GENOMIK UND PHÄNOMIK ÖSTERREICHISCHER KÄFERBOHNENHERKÜNFTE MIT DEM FOKUS AUF HITZETOLERANZ – CHARACCESS

ABSCHLUSSBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT NUMMER 101193

Bundesministerium Nachhaltigkeit und Tourismus

Das Land Steiermark

AIT AUSTRIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY

SZG SAATZUCHT GLEISDORF Gesellschaft m.b.H.

AGES

IMPRESSUM

Projektnehmer: Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Geschäftsfeld Ernährungssicherung
Adresse:Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien
Projektleiterin: DI Dr. Alexandra Ribarits
Tel. : +43 50 555-34914
E-Mail: alexandra.ribarits@ages.at
Projektmitarbeiter: DI Philipp von Gehren, Barbara Riegler BSc, DI Paul Freudenthaler, DI Martin Schwab, Dr. Linde Morawetz
Kooperationspartner: Dr. Eva Maria Sehr, AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Konrad-Lorenz-Straße 24, 3430 Tulln; Mag. DI Eveline Adam BSc, Saatzucht Gleisdorf GmbH, Am Tieberhof 33, 8200 Gleisdorf
Finanzierungsstellen: Bund/Bundesländer-Kooperation Forschung (Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus und Das Land Steiermark)
Projektlaufzeit: 15.11.2017 – 15.05.2019

1. Auflage

Alle Rechte vorbehalten.
Wien, 15.05.2019

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 4

1.1 KURZFASSUNG ERGEBNISSE CHARACCESS 4
1.2 HINTERGRUND 5

2 MATERIAL UND METHODEN 7

2.1 SAMMLUNG UND HERKUNFT DES SAATGUTES 7
2.2 AUFZUCHT DER JUNGPFLANZEN IM GLASHAUS LINZ 7
2.3 UMSIEDLUNG DER PFLANZEN & AUFZUCHT IN WIEN 7
2.4 HITZESTRESS UND TEMPERATURVERLAUF 9
2.5 SAMMLUNG BLATTMATERIAL FÜR DNA-EXTRAKTION 9
2.6 BONITUR DER BLÜTEN 10
2.7 BONITUR DER HÜLSEN 10
2.8 ERNTE DER HÜLSEN 10
2.9 BESTÄUBUNG DURCH BIENENBEFLUG 11
2.10 GENOTYPING-BY-SEQUENCING 11
2.11 DATENAUSWERTUNG 12

3 ERGEBNISSE 14

3.1 ALLGEMEINE PFLANZENENTWICKLUNG 14
3.2 ENTWICKLUNG DER BLÜTEN UND HÜLSEN VOR DEM HITZESTRESS 20
3.3 REAKTION DER PFLANZEN AUF HITZESTRESS 21
3.4 ERTRAGSLEISTUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN KÄFERBOHNEN-AKZESSIONEN UND -SORTEN BEI HITZESTRESS 29
3.5 GENOTYPING-BY-SEQUENCING UND DATENAUSWERTUNG 32
3.6 PHÄNOTYP-GENOTYP-KORRELATION 37

4 DISKUSSION 38

4.1 GENOTYPISIERUNG 38
4.2 ÜBEREINSTIMMUNG VON GENOTYP UND PHÄNOTYP 38
4.3 DIE „STEIRISCHE KÄFERBOHNE“ IN PHÄNOTYP UND GENOTYP UND IM HITZESTRESSEXPERIMENT 39
4.4 ENTWICKLUNG VON MOLEKULAREN MARKERN FÜR HITZETOLERANZ 40

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 41

6 DANKSAGUNG 43

7 LITERATURVERZEICHNIS 44

8 ANHANG 46

8.1 DIAGRAMME BLÜTEN UND HÜLSEN 46
8.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE WICHTIGSTEN GENETISCHEN GRUPPEN AUS DER STAMMBAUMDARSTELLUNG UND IHRE HERKUNFT 54
8.3 ÜBERSICHT ÜBER DIE AKZESSIONEN UND SORTEN 55

9 TABELLENVERZEICHNIS 58

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 58

1 EINLEITUNG

1.1 KURZFASSUNG ERGEBNISSE CHARACCESS

Während der Blüte und der Hülsenbildung ist die Käferbohne (*Phaseolus coccineus* L.) anfällig für Hitzestress und reagiert in Folge mit dem Abwerfen der Blüten sowie Hülsen. Hitzetolerante Sorten sind der Schlüssel zu einer nachhaltigen Langzeitstrategie im Käferbohnen-Anbau in Österreich. In dem Projekt CHARACCESS wurde die genetische Diversität von 84 Käferbohnen-Akzessionen und zehn Käferbohnen-Sorten durch Genotyping-by-Sequencing untersucht. Für 33 ausgewählte Akzessionen und Sorten wurde in einem Glashausversuch vier Wochen Hitzestress (35° C/4 h/d) simuliert. Das Zustellen von Honigbienenvölkern gewährleistete die Bestäubung der Pflanzen im Glashaus. Ausgewählte phänotypische Merkmale wie Blütenbildung und Hülsenbildung der 33 Käferbohnen-Akzessionen und Sorten wurden über die gesamte Versuchsdauer bonitiert. Eine abschließende kombinatorische Analyse der genotypischen und phänotypischen Daten erlaubte die Assoziation von Hitzetoleranz mit dazugehörigen Gen-Segmenten (SNP-Basis) und ermöglicht zukünftig die Entwicklung von molekularen Markern zur Verwendung in Züchtungsprogrammen.

In der Projektlaufzeit wurden folgende Arbeiten durchgeführt: Auswahl und Anzucht der Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten, Probenahme für die molekulare Analyse (84 Akzessionen und 10 Sorten), Feststellung der phänotypischen Merkmale, Aufbereitung und Zusammenfassung der Ergebnisse, Genotyping-by-Sequencing, Diversitäts- und Verwandtschaftsanalyse, Phänotyp-Genotyp-Korrelation, Berichtserstellung.

Die Käferbohnen wurden im Glashaus vier Wochen lang einem täglichen, vierstündigen (11:00 bis 15:00) Hitzestress von 35° C ausgesetzt. Ausgewählte phänotypische Merkmale (Blütenanzahl, Hülsenanzahl) wurden über die gesamte Dauer der Hitzeperiode bonitiert. Zur Bestäubung der Käferbohnen wurden Bienenvölker in den Glashausabteilen aufgestellt. Die ersten Blüten wurden ungefähr sechs Wochen nach der Aussaat ausgebildet. Diese wurden von den Pflanzen kontinuierlich produziert und von den Bienen besucht, wodurch die zur Hülsenbildung notwendige Bestäubung der Käferbohnen gewährleistet war. Ein Großteil der Pflanzen gelangte zur Blüte. Ungefähr acht Wochen nach der Aussaat wurden die ersten Hülsenansätze festgestellt. Bei insgesamt 32 von 33 Akzessionen und Sorten konnte eine Hülsenbildung beobachtet werden, wobei bei etwas mehr als der Hälfte der Pflanzen Hülsenansätze größer als 5 cm dokumentiert wurden. Im Durchschnitt dauerte es 14 Tage von der Beobachtung der ersten Blütenbildung an einer Pflanze bis zur ersten Hülsenbildung.

Wie zu erwarten reagierten alle 33 Akzessionen und Sorten auf den Hitzestress mit einem Abwerfen der Blüten und Hülsen. So sank innerhalb einer Woche nach Einsetzen des Hitzestresses die Gesamtblütenanzahl für alle 33 Akzessionen und Sorten von 1884 Blüten auf 327 Blüten. Zu diesem Zeitpunkt hörten auch die Bienen auf, an den Käferbohnenblüten zu sammeln. Bereits gut ausgebildete Hülsen wurden von den Pflanzen ab einem gewissen Zeitpunkt bevorzugt nicht mehr abgeworfen. Im Gegenzug werden jedoch keine neuen Hülsenansätze und keine Blüten mehr gebildet.

Knapp zwei Wochen nach Ende des Hitzestresses wurden wieder Bienen an den Blüten beobachtet. Einige Tage später konnten auch neue Hülsenansätze festgestellt werden. Bei neun Akzessionen v.a. steirischer Herkunft bzw. aus dem Burgenland sowie bei der alten Sorte Hara wurden mehr ausgereifte Käferbohnen geerntet als von der Referenzsorte „Bonela“, der in der Käferbohnenproduktion üblicherweise angebauten Sorte in Österreich. Die restlichen 22 Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten waren allesamt weniger ertragsstark als die Referenzsorte. Eine Käferbohnen-Akzession aus Italien und eine aus dem Burgenland stachen deutlich als ertragsstärkste Akzessionen heraus.

Ziele der Genotypisierung waren die Ermittlung der genetischen Diversität innerhalb der Akzessionen und der Verwandtschaftsstruktur zwischen den Akzessionen und Sorten. Zuletzt wurden die erhaltenen Daten mit phänotypischen Ausprägungen in einer Phänotyp-Genotyp-Assoziationsanalyse korreliert, um die Basis für die weiteren Schritte in Richtung der Entwicklung molekularer Marker für Hitzetoleranz zu bilden.

Nach der Analyse der genetischen Diversität der ausgewählten Käferbohnen-Akzessionen konnten von den 84 untersuchten Akzessionen drei (40, 67, 79) als diverser und sechs (21, 27, 31, 47, 49, 77) als schwach divers im Vergleich zu den weiteren Akzessionen beschrieben werden. Die Verwandtschaftsstruktur zwischen den Akzessionen und Sorten wurde eingehend analysiert und für die allgemeine Betrachtung der Ergebnisse die Stammbaumdarstellung gewählt, da diese die beste Auflösung bietet. Neben einer etwas komplexeren Struktur an den Rändern des Baumes lassen sich in der Mitte zwei große Gruppen definieren, deren Akzessionen bzw. Sorten innerhalb der Gruppe näher miteinander verwandt sind. Die Referenzsorte „Bonela“ findet sich in einer dieser Gruppen. Einzelne Akzessionen und Sorten zeigen eine große genetische Ähnlichkeit, was bei der Auswahl von Akzessionen für weitere Untersuchungen berücksichtigt werden kann.

In der Phänotyp-Genotyp-Assoziationsanalyse wurde die Korrelation von 483 Loci aus 33 Genotypen mit sechs Ausprägungen getestet. Insgesamt wurden 28 assoziierte genomische Regionen gefunden. Diese bilden die Basis für die weiteren Schritte in Richtung Entwicklung genetischer Marker, welche mit einer bestimmten Eigenschaft verbunden sind. Nach einer entsprechenden Validierung an weiteren Akzessionen könnten diese Marker in weiterer Folge in Züchtungs- und Selektionsprozessen zur Anwendung kommen.

1.2 HINTERGRUND

Der weitaus überwiegende Teil der Flächen, auf denen Käferbohnen angebaut werden, befindet sich in der Steiermark. Die herkunftsgeschützten Flächen in der Steiermark belaufen sich 2017 auf 624 ha und 2018 auf 439 ha (Quelle: Plattform zum Schutz der Steirischen Käferbohne). Die Flächenreduktion von 2017 auf 2018 ist durch das Vorhandensein von ausreichend Lagerware bedingt. Die Käferbohne ist für die steirischen Landwirte und Landwirtinnen von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Der kommerzielle Anbau erfolgt größtenteils auf Vertragsbasis und mit Mais als Stützpflanze. Als typisches Produkt der südöstlichen Steiermark – von der Region für die Region – entwickelte sich die Käferbohne zur unverkennbar steirischen Spezialität (s. „Genussregion Südoststeirische Käferbohne“), welche aber auch in anderen Regionen und Bundesländern kultiviert wird. Zudem trägt die Steirische Käferbohne seit 2016 eine geschützte Ursprungsbezeichnung (Europäische Kommission 2016) und wird als „Steirische Käferbohne g.U.“ vermarktet.

Die züchterische Beschäftigung mit der Käferbohne ist bis ins 19. Jahrhundert nachweisbar. Derzeit sind drei Sorten in der Österreichischen Sortenliste registriert: Bonela, Melange, und die Ober-Wolfsbacher Feuerbohne (BAES 2019). Zwei weitere Sorten (Steirische Riesen und Hara) waren bisher in der Österreichischen Sortenliste eingetragen. Am häufigsten wird die Sorte „Bonela“ für den Feldanbau verwendet. Sie prägt das typische Erscheinungsbild der Steirischen Käferbohne. Dennoch entspricht auch die Sorte Melange der Produktspezifikation „Steirische Käferbohne“.

