

## Brakteentrichome und ihre Beziehung zum Cannabinoidgehalt zweier Faserhanfsorten

UTE MENGE-HARTMANN und FRANK HÖPPNER

Institut für Pflanzenbau

### Einleitung

In einer vorhergehenden Arbeit wurde der Einfluß variiert Stickstoffdüngung auf die Höhe des psychoaktiven Potentials der Faserhanfsorten Felina 34 und Kompolti Hybrid TC in zweijährigen Freilandversuchen geprüft (Höppner und Menge-Hartmann, 1996). Dabei wurde der Gehalt der psychoaktiven Komponente delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und ein weiteres Hauptcannabinoid des Hanfs, das Cannabidiol (CBD), während der Pflanzenentwicklung gaschromatographisch bestimmt. Diese Untersuchungen wurden nun durch die Analyse der anatomischen Strukturen erweitert, in denen die Cannabinoide lokalisiert sind. Deren Synthese erfolgt im wesentlichen in zwei bis drei Typen von Drüsenhaaren, die sich organspezifisch und in unterschiedlicher Dichte auf der Epidermis von Sprossen, Blättern und Hüllblättern (Brakteen) der Blüten und Früchte verteilen (Mahlberg et al., 1984). Die höchsten Cannabinoidgehalte in diesen Organen wurden in den Brakteen gefunden und ihr Cannabinoidgehalt korrelierte mit der Menge zweier Drüsenhaartypen (Mahlberg et al., 1984; Petri et al., 1988).

In der vorliegenden Untersuchung sollte nun der Einfluß veränderter Umweltbedingungen, wie unterschiedliche Stickstoffdüngungsniveaus, auf diese Strukturen des Cannabinoid-Sekretsystems und deren Auswirkung auf den Cannabinoidgehalt der Brakteen geprüft werden. Da nach Berichten von Gorskova (1988) und Petri et al. (1988) vorläufige Prognosen des THC-Gehalts und damit des psychoaktiven Potentials von Hanfpflanzen aufgrund von Drüsenhaardichte und -typ (Petri et al. sprechen von „Haschisch-Trichomen“) möglich erscheinen, wurde auch die Beziehung zwischen der Konzentration eines spezifischen Cannabinoids, wie des Tetrahydrocannabinols, und spezifischen Drüsenhaaren der Brakteen untersucht.

### Material und Methoden

Für die Analyse der Trichom(Pflanzenhaar)strukturen der Brakteen der beiden Faserhanfsorten Felina 34 (monözisch, mittelfrüh; FNCP, Frankreich, aufgeführt im gemeinsamen Sortenkatalog für landwirtschaftliche Pflanzenarten der EU, 1989) und Kompolti Hybrid TC (diözisch, spät reifend; Ungarn) waren die Feldversuchsbedingungen identisch mit denjenigen für die Untersuchung der Biomasse-, Faser- und Fruchterträge in den Jahren 1992 und 1993 (Höppner und Menge-Hartmann, 1994) und die Untersuchung des delta-9-Tetrahydrocannabinol- und des Cannabidiolgehaltes während der Pflanzenentwicklung (Höppner und Menge-Hartmann, 1996).

Die Probenahme erfolgte in dreifacher Wiederholung aus der mittleren Bestandesdichte (BD2 = angestrebte Aussaatstärke von 250 Pfl./m<sup>2</sup>) und den Stickstoffstufen: „ohne Stickstoff“ (N0), 60 kg N/ha (N60) und 120 kg N/ha (N120). Zur Untersuchung der Drüsenhaarpopulation und -dichte der Brakteen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (ISI 60, Beschleunigungsspannung von 10 kV, Winkel von 10°) wurden pro Versuchsglied von 5 Pflanzen insgesamt 5 ausdifferenzierte Brakteen zu beginnender Fruchtreife entnommen, d. h. vier Wochen nach dem Ende der männlichen Blüte und bei Druckfestwerden erster Achänen von 50 % der weiblichen und/oder hermaphroditen Pflanzen (de Meijer et al., 1992).

Die Brakteen wurden 12 h bei 4 °C mit Formaldehyd-Glutaraldehyd fixiert (Karnovsky, 1965; 4 % bzw. 2,5 %, 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,8), nach Aceton-Entwässerung einer „Kritisch-Punkt-Trocknung“ unterzogen (Reimer und Pfefferkorn, 1977) und schließlich mit Gold besputtert (Edwards Sputter Coater S 150B).

