

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Leiter: Univ. Prof. Dr. sc. agr. Quendrim Zebeli

**Evaluierung eines molekularen Markers zur Bestimmung des
Cannabinoidchemotyps in *Cannabis sativa L.* anhand eines
umfangreichen Probensatzes**

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades Magister medicinae veterinariae
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Jonathan Mayer

Wien, im Mai 2021

Betreuer:

Ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. nat. techn. Johannes Novak
Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe
Leiter der Arbeitsgruppe Funktionelle Pflanzenstoffe

Begutachter:

Univ. Prof. Dr. rer. nat. Mansour El-Matbouli
Universitätsklinik für Geflügel und Fische
Leiter der klinischen Abteilung für Fischmedizin

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer, Ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. nat. techn. Johannes Novak, von ganzem Herzen bedanken, sowie auch bei Dijana Jovanovic Bsc., die beide stets bemüht waren, Licht in meine Fragestellungen zu bringen und meinem Verständnis gegebenenfalls auf die Sprünge zu helfen. Dank gilt des weiteren Ing. Harry Bein für den reibungslosen Ablauf im Labor.

Ich danke meiner geliebten Familie, allen voran meinen Eltern, Gottfried Mayer und Petra Griebler, für die nie endende Unterstützung, die ich erfahren darf und den felsenfesten Rückhalt, auf den ich mich seit je her verlassen kann.

Besonderer Dank kommt meinen beiden Großmüttern zu, Maria Erhardt und Erika Mayer, die mich während der letzten Jahre großzügig unterstützt haben und von denen Zweitere diese Zeilen leider nicht mehr lesen wird.

Zu guter Letzt sei auch meinem Chef und Mentor, Dr. med. vet. Horst Wagner, gedankt, der mich vor ein paar Jahren unter seine Fittiche nahm, mich seitdem lehrt und einen meiner größten Gönner darstellt.

Danke an alle, die daran teilhaben, dass mein Traum Wirklichkeit wird.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Hypothese	6
1.2 Taxonomie	7
1.3 Botanik der Hanfpflanze	8
1.4 Verwendung von Hanf im geschichtlichen Verlauf und heute	10
1.4.1 Medizinischer Gebrauch	10
1.5 Rechtliche Lage in Österreich	13
1.5.1 Klassifizierung als Suchtgift	13
1.5.2 Cannabinoide in Lebensmitteln und Kosmetika	14
1.6 Cannabinoide und ihre Biosynthese	15
1.7 Molekularbiologische Aspekte	17
1.8 Aufgabenstellung	18
2. Material und Methode	19
2.1 Pflanzenmaterial	19
2.2 DNA-Extraktion	19
2.3 DNA-Amplifikation	21
2.4 Agarosegelelektrophorese	22
2.5 Bestimmung des Chemotyps mithilfe der Gaschromatographie	23
2.5.1 Pflanzenmaterial	23
2.6 Statistische Auswertungen	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Polymerase-Kettenreaktion	25
3.2 Gaschromatographische Analysen	25
3.3 Korrelation der PCR-Ergebnisse zum Chemotyp	31

4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	36
6. Summary	37
7. Literaturverzeichnis	38
7.1 Internetquellen	42
8. Abbildungsverzeichnis	44
9. Tabellenverzeichnis	45
10. Abkürzungsverzeichnis	46
11. Eidesstattliche Erklärung	48

1. Einleitung

1.1 Hypothese

Kaum eine Pflanze dieser Welt wird so vielfältig und kontrovers diskutiert wie der Hanf. Der Hanf (*Cannabis sativa* Linnaeus (L.), Cannabaceae) eine der bereits am längsten kultivierten Pflanzen des Menschen, hat seinen Ursprung in Zentralasien und wächst heute als eine der meist verbreiteten Kulturpflanzen fast überall auf der Welt (Brown 1998, Clarke 1981). Schon seit ein paar tausend Jahren wird *Cannabis* auf vielerlei Weise verwendet - zur Fasergewinnung für Papier, Kleidung und Seile, als Nahrung in Form der Samenschalen, in der Medizin, als Rauschmittel oder zur Ölherstellung (Clarke 1981).

Eines besonderen Interesses erfreut sich schon seit je her das Harz der Pflanze, welches die teils psychoaktiven Cannabinoide enthält (Clarke 1981). Der Großteil ihres psychoaktiven Potenzials ist auf Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC) zurückzuführen (Staginnus et al. 2014). Neben THC ist das nicht psychoaktive *Cannabidiol* (CBD) der wichtigste Vertreter der Cannabinoide, charakteristisch für Faserhanf (Backer et al. 2012).

2021 sind in der EU bereits 73 Nutzhanfsorten für Direktzahlungen beihilfefähig und als solches in einem Sortenkatalog gelistet (AgrarMarkt Austria, 2021). Weiters gelten Blüten und daraus hergestellte Produkte dieser gelisteten Nutzhanfsorten in Österreich nicht als Suchtmittel, solange sie unter 0,3 % THC-Gehalt aufweisen (Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz 2018). Rein morphologisch kann jedoch nicht zwischen ebendiesen und den hunderten zu Suchtmittelzwecken illegal kultivierten Sorten unterschieden werden (Staginnus et al. 2014).

Bezüglich der Cannabinoide kommen im Hanf drei verschiedene Chemotypen (chemische Phänotypen) vor - unterschieden werden ein THC-dominierter, ein intermediärer und ein CBD-dominierter Chemotyp, abhängig von ihrem CBD/THC-Verhältnis, welches in der Pflanze eine über die Zeit konstante Größe darstellt (Backer et al. 2012, Pacifico et al. 2008, Staginnus et al. 2014). Es wird davon ausgegangen, dass der Bildung dieser Chemotypen genetisch ein einziger Locus mit zwei kodominanten Allelen zugrunde liegt, wobei die homozygoten Varianten die THC- und CBD-dominierten und die heterozygote Form den intermediären Phänotypen darstellen (Meijer et al. 2003, Staginnus et al. 2014).

Eine besonders wichtige Rolle in dieser Thematik übernimmt die THCA-Synthase, ein Enzym, das für die Umwandlung von *Cannabigerol* (CBG) in THC-Säure zuständig ist, dem direkten Vorläufer von THC (Taura et al. 1995). Bereits bekannt ist das Gen, welches für dieses Enzym kodiert, sowie auch Polymorphismen innerhalb der Gensequenz (Kojoma et al. 2006, Sirikantaramas et al. 2004). Staginnus et al. zeigten 2014 mithilfe von PCR-Markern, die anhand von Kojoma et al. 2006 veröffentlichter Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP – „single nucleotide polymorphism“) entworfen wurden, dass gewisse SNPs im THCA-Synthase-Gen mit der Expression des THC-dominierten oder des intermediären Chemotyps gekoppelt sind, womit unabhängig von Pflanzenalter und Pflanzenteil (außer Wurzel und Samen) eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Pflanze über ein gewisses Maß hinaus THC ausbildet und somit, ob es sich um eine Nutzhanfsorte oder eine THC-reiche Sorte handelt (Staginnus et al. 2014).

Ziel dieser Arbeit war es, das Bestehen der von Staginnus et al. 2014 entworfenen Marker anhand eines großen Probenumfangs mithilfe von PCR und gegenübergestellter Gaschromatographie zu testen und den Zusammenhang zwischen SNP anzeigendem Marker und Ausbildung eines bestimmten chemischen Phänotyps zu bestätigen.

1.2 Taxonomie

Die Gattung *Cannabis* zählt neben dem Hopfen, *Humulus*, zur Familie der *Cannabaceae*, der Hanfgewächse (Blaschek et al. 2007, Brown 1998). Sowohl der Name der Gattung - *Cannabis* - als auch der der Art - *Cannabis sativa* L - wurden erstmals 1753 in Carolus Linnaeus' (auch Carl von Linné) Werk *Species Plantarum* veröffentlicht (Clarke 1981). Lange wurde über die Nomenklatur der Spezies diskutiert, uneinig, ob die Gattung nun aus mehreren Arten, oder nur aus einer einzigen besteht (Brown 1998). Darüber hinaus war auch die weitere Unterscheidung in Unterarten umstritten (Blaschek et al. 2007).

Small und Cronquist beschrieben 1976 *Cannabis sativa* L. als sehr variable, jedoch einzige Art der Gattung mit den beiden Unterarten *C. sativa* ssp. *sativa* und *C. sativa* ssp. *indica*, die jeweils eine kultivierte und eine wilde bzw. spontane Varietät beinhalten, und schufen mit dieser Annahme die auch bis heute am weitesten verbreitete Ansicht der Nomenklatur von

Cannabis (Brown 1998, Small und Cronquist 1976). In Tabelle 1 kann ein Überblick über ebendiese Systematik gewonnen werden.

Die bekannteste Sichtweise, die von einer polytypischen Gattung ausgeht, ist die Unterteilung in die drei eigenständigen Arten *C. sativa*, *C. indica* und *C. ruderalis* (Schultes und Hoffman 1980).