Hohe Temperaturen während der Blütezeit führen zum Abwurf von Blüten und Hülsenansätzen und verringern die Überlebens- und Keimfähigkeit der Pollen (Beebe et al. 2012). Auch bei der Busch- bzw. Stangenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) sind vermehrter Blütenabwurf, Pollensterilität, Hülsenabwurf, reduzierte Samenbildung und verminderter Ertrag beschrieben worden (Porch und Jahn 2001; Rainey und Griffiths 2005; Porch et al. 2007). Am häufigsten werden Blüten abgeworfen, gefolgt von Hülsenansätzen (Porch und Jahn 2001; Rainey und Griffiths 2005; Porch et al. 2007). Auch scheint es, dass in erster Linie die Pollenentwicklung und -qualität unter dem Hitzestress leidet (Giorno et al. 2013). Die Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen kann durch Züchtungsarbeit erhöht werden, sodass die Bewältigung der Folgen des Klimawandels mit dem vorrangigen Ziel der Entwicklung trockenheits-und hitzetoleranter Sorten

weltweit als eine der größten Herausforderungen in der Bohnenzüchtung angesehen wird. Aufgrund der oben beschriebenen Auswirkungen von Hitzestress ist die Entwicklung hitzeresistenter Sorten ein wichtiger Bestandteil einer jeden langfristigen Strategie zur Steigerung von Produktivität und Nachhaltigkeit. Um die Folgen eines sich verändernden Klimas zu bewältigen, werden Landsorten als wichtige Quellen genetischen Materials für Pflanzenzüchter und Pflanzenzüchterinnen genannt. Gerade die Vielfalt an pflanzengenetischen Ressourcen, welche in Genbanken lagern, stellt eine der größten, weitestgehend ungenützten Chancen zur Überwindung von durch den Klimawandel aufkommenden Ernteausfällen dar (Mercati et al. 2015). Um diesen Reichtum an Vielfalt u.a. für die Züchtung neuer Sorten nutzen zu können, ist eine Charakterisierung der vorhandenen Genressourcen nötig. Eine integrierte Züchtungsstrategie zur Verbesserung der Hitzetoleranz beinhaltet moderne molekulare Werkzeuge zur Charakterisierung der genetischen Ressourcen und die Entwicklung molekularer Marker einerseits und die umfassende phänotypische Charakterisierung der Pflanzen andererseits. Während in der Vergangenheit mit einigen wenigen Markern gearbeitet wurde, entstanden mit der Weiterentwicklung der Methoden auch kostengünstigere und durchsatzstarke Möglichkeiten zur Identifizierung und Selektion erwünschter Eigenschaften. Zudem werden neue Methoden durch den technologischen Fortschritt auch als wichtige Werkzeuge für das effiziente Management von Genbanken gesehen. Sequenz- und Phänotypisierungsdaten sind dabei wichtige Informationen, die für mögliche Nutzer und Nutzerinnen ein deutlich verbessertes Serviceangebot darstellen. So wird ermöglicht, Interessierten die gewünschten Daten für die Auswahl geeigneter Akzessionen rasch zur Verfügung zu stellen. Nach entsprechenden Vorarbeiten und Aufbereitung der Daten können Züchter und Züchterinnen die einzelnen Akzessionen der Genbank gezielt nach den gefragten Eigenschaften durchsuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 SAMMLUNG UND HERKUNFT DES SAATGUTES

Inhalt des Projekts ist die Charakterisierung verschiedener Käferbohnen-Akzessionen vor allem österreichischer Herkunft, die in der AGES-Genbank in Linz gelagert werden. Anhand der über die gelagerten Akzessionen verfügbaren Informationen (Herkunft und Samenmerkmale gemäß UPOV) wurden 84 Muster mit dem Ziel einer möglichst großen genetischen Vielfalt ausgewählt. Zu Vergleichszwecken wurden von der Landesversuchsanstalt für Spezialkulturen in Wies die charakteristische Steirische Käferbohne Bonela (Standard), die in der Österreichischen Sortenliste eingetragene Sorte Melange, sowie ältere Sorten (Steirische Riesen, Hara, Choco, Hellviolette, Aldrian) zur Verfügung gestellt, vom niederländischen Naktuinbouw wurden die in den Niederlanden eingetragenen Sorten Lady Di, Hestia und Prijswinner angefordert. Für jedes Muster wurden Datenblätter mit Informationen über Herkunft und Samenmerkmale (dokumentiert nach UPOV-Vorgaben: Gewicht, Form des medianen Längsschnitts, Form des mittleren Querschnitts, Anzahl Farben, Hauptfarbe, ggf. Verteilung der überwiegenden Sekundärfarbe, ggf. Aderung, Farbe der Nabelumrandung) erstellt. Insgesamt wurden somit 84 Akzessionen und 10 Sorten zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

2.2 AUFZUCHT DER JUNGPFLANZEN IM GLASHAUS LINZ

Gemäß Projektplan sollten in der genomischen und phänomischen Charakterisierung jeweils acht Individuen bearbeitet werden. Aufgrund der teilweise eingeschränkten Verfügbarkeit von Samen wurde vorab keine Keimprüfung des Saatgutes durchgeführt. Je Akzession wurden 15 Samen, bei denen zunächst die Samenschale mit einem Skalpell leicht angeritzt wurde, im Glashaus in Linz vorgezogen. Die Ansaat erfolgte 2 cm tief am 12.03.2018 mit jeweils einem Samen je Topf (9x9x9,5 cm, Göttinger Etikettentöpfe). Als Substrat wurde Floragard Spezialsubstrat (Gemisch aus wenig bis stark zersetztem Hochmoortorf, kohlensaurem Kalk, Ton, mineralischem Kalk- und Magnesiumdünger sowie mineralischem Mehrnährstoffdünger) verwendet. Beim Anbau der Samen wurde auf gleiche Verhältnisse (Befüllung, Saattiefe, Wasserverhältnisse) in den einzelnen Töpfen geachtet, damit gleichmäßiger Aufgang und Entwicklung der einzelnen Pflanzen gewährleistet wurde. Die Belichtung der Jungpflanzen im Glashaus Linz erfolgte täglich über eine Dauer von 12 h durch die Verwendung von Quecksilber- und Natriumdampflampen. Die durchschnittliche Temperatur war auf 21° C am Tag und 18° C in der Nacht eingestellt. Am 19.03.2018 war der Großteil der angesetzten Samen gekeimt, am 22.03.2018 befanden sich die gekeimten Pflanzen im Zweiblatt-Stadium.

Von allen Akzessionen bzw. Sorten wurden acht gut entwickelte Jungpflanzen zur Probenahme für die spätere genetische Analyse vorgesehen. Von 23 Akzessionen und 10 Sorten wurden acht gesunde, gut entwickelte Individuen für die Erhebung weiterer phänotypischer Maßnahmen in das größere Glashaus nach Wien transportiert. Von diesen Akzessionen und Sorten wurden dieselben Individuen auch für die Probenahme herangezogen, sodass sowohl Genomik als auch Phänomik dieser Individuen untersucht werden konnten.

2.3 UMSIEDLUNG DER PFLANZEN & AUFZUCHT IN WIEN

Am 22.03.2018 wurden von 33 Akzessionen und Sorten je acht Pflanzen selektiert und diese zur weiteren Kultivierung in das Glashaus der AGES GmbH am Standort Wien Spargelfeld (WSP) überführt. Die 33 Akzessionen und Sorten wurden hinsichtlich möglichst unterschiedlicher Herkunft ausgewählt, um potenziell ein Höchstmaß an genetischer Diversität zu erreichen. Nach der Überfahrt von Linz nach Wien wurden die Pflanzen in den Ansaat-Töpfen auf Fluttische gestellt, und verblieben dort für vier Tage zwecks

Akklimatisierung. Anschließend erfolgte am 27.03.2018 ein Umtopfen in Rundtöpfe mit einem Durchmesser von 30 cm für den restlichen Versuchszeitraum. Die umgetopften Pflanzen wurden am 28.03.2018 sorten- bzw. akzessionsweise in Achtergruppen aufgeteilt und diese in zufälliger Reihenfolge in den zwei für den Hitzestress-Versuch vorgesehenen Abteilen im Glashaus WSP (GWH klein und GWH groß) aufgestellt (Abbildung 1). Bis zum Ende der Bonituren (19.06.2018) wurden die Pflanzen nicht wieder bewegt. Ein 2 m langer Bambusstab diente in jedem Topf als Rankhilfe. Eine Tröpfchenbewässerung wurde zentralisiert gesteuert und erfolgte täglich nach Bedarf. Schädlinge (hauptsächlich Spinnmilben, Thripse, Minierfliegen) wurden über die gesamte Versuchsdauer durch die Verwendung von Nützlingen erfolgreich kontrolliert. Chemischer Pflanzenschutz wurde nicht eingesetzt.

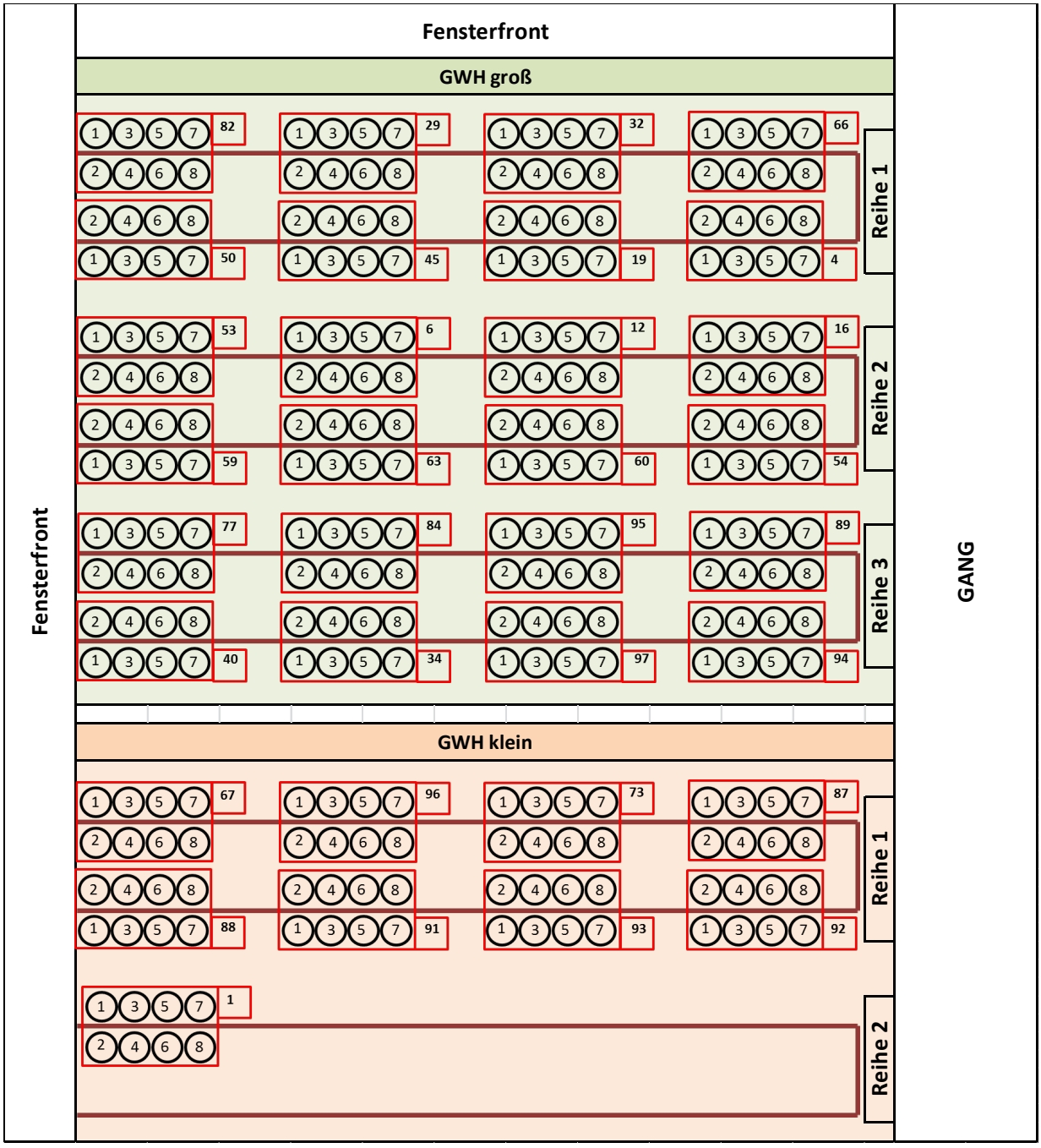


Abbildung 1: Lageplan der 33 im Glashaus WSP aufgezogenen Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten. Die Aufstellung erfolgte in zwei unterschiedlich großen Abteilen in zufällig verteilten Achtergruppen.

2.4 HITZESTRESS UND TEMPERATURVERLAUF

Ab dem 07.05.2018, 56 Tage nach der Ansaat der Pflanzen, wurde der im Projektverlauf vorgesehene Hitzestress angesetzt. Dafür wurde die Maximaltemperatur in den beiden Glashausabteilen über die nächsten drei Tage schrittweise durch das Schließen der Fensterklappen und das Zuschalten der Heizungsanlage auf eine maximale Temperatur von 35° C erhöht. Diese Temperatur wurde während des Hitzestressexperiments täglich im Zeitraum von 11:00 bis 15:00 gehalten. Abbildung 2 zeigt den Maximaltemperaturverlauf während des Versuchs in den beiden Glashausabteilen vom Zeitpunkt des Aufstellens der Töpfe bis zur finalen Bonitur der Hülsen. Zusätzlich findet sich in der Abbildung als Referenz auch die maximale gemessene Tagestemperatur der Wetterstation WSP, welche sich in unmittelbarer Nähe des Glashauses befand. Die im Zeitraum 09.04.2018 bis 10.04.2018 dokumentierte, bei moderaten Außentemperaturen auffallend hohe Temperatur in beiden Glashäusern ist auf das Schließen der Lüftungsklappen trotz unbewölkter Witterung bedingt durch einen defekten Regensensor zurückzuführen. Als Resultat war ein sprunghafter Anstieg der Innentemperaturen zu bemerken, welcher jedoch nur für den kurzen Zeitraum von etwa einer Stunde gemessen wurden.