Auf Fotos von der Mitte des Brakteen-„Rückens“ wurde bei 150facher Endvergrößerung auf 0,25 mm<sup>2</sup> großen Flächen der Interkostalfelder (pro Braktee 2 bis 5 n) die Anzahl der verschiedenen Trichome ermittelt.

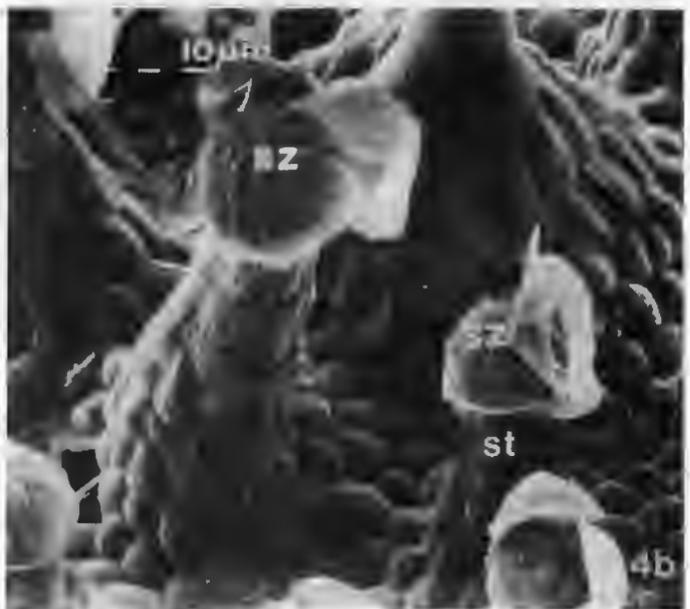
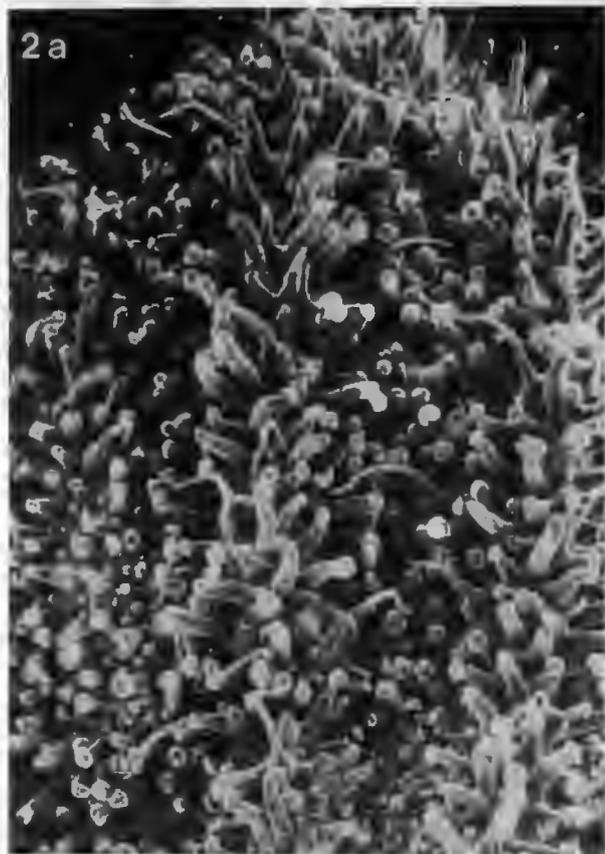
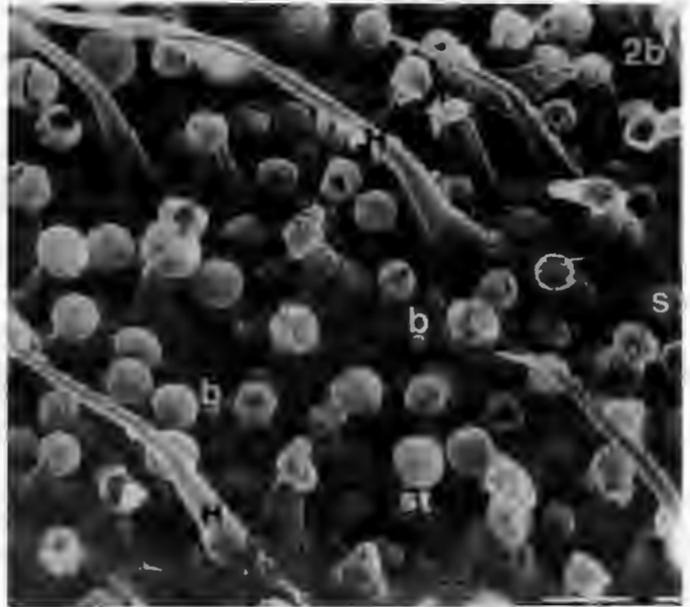
Ausgewertet wurden Brakteen gleicher Entwicklungsstadien von Kompolti Hybrid TC der Jahre 1992 und 1993, von Felina 34 standen jedoch nur Proben von 1993 zur Verfügung. 1992 wurden die Brakteen von Felina 34 drei Wochen zu früh (s. u.) geerntet und konnten daher nicht in den statistischen Vergleich der Sorten und Jahre einbezogen werden.