Tabelle 1 Unterarten und Varietäten von *Cannabis Sativa* L. nach Small und Cronquist (1976) unter Anführung der Namen der erstbeschreibenden Autoren (Brown 1998)

Gattung	<i>Cannabis</i>
Art	<i>Sativa</i>
Unterart	<i>C. sativa</i> L. ssp. <i>sativa</i> (L.) Small et Cronquist <i>C. sativa</i> L. ssp. <i>indica</i> (Lamarck) Small et Cronquist
Varietät	<i>C. sativa</i> L. ssp. <i>sativa</i> (L.) Small et Cronquist var. <i>sativa</i> (L.) Small et Cronquist, Taxon 25 (1976) 421. <i>C. sativa</i> L. ssp. <i>sativa</i> (L.) Small et Cronquist var. <i>spontanea</i> Vavilov, Taxon 25 (1976) 423. <i>C. sativa</i> L. ssp. <i>indica</i> (Lamarck) Small et Cronquist var. <i>indica</i> (Lamarck) Wehmer, Die Pflanzenstoffe (1911) 248. <i>C. sativa</i> L. ssp. <i>indica</i> (Lamarck) Small et Cronquist var. <i>kafiristanica</i> (Vavilov) Small et Cronquist, Taxon 25 (1976) 429.

1.3 Botanik der Hanfpflanze

Als Zugehörige der Hanfgewächse ist *Cannabis* eine einjährige, krautige, meist diözische (zweihäusige) Pflanze, die eine Höhe von bis zu sechs Metern erreichen und unter guten Umständen an einem Tag sieben Zentimeter an Höhe zulegen kann (Clarke 1981). Diözisch bedeutet, männliche Staub- und weibliche Stempelblüten werden von verschiedenen Individuen getragen (Brown 1998). Die aktive Rolle bei der Bestäubung übernimmt hier hauptsächlich der Wind, welcher den Pollenflug initiiert (Bloomquist 1971).

Besonders großen Einfluss auf den Lebenszyklus der Pflanze hat die Tageslänge beziehungsweise die Belichtungsdauer. Während die Tageslänge zum Sommer hin zunimmt,

wächst die Pflanze schnell, werden die Tage jedoch wieder kürzer, leitet sie ab einem kritischen Wert, der sich von Sorte zu Sorte unterscheiden kann, die Blütenbildung ein, was als photoperiodische Induktion bezeichnet wird (Clarke 1981).

Die Teile der Hanfpflanze, die sich über Bodenniveau befinden, tragen Trichome an der Oberfläche, sogenannte Pflanzenhaare, die entweder eine einfache Deck- und Schutzfunktion übernehmen, oder als glanduläre Trichome (Drüsenhaare) ausgebildet sind (Brown 1998). Letztere beinhalten und synthetisieren die für den Hanf typischen phytochemischen Substanzen, die Cannabinoide, auf die in 1.6 näher eingegangen wird (Brown 1998, Sirikantaramas et al. 2005).



Abbildung 1 Blütenstand einer weiblichen Cannabispflanze – Dichte der glandulären Trichome und in weiterer Folge auch Cannabinoidgehalt sind hier am höchsten
(Foto: ©J. Novak, 2020)

1.4 Verwendung von Hanf im geschichtlichen Verlauf und heute

Wie bereits in der Einleitung erwähnt stammt *Cannabis* ursprünglich aus einer Region in Asien, nördlich des Himalayas. Die ältesten schriftlichen Aufzeichnungen über die menschliche Nutzung von *Cannabis* stammen aus dem dritten Jahrtausend v. Chr., verfasst von Kaiser Shen Nung und bestätigen den medizinischen Gebrauch der Pflanze (Brown 1998, Mechoulam 1986). Auf eine Zeit um 1200 v. Chr. hingegen geht die älteste erhaltene Hanfprobe zurück, ein Stück eines chinesischen Grabtuches (Richardson 1988). Vom Gebrauch als Rauschmittel wurde im alten China nichts schriftlich festgehalten, genauso wenig aus dem antiken Rom oder Griechenland, wo der Hanf vor allem zur Seil- und Stoffherstellung genutzt wurde, weswegen angenommen wird, dass der Konsum von *Cannabis* als Droge sich entweder keiner großen Beliebtheit erfreute oder im Sinne der Sitten und Lebenseinstellung dieser Völker nicht besonders angesehen war, wohingegen Indien, das persische und das arabische Reich diesbezüglich auf eine lange Historie zurückblicken (Brown 1998). Das Wort „Haschisch“ stammt vom arabischen Begriff „*hashish al kief*“ ab, was übersetzt „Getrocknetes Kraut der Freude“ bedeutet (Brown 1998).

In Europa wurde *Cannabis* vor und zu Beginn der Neuzeit hauptsächlich der Faser wegen kultiviert, in den östlichen Regionen wie Ukraine, Litauen oder Polen war man vom Hanf als wichtige Nahrungsquelle wie schon im alten China abhängig (Brown 1998).

1937 wurden Besitz, Verkauf und Darreichung der psychoaktiven Teile der Pflanze in den USA verboten, in Österreich erfolgte der Schritt zum Cannabisverbot 1963 (Brown 1998). Heute hingegen ist *Cannabis* in elf von 50 Bundesstaaten der USA legal und entkriminalisiert in 13 weiteren, während sich in Österreich die CBD-Hanfprodukte in den letzten Jahren durchzusetzen scheinen (siehe 1.5.1).

1.4.1 Medizinischer Gebrauch

Einer der Gründe für diese Entwicklung scheint nicht zuletzt wachsendes Verständnis für das enorme medizinische Potenzial der Cannabinoide zu sein. Hervorzuheben ist an dieser Stelle ihre gleichzeitig erstaunlich geringe Toxizität (Dewey 1986). Die Entdeckung endogener Cannabinoidrezeptoren, CB1R und CB2R, und zwei der wichtigsten Endocannabinoide, *Anandamid* und *2-Arachidonylglycerol*, in den 1990er-Jahren waren besonders wegweisend in

der medizinischen Forschung (Devane et al. 1992, Matsuda et al. 1990, Mecha et al. 2020, Mechoulam et al. 1995, Munro et al. 1993).

Neben der psychotropen Wirkung von *Δ9-Tetrahydrocannabinol* wurden noch weitere beschrieben (Blaschek et al. 2007):

- Analgesie

Einerseits wurde bei Krebspatienten nach einer oralen Einzeldosis von 20 mg $\Delta 9$ -THC derselbe schmerzstillende Effekt festgestellt, wie bei 60 – 120 mg *Codein*, andererseits wurde teils auch Hyperalgesie beobachtet, wie zum Beispiel erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Elektroschocks auf der Haut nach Rauchen von Material, welches 12 mg $\Delta 9$ -THC entspricht (Blaschek et al. 2007, Hollister 1986)

CB1- und CB2-Rezeptor spielen beide eine Rolle bei inflammatorisch und neuropathisch mediiertem Schmerz und ihre Agonisten zeigen deutliche Effekte im Tierversuch (Elikkottil et al. 2009). CBD scheint den analgetischen Effekt von THC zu verstärken (Blaschek et al. 2007). Dies zeigen unter anderem auch die guten Behandlungserfolge in der Therapie von Multipler Sklerose mit Präparaten, die ein 1:1-Verhältnis zwischen THC und CBD beinhalten, im Gegensatz zur Verabreichung nur eines dieser Cannabinoide (Mecha et al. 2020).

- Antiemese

15 – 20 mg $\Delta 9$ -THC, zwei Stunden vor, sowie zwei und sechs Stunden nach Applikation einer Chemotherapie, zeigten bei 14 von 20 Patienten eine antiemetische Wirkung im Gegensatz zur Placebogruppe, jedoch sei erwähnt, dass zumeist eine Plasmakonzentration von über 120 ng/mL erzielt werden muss, um einen deutlichen antiemetischen Effekt hervorzurufen, weshalb mit psychotropen Nebenwirkungen zu rechnen ist (Blaschek et al. 2007, Hollister 1986).

- Antiinflammatorische Wirkung

Zunehmend wird klarer, dass Cannabinoide die Immunantwort bei entzündlichen Prozessen beeinflussen, so wurden bereits mehrere Wirkweisen auf verschiedene Zelltypen des Immunsystems im Tierversuch beschrieben (Mecha et al. 2020). Beispiele hierfür sind die Induktion der Apoptose in T-Zellen und die Unterdrückung ihrer Proliferation, wie auch die Hemmung der Bildung verschiedener Zytokine, welche Teil von Entzündungsprozessen sind (Kozela et al. 2011, Lombard et al. 2007,

Mecha et al. 2020, Palazuelos et al. 2008, Rieder et al. 2010, Sánchez und García-Merino 2012).

- Antikonvulsion

Antikonvulsive Eigenschaften wurden bei Δ -9-THC, Δ -8-THC, CBD, CBN und 11-Hydroxy- Δ -8-THC beobachtet (Blaschek et al. 2007).

Patienten, deren antiepileptische Therapie nicht ausreichend wirkte, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Besserung nach zusätzlicher Verabreichung von CBD (Hollister 1986). Das antikonvulsive Potential von CBD wird teils auf Interaktion mit Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanälen der Unterfamilie V Subtyp 1 zurückgeführt, welche Ionenkanäle in sensiblen Nervenzellen darstellen (Gray et al. 2020).

- Antimikrobieller Effekt

In vitro konnte bei Konzentrationen von 1 – 5 μ g/mL sowohl für Δ 9-THC als auch CBD ein bakteriostatischer und bakterizider Effekt auf Staphylo- und Streptokokken nachgewiesen werden (Blaschek et al. 2007, Hollister 1986).