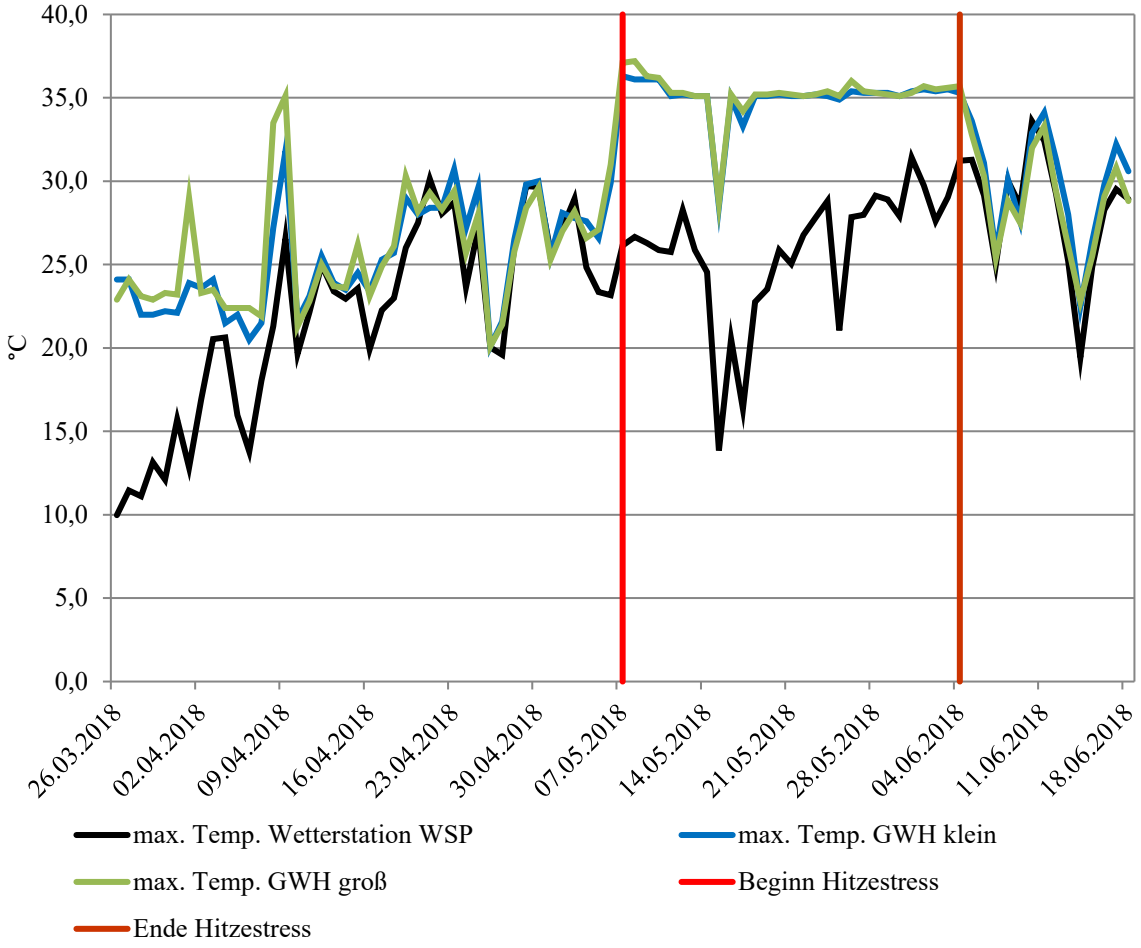


Abbildung 2: Maximale gemessene Tagestemperatur in den beiden Abteilen des Glashauses WSP sowie der Wetterstation WSP in unmittelbarer Nähe des Glashauses während des gesamten Experimentverlaufs. An Tagen mit starken Abweichungen zwischen Innen- und Außentemperatur zeigen die Temperaturkurven einen ähnlichen Verlauf. Hitzestress (Temperatur 35° C) wurde für den Zeitraum vom 07.05.2018 bis inkl. 04.06.2018 künstlich erzeugt.

2.5 SAMMLUNG BLATTMATERIAL FÜR DNA-EXTRAKTION

Für die DNA-Extraktion wurde je Akzession von acht Pflanzen 50 mg Blattmaterial in eine 96-Deep-Well-Platte gefüllt. Die nach 12 beprobten Akzessionen vollständig befüllte Platte wurden mit einer Verschlussmatte versehen und bei -20° C tiefgekühlt. Von jedem beprobten Individuum wurde zudem 150

mg Blattmaterial in eine Reserveplatte gefüllt und ebenfalls tiefgekühlt. Da es bei einigen Akzessionen während der DNA-Extraktion zu Ausfällen kam, mussten diese erneut beprobt werden. Dazu wurden von jedem erneut zu beprobendem Individuum Triebspitzen genommen und ebenfalls bei -20° C tiefgekühlt. Die DNA-Extraktion und weitere Aufarbeitung aller Proben erfolgt bei der Subauftragnehmerin Austrian Institute of Technology GmbH (AIT) in Tulln.

2.6 BONITUR DER BLÜTEN

Die Blüten-Bonitur startete am 16.04.2018, als die ersten Blüten an den Käferbohnen beobachtet wurden. Bei der Bonitierung wurde von jeder Pflanze die Anzahl der Blüten erfasst, die an diesem Tag aufgeblüht waren. Außerdem wurden die Flügel- und Fahnenfarbe sowie das Datum der ersten Blüte jeder Pflanze notiert. Um das genaue Datum der ersten Blüte feststellen zu können, wurden vom 16.04.2018 bis 27.04.2018 täglich (Montag bis Freitag) alle 264 Pflanzen (33 Akzessionen und Sorten) bonitiert. Vom 30.04.2018 bis 04.06.2018 wurde die Bonitur nur noch jeden zweiten Tag (Montag, Mittwoch und Freitag) durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt schon der Großteil der Pflanzen zu blühen begonnen hatte. Da eine Käferbohnenblüte nur einen Tag blüht und man gut erkennen kann, welche Blüten vom Vortag stammen, konnte auch auf diesem Weg das genaue Datum der ersten Blüte festgestellt werden. Des Weiteren wurde notiert, ob während der Bonitur Bienen an den Blüten beobachtet werden konnten. Die Bonitur fand jeweils zwischen ca. 8:00 und 13:00 Uhr statt.

2.7 BONITUR DER HÜLSEN

Die Hülsen-Bonitur begann mit dem 04.05.2018, mit der Beobachtung des ersten Hülsenansatzes größer als 5 cm. Fortlaufend wurde an allen Käferbohnen-Pflanzen die tagesaktuelle Hülsenanzahl an zwei Tagen der Woche (Montag und Freitag) festgestellt. Die Bonitur der Hülsen fand jeweils zwischen ca. 08:00 und13:00 Uhr statt. Neue Hülsen größer als 5 cm wurden auf dem Bonitur-Blatt vermerkt. Jede auf dem Bonitur-Blatt vermerkte Hülse größer als 5 cm wurde einmalig mit Acrylfarbe am Hülsen-Stiel markiert, um eine Wiederholung der Zählung dieser Hülse zu vermeiden. Jeder Blütenstand wurde bei der Bonitur mit einem Fähnchen versehen, auf dem das Datum der Bonitierung (z.B. 07.05.), die Anzahl der an dem Tag neu dazugezählten Hülsen (z.B. 3x) und die Nummer des Blütenstandes (z.B. 3) vermerkt wurden. Wurde an einem Blütenstand bereits an einem vorherigen Bonitur-Termin eine Hülse bonitiert und der Blütenstand folglich mit einem Fähnchen versehen, wurde bei Beobachtung von neuen Hülsen größer als 5 cm an diesem Blütenstand ein neues Fähnchen hinzugefügt.

An jedem Bonitur-Termin wurden nicht nur die neuen Hülsen mit einem Fähnchen versehen und auf dem Boniturblatt eingetragen, sondern es wurden auch die an vorherigen Bonitur-Terminen bereits notierten Blütenstände mit Hülsen größer als 5 cm auf Hülsenabwurf hin untersucht und entsprechend auf dem Bonitur-Blatt vermerkt. Das Fehlen einer Hülse wurde anhand der bereits auf dem Bonitur-Blatt erfassten Hülsenanzahl festgestellt, da jede einzelne Hülse einer Pflanze und einem Blütenstand zugeordnet war. Auch eine stark vertrocknete und damit abgestorbene Hülse wurde als abgeworfen vermerkt.

2.8 ERNTE DER HÜLSEN

Am 19.06.2018 wurden alle Hülsen im Glashaus geerntet. Diese waren zu diesem Zeitpunkt zum großen Teil abgereift. Die Hülsen wurden einzeln beschriftet (Nummer der Pflanze, Blütenstand) und mit der Hülsen-Bestandsliste abgeglichen. Die geernteten Hülsen wurden fotografiert und dokumentiert. Anschließend wurden die Bohnen aus den Hülsen aller acht Pflanzen einer Akzession zusammengeführt und gewogen.

2.9 BESTÄUBUNG DURCH BIENENBEFLUG

Um die für die Hülsenbildung notwendige Bestäubung der Käferbohnen sicherzustellen, wurden zwei Bienenvölker vom AGES-Bienenstand Rutzendorf ins Glashaus nach WSP gebracht. Die Bienen wurden während des gesamten Versuches an Futterstellen mit Honigwasser gefüttert und mittels Wasserstellen bzw. Wasserpfützen rund um die Pflanzen mit Wasser versorgt. Nachdem die Käferbohnen zu blühen begonnen hatten und die Bienen diese noch nicht beflogen, wurden die Futterstellen immer wieder für 2-3 Stunden aus den Räumen entfernt, um die Bienen stärker auf die Blüten aufmerksam zu machen. Die Bienen konnten während des gesamten Versuchs ins Freie, außer wenn die Klappen während des Hitzestresses in der Zeit von 11:00 bis 15:00 geschlossen waren.

Die Entwicklung der Bienenvölker im Glashaus wurde während der gesamten Versuchsdauer dokumentiert (Stockkarte: Gewicht der Völker, Anzahl der besetzten Waben, Anzahl und Art der Brutwaben). So konnten Probleme der Völker in der Extremsituation Glashaus erkannt werden, um bei Bedarf das Volk mit Brut- bzw. Futterwaben oder jungen Bienen zu verstärken. Am 21.06.2018 wurden die Bienenstöcke aus dem Glashaus entfernt und wieder im Freiland aufgestellt.

2.10 GENOTYPING-BY-SEQUENCING

Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der RADSeq-Methode (Restriction site associated DNA sequencing). Bei der RADSeq-Methode wird das Genom mittels eines Enzyms geschnitten, und es werden nur jene Fragmente behalten, welche auf einer Seite der Sequenz auch die Enzym-Schnittstellen-Sequenz beinhalten. So wird die Komplexität und Sequenzmenge für die weitere Sequenzierung reduziert. Für weitere Details siehe z.B. Davey und Blaxter (2010).

2.10.1 PROBENAHME UND DNA-EXTRAKTION

Für die Genotypisierung wurde Blattmaterial aller 94 Akzessionen und Sorten für jedes Individuum einzeln in 96-Deep-Well-Platten gesammelt. Es zeigt sich, dass die Probenahme an jungen Pflanzen erfolgen muss, da es bei der Extraktion aus älterem Blattmaterial verstärkt zu einer DNA-Degradation kommen kann. Wird Probenmaterial von weiter entwickelten Pflanzen genommen, sollte die Entnahme von jungen Trieben erfolgen.

Die DNA-Extraktion erfolgte nach einem optimierten Protokoll, adaptiert für eine roboterbasierte Hochdurchsatz-Extraktion. Die DNA wurde in 100 µl Wasser und 6 µl RNAse (1:10) gelöst. Die Qualität wurde mittels Agarosegel bestimmt und die Quantität mittels Fluoreszenz-Farbstoff an einem Platereader gemessen. Für die folgende Herstellung der Sequenzier-Library wurde die DNA für jede Probe normalisiert, sodass eine homogene DNA-Quantität vorlag.

2.10.2 VORBEREITUNG DER SEQUENZIER-LIBRARY PREP UND SEQUENZIERUNG

Dem Protokoll von Baird et al. (2008) folgend, wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut und RAD-Adaptoren zur Identifikation der individuellen Proben hinzugefügt. Nach Zerkleinerung und Ligation der Adaptoren für die Sequenzierung erfolgte nach einer Größenselektion (300-500 bp) mittels Agarosegel eine PCR-Amplifikation und eine Aufreinigung. Sequenziert wurde im single-end 100 bp Modus auf einem HiSeq 4000 System (Illumina Inc.).

2.11 DATENAUSWERTUNG

2.11.1 ROHDATENCHECK UND SNP CALLING

Nach der Qualitätskontrolle der Rohdaten wurden diese mittels fastq-multx ge-demultiplexed; ein Prozess, bei dem die Rohdaten wieder den einzelnen Individuen zugeteilt werden. Für die Detektion der SNPs wurde ipyrad verwendet, eine speziell für RADSeq-Daten entworfene Pipeline.

2.11.2 ERSTELLUNG DER INPUT DATENSÄTZE UND FILTERUNG FÜR DIE WEITERE ANALYTIK

Nichtinformative SNPs, welche keine Variation zeigten, wurden durch Filterung mittels des R-Pakets poppr entfernt. Verworfen wurden: Genotypen mit mehr als 50 % fehlenden Werten; Loci, deren Minor Allele Frequenz (MAF) unter 1 % lag; Loci mit weniger als mindestens zwei unterschiedlichen Proben sowie Loci, die mehr als 20 % fehlende Werte aufwiesen (ergab Datensatz I). Für die Analyse der Genotypen mit Phänotyp-Information musste der Datensatz mit ähnlichen Vorgaben weiter gefiltert werden, was zu Datensatz II führte.