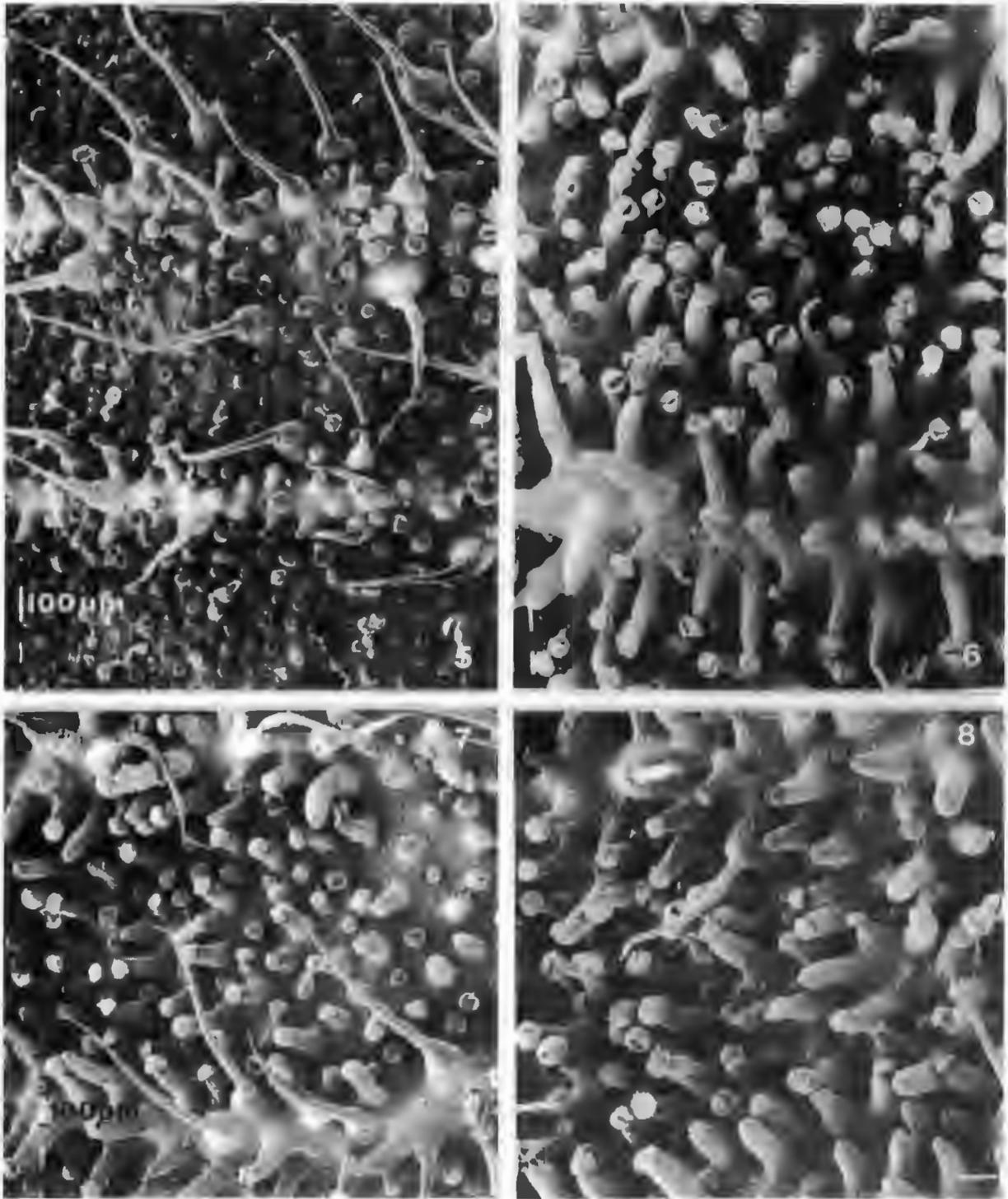
Varianzanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SAS durchgeführt. Mittelwertvergleiche der Haupteffekte zur Prüfung auf Signifikanz erfolgten mit dem Duncan-Test, wobei mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte jeweils nicht signifikant voneinander unterschieden waren. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von P=0,05 zugrundegelegt.