- Endokrinium

Cannabinoide führen zur Verminderung der Spermatogenese und zu einem niedrigen Testosteronspiegel beim Mann (Blaschek et al. 2007, Maykut 1985). Bei der Frau konnten anovulatorische Zyklen beobachtet werden nach Cannabiskonsum über längere Zeit (Blaschek et al. 2007).

- Kardiovaskuläres System

Die Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System äußert sich in einer steigenden Herzfrequenz bis hin zu Tachykardien, wie auch in einer peripheren Vasodilatation (Blaschek et al. 2007, Maykut 1985).

- Neuroprotektion

In Modellen verschiedener Krankheiten und Schäden des zentralen Nervensystems, beispielsweise Alzheimer, Schlaganfälle, Parkinson oder Amyotrophe Lateralsklerose, konnten neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden (García et al. 2011, Kolb et al. 2019, Mecha et al. 2020, Rodríguez-Cueto et al. 2018, Schubert et al. 2019).

- Tumorerregung

Transplantierte Lungentumore konnten durch Δ^9 -THC, Δ^8 -THC (*Δ8-Tetrahydrocannabinol*) und CBN (*Cannabinol*) in vitro und im Tierversuch in ihrem Wachstum gehemmt werden (Blaschek et al. 2007, Dewey 1986, Hollister 1986).

1.5 Rechtliche Lage in Österreich

1.5.1 Klassifizierung als Suchtgift

Generell unterliegt Hanf in Österreich dem Suchtmittelgesetz (SMG) und wird in §27 ff. abgehandelt. Zu Bestrafen ist laut diesem Paragraphen „wer vorschriftswidrig

1. Suchtgift erwirbt, besitzt, erzeugt, befördert, einführt, ausführt oder einem anderen anbietet, überlässt oder verschafft,

2. Opiummohn, den Kokastrauch oder die Cannabispflanze zum Zweck der Suchtgiftgewinnung anbaut...“(Gesamte Rechtsvorschrift für Suchtmittelgesetz, Fassung vom 26.02.2021).

Welche Substanzen *per definitionem* als Suchtgift kategorisiert werden, kann in der Suchtgiftverordnung (SV) nachgelesen werden. Gemäß Anhang I.1.a wird *Cannabis* wie folgt klassifiziert:

„*Cannabis* (Marihuana)

Blüten-oder Fruchtstände der zur Gattung *Cannabis* gehörenden Pflanzen, denen das Harz nicht entzogen worden ist

ausgenommen sind

- die Blüten-oder Fruchtstände jener Hanfsorten, die
 1. im Gemeinsamen Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten gemäß Artikel 17 der Richtlinie 2002/53/EG des Rates vom 13. Juni 2002, ABl. Nr. L193/2002 S.1, oder
 2. in der österreichischen Sortenliste gemäß §65 Saatgutgesetz 1997, BGBl. I Nr. 72/1997, in der geltenden Fassung, angeführt sind und deren Gehalt an *Tetrahydrocannabinol* 0,3% nicht übersteigt,

- Produkte aus Nutzhanfsorten, die im ersten Spiegelstrich angeführt sind, sofern der Gehalt an *Tetrahydrocannabinol* 0,3% vor, während und nach dem Produktionsprozess nicht übersteigt und daraus nicht leicht oder wirtschaftlich rentabel Suchtgift in einer zum Missbrauch geeigneten Konzentration oder Menge gewonnen werden kann, sowie
- die nicht mit Blüten-oder Fruchtständen vermengten Samen und Blätter der zur Gattung *Cannabis* gehörenden Pflanzen.

Cannabisharz (Haschisch)

das abgesonderte Harz der zur Gattung *Cannabis* gehörenden Pflanzen“

(Gesamte Rechtsvorschrift für Suchtgiftverordnung, Fassung vom 26.02.2021).

Unter die eben angeführten Ausnahmen von der SV fallen auch Produkte wie CBD-Öle und Liquids für E-Zigaretten – selbstverständlich nur, solange sie die genannten Anforderungen erfüllen. Ebenfalls nicht als Suchtmittel deklariert ist CBD in Reinsubstanz (Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. 2018).

1.5.2 Cannabinoide in Lebensmitteln und Kosmetika

Cannabinoid enthaltende Produkte gelten, wenn sie in Lebensmitteln oder als Nahrungsergänzungsmittel vorkommen, laut Verordnung (EU) 2283/2015 als neuartige Lebensmittel, welche nur in Verkehr gebracht werden dürfen, wenn sie zugelassen und in der zugehörigen Unionsliste aufgezählt sind. Zum momentanen Zeitpunkt gibt es in diesem Fall jedoch keine solche Zulassung (Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. 2018).

Ebenso wenig zulässig ist ein Inverkehrbringen von *Cannabis* und daraus erzeugten Extrakten in kosmetischen Produkten, was auf die Verordnung (EG) 1223/2009 zurückzuführen ist, in der für kosmetische Mittel verbotene Stoffe gelistet sind, darunter auch natürliche und synthetische Betäubungsmittel. Zu diesen zählt auch *Cannabis* (Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. 2018).

1.6 Cannabinoide und ihre Biosynthese

Als Cannabinoide werden über 60 verschiedene Terpenphenole bezeichnet, die von der Hanfpflanze gebildete Metaboliten darstellen und in der Pflanze meistens in Form ihrer Carbonsäuren vorliegen (Blaschek et al. 2007, Staginuss et al. 2014). Unterteilen lassen sich diese in mehrere Typen, bedingt durch ihren Terpenanteil (Blaschek et al. 2007, Brown 1998):

- *Cannabigerol*-Typ
- *Cannabidiol*-Typ
- Δ -9-*trans-Tetrahydrocannabinol*-Typ
- Δ -8-*trans-Tetrahydrocannabinol*-Typ
- *Cannabichromen*-Typ
- *Cannabicyclol*-Typ
- *Cannabielsoin*-Typ
- *Cannabinol*-Typ
- *Cannabinodiol*-Typ
- *Cannabitriol*-Typ

Als Vorstufe für alle anderen Cannabinoide dient Cannabigerolsäure (CBGA – en. *cannabigerolic acid*), welche ihrerseits mithilfe enzymatischer Reaktionen aus Olivetolsäure und Geranylpyrophosphat gebildet wird (Clarke 1981). Durch die beiden Enzyme THCA-Synthase, welches die Tetrahydrocannabinolsäure (THCA – en. *tetrahydrocannabinolic acid*) produziert, und CBDA-Synthase, seinerseits zuständig für die Produktion der Cannabidiolsäure (CBDA – en. *cannabidiolic acid*), wird in weiterer Folge der Umbau von CBGA induziert (Degenhardt et al. 2017). Die Biosynthese von THC und CBD wird in Abbildung 2 veranschaulicht.

Auch Umweltfaktoren können darüber hinaus die Produktion weiterer Cannabinoide verursachen. So entstehen aus THCA durch Oxidation CBNA (en. *cannabinolic acid*; dt. Cannabinolsäure) oder CBLA (*cannabicyclolic acid*; dt. Cannabicyclolsäure) aus CBCA unter Aussetzung von UV-Licht. (Degenhardt et al. 2017)

Der Verlust der Carboxylgruppe und somit Übergang von Carbonsäure in die aktivere Form eines Cannabinoids erfolgt durch Decarboxylierung (Brown 1998, Wang et al. 2016). Dies kann einerseits schnell durch Hitzeeinwirkung (z.B. Verbrennen) oder über Zeit durch extrinsische Faktoren wie Licht und Sauerstoff geschehen (Wang et al. 2016).

Besonders oft von Interesse ist die Ermittlung des Gehalts an Δ^9 -THC, auch als *Dronabinol* bezeichnet, einer Größe, die sehr stark von Faktoren wie Entwicklungsstadium, Nährstoffen und Licht abhängt, was der Vergleichbarkeit von Individuen verschiedener Populationen in so manchem Fall im Wege steht (Staginnus et al. 2014, Toonen et al. 2006). Das CBD/THC-Verhältnis hingegen stellt einen während des gesamten Lebenszyklus' der Pflanze annähernd konstanten und von externen Einflüssen unberührten Wert da (Backer et al. 2012, Pacifico et al. 2008, Staginnus et al. 2014).