2.11.3 STRUCTURE-ANALYSE

Für die Analyse mit der Software STRUCTURE wurde der zuvor gefilterte Datensatz I (674 Genotypen, 508 Loci) mit den Populationsinformationen (Zugehörigkeit zu den Akzessionen) angereichert. Für die Analyse wurde standardmäßig eine maximale Anzahl der vorhandenen Populationen bzw. Cluster von 15 angenommen, daher wurde der K-Parameter von 1 bis 15 gesetzt. Der burnin-Parameter wurde auf 20.000 gesetzt und numreps auf 50.000. Für die Analyse des Datensatz II wurden die Parameter gleich gewählt.

2.11.4 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) & DISCRIMINANT ANALYSIS OF PRINCIPAL COMPONENTS (DAPC)

Für die PCA-Analyse wurde das R-Paket Adegenet verwendet. Fehlende Werte (NAs) wurden durch die berechnete durchschnittliche Allelfrequenz pro Locus ersetzt. Der eigentliche Methodenaufruf für die PCA benötigt keine weiteren Parameter. Diese Analyse wurde auf beide Datensätze (I + II) angewandt. Eine DAPC wurde mit dem Paket hierfstat durchgeführt.

2.11.5 STAMMBAUMANALYSE

Basierend auf einer Distanzmatrix (generiert unter der Anwendung der “Euklidischen” Methode) wurde der Clustering-Algorithmus UPGMA mit Hilfe des R-Pakets hclust angewendet.

2.11.6 ASSOZIATIONSANALYSE

Die Phänotyp-Genotyp-Assoziationsanalyse wurde mit dem R-Paket LEA unter Anwendung der LFMM (Latent Factor Mixed Models) Funktion durchgeführt. Für die LFMM Funktion sind vollständige Genotypdaten erforderlich, wodurch fehlende Werte (NAs) nachberechnet werden mussten. Der Genotyp jeder Probe wurde auf die folgenden Phänotyp-Parameter getestet: maximale Anzahl der Blüten pro Individuum, Gesamtanzahl der Blüten pro Individuum, Gesamtmaximalzahl der Blüten pro Akzession (über alle Individuen hinweg summierte maximale Anzahl der Blüten pro Individuum), Gesamtanzahl der Bohnen pro Individuum, maximale Anzahl der Hülsen pro Akzession, Abwurf der Hülsen pro Akzession, durchschnittliches Gewicht pro Bohne pro Akzession. Als Parameter wurden iteration (10,000), burnin (5,000), repetitions (5) und die Anzahl der „latent factors“, welche von 1 bis 15 berechnet wurden, gewählt. Da bei den vorigen Analysen eine Populationsanzahl von vier unterschiedlichen Gruppen/Cluster festgestellt

wurde, wurden in diesem Fall die Ergebnisse mit vier latenten Faktoren ausgewählt. Für die Ergebnisliste der assoziierten Loci wurde die FDR (false discovery rate) der p-values auf 0.01 gesetzt.

2.11.7 VERWENDETE SOFTWARE

Datenaufbereitung

fastq-multx: https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils/blob/wiki/FastqMultx.md

ipyrad: https://ipyrad.readthedocs.io/

R-Pakets poppr: https://grunwaldlab.github.io/poppr/

STRUCTURE-Analyse

STRUCTURE: https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html

PCA und DAPC

R-Paket Adegenet: http://adegenet.r-forge.r-project.org/

hierfstat: https://www2.unil.ch/popgen/softwares/hierfstat.htm

Stammbaumanalyse

R-Paket hclust: https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/hclust.html

Phänotyp-Genotyp-Assoziationsanalyse

R-Paket LEA: https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/LEA.html

3 ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINE PFLANZENENTWICKLUNG

Die Samen aller angesetzten Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten zeigten zufriedenstellende Keimraten, sodass für alle Akzessionen die für die weitere Anzucht im Glashaus WSP und die Probenahme vorgesehene Anzahl von acht Jungpflanzen zur Verfügung stand. In Abbildung 3 ist exemplarisch eine Akzession zu sehen, bei der die für die Käferbohne typische hypogäische Keimung deutlich zu erkennen ist.

Abbildung 3: Hypogäische Keimung der Käferbohnen im Glashaus in Linz.

Zum Zeitpunkt der Auswahl der Akzessionen für die Überführung nach Wien befanden sich die Jungpflanzen zum überwiegenden Teil im Zweiblatt-Stadium (Abbildung 4). Nach dem Transport nach Wien im Kleintransporter konnten je acht Jungpflanzen von 33 ausgewählten Akzessionen und Sorten zur weiteren Aufzucht verwendet werden.

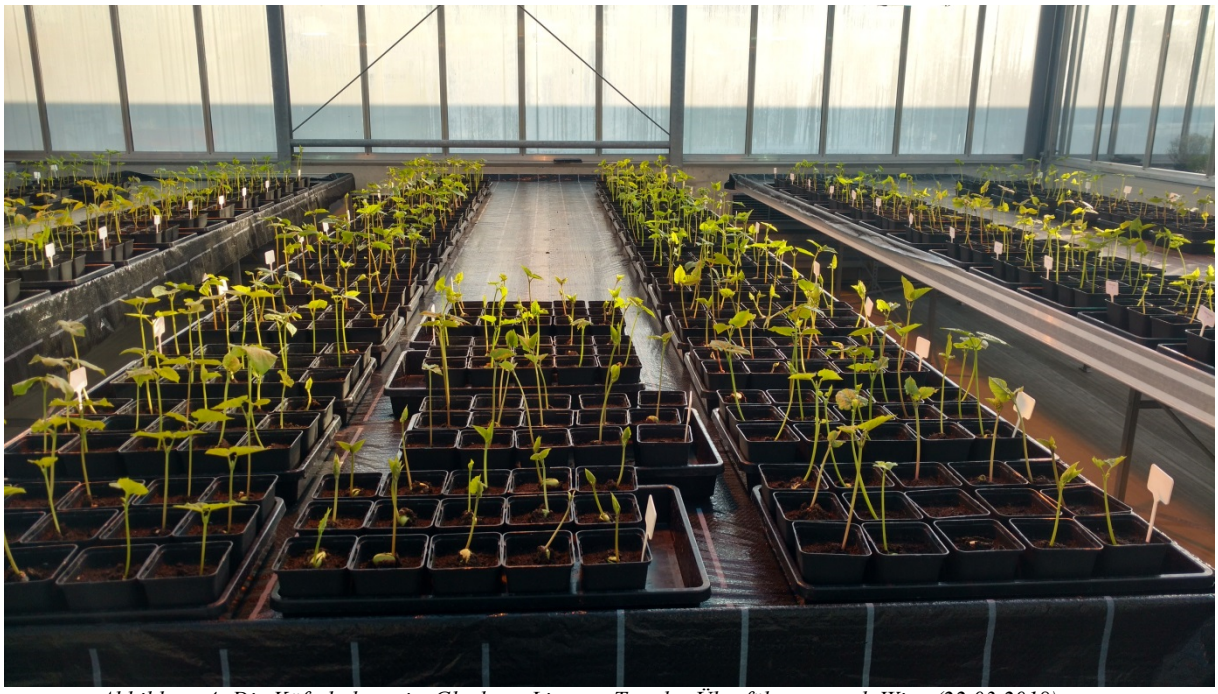


Abbildung 4: Die Käferbohnen im Glashaus Linz am Tag der Überführung nach Wien (22.03.2018).

Die nachfolgenden Fotos (Abbildung 5 bis Abbildung 9) zeigen den Wachstumsverlauf der ausgewählten Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten im kleinen Abteil des Glashauses WSP. Alle Pflanzen legten unabhängig vom Hitzestress während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich an Biomasse zu.

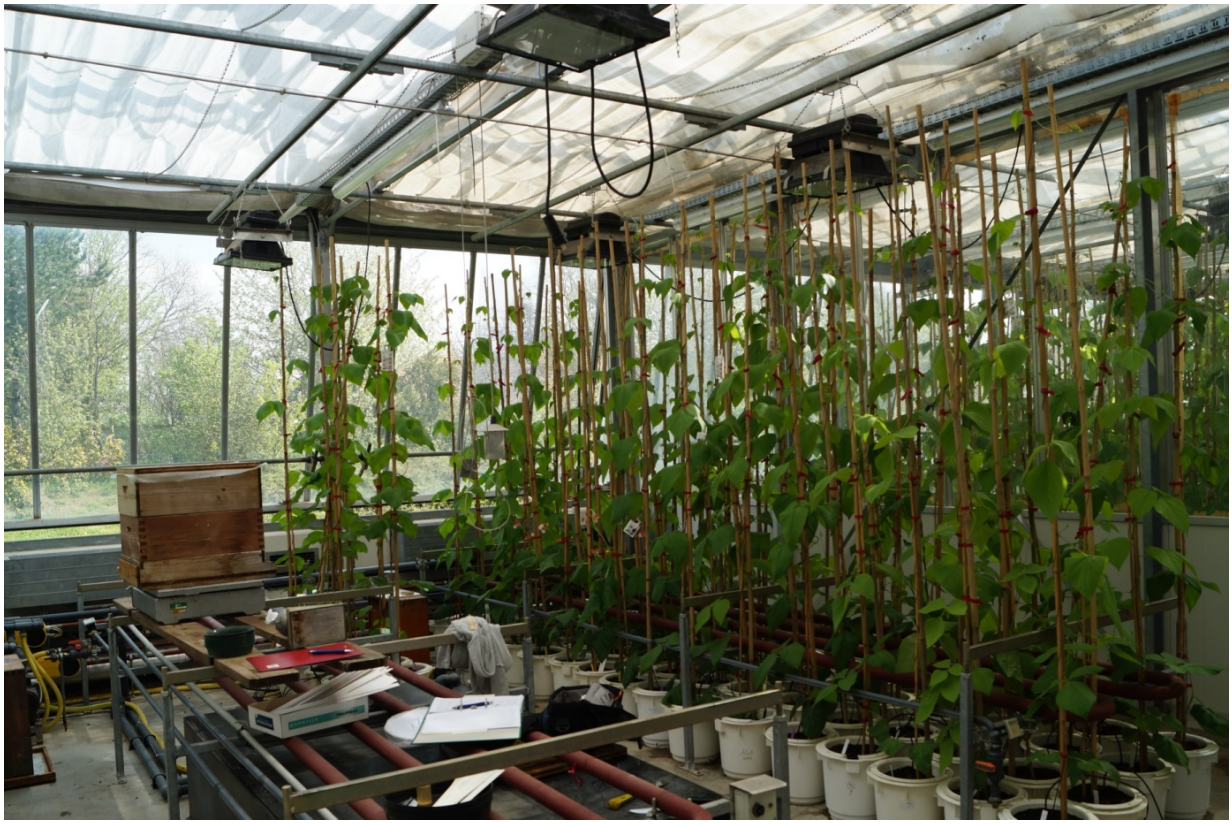


Abbildung 5: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 17.04.2018 vor dem Hitzestress. Die Pflanzen verwenden die Rankhilfen, um in die Höhe zu wachsen. Nur die Sorte „Hestia“ rankte als Buschtyp kaum. Links im Bild ist der Bienenstock zu erkennen.

Ungefähr einen Monat nach dem Aufstellen der Pflanzen im Glashaus WSP wurden die ersten Blüten ausgebildet, wobei die Blütenfarbe entweder rot, weiß oder eine Kombination von roter Fahne und weißen Flügeln war. Innerhalb einer Akzession konnten unterschiedliche Blütenfarben an den Individuen auftreten (Abbildung 6). Die Blüten wurden von den Pflanzen kontinuierlich ausgebildet, jedoch hitzestressbedingt in unterschiedlicher Anzahl (zu detaillierten Angaben über die Blütenbildung siehe 3.2 sowie 3.3). Die Blüten wurden von den Bienenvölkern angenommen und beflogen, wodurch die Bestäubung der Käferbohnen gewährleistet wurde. Der Beflug durch die Bienen begann etwa zehn Tage nach dem ersten Blütenansatz. Eine Woche nach Einsetzen des Hitzestresses stellten die Bienen die Sammelaktivität ein. Erst knapp zwei Wochen nach Ende des Hitzestresses wurden die Bienen wieder an den Blüten beobachtet und einige Tage später auch neue Hülsenansätze festgestellt.

Abbildung 6: Beispiele für die an den Käferbohnen ausgebildeten verschiedenfarbigen Blüten. Rote Blüte (links), weiße Blüte (mittig), rote Fahne und weiße Flügel (rechts).

Abbildung 7: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 11.05.2018 im Zeitraum des künstlichen Hitzestresses. Die Pflanzen haben stark an Biomasse zugenommen und blühen. Die im Bild erkennbaren Blüten wurden zu diesem Zeitpunkt aktiv von den Bienen beflogen.

Ungefähr sechs Wochen nach dem Umtopfen der Jungpflanzen und dem Aufstellen in den beiden Räumen des Glashauses WSP wurden bei der Bonitur die ersten Hülsenansätze festgestellt. Die Hülsen waren zunächst durchgängig grün gefärbt (Abbildung 8, Abbildung 10), mit beginnender Abreife erfolgte eine Verfärbung hin zu einer gelbbraunen Farbe (Abbildung 9, Abbildung 10). Innerhalb einer Hülse ließen sich ca. eine bis vier, vereinzelt auch fünf oder sechs, Bohnen als deutlich ausgeprägte Verdickungen feststellen (Abbildung 10).