### Ergebnisse und Diskussion

#### Trichomtypen von Hanfbrakteen

Die abachsialen Brakteenoberflächen der Blüten und Früchte der beiden hier untersuchten Faserhanfsorten waren von drei Drüsenhaartypen bedeckt: 1. kurzgestielten, bulbösen mit einem Durchmesser von 25 - 30 µm, 2. ungestielten mit 40 - 60 µm sowie 3. gestielten Drüsenhaaren mit bis zu 100 µm Durchmesser der Drüsenköpfe (Abbildung 1: junge Braktee, Abbildung 2 a: ausdifferenzierte Braktee, Abbildung 2 b: Detail mit bulbösen (b), ungestielten (s) und gestielten (st) Drüsenhaaren). Während die bulbösen und ungestielten Drüsen auch auf vegetativen Organen





- ← Abbildung 1: **Junge Braktee mit langen Hakenhaaren (H)**  
 ← Abbildung 2a: **ausdifferenzierte Braktee**  
 ← Abbildung 2b: **Detail mit bulbösen (b), ungestielten (s) und gestielten (st) Drüsenhaaren**  
 ← Abbildung 3: **ungestielte und gestielte Drüsen mit transparentem Sekret (Durchlicht)**  
 ← Abbildung 4a: **gestieltes Drüsenhaar mit intaktem Sekretsack**  
 ← Abbildung 4b: **gestieltes Drüsenhaar mit aufgerissenem Sekretsack, SZ = multizelluläre Scheibe sekretorischer Zellen**
- ↑ Abbildung 5: **Drei Wochen zu früh geerntete Braktee von Felina 34 des Jahres 1992**  
 ↑ Abbildung 6: **„reife“ Braktee von Felina 34 des Jahres 1993**  
 ↑ Abbildungen 7 und 8: **„reife“ Brakteen von Kompolti Hibrid TC der Jahre 1992 bzw. 1993 (stets bei 120 kg N/ha)**

und Blütenachsen auftreten, finden sich die hochentwickelten gestielten Drüsenformen nur auf in Beziehung zu Blüte und Frucht stehenden Organen, d. h. auf den Brakteen und den Laubblättern der fertilen Stengelabschnitte (Turner et al., 1977). Daneben treten die großen charakteristischen Hanf-Hakenhaare (H) ohne sekretorische Aktivität auf.

Das sekretorische Produkt der ungestielten und gestielten Drüsenhaare akkumuliert sich in einem einzigen Sekretsack (Abbildung 3, s, st) unter einer speziellen Wandschicht, die sich über einer multizellulären Scheibe sekretorischer Zellen während der Drüsenentwicklung bildet (Hammond und Mahlberg, 1978; Lanyon et al., 1981; Kim und Mahlberg, 1991). Abbildung 4a zeigt einen intakten Drüsenkopf (st) von Felina 34 und Abbildung 4b solche, bei denen die gegenüber mechanischen Verletzungen sehr empfindliche Wandschicht des Sekretsacks aufgerissen ist und das harzige Sekret durch organische Lösungsmittel während der Präparation entfernt wurde. Hierdurch wird die multizelluläre Scheibe sekretorischer Zellen (SZ) sichtbar.