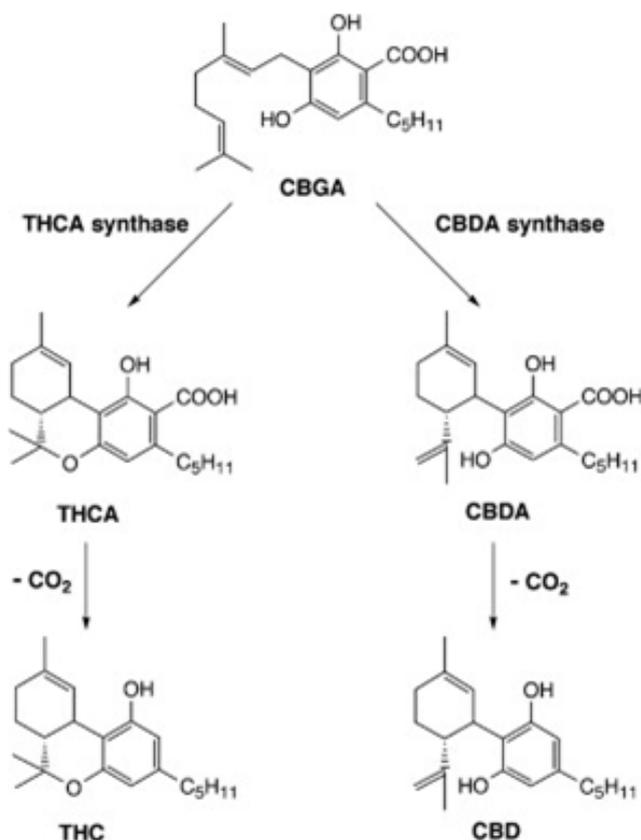


Abbildung 2 Biosynthese von THC und CBD (Taura et al. 2007)

1.7 Molekularbiologische Aspekte

Wie bereits unter 1.1 kurz erwähnt, werden drei chemische Phänotypen unterschieden. Entscheidend hierfür ist das CBD/THC-Verhältnis, so weisen Individuen des THC-dominierten Chemotyps einen Quotienten von 0,00 bis 0,05 auf, während solche des CBD-dominierten Typs Werte von 15 bis 25 erreichen. Ein Verhältnis zwischen 0,5 und 3 spricht für den intermediären Chemotyp (Staginnus et al. 2014).

Dem zugrunde liegt ein Genlocus mit zwei kodominanten Allelen, hier als Xa und Xb bezeichnet, wobei die homozygote Form Xa/Xa den THC-dominierten, Xb/Xb den CBD-dominierten und die heterozygote Variante Xa/Xb den intermediären Phänotypen darstellen (Meijer et al. 2003). Somit tragen Pflanzen, die ein gewisses Maß an THC-Gehalt überschreiten, mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest ein Xa-Allel, während CBD-dominierte Hanfsorten als Xb/Xb auftreten (Staginnus et al. 2014).

Eine Schlüsselrolle nimmt hier das Enzym THCA-Synthase ein, maßgeblich beteiligt am Umbau von CBGA in THCA (Taura et al. 1995). Ein 1635 Nukleotide langer DNA-Abschnitt, das THCA-Synthase-Gen, kodiert für ein 545 Aminosäuren langes Polypeptid, von dem ein 28 Aminosäuren langes Signalpeptid abgespalten wird, um das 517 Aminosäuren lange Enzym zu schaffen (Sirikantaramas et al. 2004). Das Vorhandensein bestimmter Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb dieser Gensequenz geht Hand in Hand mit der Expression entweder des THC-dominierten oder intermediären Chemotyps – alternative, nicht aktive Varianten des Gens führen dazu, dass die Bildung der THCA-Synthase ausbleibt und betroffene Individuen kaum THC ausbilden (Staginnus et al. 2014). Der genetische Marker D589, entwickelt von Staginnus et al. 2014, ist einer der verantwortlichen SNPs.

Auf diese Weise ist es möglich, zwischen Nutzhanfsorten vom Fasertyp und illegalen THC-reichen Sorten zu differenzieren.

CANNDAT, ein Projekt der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, des BKA Wien und des LKA Rheinland-Pfalz, hat sich die Erstellung einer Datenbank zum Ziel gesetzt, welche die Kriminaltechnik mit Informationen über die Cannabinoidchemotypen, gewonnen aus Versuchen mithilfe des erwähnten D589 Markersystems, versorgen soll (KIRAS Sicherheitsforschung 2021).

1.8 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es, das Markersystem D589 zur Feststellung des Cannabinoidchemotyps von Cannabis (KIRAS Sicherheitsforschung 2021) an einem großen Datensatz verschiedener Cannabisherkünfte unter Anwendung einer einfachen PCR mit Auswertung auf Gelelektrophorese zu überprüfen.

2. Material und Methode

2.1 Pflanzenmaterial

Der Probenumfang bestand aus 286 Cannabispflanzen aus 48 Akzessionen, zur Verfügung gestellt von der Genbank des Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, einer der größten Genbanken für Kulturpflanzen weltweit (Börner 2007).

Die Pflanzen wurden im Glashaus der Veterinärmedizinischen Universität angezogen und Blattmaterial für die DNA-Extraktion im Jungpflanzenstadium gewonnen.

2.2 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der Pflanzen-DNA wurde die CTAB-Methode gewählt (Schmiderer et al. 2013).

$\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ cm² frisch getrocknetes, grünes Pflanzenmaterial der einzelnen Proben – hier kann von reichlich DNA guter Qualität ausgegangen werden – wurde in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Zugabe einiger Glaskügelchen in der Retsch-Mühle 3 Minuten lang bei 30 Hz vermahlen, während ein Mastermix wie folgt hergestellt und im vorgeheizten Wasserbad einige Minuten auf 65°C temperiert wurde:

<u>Chemikalie</u>	<u>Pipettiervolumen pro Probe</u>
CTAB-Extraktionspuffer	950 µl
BME	0,95 µl
10% SDS	41 µl
Proteinase K	4,1 µl
PVP 40	10 mg

Nach Zugabe von 950 µl Mastermix wurden die Proben im Wasserbad bei 65°C 30 Minuten lang verdaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 405 µl Chloroform/Isoamylalkohol (IAA), sobald die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren. Eine 5 Minuten lange Zentrifugation bei 13000 rpm folgte darauf und den dabei entstandenen Überstand überführte man vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß. Erneut wurden 405 µl Chloroform/IAA zugefügt und darauffolgenden Schritte wiederholt, wodurch zirka 0,9 µl Überstand in einem neuen Eppendorf-Gefäß übrigblieben.

Für die Fällung wurden die Extrakte mit 540 µl Isopropanol überschichtet, bei -20 °C für 30 Minuten tiefgekühlt gelagert, erneut 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen.

Im Anschluss wurden die verbliebenen DNA Pellets gewaschen. Hierzu muss man die Pellets nach Zugabe von 950 µl „Wash 1“ aufklopfen, aufschütteln und erneut 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren. Dieser Schritt wird im Anschluss mit 950 µl „Wash 2“ wiederholt und die DNA-Pellets daraufhin bei 60°C getrocknet.

Um die DNA zu lösen, wurden 40 µl TE-Puffer-Lösung pH 8 zugegeben und über Nacht im Kühlschrank belassen.

Die angeführten, für die DNA-Extraktion verwendeten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

- 10% SDS-Lösung (10%SDS)

100 g SDS (Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat) in ca. 80 ml dd H₂O lösen, dann mit dd H₂O auf 1000 ml bringen

- 10 mg/ml Proteinase K

100 mg Proteinase K in 10 ml autoklaviertem dd H₂O lösen. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen Aliquots von 600 µl einfrieren (-20 °C)

- 1M Tris pH 8

121 g Trizma Base in 750 ml dd H₂O lösen, conc. HCl bis zum pH 8 zufügen (etwa 49 ml HCl), mit dd H₂O auf 1000 ml bringen und autoklavieren

- TE pH 8(10 mM Tris pH8 und 1 mM EDTA pH8)

10 ml 1M Tris pH 8 und 2ml 0,5M EDTA pH8 mit dd H₂O auf 1000 ml bringen und autoklavieren

- Extraktionspuffer (EB)

41 g NaCl und 10 g CTAB in 1 l TE pH8 lösen. Bei jeder Extraktion wird pro 1 ml EB 1 µl β-Mercaptoethanol (BME) frisch hinzugefügt

- Chloroform/IAA 24:1

480 ml Chloroform mit 20 ml Isoamylalkohol (IAA) mischen.

- 10mg/ml RNase A

100 mg RNase A in 10 ml autoklaviertem dd H₂O lösen. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen Aliquots von 50 µl einfrieren(-20°C)

- 70% EtOH 22 mM NH₄Cl (Wash1)

1,16 g NH₄Cl in 1 l Meßkolben bringen, 700 ml Ethanol (EtOH) dazu, mit dd H₂O auf 1 l auffüllen.

- 70% EtOH (Wash2)

700 ml Ethanol plus 300 ml dd H₂O

2.3 DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion fand mithilfe eines ProFlex PCR Systems Cyclers statt.

Die verwendeten Marker waren die von Staginnus et al. 2014 entwickelten PCR-Primer, D589 (F: 5' CCTGAATTCGACAATAACAAAATCTTAGATTCAT 3';

R: 5'ACTGAATATAGTAGACTTTGATGGGACAGCAACC 3') (Staginnus et al. 2014).

Als Polymerase wurde eine Taq-Polymerase gewählt und DNA-Extrakte der Proben wurden 1:20 verdünnt. Die Temperatur der Primerhybridisierung wurde mit dem Tm Calculator

(<https://www.thermofisher.com/at/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>) mit 56°C bestimmt.

