen Klone '97-1232' und 'K15-211' ließen sich mit allen sechs verwendeten Primerkombinationen identifizieren. In Abbildung 13 sind beispielhaft die AFLP-Fingerabdrücke von 19 Tettninger Pflanzen dargestellt. Die Pfeile weisen auf die Unterschiede in den Bänderungsmustern der beiden polymorphen Klone hin. Für Klon '97-1232' konnten mit den sechs Primerkombinationen insgesamt 22 Polymorphismen

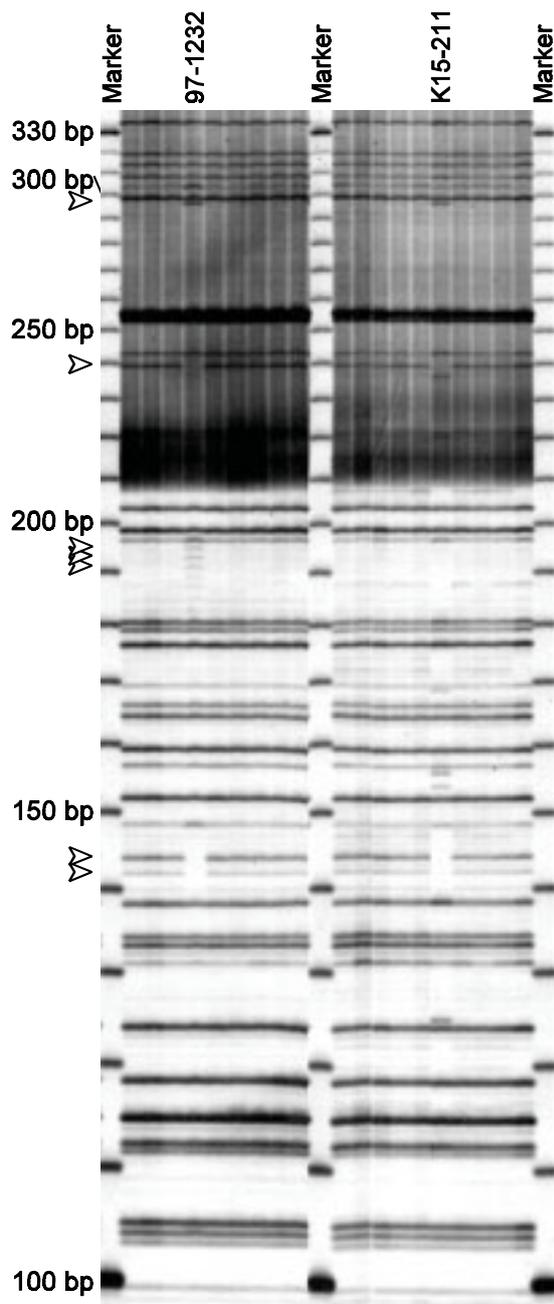


Abbildung 13:

AFLP-Analyse von 19 Pflanzen aus Tettngang.

Exemplarisch sind die Fingerabdrücke einer Auswahl von 19 Tettnganger Hopfenpflanzen gezeigt, die mit der Primerkombination E-ACT/M-CTC erzeugt wurden. Die Polymorphismen der Klone 97-1232 (offene Pfeile) und K15-211 (geschlossene Pfeile) sind gekennzeichnet. Marker: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

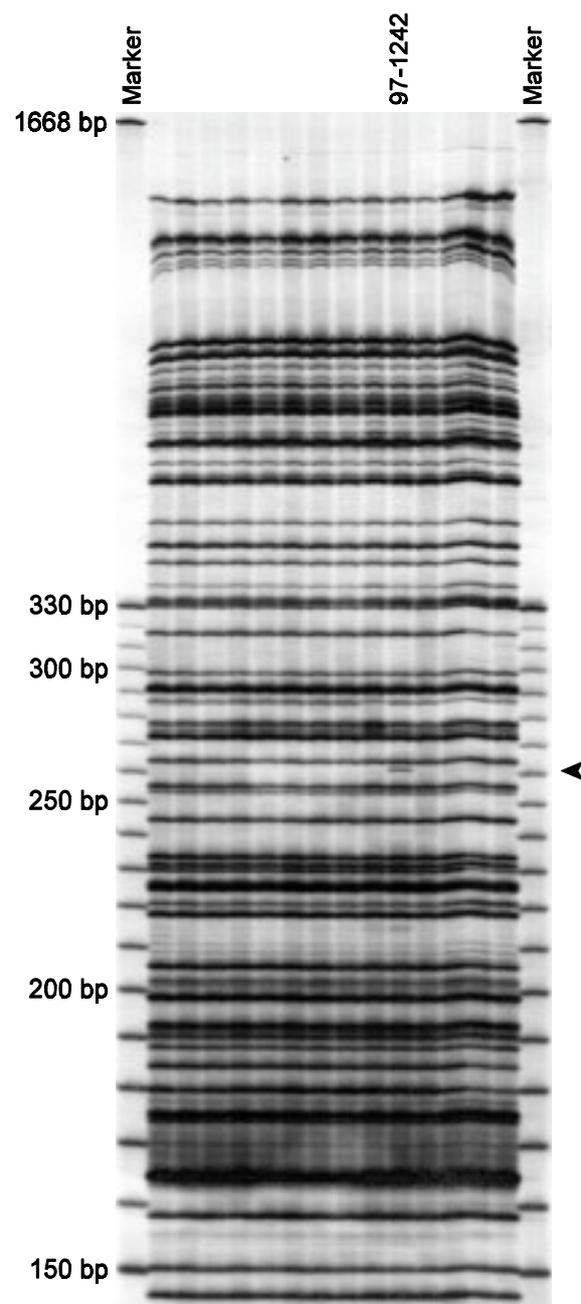


Abbildung 14:

Polymorphismus im Klon 97-1242.

Ausschnitt aus den AFLP-Fingerabdrücken von 14 Tettnganger Hopfenpflanzen, die mit der Primerkombination E-ACA/M-CTC erzeugt wurden. Klon 97-1242 zeigt nur mit dieser Primerkombination eine zusätzliche Bande (Pfeil). Marker: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

aufgezeigt werden, die Anzahl der polymorphen Fragmente für Klon 'K15-211' betrug 33.

Der Klon '97-1242' zeigte im Vergleich mit den übrigen 278 Pflanzen der Tettninger Stichprobe eine einzige zusätzliche Bande mit nur einer der getesteten Primerkombinationen (E-ACA/M-CTC, Abbildung 14).

Klon '97-1263', der bei der Probenahme durch die Ausbildung von einem Trieb mit drei Blättern pro Nodium auffiel (Punkt 4.1.1) und die Stecklinge aus dem drei-zähligen Trieb, zeigten keine Unterschiede zu den restlichen Tettninger Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Durch Einsatz von vier weiteren Primerkombinationen mit erhöhter Selektivität durch ein weiteres Nukleotid am 3'-Ende des *EcoRI*-Primers (E-ACTA/M-CTC, E-ACTC/M-CTC, E-ACTG/M-CTC und E-ACTT/M-CTC) wurden keine weiteren polymorphen Pflanzen innerhalb der Tettninger Stichprobe gefunden (Daten nicht gezeigt).

Die gesamten AFLP-Analysen zur Bestimmung der genetischen Variabilität in der Tettninger Stichprobe wurden wiederholt. Hierbei waren durchschnittlich 98,3 % aller Banden reproduzierbar.

4.4.3 Identifizierung weiterer polymorpher Pflanzen innerhalb des Klons 15

Zur Klärung, ob der gesamte Klon 15 oder nur die Einzelpflanze 'K15-211' zum übrigen Tettninger Hopfen polymorph war, wurden sechs weitere Pflanzen des Klons 15 ('K15-112', 'K15-121', 'K15-431', 'K15-661', 'K15-723' und 'K15-724') analysiert. Von den Pflanzen 'K15-211', 'K15-431', 'K15-661', 'K15-723' und 'K15-724' wurde Material aus Fehsern der Jahre 1998 und 1999 untersucht. Während die Pflanzen 'K15-723' und 'K15-724' 1998 durch phänotypische Besonderheiten (schlanker Wuchs, große teilweise verlaubte Zapfen, schwächerer Behang; WÖLLHAF, pers. Mitteilung) vom "normalen" Tettninger Habitus abwichen, wurden die Pflanzen 'K15-112', 'K15-121', 'K15-431' und 'K15-661' als "Normaltyp"-Pflanzen mit einbezogen.

Die Pflanzen des Klons 15 wurden anhand ihrer AFLP-Fingerabdrücke miteinander und mit den restlichen Klonen aus Straß verglichen (Abbildung 15). Die "Normaltyp"-Pflanzen ('K15-431', Spuren 5 und 6, 'K15-661', Spuren 7 und 8, sowie 'K15-112' und 'K15-121', Spuren 13 und 14) zeigten Bandenmuster, die den restlichen Tettninger Klonen

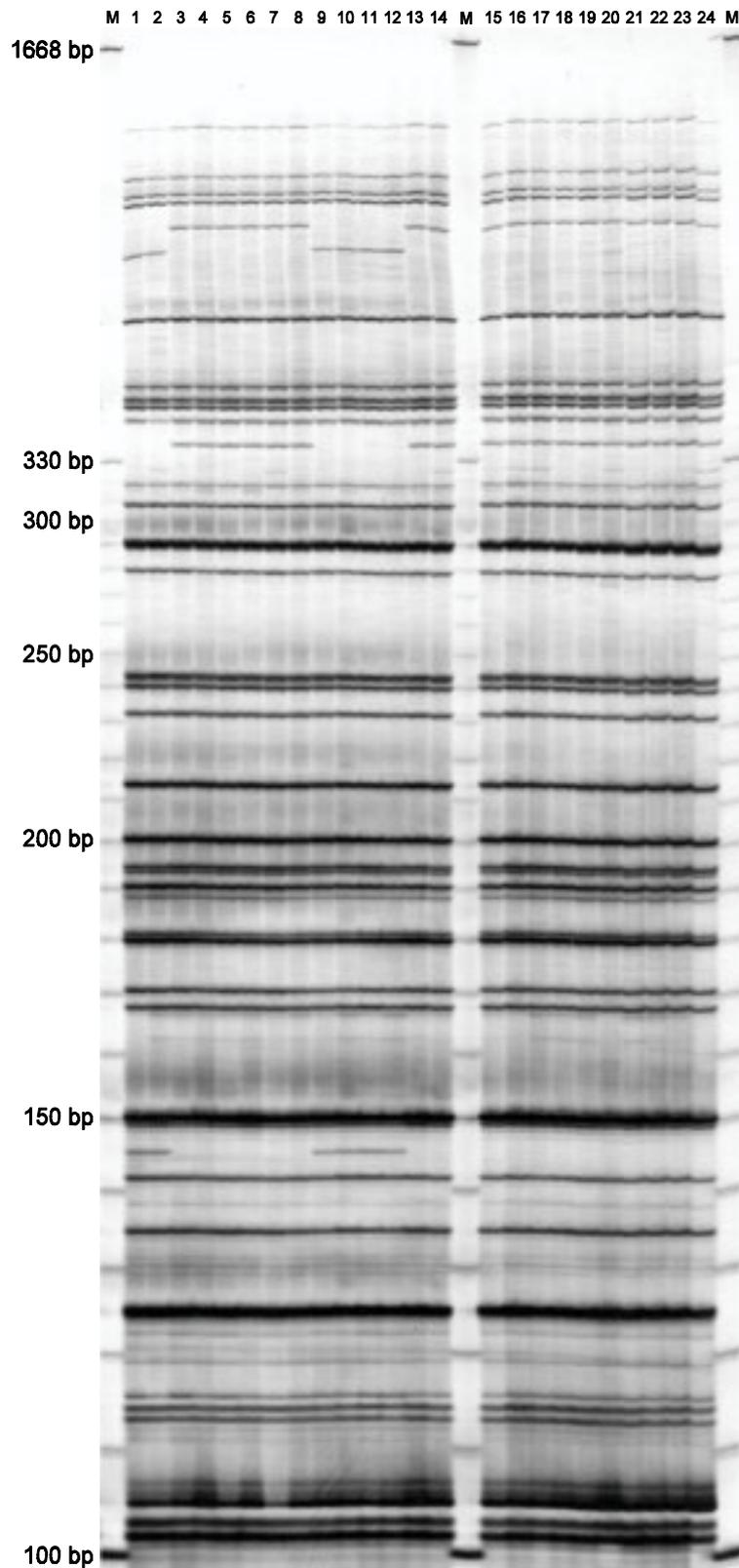


Abbildung 15:

Weitere Analyse des Klon 15.

Die AFLP-Fingerabdrücke verschiedener Pflanzen aus dem Klon 15 wurden untersucht und mit weiteren Strasser Klonen verglichen. (Primerkombination: E-ACC/M-CAG; das Jahr der Probenahme ist in Klammern angegeben.)

1, 2: K15-211 ('96); 3: K15-211 ('98);
 4: K15-211 ('99); 5: K15-431 ('98);
 6: K15-431 ('99); 7: K15-661 ('98);
 8: K15-661 ('99); 9: K15-723 ('98);
 10: K15-723 ('99); 11: K15-724 ('98);
 12: K15-724 ('99); 13: K15-112 ('99);
 14: K15-121 ('99); 15: K1-147 ('96);
 16: K3-127 ('96); 17: K7-135 ('96);
 18: K8-117 ('96); 19: K10-211 ('96);
 20: K11-165 ('96); 21: K22-126 ('96);
 22: K30-155 ('96); 23: K32-154 ('96);
 24: K38-457 ('96); M: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

(Spuren 15 bis 24) entsprachen. Die Fingerabdrücke der beiden "Abweichler" ('K15-723' und 'K15-724', Spuren 9 bis 12) wiesen die gleichen Polymorphismen auf, wie die in 1996 entnommenen Proben der Pflanze 'K15-211'. Allerdings zeigten die beiden DNA-Extraktionen der Pflanze 'K15-211' aus 1998 und 1999 (Spuren 3 und 4) nicht die Polymorphismen der Extraktionen des Materials von 1996 (Spuren 1 und 2), sondern Bandenmuster, die den "normalen" Tettninger Pflanzen entsprachen. Die Ergebnisse der erweiterten Analyse des Klon 15 sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Für die folgende Klassifizierung des Klon 15 wurde die Pflanze 'K15-723' verwendet, da sie im Gegensatz zu der Pflanze 'K15-211' reproduzierbare Polymorphismen aufwies.

Tabelle 5: Zusammenfassung der erweiterten Analyse des Klon 15.

Genotyp	Phänotyp	AFLP-Fingerabdruck
K15-211 (1996)	Normal-Typ	polymorph zu Tettninger
K15-112	Normal-Typ	wie Tettninger
K15-121	Normal-Typ	wie Tettninger
K15-431	Normal-Typ	wie Tettninger
K15-661	Normal-Typ	wie Tettninger
K15-723*	Abweichung (1998)	polymorph, wie K15-211 aus '96
K15-724	Abweichung (1998)	polymorph, wie K15-211 aus '96
K15-211 (Wdh. '98)	Normal-Typ	wie Tettninger
K15-211 (Wdh. '99)	Normal-Typ	wie Tettninger

* Klon 'K15-723' wurde zur weiteren Klassifizierung des Klon 15 verwendet.

4.5 Klassifizierung des Tettnanger Materials in Relation zu anderen Hopfensorten

4.5.1 Grad der Polymorphie

Zur Bestimmung der genetischen Beziehungen des 'Tettnanger' (und der beiden polymorphen Klone '97-1232' und 'K15-723') zu anderen Hopfensorten wurden die AFLP-Bandenmuster von 17 Hopfensorten (Tabelle 2; US-Tettnanger vertreten durch drei verschiedene Herkünfte) miteinander verglichen. Hierzu wurden die sechs bisher eingesetzten Primerpaare und zwei weitere Primerkombinationen (E-ACG/M-CTA; E-ACG/M-CTG) verwendet.