Durch die gaschromatographische Analyse des Sekrets individueller Drüsenköpfe konnte von Mahlberg et al. (1984) nachgewiesen werden, daß das Sekret der ungestielten und der gestielten Drüsenhaare neben Mono- und Sesquiterpenen eine Reihe von terpenphenolischen Komponenten, den Cannabinoiden, inklusive des Tetrahydrocannabinols (THC), enthält. Hierbei befand sich die Hauptmenge der Cannabinoide in den Köpfchen der gestielten Drüsenhaare, geringere Konzentrationen in den ungestielten Drüsen. Der aufgrund der Drüsenhaarpopulation geschätzte Gehalt an Cannabinoiden stimmte relativ gut mit dem gaschromatographisch analysierten Gehalt überein. Es zeigte sich also, daß die ungestielten und die gestielten Drüsenhaare auf den Brakteen den größten Anteil der Cannabinoide einer Braktee erzeugen konnten.

#### Einfluß von Sorte und N-Düngung auf die Trichompopulation der Brakteen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der 7 bis 8 mm langen Brakteen von Felina 34 und von Kompolti Hybrid TC und die Auswertung der Drüsenhaarpopulation und -dichte fanden in dem für die Untersuchung der vorliegenden Fragestellung geeignetsten Stadium statt, der beginnenden Fruchtreife. Die Brakteen waren ausdifferenziert und mit transparenten, leicht klebrigen, „reifen“ Drüsenhaarköpfen besetzt (vgl. Turner et al., 1977, gealterte Drüsen: gelb, mit dichterem, klebrigem Inhalt; seneszente Drüsen: mit rotem, getrocknetem Kopf

und stark vermindertem Cannabinoid-Gehalt) und hatten gleichzeitig den maximalen THC- sowie Gesamtcannabinoid-Gehalt während ihres Entwicklungsverlaufs erreicht (Höppner und Menge-Hartmann, 1996, dort in Abbildung 3 und 5, THC-Gehalte der Brakteen mit Kennzeichnung „beginnende Frucht-reife“).

1992 wurden die Brakteen von Felina 34 aus noch mangelnder Kenntnis des für die THC-Analyse geeigneten Stadiums drei Wochen zu früh geerntet (s. Material und Methoden) und waren daher noch nicht ausdifferenziert und ihr THC-Gehalt nicht maximal. Offensichtlich erfolgte in dieser Phase eine weitere Zellstreckung, denn die Anzahl der ungestielten und der bulbösen

	ungestielte Drüsen	gestielte Drüsen	Summe ungestielter und gestielter Drüsen	THC + CBD (% in TM)	bulböse Drüsen	Hakenhaare
Kompolti H. TC, 1992, Z 1	21	10	31	0,46 + 0,52 = 0,98	4	1
Felina 34 1992	16	12	28	0,12 + 1,20 = 1,32	3	1
Felina 34 1993	3 b	12 b	15 b	0,21 + 1,56 = 1,77	1 a	1 a
Kompolti H. TC, 1993	a 9 a	b 13 a	a 22 a	1,38 + 1,09 = 2,47	a 1 a	a 1 a
Kompolti H. TC, 1992, Z 2	b 8	a 15	a 23	1,06 + 1,34 = 2,40	a 2	a 1

Tabelle: Trichome pro Flächeneinheit der Brakteen von Kompolti Hybrid TC und Felina 34 der Jahre 1992 und 1993 über alle N-Düngungsstufen (rechts stehende Buchstaben beziehen sich auf Unterschiede zwischen Sorten, links stehende auf Jahre)

Drüsen sowie der Hakenhaare pro Flächeneinheit war zwei- bis viermal so hoch wie bei den „reifen“ Brakteen des Jahres 1993 (Abbildungen 5 und 6, Tabelle). Gleiche Beobachtungen wurden auch 1992 bei drei Wochen vor dem optimalen Zeitpunkt zusätzlich geernteten Brakteen von Kompolti Hybrid TC mit noch nicht maximalem THC-Gehalt (Tabelle, Kompolti H. TC, 1992, Z1) im Vergleich mit ausdifferenzierten Brakteen desselben Jahres (Kompolti H. TC, 1992, Z2) mit maximalem THC-Gehalt beobachtet. Auffällig war jedoch hierbei, daß die Anzahl eines Drüsentyps, und zwar der gestielten Drüsenhaare, im finalen Entwicklungsverlauf der Brakteen mit zunehmendem THC-Gehalt zunahm.