Abbildung 8: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 08.06.2018 nach Ende des künstlichen Hitzestresses. Die Pflanzen verwendeten zunächst die Rankhilfen um in die Höhe zu wachsen. Nachfolgende Seitensprosse benutzten auch nebenstehende Pflanzen als Rankhilfe, vereinzelt wurden auch Konstruktionen des Glashauses (Deckenlampen, Schattierungen, etc.) zur Fixierung verwendet. Der rote Pfeil markiert eine sich noch in der Entwicklung befindende Hülse.

Abbildung 9: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 18.06.2018 nach Ende des künstlichen Hitzestresses. Der rote Pfeil markiert eine ausgereifte Hülse.

Abbildung 10: Unreife Käferbohnen-Hülsen (links) und ausgereifte Käferbohnen-Hülsen zweier unterschiedlicher Akzessionen, fotografiert an unterschiedlichen Terminen. Die Verdickungen der Hülsen zeigen die Anzahl der sich in der Hülse befindenden Bohnen an. Zu sehen sind auch die zwecks Wiedererkennung an den Hülsenansatz montierten Fähnchen (rosa und gelb) und Farbmarkierungen (gelbe Acrylfarbe).

3.2 ENTWICKLUNG DER BLÜTEN UND HÜLSEN VOR DEM HITZESTRESS

Die erste Blütenbildung konnte bei einem Individuum der Nummer 91 (Sorte „Hestia“, im Wuchs der einzige Buschtyp im Versuch) am 16.04.2018 festgestellt werden, genau 35 Tage nach Ansaat der Käferbohnen, und 20 Tage nach dem Umtopfen. Von den 264 umgetopften und im Glashaus WSP weiter herangezogenen Pflanzen gelangten 254 zur Blüte, was einer Quote von 96,21 % blühenden Individuen entspricht. Lediglich bei drei Akzessionen (4, 45, 50) und drei Sorten (87: Melange, 95: Hellviolette, 97: Prijswinner) gab es Pflanzen, bei denen das Ausbilden einer Blüte während der dokumentierten Versuchsdauer nicht erfolgte. Dabei sticht die Nummer 97 (Sorte Prijswinner) mit drei nicht-blühenden Individuen heraus, bei den anderen oben genannten Akzessionen und Sorten gab es ein bis zwei nicht-blühende Individuen. Tabelle 1 gibt den Zeitpunkt an, an dem bei mindestens 50 % der Pflanzen einer Akzession oder Sorte (das entspricht vier Individuen) eine Blüte dokumentiert wurde. Ausgehend vom Aspekt der ersten Blüte einer Akzession oder Sorte lässt sich eine rasch einsetzende Entwicklung ohne große Streuung bei allen Akzessionen und Sorten beobachten (Abbildung 11). Die erste Blüte im Glashaus war am 16.04.2018 bei der Sorte Hestia zu finden. Neun Tage später, am 25.04.2018 und damit noch deutlich vor dem einsetzenden Hitzestress, hatten alle Akzessionen oder Sorten ihre erste Blüte ausgebildet.

Tabelle 1: Zeitpunkt zu dem 50 % der Pflanzen einer Akzession oder Sorte mindestens eine Blüte ausgebildet hatten.

Datum	Anzahl neu blühender Akzessionen und Sorten	% blühende Akzessionen und Sorten	Summe blühende Akzessionen und Sorten	Identifikations-nummer
16.04.2018	1	3,0	1	91
21.04.2018	1	6,1	2	82
22.04.2018	4	18,2	6	50, 59, 67, 73
23.04.2018	7	39,4	13	1, 6, 54, 77, 89, 94, 95
24.04.2018	3	48,5	16	12, 19, 53
25.04.2015	4	60,6	20	34, 40, 92, 93
26.04.2018	5	75,8	25	16, 29, 32, 66, 84
27.04.2018	3	84,8	28	45, 88, 97
29.04.2018	1	87,9	29	60
30.04.2018	2	93,9	31	63, 96
01.05.2018	1	97,0	32	87
08.05.2018	1	100,0	33	4
Total	33	100,0	33	

Bei insgesamt 32 von 33 Akzessionen und Sorten wurden Hülsenansätze größer als 5 cm dokumentiert. Bei Nummer 89 (Steirische Riesen) konnte trotz Blütenbildung bei allen acht im Glashaus aufgezogenen Käferbohnenpflanzen keine Hülsenbildung beobachtet werden. Von den 254 Blüten ausbildenden Pflanzen konnte bei 144 Individuen auch eine Hülsenbildung beobachtet werden, was einer Quote von 56,7 % entspricht. Im Durchschnitt dauerte es genau 14 Tage von der Beobachtung der ersten Blütenbildung an einer Pflanze bis zur ersten Hülsenbildung größer als 5 cm, wobei hier der Minimalwert bei 6 Tagen und der Maximalwert bei 22 Tagen lag.

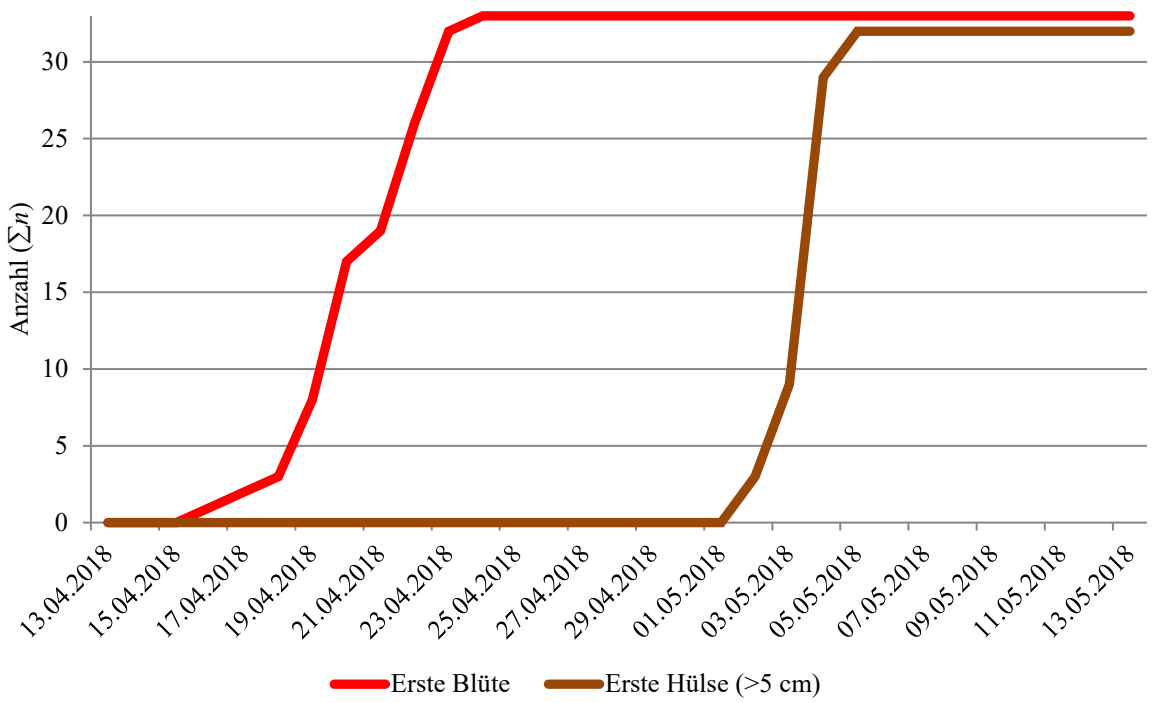


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der dokumentierten ersten Blüte und ersten Hülse größer als 5 cm an mindestens einem Individuum aller 33 im Glashaus aufgestellten Akzessionen und Sorten. Die Daten veranschaulichen die gleichmäßige und rasche Entwicklung.

3.3 REAKTION DER PFLANZEN AUF HITZESTRESS

Ab dem 07.05.2018 wurden die Käferbohnen in beiden Abteilen des Glashauses genau vier Wochen lang einem täglichen, vierstündigen (11:00 bis 15:00) Hitzestress von 35 °C ausgesetzt. Lediglich an einigen wenigen Tagen, an denen die Außentemperaturen außergewöhnlich niedrig waren, konnte diese Temperatur nicht gehalten werden (s. Abbildung 2). Beim Einsetzen des künstlichen Hitzestresses waren bereits an 99 Pflanzen Hülsenansätze festgestellt worden, was einem Anteil von 69,23 % an der Gesamtanzahl der hülsenausbildenden Pflanzen entspricht. Wie zu erwarten reagierten alle 33 Akzessionen und Sorten mit dem in der Literatur weitreichend beschriebenen Abwerfen der Blüten, auch wenn dieser Effekt mit einer kurzen zeitlichen Verzögerung von ca. drei Tagen erst deutlich sichtbar auftrat (siehe Abbildung 12). So wurde die maximale Blütenanzahl für alle 33 Akzessionen und Sorten mit einer Summe von 1884 Blüten am 09.05.2018 bonitiert. Bereits nach einer Woche Hitzestress, am 14.05.2018, hatte sich dieser Wert auf 327 Blüten reduziert. Der niedrigste Wert in der Hitzeperiode wurde am 24.05.2018 gemessen. Zu diesem Zeitpunkt konnten insgesamt nur noch 70 Blüten an allen 264 sich im Glashaus befindenden Pflanzen festgestellt werden.

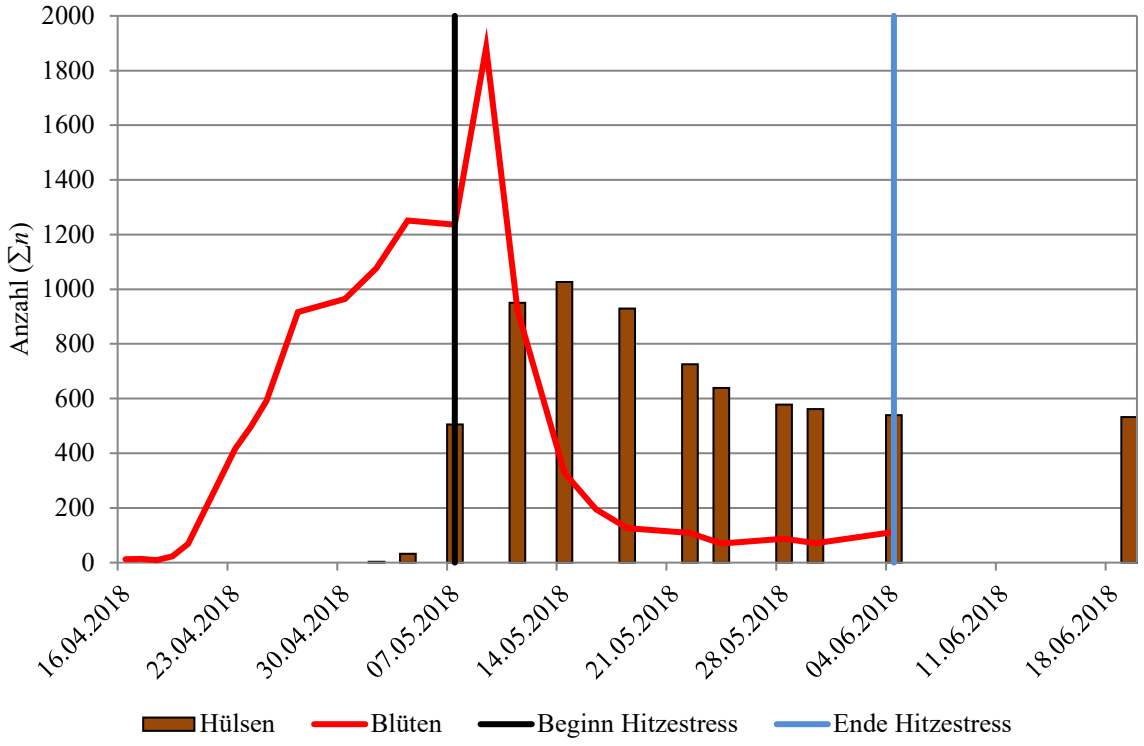


Abbildung 12: Kumulative Gesamtanzahl der ausgebildeten Blüten und Hülsen für alle 264 individuellen Pflanzen der 33 im Glashaus aufgestellten Akzessionen und Sorten. Der Beginn des Hitzestresses (07.05.2018) ist mit einem schwarzen, das Ende (04.06.2018) mit einem blauen Strich markiert.

Das deutlich gestiegene Abwerfen der Blüten und Hülsen war auch ohne Bonitur eindeutig erkennbar. Auffällig war sowohl das Fehlen der Blüten an den Pflanzen als auch die große Anzahl der auf dem Glashausboden aufgefundenen Blüten und Hülsen (Abbildung 13).

Abbildung 13: Aufgrund des Hitzestresses abgeworfene Blüten und Hülsen der Käferbohnen auf dem Boden des Glashauses. Der Hitzestress hatte keinen Einfluss auf die Bienensterblichkeit. Altersbedingt gestorbene Bienen wurden im üblichen Ausmaß beobachtet.

Auf den Diagrammen der nachfolgenden Seiten 22 bis 26 werden die kumulative Anzahl der Blüten und der Hülsen der entsprechenden Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten über die Dauer des Versuchszeitraums wiedergegeben. Zuoberst jeder Seite befindet sich das Diagramm der Referenzsorte „Bonela“, welche die übliche in der Produktion angebaute Sorte in Österreich ist und dem Typ der Steirischen Käferbohne entspricht. Die hier dargestellten Diagramme wurden für alle 33 Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten ausgearbeitet. In diesem Ergebnisteil sind die Diagramme derjenigen Akzessionen und eine Sorte angeführt, welche zum Zeitpunkt der finalen Bonitur einen höheren Käferbohnenertrag aufwiesen als die Referenzsorte „Bonela“ (siehe auch Abbildung 29 sowie Tabelle 2). Die Diagramme für die übrigen Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten sind dem Anhang zu entnehmen.