Der Ablauf der PCR erfolgte nachfolgendem Protokoll entsprechend:

95°C 15 Minuten

56°C 45 Sekunden

72°C 60 Sekunden

95°C 45 Sekunden

56°C 45 Sekunden Dieser mittlere Zyklus läuft 40-mal in Folge ab

72°C 90 Sekunden

72°C 9 Minuten

Für 50 Proben, welche nach dem ersten Lauf schwache Banden zeigten, wurde die PCR mit verlängerten Zeiten wie folgt wiederholt:

95°C	15 Minuten	
56°C	60 Sekunden	
72°C	120 Sekunden	
<hr/>		
95°C	60 Sekunden	
56°C	60 Sekunden	Dieser mittlere Zyklus läuft 40-mal in Folge ab
72°C	120 Sekunden	
<hr/>		
72°C	10 Minuten	

Als Kontrolle wurde eine separate PCR mit den Primern ITS 1 und 2 (*internal transcribed spacers* – zum Nachweis der ribosomalen Pflanzen-DNA) durchgeführt (Staginnus et al. 2014).

Für jene PCRs galt dies:

95°C	15 Minuten	
56°C	45 Sekunden	
72°C	90 Sekunden	
<hr/>		
95°C	45 Sekunden	
56°C	45 Sekunden	Dieser mittlere Zyklus läuft 40-mal in Folge ab
72°C	90 Sekunden	
<hr/>		
72°C	9 Minuten	

2.4 Agarosegelelektrophorese

Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von 1,4%-Agarosegel, welches zuerst hergestellt werden muss. Dazu wurden 150 ml Milli-Q-Wasser mit 1,92g Agarose vermischt, zum Sieden gebracht und mithilfe eines Magnetührstabes drei Minuten in einem Wasserbad gerührt und leicht abgekühlt. Während dieser drei Minuten wurden 3µl des Fluoreszenzfarbstoffes

„peqgreen“ hinzugegeben und im Anschluss das noch heiße, flüssige Gel in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen, welcher bereits mit den charakteristischen Kunststoffkämmen versehen war, die beim 30 Minuten später erstarrten Gel die Taschen bilden.

Nachdem der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingelegt und ungefähr ein bis zwei Millimeter mit SB-Puffer bedeckt worden war, wurden 4µl Probe mit Loading Dye vermengt und damit die Taschen geladen. Als Referenz wurden zusätzlich die erste und letzte Tasche jeder Reihe mit 2µl 100bp-Basenpaarleiter geladen. Der Deckel der Elektrophoresekammer wurde aufgesetzt und die Elektrophorese lief 50 Minuten bei 120 V und 400 mA ab.

Um die Ergebnisse sichtbar zu machen, wurden die fertigen Gelbilder unter fluoreszierendem Durchlicht in einem Biostep Felix Dark Hood Dh-50 betrachtet und mit einer Canon-EOS-Kamera dokumentiert.

2.5 Bestimmung des Chemotyps mithilfe der Gaschromatographie

2.5.1 Pflanzenmaterial

Zur Bestimmung des Chemotyps wurde die Blüten der Pflanzen geerntet und bei 35°C im Trockenschrank (Memmert) getrocknet.

2.5.2 Extraktion

1g getrocknete Blütenstand wurden mit 10 ml Dichlormethan im Ultraschallbad 15 Minuten lang extrahiert, durch einen Faltenfilter abfiltriert und 1 ml in ein GC-Vial überführt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.5.3 Gaschromatographie

Die Analyse wurde auf einem 7890A Gaschromatograph der mit einem massenselektiven Detektor 5975 VL und einem Flammenionisationsdetektor gekoppelt war (beide Agilent Technologies) durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit dem Trägergas Helium auf einer HP5-MS Säule (30m Länger, 0.25mm Säuleninnendurchmesser, 0.25µm Beschichtungsdicke). Weitere Geräteparameter: 1 µl Injektionsvolumen, Split 1:10, Injektortemperatur: 280°C, Temperaturprogramm: von 140°C bis 320°C mit 10°C/min., MS-Transfertemperatur: 280°C.

Die Cannabinoide wurden mit der hauseigenen Spektrenbibliothek und publizierten Retentionsindizes bestimmt.

2.6 Statistische Auswertungen

Bei den Cannabinoiden kommt es im heißen Injektor zu teilweisen Umlagerungen von THC-Säure und CBD-Säure zu THC bzw. CBD. Zur Ermittlung des THC/CBD-Verhältnisses wurden daher TCH-Säure und THC bzw. CBD-Säure und CBD zu Gesamt-THC bzw. Gesamt-CBD zusammengerechnet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm R Version 4.0.1 unter RStudio Version 1.3.959 (R Core Team 2014, RStudio Team 2020).

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist es, das Markersystem D589 zur Feststellung des Cannabinoidchemotyps von Cannabis (KIRAS Sicherheitsforschung 2021) an einem großen Datensatz verschiedener Cannabisherkünfte unter Anwendung einer einfachen PCR mit Auswertung auf Gelelektrophorese zu überprüfen. Den Ergebnissen der PCR wird eine Einteilung in Chemotypen gegenübergestellt, die auf der Analyse mit GC/MS basiert.

3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Aus den gesamt 286 Proben aus 48 Akzessionen lieferten 261 (91%) in der PCR eine Bande (sollte THC- und Intermediärtyp entsprechen, in weiterer Folge als „positiv“ bezeichnet) und 25 Proben (9%) keine Bande (sollte dem CBD-Typ – mit nur sehr geringem THC-Gehalt – entsprechen, in weiterer Folge als „negativ“ bezeichnet). Die Spannweite an negativen Proben innerhalb einer einzelnen Akzession erstreckte sich von 0 bis 3 (3 von 9 in den Akzessionen 21 und 37), während sie bei den positiven von 1 bis 9 (9 von 9 in den Akzessionen 2,10,20,22,23 und 28) reichte. Neben der Klassifizierung der Bande in „vorhanden/nicht vorhanden“ fielen 50 Proben durch schwache Banden auf. Die wiederholten Läufe dieser Proben mit verlängerten Zykluszeiten zeigte eine deutliche Verstärkung der Banden bei allen betroffenen Proben. Weiteren Aufschluss über die Ergebnisse der PCR für die einzelnen Akzessionen gibt Tabelle 2.

3.2 Gaschromatographische Analysen

Gaschromatographisch bestimmt, wiesen die 286 Proben im Durchschnitt einen CBD-Gehalt von 69 ± 36 % (von 1,8 % bis 97,2 %). Der aus den Mittelwerten der einzelnen Akzessionen gemittelte CBD-Gehalt pro Akzession lag bei 74 % (2,5 % - 96,4 %), die Standardabweichung betrug hier im Schnitt 15 % (0,07 % - 63,4 %).

Das mittlere CBD/THC-Verhältnis ergab einen Wert von 13,47 (0,02 - 32,98) mit einer zugehörigen Standardabweichung von 11,13. In Relation zur einzelnen Akzession wurde ein Mittelwert von 14,76 (0,03 – 26,89) erreicht, hier machte die Standardabweichung durchschnittlich 5,86 (0,006 - 17,634) aus. Tabelle 3 gewährt einen Überblick über die das CBD/THC-Verhältnis betreffenden Werte, aufgelistet nach Akzessionen und unter Berücksichtigung der einzelnen Spannweiten.

Darüber hinaus konnten, bedingt durch die Höhe ihres CBD/THC-Quotienten, insgesamt 57 Individuen dem THC-dominierten Cannabinoidchemotyp zugeordnet werden, während 58 weitere den Anteil des intermediären chemischen Phänotyps darstellen. 171 Individuen und somit der Großteil zählen zum CBD-dominierten Chemotyp.

In Abbildung 3 ist anstatt des Verhältnisses CBD/THC das Verhältnis $\text{CBD}/(\text{CBD}+\text{THC})$ zu sehen, wobei die Proben in absteigender Reihenfolge dargestellt sind. Durch die beiden Lücken sind die beiden Chemotypen und ihre intermediäre Form deutlich voneinander abgegrenzt.

Tabelle 2 Übersicht der PCR-Ergebnisse pro Akzession

Akzession	Häufigkeit	PCR negativ	PCR positiv
1	10	2	8
2	9	0	9
3	7	2	5
4	7	1	6
5	9	0	9
6	3	0	3
7	8	1	7
8	6	0	6
9	8	1	7
10	9	0	9
11	1	0	1
12	4	1	3
13	3	0	3
14	2	0	2
15	3	0	3
16	6	1	5
17	8	0	8
18	1	0	1
19	4	0	4
20	9	0	9
21	9	3	6
22	9	0	9
23	9	0	9
24	9	1	8
25	6	0	6
26	2	0	2
27	8	0	8
28	9	0	9
29	6	1	5
30	8	0	8
31	1	0	1
32	9	1	8
33	8	1	7
34	2	0	2
35	2	0	2
36	8	0	8
37	9	3	6
38	6	0	6

39	9	1	8
40	2	0	2
41	3	1	2
42	4	0	4
43	2	0	2
44	4	1	3
45	8	2	6
46	5	0	5
47	7	1	6
48	5	0	5
Mittelwert	5,958	0,521	5,438
Gesamt	287	25	261

Tabelle 3 Durchschnittliches CBD/THC-Verhältnis pro Akzession unter zusätzlicher Berücksichtigung zugehöriger Standardabweichung und Spannweite