Die Dichte der gestielten und insbesondere der ungestielten Drüsenhaare sowie die Summe beider Drüsentypen war im Jahr 1993 bei der Sorte Kompolti Hybrid TC über alle N-Stufen signifikant höher als bei der Sorte Felina 34 (Tabelle, Summe 22 bzw. 15 Drüsenhaare/Flächeneinheit; Abbildungen 6 und 8). Entsprechend ergab die gaschromatographische Analyse der beiden Cannabinoide Tetrahydrocannabinol und Cannabidiol signifikant höhere Gehalte für Kompolti Hybrid TC als für Felina 34 (Höppner und Menge-Hartmann, 1996; THC+CBD 2,47 % bzw. 1,77 %). Diese Beobachtungen stimmen mit denen

Turners et al. (1981) überein, die bei mehreren Hanfklonen eine positive Korrelation der Menge ungestielter und gestielter Drüsen der Brakteen mit der Gesamtmenge ihrer Cannabinoide fanden.

Anhand der Dichte eines einzelnen Drüsentyps ließ sich jedoch wie bei Turner et al. keine deutliche Beziehung zu einem spezifischen Cannabinoid, z. B. dem psychoaktiven THC, herstellen. So war die Anzahl der gestielten Drüsenhaare bei Kompolti Hybrid TC mit 1,38 %igem und Felina 34 mit 0,21 %igem THC-Gehalt der Brakteen (Höppner und Menge-Hartmann, 1996) mit 13 bzw. 12 Drüsen pro Flächeneinheit recht ähnlich (Tabelle).

Der Einfluß der Stickstoff-Düngung auf die Brakteen von Felina 34 und Kompolti Hybrid TC war im niederschlagsreichen Jahr 1993 gleichartig (Abbildung 9). In der höchsten N-Stufe bildeten beide Sorten, wenn auch nur geringfügig, so doch signifikant mehr gestielte Drüsen pro Brakteenflächeneinheit aus als in den anderen Düngungsstufen, dasselbe gilt für die Summe aus ungestielten und gestielten Drüsen. Lediglich in der Tendenz wurde hingegen unter dem Einfluß zunehmender N-Düngung ein Anstieg bei den gaschromatographisch ermittelten THC- und CBD-Gehalten der Brakteen sowie der Summe aus CBD- und THC-Gehalt beobachtet (Höppner und Menge-Hartmann, 1996). Offensichtlich wirkten sich die zwar signifikanten, jedoch nur relativ geringen Unterschiede in der Drüsenhaardichte zwischen den Düngungsstufen nicht in signifikanten Unterschieden in den Cannabinoidgehalten aus.

Im sommertrockenen, warmen Jahr 1992 nahm die Drüsenhaardichte der Brakteen bei Kompolti Hybrid TC nicht wie 1993 mit zunehmender N-Düngungsintensität zu, sondern die ungedüngten Pflanzen wiesen eine signifikant höhere Dichte auf als die gedüngten Pflanzen (Abbildung 9). Der THC-Gehalt unterschied sich jedoch auch 1992 zwischen allen drei N-Stufen nicht signifikant (Höppner und Menge-Hartmann, 1996). Im

Vergleich der beiden Anbaujahre über alle N-Stufen wies die Sorte Kompolti Hybrid TC unter den trockeneren Bedingungen des Jahres 1992 auf ihren Brakteen eine etwas höhere Dichte gestielter Drüsenhaare auf als 1993 (Tabelle). Im niederschlagsreicheren Jahr 1993 waren die Drüsenhaare insbesondere auf den kräftiger ausgebildeten Blattnerven der Brakteen überwiegend besser entwickelt und hatten längere und dickere Schäfte als 1992 (Abbildungen 7 und 8). Trotz dieser Unterschiede war in beiden Jahren die Gesamtsumme aus ungestielten und gestielten Drüsenhaaren/Flächeneinheit (Tabelle, 23 bzw. 22 Drüsen) und auch die Summe der THC- und CBD-Gehalte gleich (2,40 bzw. 2,47 %). Gegenüber 1992 war jedoch 1993 eine Verschiebung zu höheren THC-Gehalten (1,06 bzw. 1,38 %) und möglicherweise verbunden damit zu niedrigeren CBD-Gehalten erfolgt (1,34 bzw. 1,09 %). Diese ließ sich nicht eindeutig bestimmten Strukturmerkmalen zuordnen.