In Abbildung 16 sind beispielhaft die Fingerabdrücke einiger Sorten dargestellt, von denen die meisten anhand ihrer Fingerabdrücke voneinander unterschieden werden konnten. Die beiden Proben 'US-Tettnanger/Washington' und 'US-Tettnanger/Idaho' lieferten identische Bandenmuster. Ebenso waren keine Polymorphismen zwischen den Sorten 'Spalter', 'Tettnanger', 'Original Saazer' und 'Osvalds Klon 31' festzustellen. Auch in AFLP-Analysen mit erhöhter Selektivität (E-ACTA/M-CTC, E-ACTC/M-CTC, E-ACTG/M-CTC und E-ACTT/M-CTC), konnte keine weitere Differenzierung dieser Kultivare erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Mit den verwendeten acht Primerkombinationen wurden aus der DNA von 21 Hopfenkultivaren insgesamt 615 unterschiedlich große Fragmente amplifiziert, die sich über einen Größenbereich von 80 bis 1668 bp verteilten. Je nach Primerpaar wurden zwischen 55 und 112 Fragmente amplifiziert (durchschnittlich 77 Banden pro Primerkombination), von denen 15 bis 33 polymorph waren (durchschnittlich 24). Insgesamt wurden 188 polymorphe Fragmente (= 30,6 %) identifiziert. Im Durchschnitt waren 96,0 % aller Banden in den Wiederholungen der Experimente reproduzierbar.

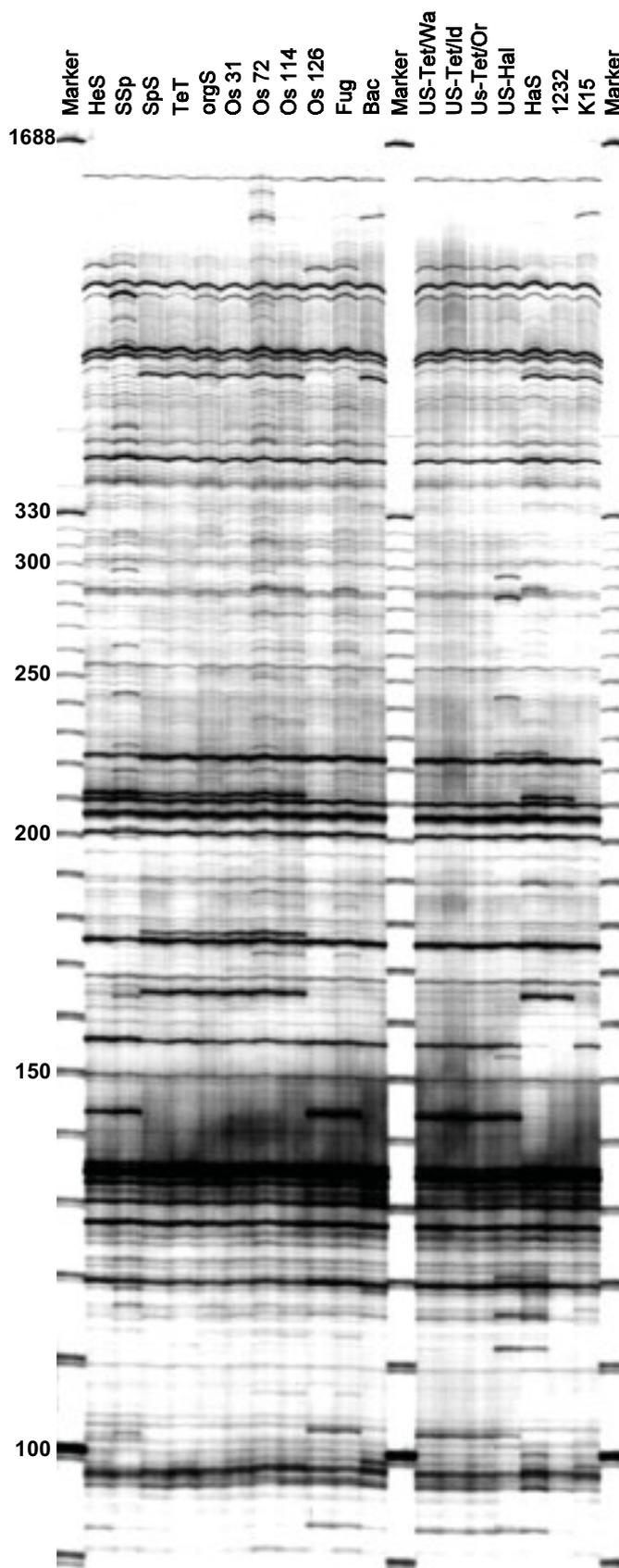


Abbildung 16:

AFLP-Analyse zur Klassifizierung des Tettninger Hopfen.

AFLP-Fingerabdrücke der beiden polymorphen Tettninger Klone sowie einiger Hopfensorten (Primerkombination: E-ACG/M-CAT). HeS: Hersbrucker; SSp: Strisselspalter; SpS: Spalter; TeT: Tettninger; orgS: Original Saa-zer; Os 31: Osvald 31; Os 72: Osvald 72; Os 114: Osvald 114; Os 126: Osvald 126; Fug: Fuggle; Bac: Backa; US-Tet/Id: US-Tett-ninger (Idaho); US-Tet/Or: US-Tett-ninger (Oregon); US-Tet/Wa: US-Tett-ninger (Washington); US-Hal: US-Hallertauer; HaS: Hallertauer mfr.; 1232: Klon 97-1232; K15: Klon K15-723; Marker: AFLP-Längenstandard (30-330 bp AFLP ladder).

4.5.2 Bestimmung der Genetischen Ähnlichkeit

Die Genetische Ähnlichkeit (GS) zwischen den Genotypen wurde durch paarweisen Vergleich nach JACCARD (1908) bestimmt, wobei nur die 188 polymorphen AFLP-Fragmente zur Berechnung der Genetischen Ähnlichkeit herangezogen wurden. Die Werte der Ähnlichkeitsvergleiche lagen zwischen 1,00 für die Sorten, welche die gleichen Fingerabdrücke zeigten ('Tettnanger', 'Spalter', 'Original Saazer' und 'Osvald Klon 31' sowie 'US-Tettnanger/Washington' und 'US-Tettnanger/Idaho') und 0,18 für die am weitesten entfernten Kultivare 'Strisselspalter' und dem polymorphen Tettnanger Klon '97-1232' bzw. 'Strisselspalter' und der Sorte 'Hallertauer mfr.' (Tabelle 6). Mit den Daten der GS-Matrix wurde mit Hilfe des UPGMA Cluster-Verfahrens ein Dendrogramm erstellt (Abbildung 17). Ein Cophenetischer Wert von $r = 0,959$ bedeutete eine "sehr gute Übereinstimmung" des Dendrogramms zu den ursprünglichen Werten der GS-Matrix.

Durch ihre Verteilung im Dendrogramm wurden die Sorten bzw. Kultivare bei einem GS-Wert von 0,30 in zwei Hauptgruppen unterteilt. Diese beiden Hauptgruppen ließen sich in insgesamt fünf Untergruppen weiter untergliedern, die nach der Anbauregion, in der die Sorten traditionellerweise angebaut werden, oder nach dem wichtigsten Vertreter in der Gruppe benannt wurden.

Die beiden polymorphen Klone aus Tettnang ('97-1232' und 'K15-723') waren in der "Hallertauer Gruppe" zu finden (Abbildung 17), wobei Klon '97-1232' eine sehr große Genetische Ähnlichkeit zu der Sorte 'Hallertauer mfr.' (GS = 0,98) zeigte. Der zweite Klon ('K15-723') lag mit einem GS-Wert von 0,93 sehr eng bei der jugoslawischen Sorte 'Backa'.

Die Daten des Dendrogramms verdeutlichten, dass die vier "Edlen Aromahopfen" ('Spalter', 'Tettnanger', 'Original Saazer' und 'Osvald 31') anhand ihrer Fingerabdrücke nicht voneinander differenziert werden konnten. Für alle ergab sich bei den paarweisen Vergleichen der GS-Analyse ein Wert von 1,00.

Innerhalb des Saazer Materials war eine Differenzierung möglich: die vier Osvald Klone ('Os 31', 'Os 72', 'Os 114' und 'Os 126') ließen sich anhand ihrer AFLP-Fingerabdrücke eindeutig voneinander unterscheiden. Hierbei zeigten die beiden Klone 'Osvald 72' und 'Osvald 114' die höchste Ähnlichkeit (GS = 0,92) und wurden zusammen mit 'Osvald

Tabelle 6: Genetische Ähnlichkeiten nach JACCARD (1908).

	HeS	Ssp	Sps	Tet	orgS	Os 31	Os 72	Os 114	Os 126	Fug	Bac	US-Tet/Wa	US-Tet/Id	US-Tet/Or	US-Hal	Has	97-1232	K15-723	SeS	PeS	NBH
HeS	1.00																				
Ssp	0.57	1.00																			
Sps	0.32	0.19	1.00																		
Tet	0.32	0.19	1.00	1.00																	
orgS	0.32	0.19	1.00	1.00	1.00																
Os 31	0.32	0.19	1.00	1.00	1.00	1.00															
Os 72	0.25	0.19	0.67	0.67	0.67	0.67	1.00														
Os 114	0.27	0.19	0.72	0.72	0.72	0.73	0.92	1.00													
Os 126	0.52	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.23	0.24	1.00												
Fug	0.43	0.31	0.25	0.25	0.25	0.25	0.43	0.45	0.66	1.00											
Bac	0.35	0.20	0.57	0.57	0.57	0.57	0.44	0.45	0.35	0.29	1.00										
US-Tet/Wa	0.55	0.31	0.33	0.33	0.33	0.33	0.25	0.26	0.96	0.66	0.38	1.00									
US-Tet/Id	0.55	0.31	0.33	0.33	0.33	0.33	0.25	0.26	0.96	0.66	0.38	1.00	1.00								
US-Tet/Or	0.54	0.31	0.33	0.33	0.33	0.33	0.25	0.27	0.94	0.76	0.37	0.98	0.98	1.00							
US-Hal	0.43	0.29	0.25	0.25	0.25	0.25	0.20	0.20	0.60	0.48	0.27	0.62	0.62	0.62	1.00						
HaS	0.33	0.18	0.59	0.59	0.59	0.59	0.42	0.45	0.32	0.26	0.61	0.35	0.35	0.34	0.32	1.00					
97-1232	0.32	0.18	0.61	0.61	0.61	0.61	0.43	0.46	0.32	0.26	0.63	0.35	0.35	0.35	0.28	0.91	1.00				
K15-723	0.36	0.22	0.53	0.53	0.53	0.53	0.41	0.43	0.32	0.29	0.93	0.35	0.35	0.35	0.26	0.56	0.60	1.00			
SeS	0.41	0.29	0.38	0.38	0.38	0.38	0.31	0.32	0.33	0.28	0.27	0.35	0.35	0.35	0.28	0.29	0.29	0.27	1.00		
PeS	0.34	0.26	0.35	0.35	0.35	0.35	0.31	0.32	0.27	0.27	0.29	0.29	0.29	0.28	0.33	0.35	0.35	0.31	0.39	1.00	
NBH	0.41	0.33	0.25	0.25	0.26	0.26	0.23	0.24	0.37	0.36	0.25	0.39	0.39	0.38	0.44	0.32	0.32	0.27	0.42	0.74	1.00

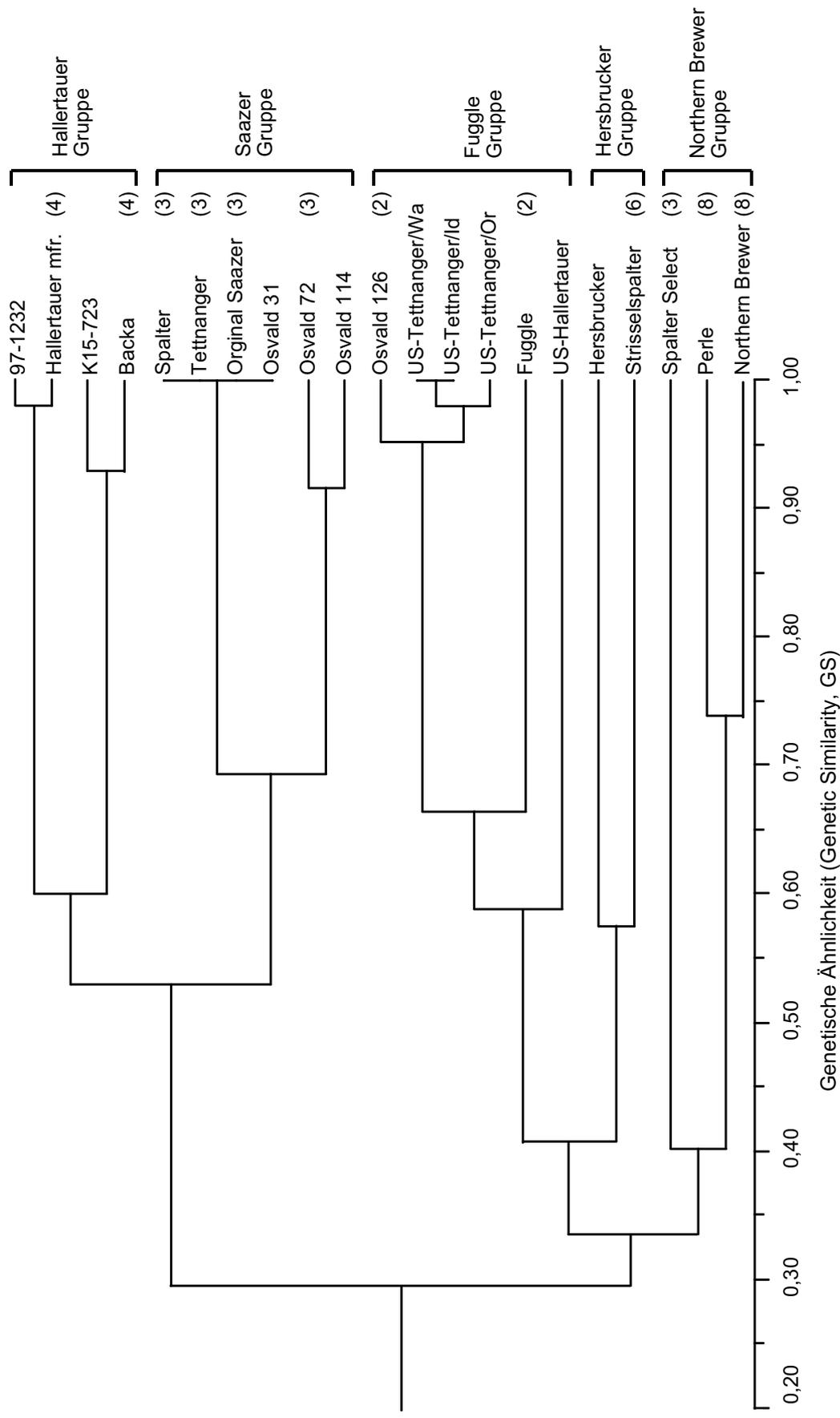


Abbildung 17: Klassifizierung des Tettnanger Hopfen.

Das Dendrogramm zeigt die genetischen Verwandtschaftsgrade der 21 Hopfenkultivare. In Klammern sind die Ölgruppen nach KRALJ *et al.* (1991) angegeben. Wa: Washington; Id: Idaho; Or: Oregon.

31' in die "Saazer Gruppe" eingeordnet. Der Klon 'Osvald 126' wies eine sehr geringe Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der "Saazer Gruppe" auf und gliederte sich in die "Fuggle Gruppe" ein. Hier zeigte er deutliche Ähnlichkeiten (GS = 0,94) zum 'US-Tettnanger'.

Die Analysen des US-Hopfen ergaben, dass innerhalb des 'US-Tettnanger' ein hohes Maß an Genetischer Ähnlichkeit festzustellen war. Hopfen aus zwei der drei Anbau-Regionen (Washington und Idaho) zeigten identische AFLP-Fingerabdrücke, während der 'US-Tettnanger' aus Oregon geringe Unterschiede zu den beiden anderen Herkünften aufwies. Der GS-Koeffizient für alle drei Herkünfte des 'US-Tettnanger' betrug 0,98 oder mehr. Es war keine Ähnlichkeit zu deutschem 'Tettnanger' erkennbar.