Akzession	Häufigkeit	Mittelwert CBD/THC	Stabw. CBD/THC	Min. CBD/THC	Max. CBD/THC
1	10	19,94	3,15	15,42	26,27
2	9	6,73	8,88	0,04	19,78
3	7	21,81	2,46	18,12	25,43
4	7	20,24	9,11	1,33	29,62
5	9	0,16	0,07	0,05	0,26
6	3	22,30	2,18	20,55	24,75
7	8	19,59	11,23	1,30	26,24
8	6	15,66	11,53	0,55	24,75
9	8	26,44	4,09	23,03	32,98
10	9	9,61	10,41	0,19	22,48
11	1	14,60		14,60	14,60
12	4	5,24	8,56	0,82	18,08
13	3	21,74	2,43	19,39	24,25
14	2	23,76	0,97	23,08	24,45
15	3	23,78	3,25	20,51	27,00
16	6	26,89	3,05	22,46	29,96
17	8	18,66	11,83	0,07	28,37
18	1	24,47		24,47	24,47
19	4	0,05	0,04	0,02	0,10
20	9	0,04	0,02	0,02	0,08
21	9	24,96	3,06	18,50	28,57
22	9	0,03	0,01	0,02	0,04
23	9	8,70	10,07	0,06	21,57
24	9	3,03	6,78	0,02	21,01
25	6	9,67	12,87	1,15	26,82
26	2	27,03	0,53	26,65	27,40
27	8	13,32	9,97	1,12	21,52
28	9	18,83	6,97	1,51	24,92
29	6	16,01	7,75	0,84	22,38
30	8	12,76	9,80	0,16	21,03
31	1	26,15		26,15	26,15
32	9	6,10	9,92	0,72	24,60
33	8	25,58	2,69	21,51	29,41
34	2	23,37	2,48	21,62	25,12
35	2	12,54	17,63	0,07	25,01
36	8	25,67	4,76	20,90	34,48
37	9	12,12	9,15	0,05	21,71
38	6	7,72	11,02	0,04	22,52
39	9	0,03	0,01	0,02	0,05
40	2	7,17	9,29	0,61	13,74
41	3	16,56	4,39	12,55	21,26

42	4	7,78	5,25	0,66	13,18
43	2	13,05	0,97	12,37	13,74
44	4	24,38	0,89	23,38	25,51
45	8	10,25	10,95	0,13	27,75
46	5	22,69	3,41	18,15	27,66
47	7	10,18	9,15	0,99	21,48
48	5	1,26	0,80	0,70	2,67
Mittelwert	5,96	14,76	5,86	8,68	21,15

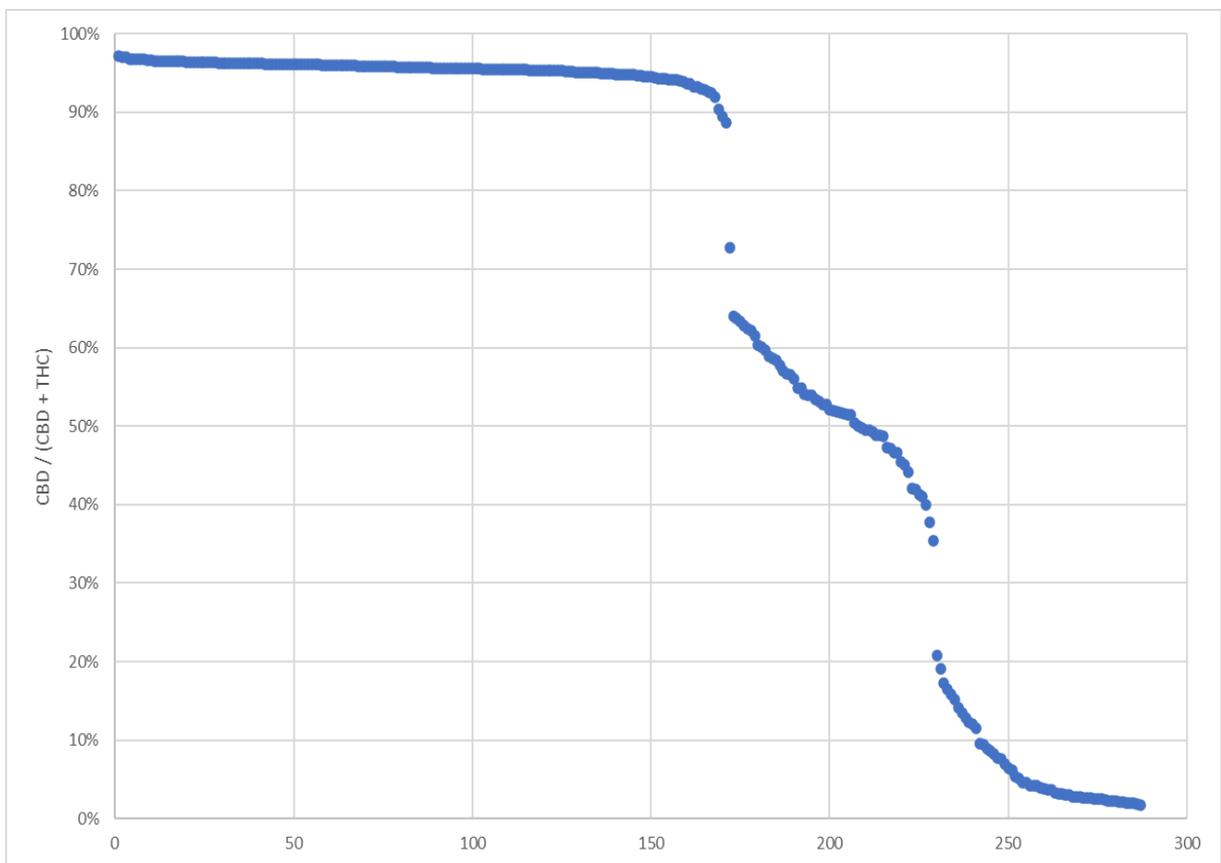


Abbildung 3 Reihung der Proben nach absteigenden CBD/(CBD+THC)-Werten – auf den ersten Blick kann die Spaltung der Probenmenge in die drei Cannabinoidchemotypen erkannt werden

3.3 Korrelation der PCR-Ergebnisse zum Chemotyp

Individuen vom THC-dominierten Chemotyp wurden mit einer Präzision von 98,3 % von der PCR als positiv erkannt (56 aus 57), beim intermediären Typ bezog sich dieser Wert auf 94,8 % (55 aus 58). Der prozentuale Anteil der falsch negativen PCR-Resultate bezogen auf die Gesamtheit aller Proben liegt somit bei 1,7 % (5 aus 287),

Aus den 171 Proben jedoch, die dem CBD-dominierten Chemotyp unterliegen, erbrachten nur 21 ein negatives Testergebnis, was bedeutet, dass 87,8 % (150 aus 171) dieser Proben und in weiterer Folge 52,5 % des gesamten Probensatzes falsch positiv getestet wurden.

Neben den normalen Banden gab es eine Gruppe von 50 Proben, die nur eine schwache Bande zeigte. 48 der 50 Proben waren vom CBD-Chemotyp. Selbst nachdem man diese 48 Proben mit schwacher Bande der Gruppe ohne Bande zurechnete, verbesserte sich das Ergebnis nur unwesentlich von 12% auf 43%.

Obwohl die Ergebnisse sehr klar waren, wurde zur statistischen Untermauerung ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt (Tabelle 4). Die Nullhypothese besagte, das Auftreten richtiger Ergebnisse komme bei THC-dominierten und intermediären Individuen genauso oft vor, wie bei CBD-dominierten. Der Chi-Quadrat-Wert lag bei 193,61, während der kritische Chi-Quadrat-Wert bei 2 Freiheitsgraden und einer Risikowahrscheinlichkeit α von 0,05 bei 5,991 liegt und daher die Nullhypothese abgelehnt wird.

Tabelle 4 Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests

	beobachtete Werte		Summe
	falsches Ergebnis	richtiges Ergebnis	
THC	2	56	58
Intermed.	3	55	58
CBD	150	21	171
Summe	155	132	287

	erwartete Werte		Chi ²		
THC	31,32	26,68	27,45	32,23	
Intermed.	31,32	26,68	25,61	30,07	
CBD	92,35	78,65	35,99	42,26	193,61

4. Diskussion

Die Expression dreier verschiedener Cannabinoidchemotypen, wie von Staginnus et al. 2014 beschrieben, konnte auch in unserem Fall gaschromatographisch bestätigt werden, wie in Abbildung 3 deutlich zu erkennen ist, wobei das Verhältnis CBD/(CBD+THC) günstiger zur Beurteilung des Chemotyps war als das Verhältnis CBD/THC. Die Grenzwerte scheinen dabei in etwa im Bereich von 30 % und 80 % CBD/(CBD+THC) zu liegen.

Zwar zeigte der Marker D589 eine Sensitivität – richtig positiv / (richtig positiv + falsch negativ) – von 96,5 %, jedoch fällt vor allem die hohe Zahl der falsch positiv getesteten Proben auf, auf die besonderes Augenmerk gelegt werden muss. Es war möglich, den THC- und den Intermediärtyp mithilfe des Markers D589 mit einer Sicherheit von 97% zu erkennen, allerdings konnten nur 12% der Proben des CBD-Typs mit diesem Marker richtig bestimmt werden. In dieser Form ist der Nachweis natürlich nicht für eine Bestimmung des Chemotyps geeignet.