Die Untersuchung der beiden Sorten zeigte, daß offensichtlich keine einfache Beziehung zwischen der Dichte einzelner Drüsenhaartypen von Brakteen und ihrem THC-Gehalt besteht, die zu einer Prognose des psychoaktiven Potentials der Sorten genutzt werden könnte. So sind zur Zeit für eine grobe Einschätzung des psychoaktiven Potentials von Hanf als nicht-chemische Charakteristika nur die Blattbreite und der Blühzeitpunkt bekannt (de Meijer et al., 1992) und direkte analytische Methoden wie GC oder HPLC für eine sichere Bestimmung unerlässlich.

#### Zusammenfassung

Die zweijährige Untersuchung der Faserhanfsorten Felina 34 und Kompolti Hybrid TC im Feldanbau zeigte, daß dem höheren Gesamtgehalt aus delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD) der Brakteen von Kompolti Hybrid TC eine höhere Dichte der die Cannabinoide akkumulierenden Drüsenhaare entsprach, dem niedrigeren Gesamtgehalt der Sorte Felina

34 eine niedrigere Dichte/Flächeneinheit der Brakteen (2,47 % - 22 bzw. 1,77 % - 15 Drüsenhaare). Zwischen dem Gehalt eines einzelnen Cannabinoids, wie dem psychoaktiven THC, und der Dichte einzelner Drüsenhaartypen bestand keine positive Beziehung. Unter dem Einfluß zunehmender Stickstoff-Düngung (variiert in den Stufen: „ohne N“, 60 kg N/ha und 120 kg N/ha) nahm die Trichomdichte 1993 bei beiden Sorten signifikant zu, ein signifikanter Anstieg des THC-Gehaltes war aber nicht zu beobachten. Der THC-Gehalt war jedoch insbesondere bei Kompolti Hybrid TC vom Anbaujahr abhängig (1992: 1,06, 1993: 1,38 %), während der Gesamtgehalt aus THC und CBD und auch die Drüsenhaardichte in beiden Jahren gleich waren. Die Drüsenhaardichte allein ist offensichtlich kein geeignetes Maß für eine Prognose des psychoaktiven Potentials von Hanfpflanzen.

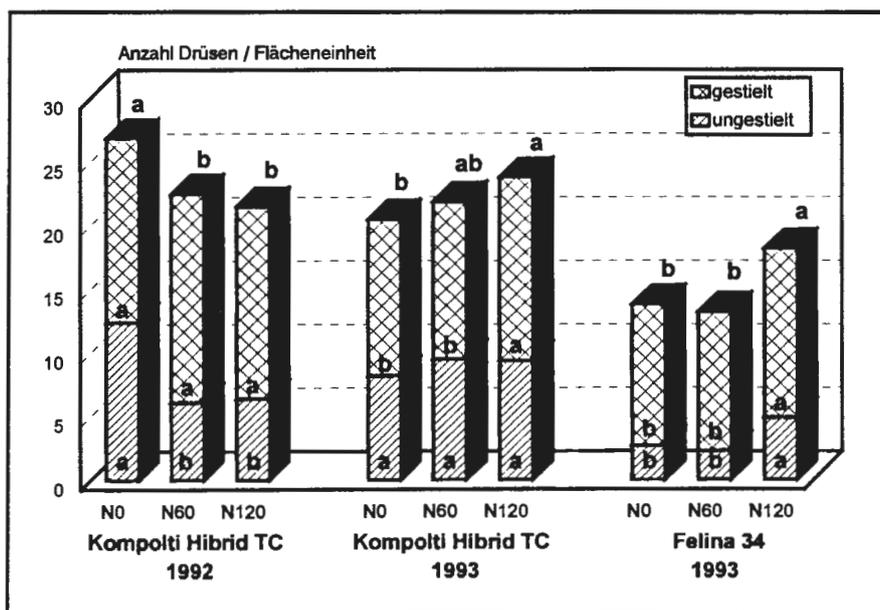


Abbildung 9: Anzahl ungestielter und gestielter Drüsenhaare von Kompolti Hybrid TC und von Felina 34 bei variiertem N-Düngung