Es zeigte sich, dass alle Akzessionen und Sorten bei einsetzendem Hitzestress mit einem Abwurf der Blüten reagierten. Oftmals konnten an den hier dargestellten ertragreichen Akzessionen und Sorten sogar keinerlei Blüten mehr festgestellt werden, weswegen davon auszugehen ist, dass das Ausbilden der Hülsenansätze bereits vor oder kurz nach dem Beginn des Hitzestresses abgeschlossen war. Anhand der nach einigen Tagen stagnierenden Gesamtanzahl von Hülsen ist erkennbar, dass die Pflanzen bereits gut ausgebildete Hülsen ab einem gewissen Zeitpunkt bevorzugt nicht mehr abwerfen. Im Gegenzug werden keine neuen Hülsenansätzen und keine Blüten mehr gebildet. Die besonders ertragreiche Akzessionen 67 (aus Italien) und 82 (aus dem Burgenland) warfen zwar auch Hülsen ab, hatten aber zum Zeitpunkt des einsetzenden Hitzestresses aufgrund ihrer hohen Anzahl an ausgebildeten Hülsen bereits so viele Hülsenansätze vorzuweisen, dass eine deutlich höhere Ertragsleistung als bei der Referenzsorte „Bonela“ erzielt wurde.

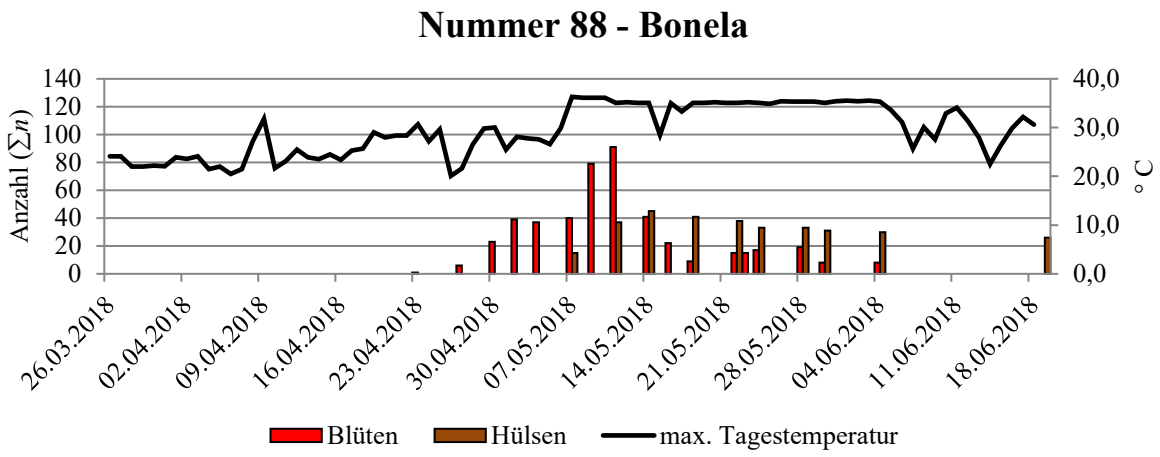


Abbildung 14: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

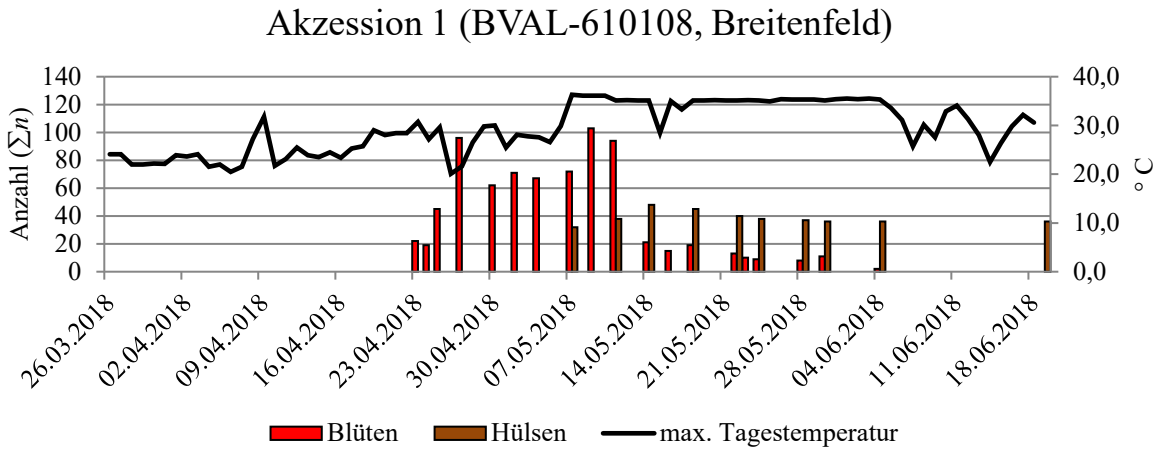


Abbildung 15: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 1 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

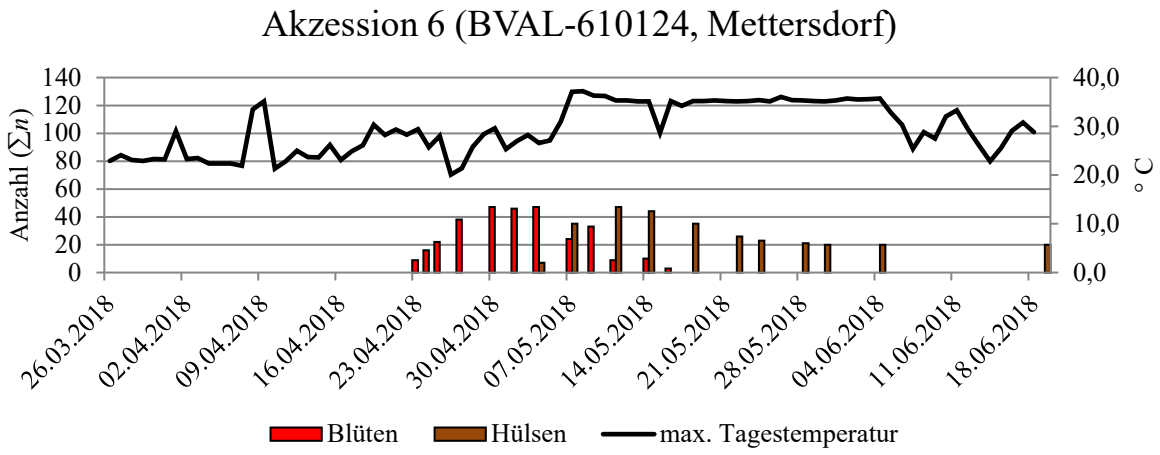


Abbildung 16: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 6 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

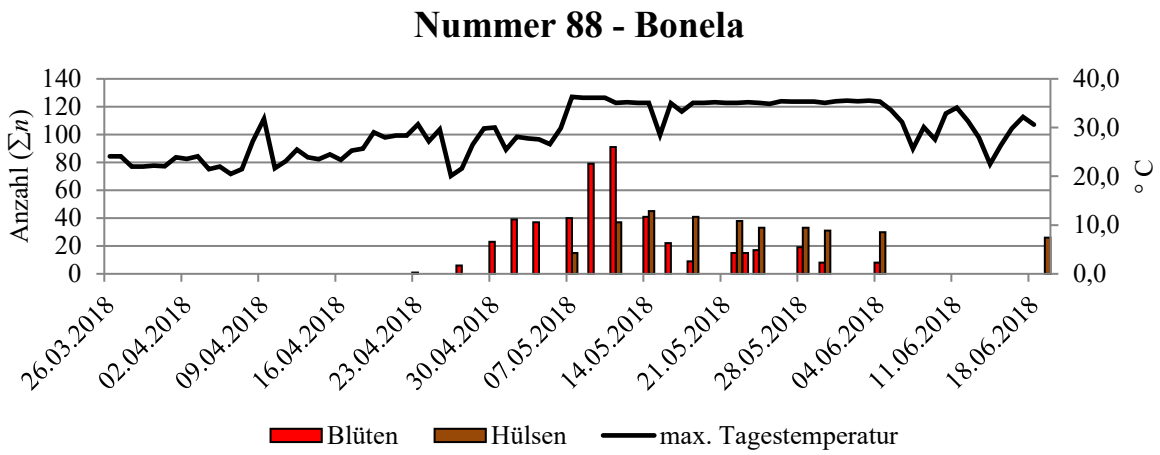


Abbildung 17: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

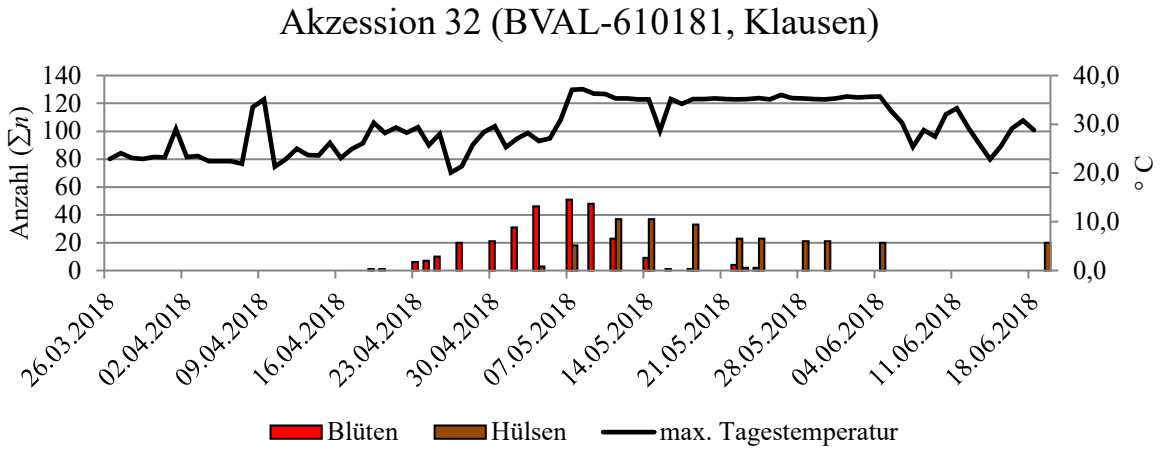


Abbildung 18: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 32 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

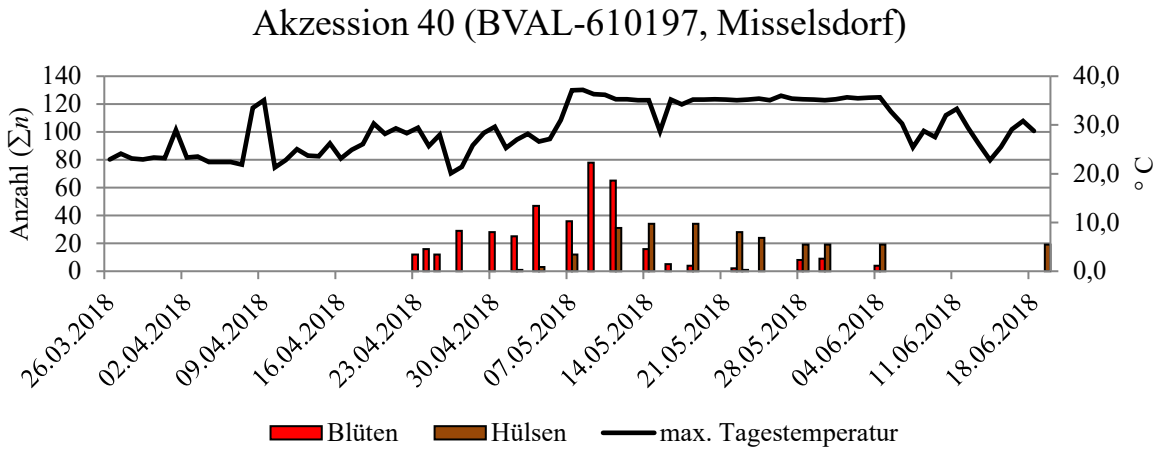


Abbildung 19: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 40 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