Ebenso wies der 'US-Hallertauer' keine Ähnlichkeiten zum 'Hallertauer mfr.' auf. Alle US-Hopfen wurden daher in die "Fuggle Gruppe" eingeordnet, die durch die Eingliederung in die zweite Hauptgruppe deutlich von der "Hallertauer Gruppe" bzw. der "Saazer Gruppe" getrennt war.

Die Sorten 'Hersbrucker' und 'Strisselspalter' wurden in der "Hersbrucker Gruppe" zusammengefasst.

In die letzte Gruppe ("Northern Brewer Gruppe") wurden die Sorten 'Spalter Select', 'Perle' und 'Northern Brewer' eingeordnet. Sie wiesen GS-Koeffizienten auf, die zwischen 0,74 und 0,39 lagen, wobei zwischen 'Perle' und 'Northern Brewer' die größere Genetische Ähnlichkeit bestand (GS = 0,74).

Zur Überprüfung der Gruppen im Dendrogramm wurde die Einteilung der Sorten nach KRALJ *et al.* (1991) herangezogen, der Hopfensorten gemäß der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe in verschiedene Ölgruppen einteilt. Die Sorten einer Gruppe im Dendrogramm (außer 'Spalter Select') gehörten jeweils der gleichen Ölgruppe an.

5 Diskussion

5.1 Wahl der Methode zur Extraktion qualitativ hochwertiger DNA

Für die Erzeugung von genetischen Fingerabdrücken mit Hilfe der AFLP-Technik ist die Qualität der eingesetzten DNA von großer Bedeutung. Nur mit reiner, hochmolekularer DNA lassen sich reproduzierbare Fingerabdrücke erzeugen (LIN UND KUO, 1995; Vos *et al.*, 1995).

In gescherter oder degenerierter DNA sind jedoch vermehrt DNA-Fragmente mit undefinierten Enden enthalten. Solche Fragmente werden nach dem Restriktionsverdau nicht mit Adaptoren ligiert und lassen sich deshalb mittels PCR nicht amplifizieren. Die Verwendung von gescherter bzw. degenerierter DNA führt somit zur Reduktion von v.a. größeren Fragmenten in den AFLP-Fingerabdrücken.

Auch nicht vollständig verdaute DNA führt zu Veränderungen in den Bandenmustern, was durch Verunreinigungen der DNA durch Salze, EDTA, Proteine oder Polysaccharide, welche die Aktivität der Restriktionsendonukleasen stören, verursacht werden kann (LIN UND KUO, 1995). Eine unvollständig verdaute DNA läßt sich im AFLP-Fingerabdruck durch das Vorhandensein von zahlreichen zusätzlichen, hauptsächlich größeren Fragmenten erkennen, die jedoch keine echten Polymorphismen in der DNA Sequenz darstellen (VOS *et al.*, 1995). Durch gleichzeitiges Fehlen kleinere Fragmente kommt es im Bandenmuster zu einer Verschiebung hin zu Fragmenten mit größerem Molekulargewicht.

Qualitativ hochwertige DNA wurde hier mit der CTAB-Methode nach Saghai-Marroof *et al.* (1984) aus Blättern und Dolden extrahiert. Diese Resultate wurden vor allem auch durch die Erhöhung der Salzkonzentration im Extraktionspuffer in Anlehnung an DOYLE UND DOYLE (1990) und FANG *et al.* (1992) erzielt. RNA-Kontaminationen konnten durch eine RNase-Behandlung vor der Isopropanol-Fällung eliminiert werden.

5.1.1 Anpassung der Extraktionsmethode auf große Probenzahlen

Zur Analyse von einer großen Anzahl von DNA-Proben mussten die DNA-Extraktionen effizient durchgeführt werden. Hierzu wurde das Volumen des Reaktionsansatzes so weit reduziert, dass in 2,0 ml-Reaktionsgefäßen gearbeitet werden konnte, in denen das eingesetzte Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Hilfe einer Kugelmühle gemahlen wurde. Dabei reichte die in den Stahlkugeln gespeicherte Kälte aus, um während des Mahlvorgangs ein Auftauen des Probenmaterials zu verhindern. Hierdurch wurde die zeitaufwendige Gefriertrocknung des frischen Probenmaterials umgangen.

5.1.2 Anpassung der Extraktionsmethode auf Doldenmaterial

Eine besondere Schwierigkeit ergab sich beim Aufarbeiten von getrockneten Hopfendolden, denn beim Mahlen in der Kugelmühle verklebte das Pflanzenmaterial zu kleinen Plättchen, so dass es sich im Extraktionspuffer nicht oder nur unvollständig homogenisieren ließ. Das Verkleben des Doldenmaterials lässt sich durch den hohen Anteil an Harzen (15 bis 25 %) und ätherischen Ölen (0,5 bis 2,5 %) in ihren Lupulin-körnern erklären (KOHLMANN UND KASTNER, 1975). Versuche, diese Doldeninhaltsstoffe vor der Extraktion durch Waschen mit Methanol zu entfernen (LAM *et al.*, 1986; NEVE, 1991), waren nicht erfolgreich. Jedoch wurde durch manuelles Mahlen der Hopfendolden in flüssigem Stickstoff ein feineres, weniger klebriges Pulver erhalten, das sich im Extraktionspuffer gut homogenisieren ließ. Mit dem so zerkleinerten Doldenmaterial konnte, nach Vergrößerung des Extraktionsvolumens und gleichzeitiger Reduktion des relativen Anteils der Probeneinwaage, aus allen Doldenproben DNA in ausreichender Quantität gewonnen werden.

Weiterhin stellen oft Polysaccharide, die häufig Bestandteile pflanzlichen Gewebes sind, ein Problem bei der DNA-Extraktion aus Pflanzen dar (MURRAY UND THOMPSON, 1980). Sie können durch ihre enzyminhibitorische Wirkung die Aktivität der RNase behindern (AOKI UND KOSHIHARA, 1972; FURUKAWA UND BHAVADNA, 1983; RICHARDS, 1988). Ebenso führen die v.a. in den Spindeln der Dolden enthaltenen Gerbstoffe (KOHLMANN UND KASTNER, 1975) wegen ihrer eiweißfällenden Wirkung zu einer Inhibierung der RNase-Aktivität. Durch die Ausdehnung der RNase-Behandlung bei der DNA-Extraktion aus Dolden konnte jedoch eine vollständige Entfernung der RNA aus dem Extraktionsansatz erreicht werden.

Eine DNA-Extraktion aus Pellets, in denen die Lupulinkörner mit den inhibitorisch wirkenden Inhaltsstoffen in erhöhter Konzentration vorlagen (es wurden ausschließlich Pellets vom Typ 45 verwendet, siehe 2.11), war nur mit dem DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) möglich. Dies lässt eine effektivere Abtrennung der störenden Inhaltsstoffe während der Extraktion vermuten. Trotzdem war auch die aus Pellets extrahierte DNA-Lösung leicht bräunlich gefärbt, was auf verbliebene Polysaccharid-Verunreinigungen hindeutete (FANG *et al.*, 1992).

5.1.3 Vergleich der DNA-Qualität der Extrakte aus verschiedenen Pflanzenmaterialien

Beim Vergleich der DNA-Qualität von Extraktionen aus den verschiedenen Pflanzenmaterialien waren deutliche Unterschiede festzustellen: die DNA-Qualität nahm von der Blatt-DNA über die Extraktionen aus Dolden bis zu der Pellet-DNA ab. In gleicher Weise ließen sich auch die erzielten DNA-Ausbeuten der Extraktionen ordnen. Diese Reihenfolge der Qualität bzw. Quantität der DNA-Extraktionen war mit dem Grad der mechanischen und thermischen Belastung des Pflanzenmaterials vor der Extraktion korreliert: je schonender das Material behandelt wurde, desto höhere DNA-Qualitäten und -Quantitäten ließen sich daraus extrahieren.

Während Blätter und Dolden von Einzelpflanzen entweder als frisches oder gefriergetrocknetes Material in die DNA-Extraktion eingesetzt wurden, werden Doldengemische bei der kommerziellen Herstellung bei ca. 60° C auf einen Wassergehalt von etwa 12 % getrocknet. Für die Pelletierung ist eine weitere Trocknung der Dolden auf einen Wassergehalt von 7 bis 8 % erforderlich (BARTH *et al.*, 1994). Sie werden anschließend unter Tiefkühlung vermahlen und gepresst. Derartige Belastungen können zur Degeneration durch Scherung der DNA führen.

5.2 Etablierung der AFLP-Technik für Hopfen

5.2.1 Wahl der Restriktionsenzyme und Bestimmung der Primerselektivität

Die Anzahl von Fragmenten, die mit der AFLP-Technik erzeugt werden können, ist entscheidend für die Aussagekraft einer Analyse. In der Praxis haben sich Bandenmuster mit 50 bis 100 Fragmenten als optimal erwiesen (VOS *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1996b), da mehr Fragmente mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese oft nicht sauber getrennt werden können. Die Anzahl der Fragmente in AFLP-Bandenmustern hängt von mehreren Faktoren ab: **i)** von der Anzahl der selektiven Nukleotide am 3'-Ende der Primer, **ii)** von der Größe und der Komplexität des Genoms, **iii)** von der Wahl der verwendeten Restriktionsendonukleasen und **iv)** vom GC-Gehalt der untersuchten DNA (ZABEAU UND VOS, 1993; VOS *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1996a).

Der wichtigste Faktor hierbei ist die Anzahl der selektiven Nukleotide der Primer in der AFLP-Reaktion. Um Bandenmuster mit optimaler Fragmentanzahl zu produzieren, muss die Anzahl der selektiven Nukleotide an die Genomgröße angepasst sein. So eignen sich Primerkombinationen mit insgesamt fünf selektiven Nukleotiden für kleine Genome (1×10^8 bp bis 5×10^8 bp; LIN *et al.*, 1996a). Für mittelgroße Genome im Bereich von 5×10^8 bp bis 6×10^9 bp werden Primer mit insgesamt sechs selektiven Nukleotiden verwendet (VOS *et al.*, 1995). Besonders große Genome, wie das der Inkalilie (*Alstroemeria* spp., ca. 25×10^9 bp), erfordern sieben bis acht selektive Basen (HAN *et al.*, 1999).

Weiterhin wirken sich die verwendeten Restriktionsenzyme auf die Anzahl der produzierten Banden aus. Ein häufig schneidendes Enzym generiert dabei Fragmente von einer Größe, die sich leicht amplifizieren lassen. Die Wahl eines seltener schneidenden Enzyms hingegen bestimmt die Anzahl der nachweisbaren Amplifikationsprodukte, denn es sind nur solche Fragmente detektierbar, die den markierten, zum Adapter des seltener schneidenden Enzyms homologen Primer besitzen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei Hopfen gut differenzierbare AFLP-Bandenmuster erzeugt werden konnten, wenn die Restriktionsenzyme *EcoR* I und *Mse* I in Verbindung mit insgesamt sechs selektiven Nukleotiden in der PCR-Amplifikation verwendet wurden. Weniger selektive Bedingungen, z.B. durch Wahl von Primern mit

fünf selektiven Nukleotiden, resultierten aufgrund sehr zahlreicher Fragmente in nicht klar differenzierbaren Bandenmustern. Nur sehr wenige Fragmente wurden erzeugt, wenn eine zu hohe Selektivität durch Verwendung von Primern mit insgesamt sieben selektiven Nukleotiden gewählt wurde.

Aufgrund der hier gemachten Beobachtungen (Selektivität der Primer-Nukleotide) wurde die Größe des Hopfengenoms auf 5×10^8 bp bis 6×10^9 bp geschätzt. Erst nach Abschluss der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen wurde über die Bestimmung des DNA-Gehaltes für das Hopfengenom ($2C = 4,57$ pg) mittels Durchfluss-Cytometrie berichtet (SESEK *et al.*, 2000; JAVORNIK, pers. Mitteilung). Hierdurch lässt sich eine Genomgröße von $4,4 \times 10^9$ bp berechnen (1 pg = 965 Mb; BENNETT UND LEITCH, 1995). Die ermittelte Genomgröße zeigt somit eine gute Übereinstimmung mit der hier geschätzten.

5.2.2 Differenzierbarkeit von Hopfensorten

Anhand zahlreicher polymorpher Fragmente wurde die Differenzierbarkeit zwischen verschiedenen Hopfensorten gezeigt. Somit konnte die Anwendbarkeit der radioaktiven AFLP-Technik für den Einsatz im Hopfen erfolgreich etabliert werden. Eine Differenzierung von Hopfensorten mittels fluoreszenzmarkierter AFLP-Fingerabdrücke wurde parallel zu den hier vorgestellten Arbeiten von HARTL UND SEEFELDER (1998) erarbeitet.

5.2.3 Einfluss verschiedener DNA-Quellen auf die Ausprägung von AFLP-Bandenmustern

DNA-Proben aus unterschiedlichen Geweben einer Pflanze können zu veränderten AFLP-Fingerabdrücken führen. Bei Weizen z.B. stellten DONINI *et al.* (1997) Unterschiede in den AFLP-Bandenmustern zwischen DNA aus Körnern und Blättern fest, was auf unterschiedliche Methylierungsmuster der DNA in den Organen zurückzuführen sein könnte. Da der Grad der DNA-Methylierung aber auch zwischen verschiedenen Stadien in der Entwicklung einer Pflanze variieren kann (BROWN, 1989), empfahlen DONINI *et al.* (1997), für AFLP-Analysen DNA aus physiologisch einheitlichem Pflanzenmaterial zu verwenden. Den Einfluss von Methylierungsunterschieden kann man jedoch auch durch die Verwendung von nicht-methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen umgehen.

Beim Hopfen hatte weder die Beschaffenheit des für die DNA-Extraktion eingesetzten Pflanzenmaterials (frisches Material oder gefriergetrocknetes Material) noch der physiologische Zeitpunkt der Probenahme (von der jungen Pflanze oder von der adulten Pflanze) ein Einfluss auf die Ausprägung der AFLP-Bandenmuster, ebenso wie DNA aus verschiedenen Organen der selben Pflanze (Blätter oder Dolden) oder aus Doldengemischen der selben Sorte. Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Mse* I (beide nicht-methylierungssensitiv) wurden daher erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den AFLP-Bandenmustern von verschiedenen DNA-Quellen aus der gleichen Einzelpflanze erhalten.

In zahlreichen Untersuchungen zur Differenzierbarkeit von Hopfensorten (ABBOTT UND FEDELE, 1994, RAPD; PILLAY UND KENNY, 1996, RAPD; HARTL UND SEEFELDER, 1998, AFLP; SUSTAR-VOZLIC UND JAVORNIK, 1999, RAPD) wurde bisher fast ausschließlich DNA aus Blattmaterial verwendet. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit gelang es, AFLP-Fingerabdrücke auch mit DNA aus Hopfendolden zu erzeugen, was ebenfalls von TOWNSEND *et al.* (2000) gezeigt werden konnte.

Aus der Verwendbarkeit von Dolden-DNA zur Sortendifferenzierung lassen sich weitere, v.a. kommerziell interessante Anwendungsmöglichkeiten ableiten, wie z.B. die Verifizierung der Sortenreinheit von Hopfenlieferungen. Erste Ergebnisse hierzu erzielten bereits TSUCHIYA *et al.* (1997), ARAKI *et al.* (1998) und JAKSE UND JAVORNIK (1999) mit RAPDs während SINGRÜN (1999) die Differenzierung von Hopfensorten mittels AFLP etablieren konnte. Allerdings können mit beiden Methoden Verunreinigungen durch andere Hopfensorten erst ab einem Mindestanteil von 5 % nachgewiesen werden.

Erstmals wurde auch die Verwendung von Hopfenpellets für die Erzeugung von molekularen Fingerabdrücken mittels AFLP-Technik untersucht. Die Fingerabdrücke von Pellets wiesen jedoch zunächst nicht reproduzierbare, abnormale Bandenmuster auf. Diese Abweichungen könnten auf Verunreinigungen oder Degradation der DNA während der Pelletierung oder aber auf einen unvollständigen Verdau der DNA zurückzuführen sein (enzyminhibitorische Wirkung von Polysaccharid-Kontaminationen; Punkt 5.1.2).