Zu diskutieren gilt zunächst die Möglichkeit von Fehlerquellen. Um die Ursachen solcher im Falle der vorliegenden Ergebnisse zu eruieren, liegt es nahe, Abweichungen im Aufbau unseres Experiments gegenüber dem 2014 von Staginnus et al. durchgeführten zu erörtern.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Arbeiten liegt in der Detektion des Amplikons. Während Staginnus et al. (2014) eine Kopplung des molekularen Markers D589 mit einem HEX-Fluoreszenzfarbstoff wählten, entschieden wir uns für eine einfache Detektion im Agarosegel mit einem interkalierenden Farbstoff. Die Fluoreszenzdetektion mit HEX-markierten Markern erlaubt natürlich eine höhere Sensitivität, sowie auch eine quantitative Auswertung, wohingegen unser Experiment, in welchem versucht wurde, dieselben Ergebnisse in einer gewöhnlichen Singleplex-PCR zu erzielen, eine rein qualitative Aussage tätigt, indem eine Bande auf dem Gel entweder zu sehen ist oder nicht. Möglicherweise könnten diese anhand eines HEX-Farbstoffes eindeutig von den positiven Proben abgegrenzt werden.

Allerdings war in unserem Ansatz doch eine gewisse weitere Differenzierung neben Bande vorhanden/nicht vorhanden zu sehen, nämlich schwach sichtbare, aber doch deutliche Banden. Wenn man diese Proben dem CBD-Typ zurechnete, verbesserte sich das Ergebnis

nur von 12% auf 43% richtig erkannte Proben des CBD-Typs. Durch Veränderung der PCR-Zykluszeiten war es möglich, aus den schwachen Banden starke Banden zu generieren. Dies zeigt den starken Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Methode und somit eine geringe Robustheit der Methode.

Einen weiteren Punkt, in dem sich die beiden Arbeiten unterscheiden, welcher darüber hinaus vermutlich am wahrscheinlichsten zum Scheitern des Rekonstruierens von Resultaten, wie sie Staginnus et al. 2014 veröffentlichten, beiträgt, stellen die für die PCR gewählten Temperaturen dar. Die Primerhybridisierung lief in diesem Experiment bei 56 °C ab, während Staginnus et al. eine Temperatur von 62 °C wählten. Diese Differenz von 6 °C könnte dazu führen, dass der Primer in unserem Fall bedeutend weniger spezifisch arbeiten konnte, was den Schluss der fehlenden Robustheit dieser Methode nahelegen würde. Nach Überprüfung der Primerhybridisierungstemperatur des Primersets mit mehreren Programmen zeigte sich, dass sich die von den verschiedenen Programmen vorgeschlagenen Temperaturen sehr stark unterscheiden.

Auch dieser Ansatz ginge gut mit der zuvor erwähnten Beobachtung bezüglich der fast ausschließlich falsch positiven Individuen unter den Proben, die schwache Banden zeigten, einher. Aufgrund der niedrigen Annealing-Temperatur konnte der Marker doch an der Mutationsstelle binden und somit ungewollt das Produkt bilden.

Unter Unterlassen der Berücksichtigung von Fehlermöglichkeiten muss darüber hinaus der eher unwahrscheinliche Fall in Betracht gezogen werden, dass die von Staginnus et al. (2014) gewählten spezifischen Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb der Sequenz des THCA-Synthase-Gens, welche besagter Marker D589 adressiert, nicht ausreichend zwingend mit der Ausprägung eines bestimmten Cannabinoidchemotyps einhergehen, und somit eine Aussage auf der alleinigen Basis des Resultates dieser PCR-Testung nicht als sicheres Testergebnis angesehen werden kann.

Schlussfolgernd bleibt zu erwähnen, dass die Resultate zwar stark von den Erwartungen abweichen, diese Arbeit jedoch auf anderweitigem Wege interessanten Aufschluss über den molekularen Marker D589 gibt.

Um jedoch behaupten zu können, die Methode sei nicht – wie hier – vereinfacht in Form einer Singleplex-PCR erfolgreich durchzuführen, müsste zuvor die Frage nach der Robustheit der Methode in Bezug auf das Temperatur- und Zeitprotokoll der PCR abgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

Die Differenzierung von Pflanzen der Art *Cannabis sativa* L. in drei Cannabinoidchemotypen, einen THC-dominierten, einen CBD-dominierten und einen Typ intermediär zwischen THC und CBD, abhängig von einem Genlocus mit zwei kodominanten Allelen, der über die Ausbildung des Enzyms THCA-Synthase bestimmt, führte dazu, dass ohne Rücksicht auf Pflanzenalter oder äußere Einflüsse nehmen zu müssen, mit einem molekularen Marker zwischen Hanf vom Fasertyp und solchem vom Drogentyp unterschieden werden kann. Der molekulare Marker D589, entworfen und veröffentlicht von Staginnus et al. (2014), bindet an spezifische Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb der Gensequenz des THCA-Synthase-Gens und amplifiziert somit nur Pflanzen, die entweder an einem oder an beiden Allelen eine funktionelle THCA-Synthase ausbilden (intermediär oder THC-dominiert). Dies bedeutet, dass mit diesem Marker zwischen Drogen- (THC und Intermediär) und Fasertyp (CBD-Typ) unterschieden werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand eines großen, von der Genbank Gatersleben Deutschland zur Verfügung gestellten Probensatzes die Ergebnisse von Singleplex-PCR und gaschromatographischer Analyse gegenübergestellt und interpretiert.

Die erbrachten Resultate zeigten ein durchaus unerwartetes Bild. Während THC- und Intermediärtyp korrekt identifiziert wurde, war die Fehlerrate beim CBD-Typ enorm hoch. Wie sehr die Fehlerrate durch die abweichenden Parameter (Primerhybridisierungstemperatur und Detektion des Amplikons) zwischen Staginnus et al. (2014) und unserem Ansatz bedingt ist, muss noch weiter abgeklärt werden. Wie sich durch Veränderung der PCR-Zykluszeiten gezeigt hat, ließ sich das Ergebnis schon dadurch stark beeinflussen.

Trotz Abweichung der Ergebnisse von den Erwartungen, konnten durch die Unterschiede im Aufbau und Ablauf der Versuche interessante Erkenntnisse gewonnen werden, die ihrerseits jedoch wiederum neue Fragestellungen aufwerfen, etwa in Bezug auf Robustheit der Methode oder auch auf das Bestehen beziehungsweise Nichtbestehen der Möglichkeit, diese Methode in vereinfachter Form ohne qPCR-Gerät mit Detektion auf einem Agarosegel erfolgreich durchführen zu können.

6. Summary

Cannabis sativa L. is characterized by valuable plant secondary compounds only present in this genus, the cannabinoids. The differentiation into three cannabinoid chemotypes, a THC-dominant, a CBD-dominant type and a type with both THC and CBD at similar levels, depend on the variation of one gene locus with two codominant alleles, which determines the expression of the enzyme THCA synthase. The genetic variation led to the idea to distinguish between hemp of the fibre type (CBD type) and the drug type (THC and intermediary type) without having to take plant age or external influences into consideration. The molecular marker D589, designed and published by Staginnus et al. 2014, binds to specific single nucleotide polymorphisms within the gene sequence of the THCA synthase gene and thus recognises plants that carry the predisposition to synthesize THC in larger amounts and therefore belong to the drug type.

In this work, the results of PCR with detection on agarose gel and gas chromatographic analysis were compared and interpreted on the basis of a large set of samples provided by the Gatersleben gene bank (Germany).

The results showed a quite unexpected picture. Particularly noticeable appeared not only the high number of false positives alone, but also the gap between the precise recognition of the drug-type hemp and the high error rate in individuals of the fibre-type, producing the drug-type amplicon. Our observations support the theory that this could be due to a possible tendency to amplify the drug-type amplicon when a certain annealing temperature falls below a certain value.

Despite the deviation of the results from the expectations, interesting findings were obtained due to the differences in the set-up and procedure of the experiments, which in turn, however, raise new questions, for example, with regard to the robustness of the method or about the difficulty to perform this method in a simplified environment without qPCR.

7. Literaturverzeichnis

Backer B de, Maebe K, Verstraete AG, Charlier C. 2012. Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type cannabis cuttings and seedlings during growth of plants. *Journal of forensic sciences*, 57 (4): 918–922. DOI 10.1111/j.1556-4029.2012.02068.x.

Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V, Hrsg. 2007. *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. Sechste Auflage*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Bloomquist ER. 1971. *Marijuana the second step (Revised Edn)*. Glencoe Press.

Börner A (2006) Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. *Biotechnology Journal* 1:1393–1404. <https://doi.org/10.1002/biot.200600131>

Brown DT. 1998. *Cannabis. The genus Cannabis*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 308.

Clarke RC. 1981. *Marijuana Botany*. Berkeley, Kalifornien, USA: Ronin Publishing, 239.

Degenhardt F, Stehle F, Kayser O. 2017. The Biosynthesis of Cannabinoids. In: Preedy VR, *Handbook of cannabis and related pathologies. Biology, pharmacology, diagnosis, and treatment*. London, San Diego: Elsevier Academic Press, 13–23.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258 (5090): 1946–1949. DOI 10.1126/science.1470919.

Dewey WL. 1986. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological Reviews*, (38(2)): 151–178.

Elikkottil J, Elikottil J, Gupta P, Gupta K. 2009. The analgesic potential of cannabinoids. *Journal of opioid management*, 5 (6): 341–357.