### Trichomes of pistillate bracts and their relation to the cannabinoid content of two fibre hemp varieties

Two year field tests with the fibre hemp varieties Felina 34 and Kompolti Hibrid TC showed, that the higher total content of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and of cannabidiol (CBD) of the bracts of Kompolti Hibrid TC corresponded to a higher density of capitate sessile and capitate stalked glands, accumulating cannabinoids, the lower total content of Felina 34 to a lower density /area of the bracts (2.47 % - 22, 1.77 % - 15 glands, resp.). Between the content of the individual cannabinoid THC and the density of an individual gland type there was no direct relation. Under the influence of increasing nitrogen fertilisation (in the steps: without N, 60 kg N/ha and 120 kg N/ha) in 1993 the density of the trichomes increased significantly with both varieties, a significant increase of the THC content was not to be observed. But the THC content, especially with Kompolti Hibrid TC, was influenced in the years (1992: 1.06, 1993: 1.38%), while the total content of THC and CBD as well as the density of the glands was equal in both years. So the density of the glands obviously is not a suitable means for the prediction of the THC content and the psychoactive potential of hemp plants.

### Literatur

- Gorshkova, L. M., G. I. Senchenko und V. G. Virovets: Method of evaluating hemp plants for content of cannabinoid compounds (in Russisch). - Referativnyi Zhurnal 12.65.322. (1988).
- Hammond, C.T. und P. G. Mahlberg: Ultrastructural Development of Capitate Glandular Hairs of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). - Amer. J. Bot. 65(2) (1978), S. 140-151.
- Höppner, F. und Menge-Hartmann, U.: Anbauversuche zur Stickstoffdüngung und Bestandesdichte von Faserhanf. - Landbauforschung Völkenrode, 44. Jahrg. (1994), H. 4, S. 314 - 324.
- Höppner, F. und Menge-Hartmann, U.: Organspezifische Entwicklung der  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol(THC)- und Cannabidiol(CBD)-Konzentration während der Vegetationsperiode zweier Faserhanfsorten im Feldanbau. - Landbauforschung Völkenrode, 46. Jahrg. (1996), H. 2, S. 55-64.
- Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. - J. Cell Biol. 27 (1965), S. 137A-138A.
- Kim, Eun-Soo, P. G. Mahlberg: Secretory cavity development in glandular trichomes of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). - American J. Botany 78 (1991) H. 2, S. 220-229.
- Lanyon, V. S., J. C. Turner, P. G. Mahlberg: Quantitative analysis of cannabinoids in the secretory product from capitate - stalked glands of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). - Bot. Gaz. 142 (1981) H. 3, S. 316-319.
- Meijer, de E. P. M., H. J. van der Kamp und F. A. van Eeuwijk: Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. - Euphytica 62 (1992), S. 187-200.
- Mahlberg, P. G., C. T. Hammond, J. C. Turner, J. K. Hemphill: Structure, development and composition of glandular trichomes of *Cannabis sativa* L. - In: E. Rodriguez, P. L. Healey, I. Mehta (eds.): Biology and Chemistry of Plant Trichomes. Plenum Press, N. York, London, 1984.
- Petri, G., P. Oroszlan, L. Fridalszky: Histochemical detection of hemp trichomes and their correlation with the THC content. - Acta Biologica Hungarica 39 (1988) H. 1, S. 59-74.
- Reimer, L., G. Pfefferkorn: Raster-Elektronenmikroskopie. - Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
- Turner, J. C., J. K. Hemphill, P. G. Mahlberg: Gland distribution and cannabinoid content in clones of *Cannabis sativa* L. - Amer. J. Bot. 64 (1977), S. 687-693.
- Turner, J. C., J. K. Hemphill, P. G. Mahlberg: Interrelationships of glandular trichomes and cannabinoid content. I: Developing pistillate bracts of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). - Bulletin on Narcotics 33 (1981) H. 2, S. 59-69.
- Verfasser: Menge-Hartmann, Ute, Dr. rer. nat.; Höppner, Frank, Dr. sc. agr., Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), komm. Leiter: Prof. Dr. agr. habil. Friedrich Weißbach.