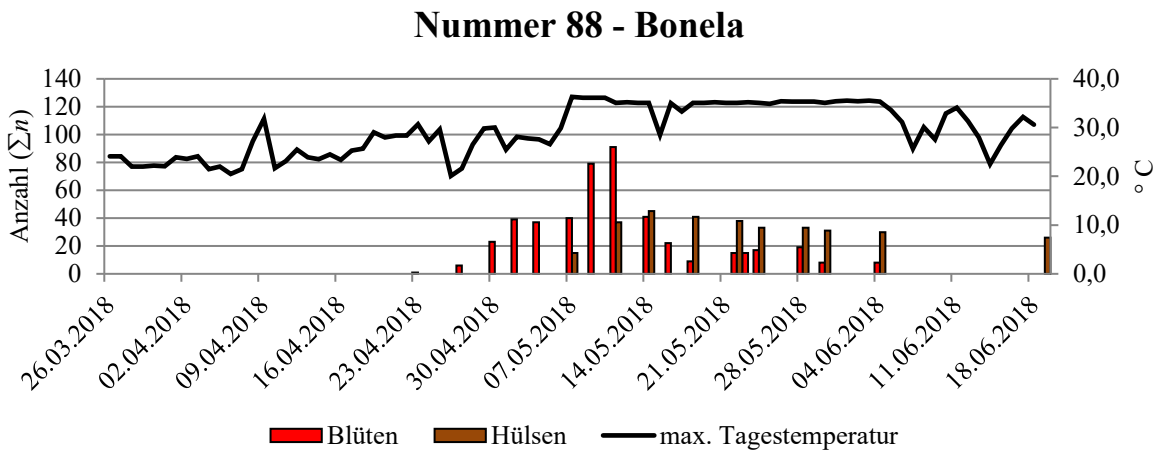


Abbildung 20: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

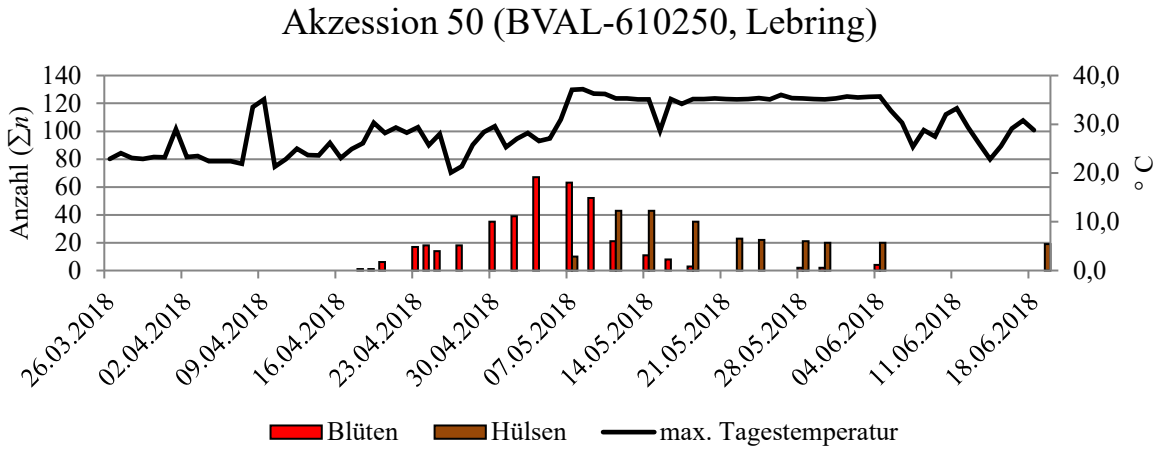


Abbildung 21: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 50 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

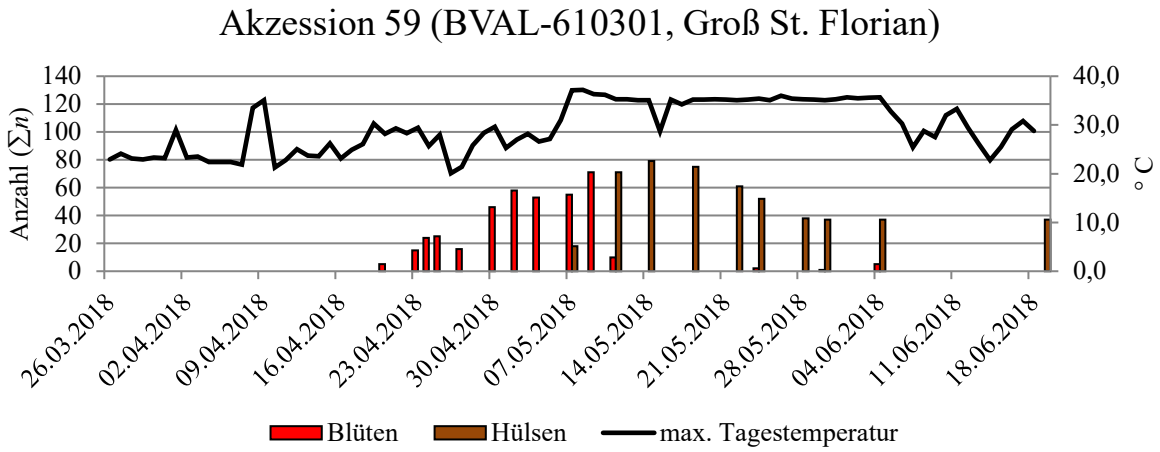


Abbildung 22: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 59 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

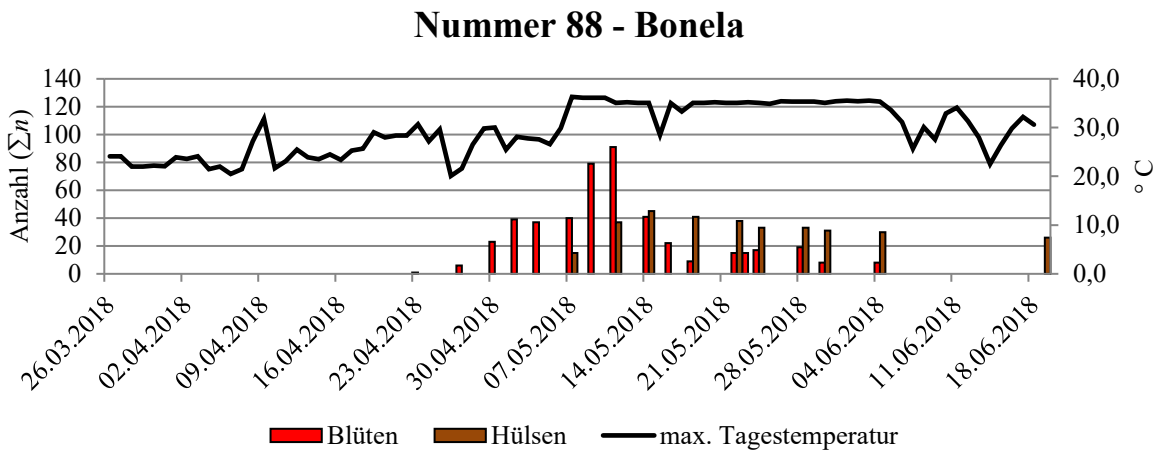


Abbildung 23: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

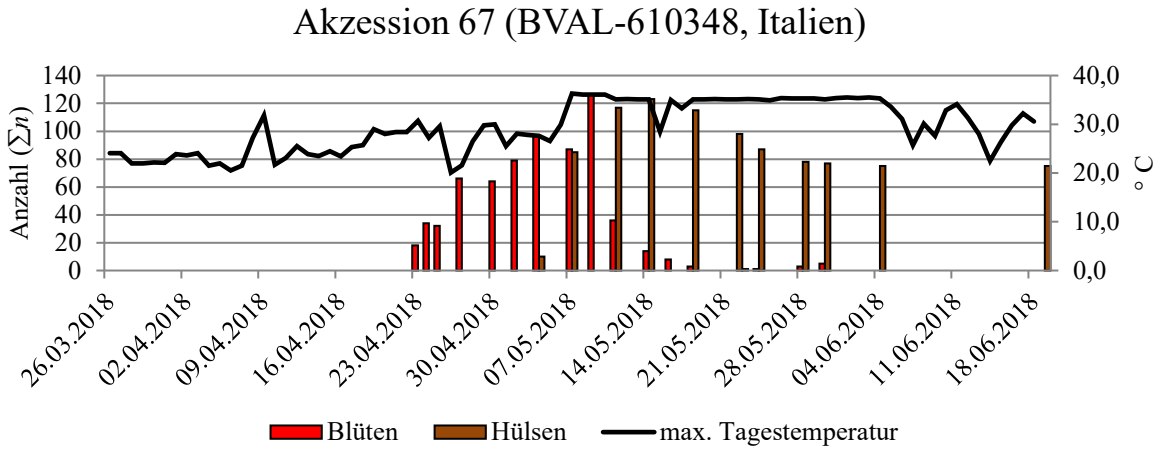


Abbildung 24: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 67 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

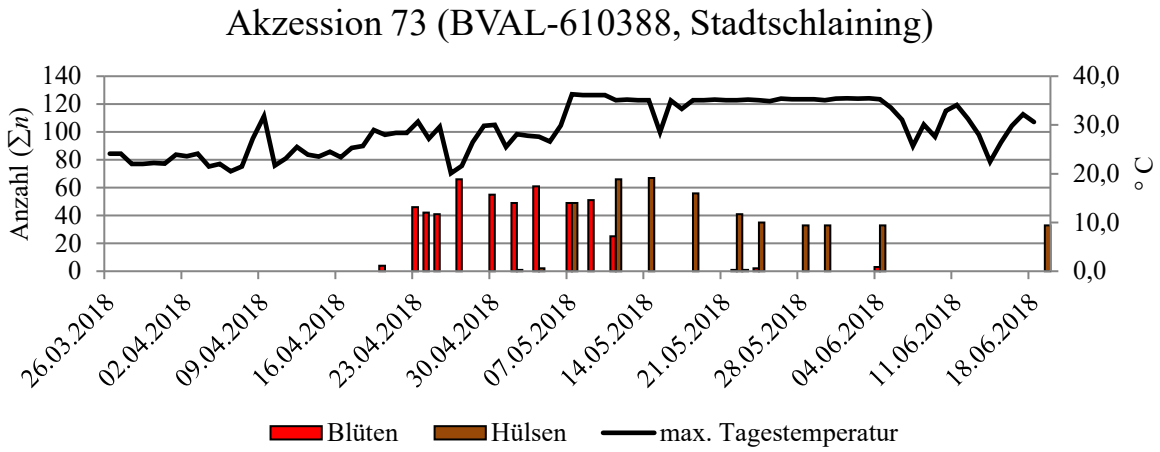


Abbildung 25: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 73 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

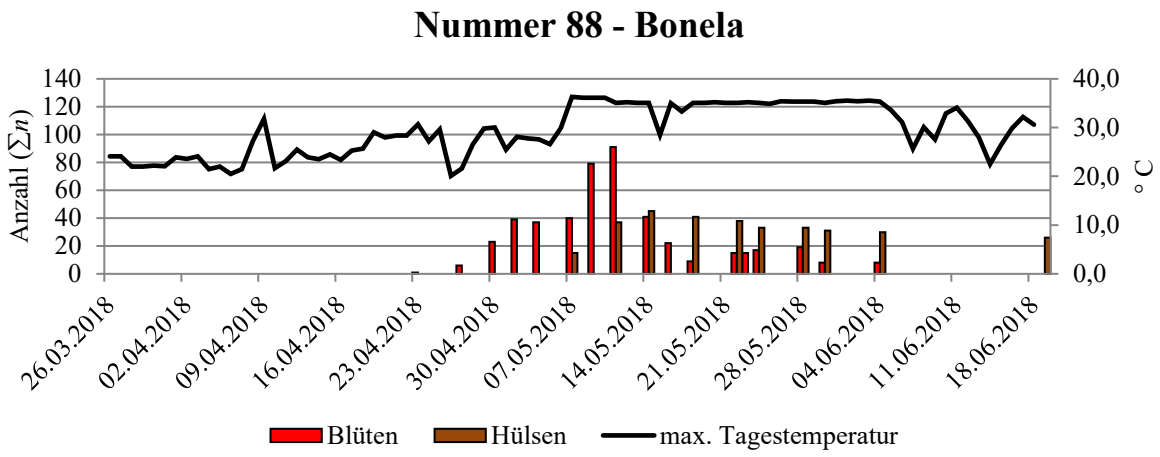


Abbildung 26: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

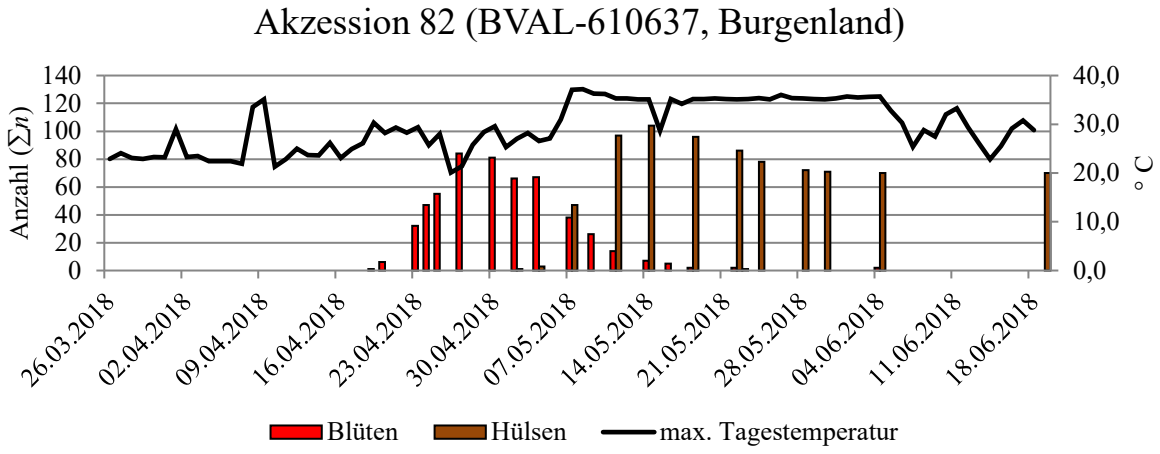


Abbildung 27: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 82 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

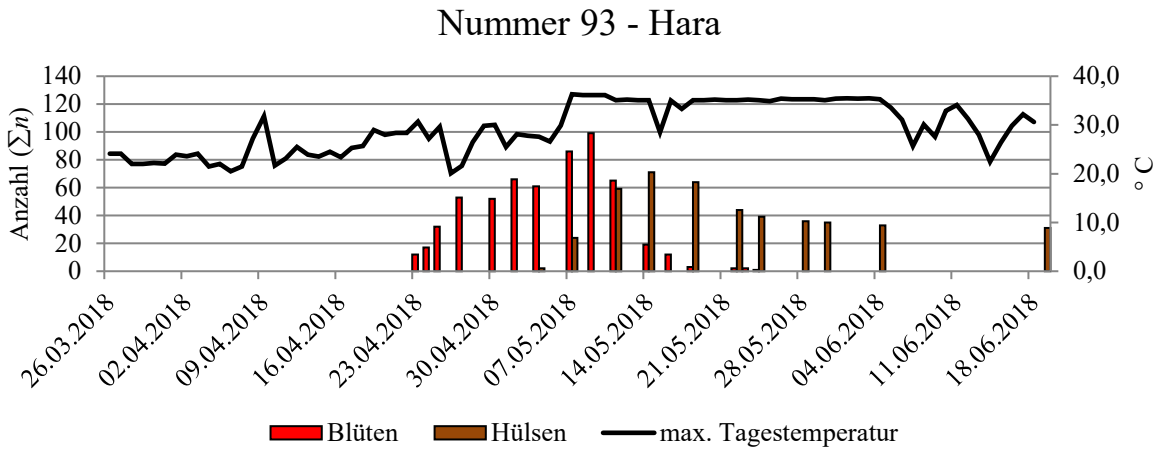


Abbildung 28: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Sorte „Hara“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an.