Zu Verunreinigungen in Hopfenpellets kann es bei deren Herstellung kommen, da meist Hopfenpellets mit einem standardisierten α -Säure-Gehalt erzeugt werden. Dies kann z.B. durch Beigabe von ausgesiebttem Lupulin oder durch Mischen von Sorten mit unterschiedlichem α -Gehalt erfolgen (NEVE, 1991).

Eine Degradation der DNA während der Pelletproduktion (hier durch eine kontrollierte Scherung der DNA simuliert) hätte den Ausfall von v.a. größeren Fragmenten zur Folge gehabt. Die mit gescherter DNA erzeugten AFLP-Bandenmuster zeigten aber nur geringe Abweichungen in ihrer Fragmentzusammensetzung verglichen mit denen der entsprechenden ungescherten Doldengemische. Vielmehr deuteten einige zusätzlich in den AFLP-Fingerabdrücken vorhandene, größere Fragmente, teilweise begleitet von einer Verschiebung der Bandenmuster hin zu größeren Fragmenten, auf einen unvollständigen Verdau der DNA hin (VOS *et al.*, 1995; LIN UND KUO, 1995). Eine Inhibierung des Restriktionsverdaus von DNA aus Pellets könnte durch die in den Pellets zahlreich enthalten sekundären Metabolite bedingt sein, was auch von TOWNSEND *et al.* (2000) bei Hopfendolden festgestellt wurde.

Nach Optimierung der DNA-Extraktion aus Pellets und deren Verdau zeigten die Bandenmustern der Pellets verglichen mit denen der Doldengemische nur noch geringe Abweichungen. Die Abweichungen der Pellet-Bandenmuster waren somit tatsächlich auf einen unvollständigen Verdau der Pellet-DNA zurückzuführen. Da aber bisher keine vollständig identischen Fingerabdrücke aus Pellets und den anderen DNA-Quellen (Blätter, Dolden von Einzelpflanzen, Doldengemische) erzeugt werden konnten, könnten mehrere, die Reaktion störende Faktoren vorliegen. Deshalb können Pellets derzeit für die Sortendifferenzierungen noch nicht eingesetzt werden. Eine weitere Optimierung der Technik für den kommerziell wichtigen Einsatz von Hopfenpellets ist daher erforderlich.

Die bisherigen Ergebnisse zur Etablierung der AFLP-Technik für den Hopfen können wie folgt zusammengefasst werden: **i)** die radioaktive AFLP-Methode konnte erfolgreich für Hopfen etabliert werden. AFLP-Marker stellen somit ein sicheres Werkzeug zur Analyse von genetischen Polymorphismen im Hopfen dar. **ii)** Eine Sortendifferenzierung ist unabhängig vom eingesetzten Pflanzenmaterial und der Anbauregion der Sorten möglich, d.h. es kann sowohl DNA aus Blättern wie auch aus Hopfendolden eingesetzt werden. Pellets lassen sich zur Sortendifferenzierung durch AFLP-Fingerabdrücke derzeit noch nicht einsetzen. **iii)** Die Qualität der Fingerabdrücke hängt von der Qualität der verwendeten DNA ab. Je schonender das Pflanzenmaterial vor der DNA-Extraktion behandelt wurde, desto qualitativ hochwertigere DNA konnte extrahiert werden, mit der sich gut differenzierbare Fingerabdrücke erzeugen ließen. Entgegen früherer Aussagen (VOS *et al.*, 1995; LIN UND KUO, 1995) konnten auch mit Hopfen-DNA von geringerer Qualität (wie die aus Doldengemischen) AFLP-Fingerabdrücke erzeugt werden.

5.3 Grad der genetischen Variabilität im Tettninger Hopfen

Zwischen den 279 untersuchten Tettninger Hopfenpflanzen wurde eine sehr geringe genetische Variabilität gefunden. Nur drei Pflanzen ('97-1232', 'K15-211' und '97-1242') zeigten polymorphe Fingerabdrücke, wobei letztere mit nur einer Primerkombination ein einziges zusätzliches AFLP-Fragment zeigte. Es könnte sich somit bei diesem Polymorphismus um eine Punktmutation handeln, wie analoge Resultate beim Wein (SCOTT *et al.*, 2000) nahelegen.

Bei Klon '97-1263' (drei-zählige Symmetrie in einem der beprobten Triebe) handelte es sich offensichtlich nicht um eine Mutation, die mit der AFLP-Technik aufzudecken war. Vielmehr könnte die Ausbildung des Triebs, der drei Blättern pro Nodium aufwies, auf umweltbedingte Einflüsse zurückzuführen sein (evtl. auf eine Störung bei der Entwicklung des Meristems). Solche "spontanen Knospensvariationen" wurden schon von FRUWIRTH (1928) als ein in Hopfengärten häufig auftretendes Phänomen beschrieben.

Basierend auf den AFLP-Analysen der Stichprobe des Tettninger Hopfens lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten: **i)** aufgrund der sehr geringen genetischen Variabilität innerhalb der analysierten Stichprobe der Tettninger Hopfenpflanzen wird auch für die Landsorte 'Tettninger' eine nur sehr geringe genetische Variabilität angenommen. **ii)** Die ermittelte geringe genetischen Variabilität ist jedoch nicht auf eine ungenügende Sensibilität der AFLP-Methode zurückzuführen, da die AFLP-Technik bereits für vergleichbare Organismen etabliert wurde und sich dabei auch zur Differenzierung von sehr geringen genetischen Unterschieden eignete (MAUGHAN *et al.*, 1996; ELLIS *et al.*, 1997; CERVERA *et al.*, 1998). **iii)** Es wird daher vermutet, dass der 'Tettninger' höchstwahrscheinlich aus einem einzigen Klon besteht.

Die geringe genetische Variabilität im Tettninger Hopfen legt die Vermutung nahe, dass er sich aus nur wenigen Pflanzen einer Ausgangspopulation entwickelt haben könnte. Aufgrund der klonalen Vermehrung von Hopfen (NEVE, 1991), der relativ kurzen Zeitspanne, in der im Tettninger Raum Hopfen kommerziell angebaut wird (seit etwa 150 Jahren) und des hohen Alters der Tettninger Hopfengärten (die zum Teil 50 bis 100 Jahre alt sind und von denen einige noch immer mit dem ursprünglichen

Pflanzenmaterial kultiviert werden, WÖLLHAF, pers. Mitteilung), hat sich kaum eine genetische Variabilität entwickeln können. Genetische Variabilität könnte nur durch Vermischung mit anderen Sorten oder durch somatische Mutationen in Stecklingen entstanden sein (FRUWIRTH, 1924).

Die Analyse des Klon 15 deckte eine genetische Heterogenität innerhalb dieses Klons auf. Die beiden "Abweichler" ('K15-723' und 'K15-724'), die 1998 durch phänotypische Besonderheiten auffällig waren, konnten auch anhand ihrer AFLP-Fingerabdrücke als polymorph identifiziert werden. Allerdings waren beide Pflanzen im folgenden Jahr phänotypisch wieder unauffällig (WÖLLHAF, pers. Mitteilung). Phänotypische Unterschiede zwischen Hopfenpflanzen einer Sorte können durchaus vorkommen, und sind durch Genotyp-Umwelt-Interaktionen erklärbar. So können z.B. der Zeitpunkt des Schneiden und des Anleiten, die Auswahl und Anzahl der angeleiteten Reben, individueller Krankheitsbefall oder Vireninfectionen phänotypischen Unterschiede verursachen (KOHLMANN UND KASTNER, 1975; VENT, 1999).

5.4 Vergleich des 'Tettnanger' mit anderen Hopfensorten und Klassifizierung der untersuchten Sorten

Mit Hilfe der AFLP-Technik wurden 21 verschiedene Hopfenkultivare untersucht und eine genetische Variabilität von 30,6 % ermittelt. Hierfür wurden vorwiegend zentral-europäische Sorten, insbesondere europäische Aromasorten verwendet. Eine etwas höhere genetische Variabilität (37,5 %) wurde von SEEFELDER *et al.* (2000a) mittels AFLP in einer Weltkollektion aus 90 Hopfensorten bestimmt und SUSTAR-VOZLIC UND JAVORNIK (1999) fanden 38,6 % genetische Variabilität bei RAPD-Analysen von 65 Hopfenkultivaren. Diese Autoren untersuchten jeweils eine deutlich größere Anzahl von Hopfenpflanzen, die auch Genotypen aus dem amerikanischen, australischen und asiatischen Genpool beinhalteten, was den höheren Grad der genetischen Variabilität erklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen ein deutlich engeres Sortenspektrum untersucht, so dass eine größere Ähnlichkeit der Sorten zu erwarten war. Es konnten jedoch mit 188 Polymorphismen zwischen 21 Kultivaren mehr Polymorphismen zur Unterscheidung von weniger Sorten erzeugt werden, was die Zuverlässigkeit der Ergebnisse deutlich erhöhte.

Im folgenden wird die Differenzierbarkeit der Proben und ihre Einteilung in verschiedene Gruppen (basierend auf der Darstellung im Dendrogramm in Abbildung 17) diskutiert.

Saazer Gruppe

Zwischen den Sorten 'Tettnanger', 'Spalter', 'Original Saazer' und 'Osvald 31' wurde eine sehr enge Verwandtschaft gefunden, da sie sich mit keiner der verwendeten Primerkombinationen differenzieren ließen. Zu konformen Resultaten kam auch SEEFELDER (1999), der mit Hilfe von AFLP-Markern wie auch mit STS-Markern (BRADY *et al.*, 1996) ebenfalls keine Unterschiede zwischen diesen Sorten nachweisen konnte. Die enge Verwandtschaft dieser Sorten, die allgemein als "Saazer Formenkreis" zusammen gefasst werden (NEVE, 1991), zeigte sich auch in der Ähnlichkeit der Zusammensetzung ihrer Hopfenöle, anhand derer sie ebenfalls nur schwer unterscheidbar sind (MAIER, 1978; FREUNDORFER, 1988; PEACOCK UND MCCARTY, 1992; FORSTER UND SCHMIDT, 1993; GREEN, 1997). Bemerkenswert ist der in allen Sorten des

Saazer Formenkreises auffallend hohe Anteil an Farnesen (PEACOCK UND MCCARTY, 1992). Farnesen wurde daher als wesentlicher Indikator für Hopfen des Saazer Formenkreis herangezogen (FORSTER UND SCHMIDT, 1993; KAMMHUBER, 2000).

Andererseits beobachteten ARAKI *et al.* (1998) und MURAKAMI (2000) mit RAPD-Markern eine Differenzierung innerhalb des Saazer Formenkreises. In beiden Arbeiten wurden jedoch nur sehr wenige Marker (teils auch schwache Banden, MURAKAMI, 2000) zur Differenzierung der Kultivare verwendet. Zudem handelt es sich bei der RAPD-Technik um ein Markersystem, bei dem es zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Daten kommen kann (SKROCH UND NIENHUIS, 1995). Diese Tatsache wird auch von ARAKI *et al.* (1998) diskutiert. Wegen dieser systembedingten Schwächen der RAPD-Technik sollten die mittels AFLP produzierten Resultate, die zudem mehrfach unabhängig voneinander bestätigt wurden, als zuverlässiger angesehen werden.

Die hohe genetische Uniformität innerhalb des Saazer Formenkreises und die Tatsache, dass alle Sorten die gruppentypischen Aromaeigenschaften aufweisen, bestätigen die Annahme, dass die Sorten 'Saazer', 'Spalter' und 'Tettnanger' einen gemeinsamen Ursprung haben (FRUWIRTH, 1928). Es wäre sogar denkbar, dass sie durch Selektion aus der selben Ausgangspopulation abstammen (HARTL UND SEEFELDER, 1998). Auch PINCKERT (1861), FRUWIRTH (1888) und GROSS (1899) vermuteten schon, dass es sich bei den meisten damaligen Hopfensorten im Grunde genommen nur um "Standortmodifikationen" handelte, von denen einige Sorten (wie z.B. der 'Spalter') auf Saazer Fehser zurückzuführen seien.

Eine so große Ähnlichkeit der Genotypen, wie sie in dieser Gruppe zu finden war, lässt sich nach Meinung von SEEFELDER *et al.* (2000a) aufgrund der hohen Heterozygotie in Hopfenpflanzen nur durch Klonauslese oder starke Rückkreuzungen erklären. Trotzdem weisen die drei Sorten des Saazer Formenkreises geringe Unterschiede in morphologischen Merkmalen, in den Aromaeigenschaften und im Resistenzverhalten gegenüber Schädlingen auf, die dann allerdings auf einen sehr kleinen Anteil des Genoms zurückzuführen zu sein müssten (HARTL UND SEEFELDER, 1998), der möglicherweise nicht durch die AFLP-Analysen erfasst wurde.

Während eine Differenzierung zwischen den Sorten des Saazer Formenkreis nicht möglich war, ließ sich aber innerhalb des Saazer Materials, hier repräsentiert durch die vier Osvald Klone ('Os 31', 'Os 72', 'Os 114' und 'Os 126'), genetische Variabilität nachweisen, wie auch von PATZAK (2001) gezeigt wurde. Mit Hilfe der AFLP-Fingerabdrücke konnten alle vier Osvald Klone eindeutig differenziert werden.

Angaben von OSVALD (1944) zufolge, läßt sich der gesamte tschechische Hopfen auf eine "ursprüngliche Saazer Sorte" zurückführen, die aus einem Gemisch von Pflanzen genetisch unterschiedlicher Herkunft entstand, deren lokale Modifikationen allerdings als Sorten ("Regionalsorten") bezeichnet wurden (RYBACEK, 1991). Aus ihnen sind alle tschechischen Hopfensorten meist durch wiederholte Klonauslese entstanden, so dass die ursprüngliche genetische Variabilität größtenteils erhalten blieb.

In den 1920er Jahren selektierte Osvald aus der "Saazer Regionalsorte" drei Klone ('Os 31', 'Os 72' und 'Os 114'), die 1952 als unabhängige Sorten anerkannt wurden (LINHART, 1999). Angaben von RYBACEK (1991) zufolge, sollten die Klone 'Os 72' und 'Os 114' von der gleichen Mutterpflanze abstammen, was ihre große Genetische Ähnlichkeit erklären würde ($GS = 0,92$). Dennoch waren sie genetisch nicht vollständig identisch und ließen sich anhand ihrer genetischen Fingerabdrücke differenzieren. Dies stellt an sich einen Widerspruch dar. Es müsste somit zu genetischen Veränderungen während der Selektion der beiden Klone gekommen sein (z.B. somatische Variation in der Mutterpflanze), oder die beiden Pflanzen könnten vielleicht doch von verschiedenen Mutterpflanzen abstammen. Leider gibt es über die genaue Abstammung der Osvald Klone nur sehr wenig Information, so dass ihre genetische Verwandtschaft nicht genau nachvollzogen werden kann.

Osvald (1899-1948) beobachtete weiterhin Unterschiede in der Entwicklung von Klonen, die aus dem gleichen Stock stammten, und vermutete, dass diese auf den Einfluss von Viren zurückzuführen sein könnte (LINHART, 1999). Infektionen von Hopfen durch Viren wurden später durch ELISA-Tests (THRESH *et al.*, 1977; POLAK UND SVOBODA, 1989; SVOBODA, 1993) oder durch PCR-Tests (PETRZIK UND SVOBODA, 1997) bestätigt. Dass es zu Veränderungen im AFLP-Bandenmuster durch Kontaminationen mit z.B. Bakterien kommen kann, wurde von DYER UND LEONARD (2000) beschrieben. Sie lassen sich allerdings nur in eng verwandten Individuen mit ansonsten sehr ähnlichen Fingerabdrücken nachweisen. Die Möglichkeit, dass die Differenzierbarkeit

zwischen den Osvald Klonen ('Os 72' und 'Os 114') evtl. auf den Befall mit unterschiedlichen Viren zurückzuführen sein könnte, sollte daher nicht völlig ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass insgesamt eine hohe Uniformität im tschechischen Hopfen festzustellen ist, so dass alle Saazer Kultivare unter der Sortenbezeichnung 'Saazer' zusammengefasst wurden (NEVE, 1991). Die ursprüngliche Ausgangspopulation muss allerdings genügend genetische Variabilität besessen haben, so dass eindeutig differenzierbare Klone daraus selektiert werden konnten.