- García C, Palomo-Garo C, García-Arencibia M, Ramos J, Pertwee R, Fernández-Ruiz J. 2011. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *British journal of pharmacology*, 163 (7): 1495–1506. DOI 10.1111/j.1476-5381.2011.01278.x.
- Gray RA, Stott CG, Jones NA, Di Marzo V, Whalley BJ. 2020. Anticonvulsive Properties of Cannabidiol in a Model of Generalized Seizure Are Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Dependent. *Cannabis and cannabinoid research*, 5 (2): 145–149. DOI 10.1089/can.2019.0028.
- Hollister LE. 1986. Health aspects of cannabis. *Pharmacological Reviews*, 38 (1): 1–20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3520605/>.
- Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T. 2006. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. *Forensic science international*, 159 (2-3): 132–140. DOI 10.1016/j.forsciint.2005.07.005.
- Kolb B, Saber H, Fadel H, Rajah G. 2019. The endocannabinoid system and stroke: A focused review. *Brain circulation*, 5 (1): 1–7. DOI 10.4103/bc.bc_29_18.
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z. 2011. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *British journal of pharmacology*, 163 (7): 1507–1519. DOI 10.1111/j.1476-5381.2011.01379.x.
- Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti P. 2007. CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clinical Immunology*, 122 (3): 259–270. DOI 10.1016/j.clim.2006.11.002.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346 (6284): 561–564. DOI 10.1038/346561a0.

Maykut MO. 1985. Health consequences of acute and chronic marihuana use. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 9 (3): 209–238. DOI 10.1016/0278-5846(85)90085-5.

Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Feliú A, Mestre L, Guaza C. 2020. Perspectives on Cannabis-Based Therapy of Multiple Sclerosis: A Mini-Review. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14: 34. DOI 10.3389/fncel.2020.00034.

Mechoulam R. 1986. *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50 (1): 83–90. DOI 10.1016/0006-2952(95)00109-D.

Meijer EPM de, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni V, Ranalli P, Mandolino G. 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 2003 Jan; 163(1):335-46.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365 (6441): 61–65. DOI 10.1038/365061a0.

Pacifico D, Miselli F, Carboni A, Moschella A, Mandolino G. 2008. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*, 160 (2): 231–240. DOI 10.1007/s10681-007-9543-y.

Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzmán M, Nataf S, Galve-Roperh I. 2008. The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 283 (19): 13320–13329. DOI 10.1074/jbc.M707960200.

Richardson PM. 1988. *Flowering Plants - Magic in Bloom*. London: Burke Publishing Co.

- Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology*, 215 (8): 598–605. DOI 10.1016/j.imbio.2009.04.001.
- Rodríguez-Cueto C, Santos-García I, García-Toscano L, Espejo-Porras F, Bellido M, Fernández-Ruiz J, Muñoz E, Lago E de. 2018. Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1G93A transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical Pharmacology*, 157: 217–226. DOI 10.1016/j.bcp.2018.07.049.
- Sánchez AJ, García-Merino A. 2012. Neuroprotective agents: cannabinoids. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 142 (1): 57–67. DOI 10.1016/j.clim.2011.02.010.
- Schmiderer C, Lukas B, Novak J. 2013. Effect of different DNA extraction methods and DNA dilutions on the amplification success in the PCR of different medicinal and aromatic plants. *Journal of Medicinal and Spice Plants*, (18(2)): 65–72.
- Schubert D, Kepchia D, Liang Z, Dargusch R, Goldberg J, Maher P. 2019. Efficacy of Cannabinoids in a Pre-Clinical Drug-Screening Platform for Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 56 (11): 7719–7730. DOI 10.1007/s12035-019-1637-8.
- Schultes RE, Hoffman A. 1980. *The botany and chemistry of hallucinogens*. Springfield, Illinois, USA: Charles C. Thomas.
- Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, Ishikawa Y, Wada Y, Shoyama Y, Taura F. 2004. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *The Journal of biological chemistry*, 279 (38): 39767–39774. DOI 10.1074/jbc.M403693200.
- Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, Ishikawa Y, Morimoto S, Shoyama Y. 2005. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant & cell physiology*, 46 (9): 1578–1582. DOI 10.1093/pcp/pci166.
- Small E, Cronquist A. 1976. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, (25): 405-435.

Staginnus C, Zörntlein S, Meijer E de. 2014. A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of forensic sciences*, 59 (4): 919–926. DOI 10.1111/1556-4029.12448.

Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Yoshikai K, Shoyama Y, Morimoto S. 2007. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS letters*, 581 (16): 2929–2934. DOI 10.1016/j.febslet.2007.05.043.

Taura S, Morimoto S, Shoyama Y. 1995. First direct evidence for the mechanism of D-1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis.

Toonen M, Ribot S, Thissen J. 2006. Yield of illicit indoor cannabis cultivation in the Netherlands. *Journal of forensic sciences*, 51 (5): 1050–1054. DOI 10.1111/j.1556-4029.2006.00228.x.

Wang M, Wang Y-H, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, Parcher JF, ElSohly MA, Khan IA. 2016. Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis and cannabinoid research*, 1 (1): 262–271. DOI 10.1089/can.2016.0020.

7.1 Internetquellen

AgrarMarkt Austria. 2021.

Hanfsortenliste 2021, Quelle: Gemeinsamer Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten der EU

https://www.ama.at/getattachment/823c61cf-84cb-4cb3-8b01-8186158f9164/Hanfsortenliste_2021.pdf (Zugriff 26.02.2021)

Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. 2018.

CBD- und Hanfprodukte. anzuwendende Bestimmungen und rechtliche Beurteilung

https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/Lebensmittel/Cannabinoid/Information_-_Hanf-_und_CBD-Produkte_%2819.10.18%29.pdf?7vjan5 (Zugriff 26.02.2021)

Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. 2018.

Erlass

https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/Lebensmittel/Cannabinoid/Erledigung_Erlass_LH_BMASGK-75100_0020-IX_B_16a_2018_04.12.2.pdf?7vjan5 (Zugriff 26.02.2021)

Gesamte Rechtsvorschrift für Suchtgiftverordnung, Fassung vom 26.02.2021

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung/Bundesnormen/10011053/SV%2c%20Fassung%20vom%2026.02.2021.pdf> (Zugriff 26.02.2021)

Gesamte Rechtsvorschrift für Suchtmittelgesetz, Fassung vom 26.02.2021

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung/Bundesnormen/10011040/SMG%2c%20Fassung%20vom%2026.02.2021.pdf> (Zugriff 26.02.2021)

KIRAS Sicherheitsforschung. 2021

CANNDAT

<https://www.kiras.at/gefoerderte-projekte/detail/d/canndat/> (Zugriff 26.02.2021)

R Core Team (2014).

R: A language and environment for statistical computing.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

<http://www.R-project.org/> (Zugriff 26.02.2021)

RStudio Team (2020).

RStudio: Integrated Development for R. RStudio,

PBC, Boston, MA

<http://www.rstudio.com/>. (Zugriff 26.02.2021)

Thermo Fisher Scientific 2021

Tm Calculator

<https://www.thermofisher.com/at/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (Zugriff 26.02.2021)

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Blütenstand einer weiblichen Cannabispflanze.....	9
Abbildung 2 Biosynthese von THC und CBD	16
Abbildung 3 Reihung der Proben nach absteigenden CBD/(CBD+THC)-Werten.....	30

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Unterarten und Varietäten von Cannabis Sativa L. nach Small und Cronquist	8
Tabelle 2 Übersicht der PCR-Ergebnisse pro Akzession	27
Tabelle 3 Durchschnittliches CBD/THC-Verhältnis pro Akzession.....	29
Tabelle 4 Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests.....	32

10. Abkürzungsverzeichnis

ABl.	Amtsblatt
BGBI.	Bundesgesetzblatt
BKA Wien	Bundeskriminalamt Wien
BME	β -Mercaptoethanol
CBCA	Cannabichromensäure; en. <i>cannabichromenic acid</i>
CBD	<i>Cannabidiol</i>
CBDA	Cannabidiolsäure; en. <i>cannabidiolic acid</i>
CBG	<i>Cannabigerol</i>
CBGA	Cannabigerolsäure; en. <i>cannabigerolic acid</i>
CBLA	Cannabicyclicsäure; en. <i>cannabicyclic acid</i>
CBN	<i>Cannabinol</i>
CBNA	Cannabinolsäure; en. <i>cannabinolic acid</i>
CB1R	Cannabinoidrezeptor 1
CB2R	Cannabinoidrezeptor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure; en. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
ff.	Fortfolgende
HCl	Salzsäure
IAA	Isoamylalkohol
ITS	internal transcribed spacer
LKA Rheinland-Pfalz	Landeskriminalamt Rheinland-Pfalz
NaCl	Kochsalz; <i>Natriumchlorid</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMG	Suchtmittelgesetz
SNP	Einzelnukeotidpolymorphismus
ssp.	Subspezies
Stabw.	Standardabweichung
SV	Suchtgiftverordnung

THC	<i>Δ-9-Tetrahydrocannabinol</i>
THCA	Tetrahydrocannabinolsäure; en. <i>tetrahydrocannabinolic acid</i>
v. Chr.	vor Christus
var.	Varietät
Δ8-THC	<i>Δ-8-Tetrahydrocannabinol</i>

11.Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Quellen angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.