Ein einheitliches Bild der Sortendifferenzierung innerhalb des Saazer Formenkreises konnte bisher noch nicht erreicht werden. Obwohl die Sorten phänotypisch unterschieden werden können, scheint sowohl eine Differenzierung anhand der Inhaltstoffe wie auch auf genetischer Basis derzeit noch nicht zuverlässig möglich zu sein.

Hallertauer Gruppe

Die beiden polymorphen Tettninger Klone wurden aufgrund ihrer Fingerabdrücke der Hallertauer Gruppe zugeordnet. Der Klon '97-1232' zeigte hier eine sehr hohe Genetische Ähnlichkeit zur Sorte 'Hallertauer mfr.' (GS = 0,98). Da beide Sorten ('Tettninger' und 'Hallertauer mfr.') in der Tettninger Region angebaut werden, scheint es sich in diesem Fall um eine unbeabsichtigte Vermischung des Pflanzenmaterials zu handeln. Der Klon '97-1232' stellt somit keinen "echten" Polymorphismus dar, sondern ist wahrscheinlich eine "Verunreinigung" des Tettninger Pflanzenmaterials.

Für den zweiten polymorphen Klon ('K15-273') konnte eine große Ähnlichkeit zum jugoslawischen 'Backa' Hopfen aufgezeigt werden. Auch hier liegt aufgrund des hohen GS-Werts (GS = 0,93) die Vermutung nahe, dass es zu einer Vermischung von Pflanzenmaterial gekommen sein könnte. Jedoch sind keine Kontakte (wie z.B. ein Materialaustausch) zwischen den Anbauregionen Tettning und Neusatz dokumentiert. Ferner ist die genaue Herkunft des 'Backa' Hopfen nicht bekannt. Es wird angenommen, dass er auf Saazer Fechser zurückzuführen sein könnte (THOMPSON, 1972; BARTH *et al.*, 1994) oder durch Klonauslese aus einer jugoslawischen Landsorte entstanden sei (GALOVIC, pers. Mitteilung). Andere Quellen berichten, dass er von bayerischem Hopfen abstammen soll (SUSTAR-VOZLIC UND JAVORNIK, 1999; KOKAI-KOTA, pers.

Mitteilung). Untersuchungen zur Zusammensetzung der Hopfenöle ergaben, dass 'Backa'-Hopfen eher Ähnlichkeiten zum 'Hallertauer mfr.' als zum 'Saazer' Hopfen aufwies (PEACOCK UND MCCARTY, 1992).

Interessanterweise zeigten beide "polymorphen" Klone den "typischen" Tettnanger Habitus und wiesen keine wiederkehrenden phänotypischen Abweichungen auf (WÖLLHAF, pers. Mitteilung).

Fuggle Gruppe

Namensgeber dieser Gruppe ist die alte englische Hopfensorte 'Fuggle' von der der vierte Osvold Klon ('Os 126') abstammen soll (VENT, 1999), der wegen seiner grünen Rebenfarbe deutlich von den rotrebenen Saazer Hopfen zu unterscheiden ist.

In diese Gruppe waren ebenfalls die drei Proben des 'US-Tettnanger' zu finden, von denen jedoch nur zwei der drei Proben (aus Washington und Idaho) identische Bandenmuster zeigten, während die Probe aus Oregon geringe Abweichungen aufwies. Da von allen US-amerikanischen Proben nur befruchtete Doldengemische verfügbar waren, deren Samen vor der DNA-Extraktion manuell entfernt werden mussten, könnten Unterschiede in den Bandenmustern auf in den Dolden verbliebene Samen zurückzuführen sein.

Der 'US-Tettnanger' stammte ursprünglich von Wurzelfechtern des deutschen Tettnanger ab (ROMANKO, 1986), soll sich aber mit der Sorte 'Fuggle' genetisch vermischt haben (USDA, 2001). Heute weichen seine wichtigsten Qualitätsmerkmale deutlich von denen des deutschen 'Tettnanger' ab und sind nahezu identisch mit denen des 'Fuggle' (GREEN, 1997). Ebenso zeigte GREEN (1997) auch für den 'US-Hallertauer', dass er in der Zusammensetzung wesentlicher Bestandteile der Hopfenöle eine deutlich größere Ähnlichkeit zum 'Fuggle' aufwies als zum 'Hallertauer mfr.'. Somit handelt es sich beim 'US-Hallertauer' vermutlich ebenfalls um eine genetische Vermischung mit 'Fuggle'. Die Unterschiede dieser beiden US-amerikanischen Sorten zu ihren deutschen Ursprüngen wird auch durch ihre Eingliederung in verschiedene Hauptgruppen verdeutlicht. Daher sollten der 'US-Tettnanger' und der 'US-Hallertauer' als unabhängige Sorten angesehen werden.

Hersbrucker Gruppe

In dieser Gruppe wurden die beiden Sorten 'Hersbrucker' und 'Strisselspalter' zusammengefasst. Letzterer entstand in den 1880er Jahren in Frankreich bei dem Versuch, im Elsaß bayerischen Hopfen anzubauen (BARTH *et al.*, 1994). Zwar scheiterte das Vorhaben, aber aus Sämlingen der Versuchspflanzen konnten einige Stämme gezüchtet werden, von denen den Besten der Name 'Strisselspalter' verliehen wurde. Mit der Namensgebung sollte nicht eine Herkunft aus Spalt assoziiert, sondern seine gute Qualität charakterisiert werden (Spalt stand damals für Qualität, "Strissel" = Bouquet; BARTH *et al.*, 1994). Obwohl der 'Strisselspalter' morphologisch mit dem 'Hallertauer mfr.' verwandt sein könnte (BARTH *et al.*, 1994), wird er eher zu den mittelspät reifenden Aromasorten gezählt und teilweise sogar als mit dem 'Hersbrucker' identisch angesehen (THOMPSON, 1972; HOPUNION, 2001).

Northern Brewer Gruppe

Die Genotypen der letzten Gruppe sind alle mit dem englischen Kultivar 'Northern Brewer' verwandt. Er wurde bei der Kreuzung eines männlichen Sämlings der Bittersorte 'Brewers Gold' mit dem Aromahopfen 'Canterbury Golding' erhalten (SALMON, 1944). Aufgrund seiner erhöhten Resistenz gegenüber der *Verticillium*-Welke, seines hohen α -Säuregehalts (ca. 11 %) und relativ hoher Erträge wurde der 'Northern Brewer' oft in Züchtungsprogramme integriert (NEVE, 1991). Die Sorten 'Perle' und 'Spalter Select' stellen solche Neuzüchtungen dar und können als Aromasorten mit erhöhtem Bitterstoffgehalt eingestuft werden (MAIER UND NARZISS, 1979; 1991), wobei 'Spalter Select' das für den Saazer Formenkreis typische Farnesen enthält. Beide Sorten zeigen eine verbesserte Toleranz gegenüber der Welke verglichen mit den "alten Landsorten". Allerdings sollte der 'Spalter Select' näher mit dem Saazer Formenkreis verwandt sein, da sich sein genetischer Hintergrund aus 12 % 'Saazer' und 9 % 'Spalter' aber nur 1 % 'Northern Brewer' zusammensetzt (SEEFELDER *et al.*, 2000a).

Die Stammbaumdaten der vorliegenden Arbeit wiesen eine hohe Übereinstimmung mit den Arbeiten von SUSTAR-VOZLIC UND JAVORNIK (1999, RAPD) und SEEFELDER *et al.* (2000a, AFLP) auf, wobei im Hinblick auf die europäischen Hopfensorten eine größere

Übereinstimmung mit dem auf RAPDs basierenden Dendrogramm festgestellt wurde. Da es sich bei den meisten der hier untersuchten Sorten um "alte Landsorten" handelte, wurde zur Verifizierung der Gruppierung im Dendrogramm auch die Klassifizierung der Hopfensorten nach Ölgruppen gemäß KRALJ *et al.* (1991) herangezogen. Hierbei wurde eine besonders gute Übereinstimmung zwischen der Gruppierung im Dendrogramm und der Einteilung in die Ölgruppen festgestellt: in einer Gruppe im Dendrogramm waren jeweils nur Sorten aus der gleichen Ölgruppe vorhanden. Obwohl für die US-amerikanischen Sorten keine Ölgruppen-Daten vorlagen, kann aufgrund der Analysen von GREEN (1997) eine dem 'Fuggle' entsprechende Einteilung in die Ölgruppe 2 angenommen werden. Ebenso wird für die Osvald Klone 'Os 31' und 'Os 114' eine Zugehörigkeit zur gleichen Ölgruppe wie für den 'Osvald 72' vermutet, da sie aus der gleichen Ausgangspopulation selektiert wurden und eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Aromakomponenten aufweisen (PATZAK, 2001). Die einzige Ausnahme stellt der 'Spalter Select' dar, der nach der Zusammensetzung seiner Ölkomponenten und nach seiner genetischen Abstammung eher der Saazer Gruppe zugeordnet werden müsste. Für den 'Hersbrucker' lagen keine Ölgruppen-Daten vor. Er wird jedoch von MAIER (1977) zum gleichen Ölgruppen Typ gezählt wie der "Strisselspalter".

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Zusammensetzung des Tettlinger Hopfen und anderer Hopfensorten aus seinem näheren geographischen und verwandtschaftlichen Umfeld untersucht. Es war trotz intensiver AFLP-Analysen nicht möglich, eine Differenzierung zwischen den Sorten des Saazer Formenkreis zu erreichen. Eine zu geringe Sensibilität der AFLP-Technik konnte jedoch ausgeschlossen werden, da sich die AFLP-Technik bei der Analyse der genetischen Variabilität in vergleichbaren Organismen als ausreichend sensitiv erwiesen hat. So konnten CERVERA *et al.* (1998) bei Wein (*Vitis vinifera* L.) sogar einzelne Klone, die zu dem selben Kultivar gehörten, mittels AFLP-Fingerabdrücken differenzieren. Außerdem konnten TOWNSEND *et al.* (2000) zeigen, dass mit der Differenzierung von Halbgeschwistern bei der Sorte 'Sterling' auch beim Hopfen sehr eng verwandte Individuen mit Hilfe von AFLP-Fingerabdrücken unterschieden werden können. Es muss daher angenommen werden, dass es sich bei den Sorten des Saazer Formenkreis um genetisch nahezu identisches Material handelt, deren geringe morphologische Unterschiede auf kleine Regionen im Genom zurückzuführen sein müssten (HARTL UND SEEFELDER, 1998). Obwohl SEEFELDER *et al.* (2000a; 2000b) durch die Kartierung ihrer Marker sicherstellen konnten, dass die verwendeten Marker das gesamte Genom abgedeckten, war ihnen eine Differenzierung im Saazer Formenkreis nicht möglich.

In pflanzlichen Genomen wird die Genexpression u.a. durch die Methylierung bestimmter Nukleotide reguliert (CEDAR, 1988; KASS *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 1999), indem in methylierten Bereichen durch Strukturveränderungen des Chromatins die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird (INAMADAR *et al.*, 1991; DAVEY *et al.*, 1997) und somit diese DNA-Bereiche "stillgelegt" werden. Exprimierte Regionen sind folglich nicht methyliert.

Die Analyse von exprimierten Bereichen könnte demnach durch den Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen erreicht werden. Dass derartige Versuchsansätze erfolgreich sein können, zeigten BURR *et al.* (1988) bei Mais sowie KEIM UND SCHOEMAKER (1988) bei Soja, die das methylierungssensitive Restriktionsenzym *Pst* I zum Klonieren von Einzelkopie-Sequenzen benutzten, die dann als RFLP-Proben

eingesetzt wurden. Hierdurch gelang es ihnen, repetitive DNA-Bereiche auszuschließen und dadurch gezielt die Markerdichte in genetisch aktiven Euchromatin-Bereichen zu erhöhen. Ein ähnliches Vorgehen wäre auch bei der AFLP-Technik denkbar. Arbeiten von YOUNG *et al.* (1999) deuteten darauf hin, dass bei Soja die mit *Pst* I und *Mse* I erzeugten AFLP-Marker tatsächlich bevorzugt in wenig methylierten Regionen lokalisiert waren. Bei der Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsenzyme muss aber wegen möglicher organspezifischer und entwicklungsphysiologischer Unterschiede im Methylierungsmuster in den zu untersuchenden Proben physiologisch einheitliches Pflanzenmaterial verwendet werden (DONINI *et al.*, 1997).

Im Hinblick auf die dieser Arbeit zugrunde liegenden Intention, nämlich den Einsatz von Spritzmitteln im Tettninger Hopfen durch den Anbau von pilz- bzw. krankheitsresistenten Hopfenpflanzen zu reduzieren, ist folgendes festzuhalten: Es konnte gezeigt werden, dass einerseits die im Tettninger Hopfen natürlich vorhandene genetische Variabilität nicht ausreichend ist, um nach resistenten oder toleranten Einzelpflanzen zu selektieren. Andererseits ist bei der Durchführung von Kreuzungen wegen des hohen Grads der Heterozygotie beim Hopfen (NEVE, 1991) mit der Aufspaltung und dem damit meist einhergehenden Verlust der agronomisch und qualitativ wertvollen Merkmale zu rechnen. Aufwendige Rückkreuzungsprogramme wären erforderlich, deren Erfolg (Erhaltung bzw. Wiederherstellung der Aromaeigenschaften des 'Tettninger') unter agronomisch sinnvollen Aspekten nicht sichergestellt werden kann. Zudem sind keine geeigneten Kreuzungspartner mit Resistenzen gegen *Pseudoperonospora humuli* bekannt. Unter dieser Prämisse ist folglich eine Einkreuzung von Resistenzeigenschaften nicht ratsam. Es sollte daher auf Techniken zurückgegriffen werden, die eine Einschleusung von Resistenzeigenschaften ermöglichen, ohne dabei den genetischen Hintergrund der Empfängerpflanze zu beeinflussen.

Ein erster Ansatz zur Erzeugung von Resistenzen wurde von CONNELL UND HEALE (1986a, b) und von HEALE *et al.* (1989a, b) untersucht: Über die Erzeugung von somaklonalen Varianten aus Kallus- und Suspensionskulturen, denen Kulturfiltrate pathogener Pilze zugesetzt wurden, konnten die Autoren eine erhöhte Toleranz gegenüber den Pathogenen induzieren. Allerdings wiesen die regenerierten Pflanzen morphologische, physiologische und genetische Abweichungen auf.

Erheblich erfolgsversprechender erscheint jedoch die gezielte Transformation von Genen für Pilz- oder Krankheitsresistenzen. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der klassischen Kreuzungszüchtung besteht hierbei v.a. darin, dass auch artfremde Resistenzgene eingebracht und exprimiert werden können. Außerdem werden nur wenige genau definierte Gene in das Genom der Empfängerpflanze integriert, so dass im allgemeinen die Eigenschaften der transgenen Pflanze weitgehend unverändert bleiben sollten.

Erste Arbeiten zur Transformation beim Hopfen liegen bereits vor: HEALE *et al.* (1989a) gelang es, in Protoplasten der Sorte 'Fuggle' nach der Transformation mit dem Plasmid pBI121.1 Kanamycinresistenz zu exprimieren. Über erfolgreiche Transformationen mit *Agrobacterium tumefaciens* wurde von ORINIAKOVA UND MATOUSEK (1996) berichtet, denen es zwar gelang, transformierten Kallus herzustellen, daraus aber bisher keine transgenen Pflanzen regenerieren konnten (ORINIAKOVA *et al.*, 1999). In aufwendigen Untersuchungen konnte BECKER (2000) hingegen durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation phosphinotricin- und kanamycinresistente Kallus- und Suspensionskulturen der Sorten 'Osvold Saazer', 'Perle' und 'Spalter Select' etablieren. Die Regeneration transgener Pflanzen konnte bisher jedoch nur aus den Kulturen des 'Osvold Saazer' erfolgreich eingeleitet werden. Da auch beim Hopfen der Transformationserfolg maßgeblich von der Regenerationsfähigkeit der verwendeten Sorte beeinflusst wird (SUSTAR-VOZLIC *et al.*, 1997), dürften wegen der großen Genetischen Ähnlichkeit des 'Osvold Saazer' zum 'Tettnanger' auch für Transformationsansätze beim 'Tettnanger' ähnlich erfolgsversprechende Resultate zu erwarten sein, wie sie von BECKER (2000) beschrieben wurden. Erste erfolgreiche Ergebnissen zur Transformation beim 'Tettnanger' konnten bereits von HORLEMANN UND WEBER (2002) erzielt werden.

6 Zusammenfassung

Hopfen (*Humulus lupulus* L.) wird fast ausschließlich zur Nutzung in der Brauindustrie angebaut. Hierfür sind die Blütenstände der weiblichen Hopfenpflanzen (Dolden) von kommerziellem Wert, in denen das brautechnisch wertvolle Lupulin gebildet wird. Je nach Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Lupulinkörner unterscheidet man zwischen 'Aromasorten', 'Bittersorten' und 'Hochalpha-Hopfen'.

Erhebliche Ernteauffälle im Hopfenanbau werden durch Krankheits- oder Schädlingsbefall verursacht. Sie können derzeit nur durch den Einsatz von Spritzmitteln bekämpft werden, die meist präventiv ausgebracht werden. Aus ökologischen und ökonomischen Gründen wird daher der Anbau von resistenten Hopfenpflanzen angestrebt. Aufgrund des hohen Grades an Heterozygotie im Hopfen würden aber Kreuzungen, die zur Einbringung von Resistenzen dienen, wahrscheinlich auch die wertvollen Aromaeigenschaften der Sorten verändern. Die Selektion von Pflanzen mit natürlicher Resistenz könnte somit eine Alternative darstellen.

Der Tettlinger Hopfen wird wegen seines besonders feinen Aromas zur Gruppe der "Edlen Aromahopfen" gezählt und wurde bisher als eine "alte Landsorte" angesehen. Da die Herkunft des 'Tettlinger' und sein genetischer Ursprung bislang unbekannt waren, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der genetischen Variabilität des Tettlinger Hopfen mit Hilfe von AFLP-Fingerabdrücken, um festzustellen, ob sie für eine Selektion innerhalb der Sorte ausreichend groß ist. Außerdem sollten die verwandtschaftlichen Beziehungen des 'Tettlinger' zu anderen Hopfensorten näher charakterisiert werden. Weiterhin wurde die Eignung von verschiedenen DNA-Quellen zur Erzeugung von AFLP-Fingerabdrücken untersucht.

Hierzu wurden folgende Arbeiten durchgeführt: (1) Probenahme einer repräsentativen Stichprobe aus dem Tettlinger Anbaugebiet und Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus; (2) Entwicklung geeigneter DNA-Extraktionsmethoden für verschiedene Pflanzenmaterialien; (3) Etablierung der radioaktiven AFLP-Technik und Bestimmung der optimalen Primerselektivität für Hopfen; (4) Analyse der genetischen Variabilität innerhalb des Tettlinger Hopfens; (5) Untersuchung des Grades der Verwandtschaft des 'Tettlinger' zu anderen Hopfensorten.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Von einer Stichprobe von 288 Hopfenpflanzen ließen sich 273 Pflanzen als Stecklinge erhalten. Aus 268 von ihnen konnte DNA extrahiert werden. Zusammen mit 11 DNA-Extraktionen aus Pflanzen von der Versuchsanstalt in Straß standen 279 Pflanzen für AFLP-Analysen zur Verfügung.
- Die Methode zur Extraktion von DNA aus Hopfenblättern konnte erarbeitet und für Doldenmaterial und Hopfenpellets angepasst werden.
- Die radioaktive AFLP-Technik ließ sich für Hopfen etablieren, wobei sich zeigte, dass der Einsatz von insgesamt sechs selektiven Nukleotiden zur Erzeugung von AFLP-Fingerabdrücken im Hopfen optimal war. Hierauf basierend konnte die Größe des Hopfengenoms auf 5×10^8 bp bis 6×10^9 bp geschätzt werden.
- Für die Erzeugung von AFLP-Fingerabdrücken im Hopfen waren Blätter, Dolden sowie Doldengemische gleichermaßen geeignet. Der entwicklungsphysiologische Zustand des Materials oder seine Herkunft aus unterschiedlichen Anbauregionen hatten keinen Einfluss auf die Ausprägung der AFLP-Bandenmuster. Nur mit Pellets konnten keine reproduzierbaren Bandenmuster erzeugt werden.
- Innerhalb der repräsentativen Stichprobe von 279 Tettninger Hopfenpflanzen konnte ein nur sehr geringer Grad an genetischer Variabilität festgestellt werden. Es wurden nur drei polymorphe Pflanzen identifiziert, von denen eine wahrscheinlich als eine Punktmutation anzusehen ist.
- Durch den Vergleich des Tettninger Hopfen mit 17 weiteren Hopfensorten, die eindeutig voneinander unterschieden werden konnten, wurde gezeigt, dass es sich bei den beiden anderen polymorphen Tettninger Pflanzen vermutlich jeweils um eine unbeabsichtigte Vermischung durch die Sorten 'Hallertauer mfr.' bzw. 'Backa' handelt.
- Die enge Verwandtschaft des 'Tettninger' zum Saazer Material konnte bestätigt werden. Eine genauere Bestimmung der Abstammung des 'Tettninger' war jedoch nicht möglich.
- Es wird vermutet, dass der 'Tettninger' höchstwahrscheinlich aus einem einzigen Klon besteht. Eine Selektion auf resistente Einzelpflanzen im Tettninger Hopfen scheint somit nicht möglich zu sein. Andere Techniken zur Einbringung von Resistenzen sind somit erforderlich, wobei die gezielte Transformation von Resistenzgenen eine Alternative darstellen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten somit, dass die AFLP-Technik eine geeignete Methode zur Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb einer Hopfensorte und auch zwischen Sorten darstellt.

7 Literatur

- Abbott, M. S. and Fedele, M. J.** (1994). A DNA-based varietal identification procedure for hop leaf tissue. *J. Inst. Brew.* 100: 283-285.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., and Baldoni, L.** (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98: 411-421.
- Aoki, Y. and Koshihara, H.** (1972). Inhibitory effects of acid polysaccharides from sea urchin embryos on RNA polymerase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 272: 33-43.
- Araki, S., Tsuchiya, Y., Takashio, M., Tamaki, T., and Shinotsuka, K.** (1998). Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56: 93-98.
- Bamforth, C. W.** (1985). The foaming properties of beer. *J. Inst. Brew.* 91: 370-383.
- Barth, H. J., Klinke, C. und Schmidt, C.** (1994). *Der große Hopfenatlas: Geschichte und Geographie einer Kulturpflanze.* Joh. Barth & Sohn, Nürnberg.
- Becker, J.** (2000). Untersuchungen zur in vitro Regeneration und genetischen Transformation von Hopfen (*Humulus lupulus* L.). Dissertation Universität Kaiserslautern.
- Bennett, M. D. and Leitch, I. J.** (1995). Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113-176.
- Brady, J., Scott, N. S., and Thomas, M. R.** (1996). DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica* 91: 277-284.
- Brown, P. T. H.** (1989). DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 31: 717-729.
- Burr, B., Burr, F. A., Thompson, K. H., Albertson, M. C., and Stuber, C. W.** (1988). Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118: 819-526.
- Cedar, H.** (1988). DNA methylation and gene activity. *Cell* 53: 3-4.
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Sancha, J. C., Martinez de Toda, F., and Martinez-Zapater, J. M.** (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine of *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from

- Rioja (Spain). Theor. Appl. Genet. 97: 51-59.
- Connell, S. A. and Heale, J. B.** (1986a). *In vitro* use of *Verticillium albo-atrum* culture filtrates to select for disease resistance in regenerating callus cultures of hop (*Humulus lupulus* L.). Proc. Int. Symp. Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement. IAEA, Vienna 1985. IAEA-Sm-282/55P, pp 309-313.
- Connell, S. A. and Heale, J. B.** (1986b). Development of an *in vitro* selection system for novel sources of resistance to *Verticillium* wilt in hops. *In*: L. A. Withers and P. G. Alderson (eds.) Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, London, pp 451-459.
- Davey, C., Pennings, S., and Allen, J.** (1997). CpG methylations re-models chromatin structure *in vitro*. J. Mol. Biol. 267: 276-288.
- De Cooman, L., Everaert, E., and De Keukeleire, D.** (1998). Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. Phytochem. Anal. 9: 145-150.
- Dellaporta, S. L. and Calderon-Urrea, A.** (1993). Sex determination in flowering plants. Plant Cell 5: 1241-1251.
- Donini, P., Elias, M. L., Bougourd, S. M., and Koebner, R. M. D.** (1997). AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. Genome 40: 521-526.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Dyer, A. T. and Leonard, K. J.** (2000). Contamination, error, and nonspecific molecular tools. Phytopathology 90: 565-567.
- Ellis, R. P., McNicol, J. W., Baird, E., Booth, A., Lawrence, P., Thomas, B., and Powell, W.** (1997). The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. Mol. Breed. 3: 359-369.
- Engelhard, B., Lutz, A. und Mayer, M.** (1999). Überprüfung von drei Prognosemodellen zur Bekämpfung der Hopfenperonospora. Proc Sci. Com. IHGC, Pulawy, pp 90-95.
- Eri, S., Khoo, B. K., Lech, J., and Hartman, T. G.** (2000). Direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil in support of varietal characterization. J. Agric. Food Chem 48: 1140-1149.

- Fang, G., Hammar, S., and Grumet, R.** (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13: 52-55.
- Flatau, J. J.** (1866). *Ueber Hopfenbau*. Wiegand & Hempel, Berlin.
- Forster, A.** (1993). How to analyse hops. *Hopfenrundschau - International edition*. pp 45-53.
- Forster, A. und Schmidt, R.** (1993). Zur Charakterisierung und Gruppierung von Hopfensorten. *Brauwelt* 40: 2036-2038, 2049-2057.
- Freundorfer, J.** (1988). Computergestützte Sortenerkennung bei Hopfen. *Monatschrift für Brauwissenschaft* 8: 321-316.
- Frost, A. A.** (1983). Hops. *In: G. S. Wratt and H. C. Smith (eds.) Plant Breeding in New Zealand*. Butterworth of NZ Ltd, Wellington.
- Fruwirth, C.** (1888). *Hopfenbau und Hopfenbehandlung*. Paul Parey-Verlag, Berlin.
- Fruwirth, C.** (1924). *Die Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*. Band 3. Paul Parey-Verlag, Berlin.
- Fruwirth, C.** (1928). *Hopfenbau und Hopfenbehandlung*. Paul Parey-Verlag, Berlin.
- Furukawa, K. and Bhavadna, V. P.** (1983). Influences of amniotic polysaccharides on DNA synthesis in isolated nuclei and by DNA polymerase: correlation of observed effects with properties of the polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 740: 466-475.
- Gamborg, O. L.** (1975). Callus and cell culture. *In: O. L. Gamborg and L. R. Wetter (eds.) Plant Tissue Culture Methods*. N. R. C. Ottawa, Ontario, Canada.
- Garcia-Mas, J., Oliver, M., Gomez-Paniagua, H., and de Vicente, M. C.** (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.* 101: 860-864.
- Grant, H. L.** (1995). Hops. *In: W. A. Hardwick (ed.) Handbook of Brewing*. Dekker, New York.
- Green, C. P.** (1986). Gas-liquid chromatography, hop oils and variety identification. *J. Eng. Hops* 6: 10-11.
- Green, C. P.** (1997). Comparison of Tettnanger, Saaz, Hallertau and Fuggle hops grown in the USA, Australia and Europe. *J. Inst. Brew.* 103: 239-243.
- Groß, E.** (1899). *Der Hopfen in botanischer, landwirthschaftlicher und technischer Beziehung, sowie als Handelswaare*. Gerold, Wien.

- Haas, G. J. and Barsoumian, R.** (1994). Antimicrobial activity of hop resins. *J. Foodprotection (USA)*. 57: 59-61.
- Han, T. H., van Eck, H. J., De Jeu, M. J., and Jacobsen, E.** (1999). Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with large-sized genome: a study on *Alstroemeris* ssp. *Theor. Appl. Genet.* 98: 465-471.
- Hartl, L. and Seefelder, S.** (1998). Diversity of selected hop cultivars by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 96: 112-116.
- Haunold, A.** (1990). Development of hop varieties. *Zymurgy* 13: 15-23.
- Hautke, P. and Petricek, D.** (1967). The influence of environmental conditions on the proportions of cohumulone, adhumulone and humulone in hop alpha-acids. *J. Inst. Brew.* 73: 51-59.
- Heale, J. B., Legg, T., Brar, J., Fabb, A., and Bainbridge, B.** (1989a). Application of plant tissue culture and molecular biology techniques to progressive wilt hops caused by *Verticillium albo-atrum*. Proceedings of the European Convention Congress, Symposium on Plant Biotechnology, Helsinki, pp 70-82.
- Heale, J. B., Legg, T., and Connell, S. A.** (1989b). *Humulus lupulus* L. (Hop): *In vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance. *In: Y. P. S. Bajaj (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol 7: Medicinal and agronomic plants II*, pp 264-285. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Heidtmann, P.** (1993). Klasse statt Masse: Aromahopfen aus Tett nang. Hopfenrundschau - International edition. pp 31, 33-37.
- Heidtmann, P.** (1994). Grünes Gold - 150 Jahre Hopfenbau in Tett nang. Verlag Lorenz Senn, Tett nang.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., and Michelmore, R.** (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* ssp. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1201-1210.
- Horlemann, C. und Weber, G.** (2002). Transformation der Hopfensorte Tett nanger zur Erhöhung der Resistenz gegen Pathogene. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 54: 353-355.
- [Hopunion]** Hop Variety Data Booklet (2001). <<http://hopunion.com/frenchstrissel-spalt.htm>> (Zugriff März 2001).
- Howard, B. H.** (1965). Regeneration of the hop plant (*Humulus lupulus* L.) from soft-

- wood cuttings. I. The cutting and its rooting environment. *J. Hort. Sci.* 40: 181-191.
- Inamadar, N. M., Ehrlich, K. C., and Ehrlich, M.** (1991). CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Mol. Biol.* 17: 111-123.
- Jaccard, P.** (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270.
- Jakse, J. and Javornik, B.** (1999). Identification of hop cultivar mixtures by means of RAPD, microsatellite and STS markers. *Proc Sci. Com. IHGC, Pulavy*, pp 62-65.
- Junghans, H. and Metzlauff, M.** (1990). A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechniques* 8: 176.
- Kammhuber, K.** (2000). Untersuchung zur Biogenese der ätherischen Öle des Hopfens. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* 53: 138-142.
- Kass, S. U., Pruss, D., and Wolffe, A. P.** (1997). How does methylation repress transcription. *Trends Genet.* 13: 444-449.
- Keim, P. and Shoemaker, R. C.** (1988). Construction of a random recombinant DNA library that is primarily single-copy sequence. *Soybean Genet. Newslett.* 15: 147-148.
- Kohlmann, H. und Kastner, A.** (1975). *Der Hopfen*. Hopfen-Verlag, Wolnzach.
- Kralj, D., Zupanec, J., Vasilj, D., Kralj, S., and Psenicnik, J.** (1991). Variability of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Inst. Brew.* 97: 197-206.
- Lam, K. C., Nickerson, G. B., and Deinzer, M.** (1986). A rapid solvent extraction method for hop essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 34: 63-66.
- Lin, J. J. and Kuo, J.** (1995). AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17: 66-70.
- Lin, J. J., Kuo, J., and Ma, J.** (1996a). Effect of different primer combinations on the resolution of AFLP in plants with small genomes. *Focus* 18: 68-69.
- Lin, J. J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N., and Matthews, B. F.** (1996b). Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP mapping techniques. *Plant Molec. Biol. Rep.* 14: 156-169.
- Linhart, J.** (1999). Das Vermächtnis des Doz. Oswald für das heutige Prüfwesen für

- Hopfen. Chmelarstvi. International Edition, pp 18-19.
- Litt, M. and Luty, J. A.** (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Maier, J.** (1977). Versuche zur Bestimmung von Hopfensorten nach chemischen Kennzeichen bei Naturhopfen, Hopfenextrakten und in Gemischen. *Hopfen-Rdsch.* 28: 140, 142, 144.
- Maier, J.** (1978). Zur chemischen Sortenbestimmung bei Hopfen. *Hopfen-Rdsch.* 29: 258-263.
- Maier, J. und Narziss, L.** (1979). Die Hopfensorte Perle. *Brauwelt* 36: 1260-1263.
- Maier, J. und Narziss, L.** (1991). Neue Hopfensorten. *Brauwelt* 131: 497-502, 515.
- Maughan, J. P., Saghai Maroof, M. A., Buss, G. R., and Huestis, G. M.** (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogonic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401.
- Mizobuchi, S. and Sato, Y.** (1985). Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. Part III. Antifungal activity of 2,4-dihydroxyacylphenones and related compounds. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1327-1333.
- Moir, M.** (2000). Hops - a millennium review. *J. Am. Brew. Chem.* 58: 131-146.
- Morgante, M. and Olivieri, A. M.** (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Murakami, A.** (2000). Hop variety classification using genetic distance based on RAPD. *J. Inst. Brew.* 106: 157-161.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 740: 4321-4325.
- Neve, R. A.** (1961). Sex determination in the cultivated hop *Humulus lupulus*. PhD thesis, Univ. of London.
- Neve, R. A.** (1991). Hops. Chapman and Hall, London.
- Nickerson, G. B., Williams, P. A., and Haunold, A.** (1986). Varietal differences in the proportions of cohumulone, adhumulone and humulone in hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 44: 91-94.
- Oriniakova, P. and Matousek, J.** (1996). Viroid infection of hop (*Humulus lupulus* L.)

- mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and conditions for hop transformation. Rost. Vyr. 42: 233-239.
- Oriniakova, P., Pavingerova, D., and Matousek, J.** (1999). Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. Rost. Vyr. 45: 219-227.
- Osvald, K.** (1944). Studies on hop genetics. Union of Hop Growers. Louny.
- Parker, J. S. and Clark, M. S.** (1991). Dosage sex-chromosome systems in plants. Plant Sci. 80: 79-92.
- Patzak, J.** (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular markers used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica 121: 9-18.
- Peacock, V. E. and McCarty, P.** (1992). Varietal identification of hops and hop pellets. Tech. Q. Mast. Brew. Assoc. Am. 29: 81-85.
- Petrzik, K. and Svoboda, P.** (1997). Screening of apple mosaic virus in hop cultivars in the Czech Republic by reverse transcription-polymerase chain reaction. Acta virologica 41: 101-103.
- Pillay, M. and Kenny, S. T.** (1996). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F₁ progeny. Theor. Appl. Genet. 92: 334-339.
- Pinckert, F. A.** (1861). Der praktische Hopfenbau in seinem höchsten Ertrage unter Berücksichtigung der neuesten Fortschritte und Erfahrungen in Böhmen, Baiern, England etc.; Nebst der berühmten Neutomysler und Spalter Hopfen-cultur. Schotte, Berlin.
- Polak, J. and Svoboda, P.** (1989). Preliminary results of screening hop varieties and clones for the presence of some hop viruses in Czechoslovakia using ELISA. Proc. Int. Workshop on Hop Virus Diseases, Rauschholzhausen 1988, pp 27-31.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A.** (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.
- Richards, E.** (1988). Preparation of genomic DNA from plant tissue. In F. M. Ausubel, R. Bent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.

- Rohlf, F. J.** (1998). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0, Exeter Software, Setauket, N.Y.
- Rohlf, F. J. and Sokal, R. R.** (1981). Comparing numerical taxonomic studies. *Syst. Zool.* 30: 459-490.
- Romanko, R. R.** (1986). Amerikanischer Hopfenführer III. *In: Steiner's Handbuch der amerikanischen Hopfen III.* S. S. Steiner Inc., New York. pp 167-168.
- Russel, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W., and Waugh, R.** (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- Rybacek, V.** (1991). Hop production. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 8014-8019.
- Salmon, E. S.** (1944). Four seedlings of the Canterbury Golding. *J. S. E. Agric. Coll., Wye*, 8 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. USA.
- Schmidt, K.** (1958). Die deutschen Hopfensorten. Hopfenrundschau, Sonderdruck aus Nr. 11, 12, 13, 14, 16 u. 19.
- Scott, K. D., Ablett, E. M., Lee, L. S., and Henry, R. J.** (2000). AFLP markers distinguish an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica* 113: 245-249.
- Seefelder, S.** (1999). Identifizierung molekularer Marker bei Hopfen (*Humulus lupulus* L.). Dissertation Universität Dresden.
- Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., and Seigner, E.** (2000a). Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as detected by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding* 119: 257-263.
- Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., and Seigner, E.** (2000b). Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus* L. *Plant Breeding* 119: 249-255.
- Sensi, E. R., Vignani, W., Rohde, W., and Biricolli, S.** (1996). Characterization of

- genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 183-188.
- Sesek, P., Sustar-Vozlic, J., and Bohanec, B.** (2000). Determination of aneuploids in hops (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Eur. J. Physiol.* 439 [Suppl]: R16-R18.
- Singrün, C.** (1999). Entwicklung eines DNA-analytischen Verfahrens (AFLP) zur Identifizierung von Hopfenvarietäten (*Humulus lupulus* L.) aus getrockneten Dolden. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.
- Skroch, P. and Nienhuis, J.** (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1086-1091.
- Small, E.** (1978). A numerical and nomenclatural analysis of morphogeographic taxa of *Humulus*. *Syst. Bot.* 3: 37-76.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R.** (1973). Numerical Taxonomy. *In*: D. Kennedy and R. B. Park (eds.) Freeman and Company, San Francisco.
- Sustar-Vozlic, J., Bohanec, B., and Javornik, B.** (1997). Somaclonal variation in hop (*Humulus lupulus* L.) Breeding and evaluation of hop germplasm by RAPD markers. *Proc Sci. Com. IHGC, Zatec*, pp 77-82.
- Sustar-Vozlic, J. and Javornik, B.** (1999). Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding* 118: 175-181.
- Svoboda, P.** (1993). Determination of carla virus and ilarvirus in Czech hop varieties by ELISA immuno-enzymatic method. *Plant Protection* 29: 259-264.
- Thompson, F. C.** (1972). The hop growing districts in Europe. *Brygmesteren* 2: 41-51.
- Thresh, J. M., Adams, A. N., Barbara, D. J., and Clark, M. F.** (1977). The detection of three viruses of hop (*Humulus lupulus*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 87: 57-65.
- Townsend, M. S., Henning, J. A., and Moore, D. L.** (2000). AFLP analysis of DNA from dried hop cones. *Crop Sci.* 40: 1383-1386.
- Tsuchiya, Y., Araki, S., Takashio, M., and Tamaki, T.** (1997). Identification of hop varieties using specific primers derived from RAPD markers. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 103-107.
- [USDA]** USDA named hop variety descriptions (2001). <<http://www.freshops.com/>

- usda_hop_desc2.html> (Zugriff März 2001).
- Vent, L.** (1999). Osvalds Vermächtnis. Chmelarstvi. International Edition, pp 14-15.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wackerbauer, K. and Balzer, U.** (1988). Varietal determination of German hops and hop-products by HPLC-analysis of humulones and lupulones. *Mschr. f. Brauwiss.* 41: 252-255.
- Wagner, F.** (1905). Die bayerischen Hopfensorten ihre Entstehung, Verbreitung und Eigenschaften. Ulmer, Stuttgart.
- Welsh, J. and McClelland, M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Wetmore, R. H. and Sorokin, S.** (1955). On the differentiation of xylem. *J. Arnold Arbor Harv. Univ.* 36: 305-317.
- Williams, I. H. and Sykes, J. T.** (1959). Hop propagation II, soft internodal cuttings. *Rep. Dept. Hop Res. Wye Coll. for 1959:* 62-69.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6231 - 6235.
- Winge, O.** (1914). The pollination and fertilization processes in *Humulus lupulus* L. and *H. Japonicus* Sieb. et Zucc. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg* 11: 1-44.
- Young, W. P., Schupp, J. M., and Keim, P.** (1999). DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* 99: 785-790.
- Zabeau, M. and Vos, P.** (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7 (Publ no. 0534858 A1).
- Zabel-Wittoch, B.** (1977). Hopfen im Gäu, Rückblick auf rund 175 Jahre Hopfenbau. Heft 6 aus der Reihe "Das Gäu" - Geschichte, Persönlichkeiten, Wirtschaft. (Anlage zum Geschäftsbericht 1997). Volksbank Herrenberg eG.
- Zattler, F. und Krauß, G.** (1970). Versuche über den Einfluß der Samen auf die Hopfen- und Bierqualität. *Monatsschrift für Brauerei* 23: 220-221.
- Zattler, F.** (1961). Zustandekommen und Verhinderung der Befruchtung des Kulturhopfens. *Hopfenrundschaue* 12: 211-212.

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettninger Stichprobe.

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Garten	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1001	12	Bonenberger, Markus	Tett nang	ca. 1950	2 / 4 / -12	15.05.97
97-1002	13	Locher, Richard	Missenhardt	ca. 1930	3 / 4 / -11	15.05.97
97-1003	13				4 / 1 / -10	15.05.97
97-1004	13				4 / 4 / -13	15.05.97
97-1005	13				4 / 3 / -23	15.05.97
97-1006	13				4 / 3 / -31	15.05.97
97-1007	19	Kling, Hubert	Schierlingen	ca. 1930	7 / 2 / -8	15.05.97
97-1008	19				7 / 2 / -26	15.05.97
97-1009	19				7 / 2 / -39	15.05.97
97-1010	19				7 / 2 / -55	15.05.97
97-1011	19				7 / 2 / -67	15.05.97
97-1012	19				10 / 7 / 28	15.05.97
97-1013	5	Steinhauser, Adelbert	Habacht	ca. 1950	5 / 4 / 7	19.03.49
97-1014	5				5 / 4 / 21	20.05.97
97-1015	5				5 / 4 / 37	20.05.97
97-1016	5				5 / 4 / 62	20.05.97
97-1017	5				5 / 4 / 74	20.05.97
97-1018	6	Bernhard, Vinzenz	Brugg	ca. 1960	2 / 3 / -9	20.05.97
97-1019	6				2 / 3 / -21	20.05.97
97-1020	6				2 / 3 / -34	20.05.97
97-1021	6				2 / 3 / -44	20.05.97
97-1022	6				2 / 3 / -54	20.05.97
97-1023	7	Keckeisen, Max	Brochenzell	ca. 1950	6 / 2 / 15	20.05.97
97-1024	7				6 / 2 / 30	20.05.97
97-1025	7				6 / 2 / 45	20.05.97
97-1026	7				6 / 2 / 60	20.05.97
97-1027	7				6 / 2 / 75	20.05.97
97-1028	15	Muth, Norbert	Hübschenberg	ca. 1880	3 / 3 / 10	20.05.97
97-1029	15				3 / 3 / 20	20.05.97
97-1030	15				3 / 3 / 30	20.05.97
97-1031	15				3 / 3 / 40	20.05.97
97-1032	15				3 / 3 / 50	20.05.97
97-1033	16	Luitz, Max	Siggenweiler	ca. 1920	2 / 4 / -12	20.05.97
97-1034	16				2 / 4 / -24	20.05.97
97-1035	16				2 / 4 / -36	20.05.97
97-1036	16				2 / 4 / -48	20.05.97
97-1037	16				2 / 4 / -60	20.05.97
97-1038	12	Bonenberger, Markus	Tett nang	ca. 1950	2 / 2 / -11	20.05.97
97-1039	12				2 / 4 / -25	20.05.97
97-1040	12				2 / 2 / -24	20.05.97
97-1041	12				2 / 2 / -42	20.05.97
97-1042	8	Schiller, Josef	Eriskirch	ca. 1945	3 / 3 / -8	20.05.97
97-1043	8				3 / 3 / -18	20.05.97
97-1044	8				3 / 3 / -30	20.05.97
97-1045	8				3 / 3 / -41	20.05.97
97-1046	8				3 / 3 / -52	20.05.97

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Garten	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1047	9	Marschall, Theresia	Wolfzennen	ca. 1950	10 / 4 / 6	20.05.97
97-1048	9				10 / 4 / 12	20.05.97
97-1049	9				10 / 4 / 18	20.05.97
97-1050	9				10 / 4 / 24	20.05.97
97-1051	9				10 / 4 / 30	20.05.97
97-1052	29	Ruess, Hans-Leo	Unterteiringen	ca. 1965	2 / 4 / 10	20.05.97
97-1053	29				2 / 4 / 20	20.05.97
97-1054	29				2 / 4 / 29	20.05.97
97-1055	29				2 / 4 / 39	20.05.97
97-1056	29				2 / 4 / 49	20.05.97
97-1057	10	Welte, Paul	Kau	ca. 1965	2 / 3 / 10	20.05.97
97-1058	10				2 / 3 / 19	20.05.97
97-1059	10				2 / 3 / 29	20.05.97
97-1060	10				2 / 3 / 39	20.05.97
97-1061	10				2 / 3 / 50	20.05.97
97-1062	1	Heimpel, Johann	Apflau	ca. 1960	1 / 2 / 8	22.05.97
97-1063	1				1 / 2 / 16	22.05.97
97-1064	1				1 / 2 / 25	22.05.97
97-1065	1				1 / 2 / 33	22.05.97
97-1066	1				1 / 2 / 43	22.05.97
97-1067	2	Mack, Alois	Apflau	ca. 1960	1 / 4 / 8	22.05.97
97-1068	2				1 / 4 / 16	22.05.97
97-1069	2				1 / 4 / 23	22.05.97
97-1070	2				1 / 4 / 31	22.05.97
97-1071	2				1 / 4 / 41	22.05.97
97-1072	3	Lanz, August	Unterlangnau	?	1 / 5 / 7	22.05.97
97-1073	3				1 / 5 / 14	22.05.97
97-1074	3				1 / 5 / 22	22.05.97
97-1075	3				1 / 5 / 30	22.05.97
97-1076	3				1 / 5 / 37	22.05.97
97-1077	3				1 / 5 / 45	22.05.97
97-1078	27	Stohr, Hans	Wilpoltsweiler	ca. 1935	3 / 2 / 7	22.05.97
97-1079	27				3 / 2 / 12	22.05.97
97-1080	27				3 / 2 / 20	22.05.97
97-1081	27				3 / 2 / 27	22.05.97
97-1082	27				3 / 2 / 33	22.05.97
97-1083	18	Martin, Bernhard	Flockenbach	ca. 1950	2 / 3 / -7	22.05.97
97-1084	18				2 / 3 / -14	22.05.97
97-1085	18				2 / 3 / -21	22.05.97
97-1086	18				2 / 3 / -28	22.05.97
97-1087	18				2 / 3 / -38	22.05.97
97-1088	17	Weishaupt, Anton	Matzenhaus	ca. 1965	4 / 3 / 7	22.05.97
97-1089	17				4 / 3 / 14	22.05.97
97-1090	17				4 / 3 / 21	22.05.97
97-1091	17				4 / 3 / 28	22.05.97
97-1092	17				4 / 3 / 35	22.05.97

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Garten	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1093	21	Ibele, Berthold	Notzenhaus	ca. 1950	2 / 2 / 6	22.05.97
97-1094	21				2 / 2 / 14	22.05.97
97-1095	21				2 / 2 / 22	22.05.97
97-1096	21				2 / 2 / 30	22.05.97
97-1097	21				2 / 2 / 38	22.05.97
97-1098	20	Bentele, Franz	Vorderreute	ca. 1946	5 / 2 / 11	22.05.97
97-1099	20				5 / 2 / 21	22.05.97
97-1100	20				5 / 2 / 31	22.05.97
97-1101	5	Steinhauser, Adelbert	Habacht	ca. 1950	5 / 4 / 9	1996
97-1102	5				5 / 4 / 12	1996
97-1103	5				5 / 4 / 18	1996
97-1104	5				5 / 4 / 31	1996
97-1105	5				5 / 4 / 33	1996
97-1106	5				5 / 4 / 38	1996
97-1107	6	Bernhard, Vinzenz	Brugg	ca. 1960	3 / 4 / -11	1996
97-1108	6				3 / 4 / -17	1996
97-1109	6				3 / 4 / -33	1996
97-1110	6				3 / 4 / -40	1996
97-1111	6				3 / 4 / -52	1996
97-1112	7	Keckeisen, Max	Brochenzell	ca. 1950	5 / 1 / 9	1996
97-1113	7				5 / 1 / 14	1996
97-1114	7				5 / 1 / 20	1996
97-1115	7				5 / 1 / 24	1996
97-1116	7				4 / 7 / 25	1996
97-1117	15	Muth, Norbert	Hübschenberg	ca. 1880	2 / 4 / -6	1996
97-1118	15				2 / 4 / -17	1996
97-1119	15				2 / 4 / -20	1996
97-1120	15				2 / 4 / -27	1996
97-1121	15				2 / 4 / -32	1996
97-1122	16	Luitz, Max	Siggenweiler	ca. 1920	1 / 4 / 8	1996
97-1123	16				1 / 4 / 11	1996
97-1124	16				1 / 4 / 16	1996
97-1125	16				1 / 4 / 24	1996
97-1126	16				1 / 4 / 32	1996
97-1127	12	Bonenberger, Markus	Tettling	ca. 1950	2 / 3 / -9	1996
97-1128	12				2 / 3 / -13	1996
97-1129	12				2 / 3 / -19	1996
97-1130	12				2 / 3 / -25	1996
97-1131	12				2 / 3 / -33	1996
97-1132	12				2 / 3 / -37	1996
97-1133	8	Schiller, Josef	Eriskirch	ca. 1945	2 / 3 / -5	1996
97-1134	8				2 / 3 / -8	1996
97-1135	8				2 / 3 / -10	1996
97-1136	8				2 / 3 / -12	1996
97-1137	8				2 / 3 / -14	1996
97-1138	8				2 / 3 / -20	1996

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungs- nummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Garten	Pflanz- jahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1139	9	Marschall, Theresia	Wolfzennen	ca. 1950	9 / 3 / 9	1996
97-1140	9				9 / 3 / 10	1996
97-1141	9				9 / 3 / 13	1996
97-1142	9				9 / 3 / 17	1996
97-1143	9				9 / 3 / 24	1996
97-1144	29	Ruess, Hans-Leo	Unterteiringen	ca. 1965	3 / 3 / 4	1996
97-1145	29				3 / 3 / 10	1996
97-1146	29				3 / 3 / 15	1996
97-1147	29				3 / 3 / 22	1996
97-1148	29				3 / 3 / 29	1996
97-1149	29				3 / 3 / 39	1996
97-1150	10	Welte, Paul	Kau	ca. 1965	3 / 4 / 13	1996
97-1151	10				3 / 4 / 19	1996
97-1152	10				3 / 5 / 17	1996
97-1153	10				3 / 4 / 23	1996
97-1154	10				3 / 4 / 39	1996
97-1155	1	Heimpel, Johann	Apflau	ca. 1960	1 / 4 / 9	1996
97-1156	1				1 / 4 / 11	1996
97-1157	1				1 / 4 / 17	1996
97-1158	1				1 / 4 / 20	1996
97-1159	1				1 / 4 / 26	1996
97-1160	1				1 / 4 / 29	1996
97-1161	2	Mack, Alois	Apflau	ca. 1960	2 / 3 / 8	1996
97-1162	2				2 / 3 / 12	1996
97-1163	2				2 / 3 / 15	1996
97-1164	2				2 / 3 / 21	1996
97-1165	2				2 / 3 / 26	1996
97-1166	2				2 / 3 / 30	1996
97-1167	3	Lanz, August	Unterlangnau	?	2 / 3 / 9	1996
97-1168	3				2 / 3 / 13	1996
97-1169	3				2 / 3 / 16	1996
97-1170	3				2 / 3 / 17	1996
97-1171	3				2 / 3 / 21	1996
97-1172	3				2 / 3 / 27	1996
97-1173	27	Stohr, Hans	Wilpoltzweiler	ca. 1935	2 / 3 / 11	1996
97-1174	27				2 / 3 / 27	1996
97-1175	27				2 / 3 / 36	1996
97-1176	27				2 / 3 / 42	1996
97-1177	27				2 / 3 / 47	1996
97-1178	18	Martin, Bernhard	Flockenbach	ca. 1950	2 / 5 / -5	1996
97-1179	18				2 / 5 / -8	1996
97-1180	18				2 / 5 / -17	1996
97-1181	18				2 / 5 / -22	1996
97-1182	18				2 / 5 / -25	1996
97-1183	18				2 / 5 / -48	1996

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Garten	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1184	17	Weishaupt, Anton	Matzenhaus	ca. 1965	4 / 6 / 5	1996
97-1185	17				4 / 6 / 11	1996
97-1186	17				4 / 6 / 26	1996
97-1187	17				4 / 6 / 32	1996
97-1188	17				4 / 6 / 42	1996
97-1189	17				4 / 6 / 52	1996
97-1190	21	Ibele, Berthold	Notzenhaus	ca. 1950	3 / 3 / 17	1996
97-1191	21				3 / 3 / 24	1996
97-1192	21				3 / 3 / 30	1996
97-1193	21				3 / 3 / 35	1996
97-1194	21				3 / 3 / 46	1996
97-1195	21				3 / 3 / 55	1996
97-1196	20	Bentele, Franz	Vorderreute	ca. 1946	5 / 3 / 54	1996
97-1197	20				4 / 5 / 40	1996
97-1198	20				4 / 5 / 61	1996
97-1199	20				4 / 4 / 58	1996
97-1200	20				4 / 5 / 82	1996
97-1201	28	Weishaupt, Johann	Gornhofen	ca. 1900	2 / 3 / -39	1996
97-1202	28				2 / 3 / -42	1996
97-1203	28				2 / 3 / -44	1996
97-1204	28				2 / 3 / -49	1996
97-1205	28				2 / 3 / -51	1996
97-1206	22	Baumann, Eugen	Vorderreute	ca. 1930	4 / 3 / 34	1996
97-1207	22				4 / 3 / 53	1996
97-1208	22				4 / 3 / 58	1996
97-1209	22				4 / 3 / 64	1996
97-1210	22				4 / 3 / 69	1996
97-1211	23	Sterk, Benno	Hinterreute	ca. 1935	5 / 3 / 11	1996
97-1212	23				5 / 3 / 14	1996
97-1213	23				5 / 3 / 23	1996
97-1214	23				5 / 3 / 36	1996
97-1215	23				5 / 3 / 44	1996
97-1216	24	Metzler, Georg	Fanhalden	ca. 1955	1 / 3 / 13	1996
97-1217	24				1 / 3 / 22	1996
97-1218	24				1 / 3 / 24	1996
97-1219	24				1 / 3 / 31	1996
97-1220	24				1 / 3 / 38	1996
97-1221	26	Heine, Franz	Billenhaus	ca. 1950	2 / 3 / -5	1996
97-1222	26				2 / 3 / -10	1996
97-1223	26				2 / 3 / -13	1996
97-1224	26				2 / 3 / -22	1996
97-1225	26				2 / 3 / -24	1996

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Gartens	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1226	19	Kling, Hubert	Schierlingen	ca. 1930	7 / 4 / -7	1996
97-1227	19				7 / 4 / -10	1996
97-1228	19				7 / 4 / -12	1996
97-1229	19				7 / 4 / -13	1996
97-1230	19				7 / 4 / -21	1996
97-1231	14	Locher, Karl	Untereisenbach	ca. 1956	3 / 3 / -7	1996
97-1232	14				3 / 3 / -9	1996
97-1233	14				3 / 3 / -15	1996
97-1234	14				3 / 3 / -20	1996
97-1235	14				3 / 3 / -25	1996
97-1236	11	Birkle, Oskar	Wagnerberg	ca. 1958	2 / 3 / 7	1996
97-1237	11				2 / 3 / 11	1996
97-1238	11				2 / 3 / 23	1996
97-1239	11				2 / 3 / 26	1996
97-1240	11				2 / 3 / 29	1996
97-1241	13	Locher, Richard	Missenhardt	ca. 1930	3 / 3 / -9	1996
97-1242	13				3 / 3 / -13	1996
97-1243	13				3 / 3 / -23	1996
97-1244	13				3 / 3 / -31	1996
97-1245	13				3 / 3 / -37	1996
97-1246	9	Marschall, Theresia	Wolfzennen	ca. 1950	9 / 3 / 25	1996
97-1247	25	Schmid, Josef	Kerlenmoos	ca. 1965	1997 gerodet	1996
97-1248	25				1997 gerodet	1996
97-1249	25				1997 gerodet	1996
97-1250	25				1997 gerodet	1996
97-1251	25				1997 gerodet	1996
97-1252	20	Bentele, Franz	Vorderreute	ca. 1946	5 / 2 / 40	22.05.97
97-1253	20				5 / 2 / 50	22.05.97
97-1254	28	Weishaupt, Johann	Gornhofen	ca. 1900	1 / 5 / -39	22.05.97
97-1255	28				1 / 5 / -44	22.05.97
97-1256	28				1 / 5 / -49	22.05.97
97-1257	28				1 / 5 / -54	22.05.97
97-1258	28				1 / 5 / -59	22.05.97
97-1259	22	Baumann, Eugen	Vorderreute	ca. 1930	3 / 3 / 10	22.05.97
97-1260	22				3 / 3 / 20	22.05.97
97-1261	22				3 / 3 / 30	22.05.97
97-1262	22				3 / 3 / 40	22.05.97
97-1263	22				3 / 3 / 50	22.05.97
97-1264	23	Sterk, Benno	Hinterreute	ca. 1935	6 / 2 / 7	22.05.97
97-1265	23				6 / 2 / 14	22.05.97
97-1266	23				6 / 2 / 22	22.05.97
97-1267	23				6 / 2 / 29	22.05.97
97-1268	23				6 / 2 / 38	22.05.97

Anhang 2: Aufstellung der beprobten Pflanzen der Tettlinger Stichprobe. (Fortsetzung)

Erhebungsnummer	Betrieb	Pflanzer	Lage des Gartens	Pflanzjahr	Position Fach/Reihe/Pflanze	Datum der Probenahme
97-1269	24	Metzler, Georg	Fanhalden	ca. 1955	2 / 2 / 6	22.05.97
97-1270	24				2 / 2 / 17	22.05.97
97-1271	24				2 / 2 / 21	22.05.97
97-1272	24				2 / 2 / 27	22.05.97
97-1273	24				2 / 2 / 37	22.05.97
97-1274	26	Heine, Franz	Billenhaus	ca. 1950	2 / 6 / -9	22.05.97
97-1275	26				2 / 6 / -13	22.05.97
97-1276	26				2 / 6 / -21	22.05.97
97-1277	26				2 / 6 / -27	22.05.97
97-1278	26				2 / 6 / -36	22.05.97
97-1279	14	Locher, Karl	Untereisenbach	ca. 1956	4 / 4 / -6	22.05.97
97-1280	14				4 / 4 / -19	22.05.97
97-1281	14				4 / 4 / -27	22.05.97
97-1282	14				4 / 4 / -34	22.05.97
97-1283	14				4 / 4 / -45	22.05.97
97-1284	11	Birkle, Oskar	Wagnerberg	ca. 1958	2 / 5 / 9	22.05.97
97-1285	11				2 / 5 / 20	22.05.97
97-1286	11				2 / 5 / 32	22.05.97
97-1287	11				2 / 5 / 41	22.05.97
97-1288	11				2 / 5 / 50	22.05.97

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis April 2000 am Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim in Stuttgart, Fachbereich Pflanzenzüchtung und Biotechnologie - Prof. Dr. G. Weber, in Zusammenarbeit mit der Landessaatzuchtanstalt, Baden-Württemberg - Dr. C. Kling, erstellt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. G. Weber sowie bei Herrn Dr. C. Kling für die interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und das immer entgegengebrachte Interesse an der Arbeit bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich ebenso Herrn Prof. Dr. A. Pfitzner für die Übernahme des Korreferates der Dissertation.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich beim Ministerium Ländlicher Raum, Baden-Württemberg, und dem Hopfenpflanzerverband Tettngang e.V. In diesem Zusammenhang geht mein ganz besonderer Dank an Herrn Ministerialdirektor R. Arnold, ohne dessen persönliches Engagement dieses Projekt gar nicht erst zustande gekommen wäre, und an Herrn Dr. F. Schulze, der immer mit interessierter Anteilnahme den Fortgang dieser Arbeit verfolgte.

Auf Seiten des Tettnanger Hopfenpflanzerverbandes möchte ich besonders Herrn Dr. B. Locher für seine offene Kooperationsbereitschaft und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen. Ebenso danke ich Herrn F. Wöllhaf und Herrn G. Hurler für ihre tatkräftige und unkomplizierte Unterstützung besonders bei der Probenahme. Sie ließen mich außerdem bereitwillig an ihrem umfangreichen Wissen über Hopfen teilhaben.

Des weiteren danke ich Frau Dipl. Biol. C. Singrün für ihre unermüdliche Hilfe im Labor und bei der Kultur der Stecklinge im Gewächshaus.

Danke ebenso an Herrn Dipl. Agr. C. Horlemann für die Hilfe bei der Auswertung der Fingerabdrücke, die vielen anregenden Diskussionen und seine stete Hilfsbereitschaft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Henrich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die umsichtige Unterstützung in vielen technischen und praktischen Dingen bedanken, der mir immer auch mit brüderlichem Rat zur Seite stand. Vielen Dank auch für die geduldige Durchsicht des Manuskriptes.

Für die Bereitstellung diverser Hopfenproben bin ich Herrn Ohr von der Hopfenverwertungsgenossenschaft Spalt e.G., Herrn Dr. R. Kugel von der Firma Joh. Barth & Sohn, Frau Dr. E. Seigner und Herrn S. Seefelder von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Hüll, Herrn Ing. Josef Pazak vom Hop Research Institute, Zatec, Frau Dr. C. Arnold von der Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg, Illkirch, und dem Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, zu Dank verpflichtet.

Für die Unterstützung bei der kritischen Durchsicht des Manuskriptes bedanke ich mich bei Frau Dr. E. Bauer, Herrn Dr. A. Schwekendiek und meiner lieben Ehefrau M. Fleischer.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik sowie der Landessaatzuchtanstalt, Baden-Württemberg, insbesondere bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Weber, für die kollegiale Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken, die mich dadurch auf die Zeit am Institut mit vielen guten Erinnerungen zurückblicken lassen.

Curriculum vitae

Dipl. Biol. Robert Fleischer

* 16.04.1968 in Winz-Niederwenigern (Hattingen)

Schule

1974 - 1978 Albert-Schweitzer-Grundschule in Kaarst
1978 - 1987 Albert-Einstein-Gymnasium in Kaarst

Berufsausbildung

09/1987 - Rheinische Akademie e.V., Köln
06/1989 Abschluß: Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent

Studium

10/1989 - Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität,
11/1991 Würzburg
Abschluß: Vordiplom

12/1991 - Studium der Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart
10/1996 Fächer: Pflanzenphysiologie, Genetik, Biochemie und Pflanzenzüchtung
Diplomarbeit im Fach Pflanzenzüchtung: „Herstellung und Analyse segmentspezifischer DNA-Bibliotheken von B-Chromosomen bei *Zea mays* L.“
Abschluß: Diplom-Biologe

Promotion

10/1996 - Doktorand der Fakultät II (Biologie), Universität Hohenheim, Stuttgart
04/2000 Erarbeitung der experimentellen Daten für die vorliegende Dissertation am Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Fachbereich „Biotechnologie und Pflanzenzüchtung“

Praktische Tätigkeiten

08/1989 - Insgesamt 32 Wochen Werksstudent bei der Firma EC - Erdölchemie
04/1993 GmbH, Köln, im Bereich „Analytische Laboratorien“

06/1994 - Biotechnologisches Praktikum am Forschungsschwerpunkt „Biotechnologie und Pflanzenzüchtung“ der Universität Hohenheim mit Schwerpunkt
07/1994 Extraktion und Analyse von DNA aus Mais und Bakterien, sowie bakterielle Transformationen

11/2000 - Kaufmännischer Assistent bei der UNIPROF Facility Management
05/2001 GmbH, Stuttgart

seit 06/2001 Wissenschaftlicher Angestellter am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Abteilung Funktionelle Genomanalyse