3.4 ERTRAGSLEISTUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN KÄFERBOHNEN-AKZESSIONEN UND -SORTEN BEI HITZESTRESS

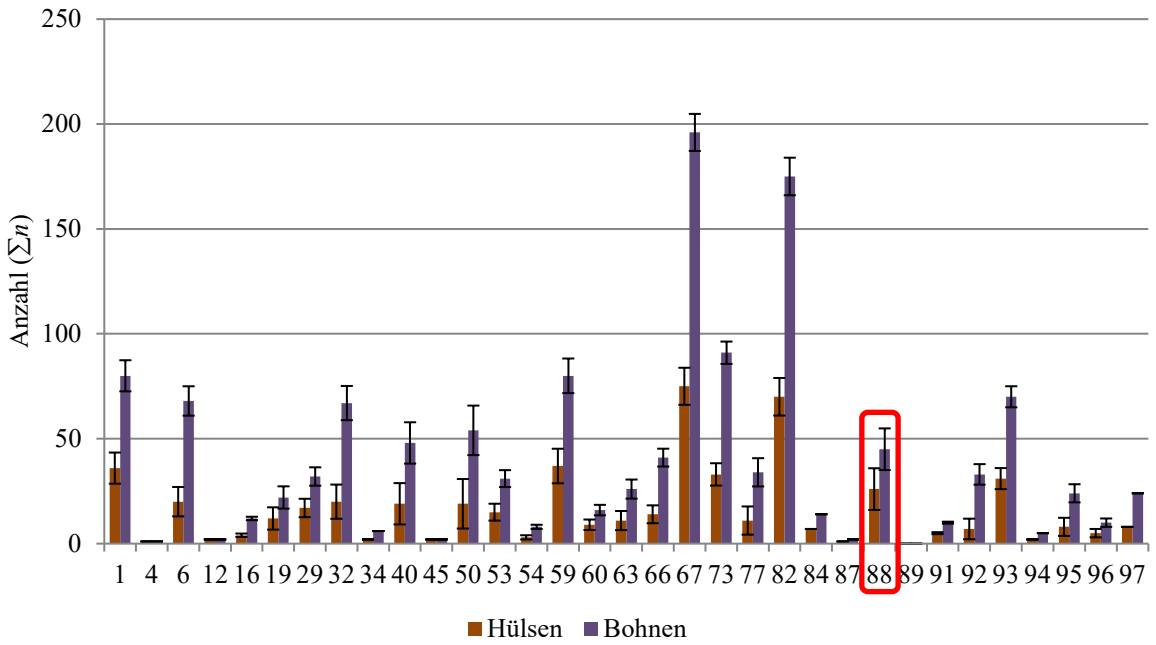


Abbildung 29: Anzahl (± Standardfehler) der von den 33 unterschiedlichen Akzessionen und Sorten ausgebildeten Hülsen und Bohnen zum Zeitpunkt der Hülsenernte am 19.06.2018. Die Referenzsorte „Bonela" ist rot markiert.

Für alle 33 Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten wurde ungefähr zwei Wochen nach dem Beenden des Hitzestresses (04.06.2018) am 19.06.2018 eine finale Bonitur durchgeführt, bei welcher alle vorhandenen Hülsen dokumentiert und geerntet wurden. Die geernteten Hülsen wurden fotografiert und die Bohnen anschließend entnommen. Eine Übersicht über die dabei dokumentierte Anzahl von Hülsen und Bohnen je Akzession bzw. Sorte gibt die Abbildung 29. Die Käferbohnen-Akzessionen 67 und 82 stechen dabei deutlich und mit größerem Abstand als ertragsstärkste Akzessionen heraus. Danach folgt ein größeres oberes Mittelfeld, in welchem sich die Akzessionen 73, 59, 1, 6, 32, 50 und 40 bzw. die Sorte „Hara" (Nummer 93) befinden. Von allen diesen Akzessionen wurden mehr ausgereifte Käferbohnen geerntet als von der Referenzsorte „Bonela". Die restlichen 22 Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten waren allesamt weniger ertragsstark als die Referenzsorte (s. Diagramme im Anhang).

Aufbauend auf der finalen Bonitur der Hülsen und der Auszählung der Bohnen wurden mehrere ertragsleistungsrelevante Parameter erhoben und berechnet, welche in Tabelle 2 wiedergegeben sind. Die besonders ertragsstarken Akzessionen 67 und 82 bildeten deutlich mehr Hülsen und Bohnen aus als die Referenzsorte „Bonela" (Nummer 88), und hatten auch eine niedrigere Abwurfquote zu verzeichnen. Die Akzession 82 bildete weniger Bohnen aus als die Akzession 67, kam aber mit geringerer Abwurfquote und höherem Gewicht der Bohnen auf einen größeren absoluten Ertrag. Ein weiteres interessantes Charakteristikum findet sich bei Akzession 6, welche zwar ca. 20 % weniger Hülsen ausbildete als „Bonela", aufgrund einer hohen Anzahl an Bohnen pro Hülse dennoch einen deutlich höheren Ertrag erzielte. Derselbe Effekt tritt bei den Akzession 32, 40 und 50 auf, und führt zu einem höheren Bohnenertrag als bei „Bonela". Hinsichtlich Bohnen pro Hülse stach ebenfalls die Sorte Nummer 92 (Lady Di) besonders hervor. Diese Sorte fiel bereits im Glashaus durch auffällig lange Hülsen auf, was sich durch die hohe Anzahl an Bohnen pro Hülse letztendlich bestätigte. Insgesamt korreliert die Anzahl der Hülsen deutlich mit der Anzahl der Bohnen pro Pflanze (r=0,983), genauso wie die Anzahl der Hülsen auch deutlich mit dem Bohnenertrag korreliert (r=0,984).

Tabelle 2: Erhobene Ertragsparameter der verschiedenen Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten nach der Hülsenernte am 19.06.2018. Die Referenzsorte „Bonela“ ist rot markiert. Höchstwerte der erhobenen Parameter sind fett markiert. N/A=nicht anwendbar

Akzession/ Sorte	Hülsen	Bohnen	%-Abwurf Hülsen	Ertrag Bohnen (g)	Bohnen pro Hülse	Gewicht pro Bohne (g)
1	36	80	25,00	88,76	2,22	1,1095
4	1	1	50,00	1,17	1,00	1,1700
6	20	68	57,45	69,19	3,40	1,0175
12	2	2	85,71	2,65	1,00	1,3250
16	4	12	50,00	9,61	3,00	0,8008
19	12	22	62,50	24,50	1,83	1,1136
29	17	32	32,00	29,91	1,88	0,9347
32	20	67	47,37	53,04	3,35	0,7916
34	2	6	77,78	5,26	3,00	0,8767
40	19	48	44,12	56,48	2,53	1,1767
45	2	2	0,00	1,45	1,00	0,7250
50	19	54	56,82	48,92	2,84	0,9059
53	15	31	37,50	34,87	2,07	1,1248
54	3	8	**86,36**	6,70	2,67	0,8375
59	37	80	53,75	86,65	2,16	1,0831
60	9	16	70,97	15,03	1,78	0,9394
63	11	26	66,67	21,62	2,36	0,8315
66	14	41	46,15	50,92	2,93	1,2420
67	**75**	**196**	39,02	**184,44**	2,61	0,9410
73	33	91	51,47	74,95	2,76	0,8236
77	11	34	21,43	24,32	3,09	0,7153
82	70	175	32,69	184,45	2,50	1,0540
84	7	14	41,67	10,30	2,00	0,7357
87	1	2	50,00	2,76	2,00	**1,3800**
88	26	45	44,68	41,20	1,73	0,9156
89	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
91	5	10	12,50	6,72	2,00	0,6720
92	7	33	56,34	28,89	**4,71**	0,8755
93	31	70	80,00	67,31	2,26	0,9616
94	2	5	60,00	3,83	2,50	0,7660
95	8	24	70,59	22,30	3,00	0,9292
96	5	10	38,46	12,08	2,00	1,2080
97	8	24	25,00	15,40	3,00	0,6417
Ø	16,12	40,27	49,97	40,18	2,41	0,95

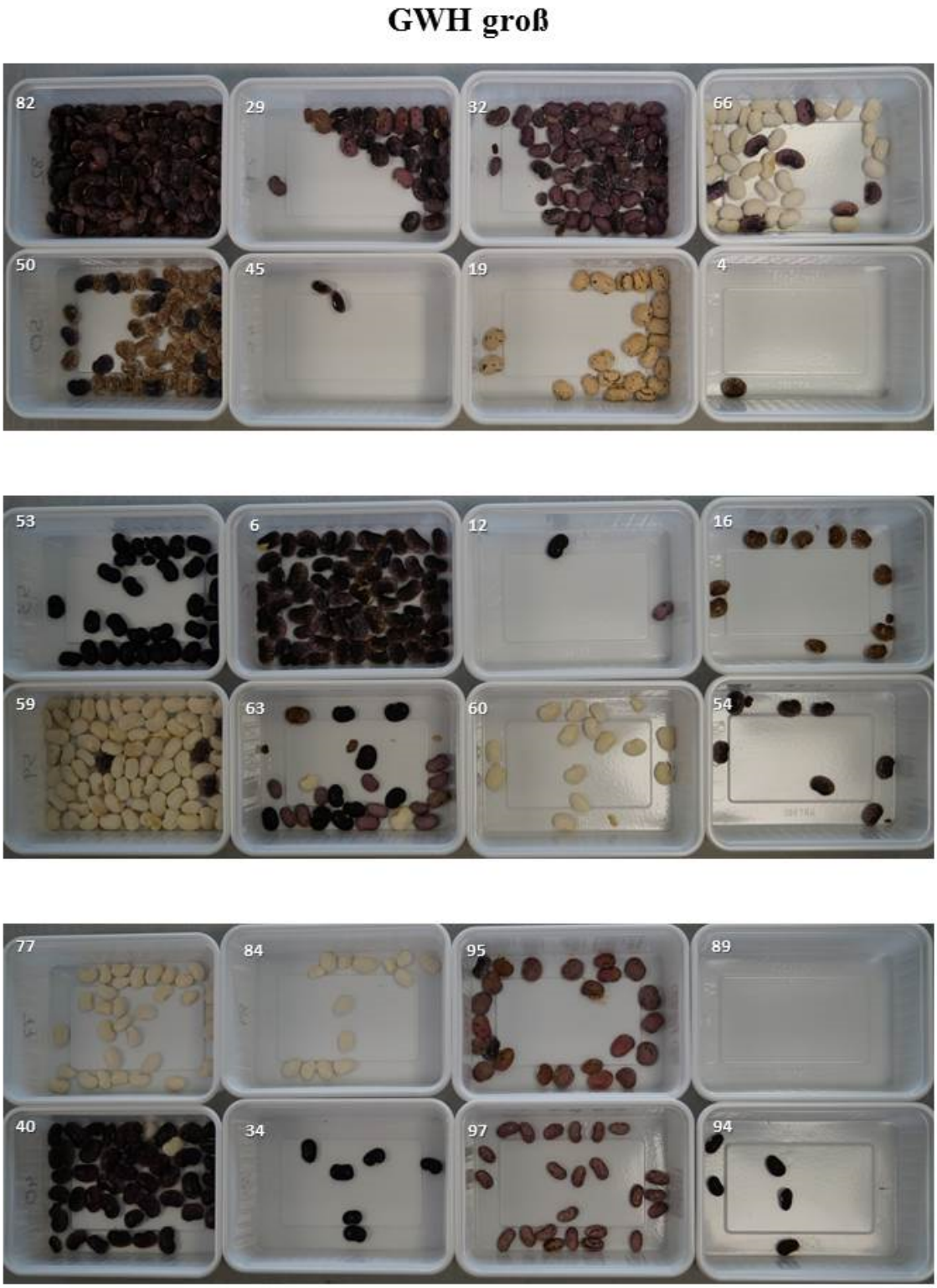


Abbildung 30: Geerntete Käferbohnen der unterschiedlichen Akzessionen und Sorten des großen Glashausabteils. Die Positionierung der Schalen erfolgte nach der Platzierung der Käferbohnen im Glashaus (s. Abbildung 1).

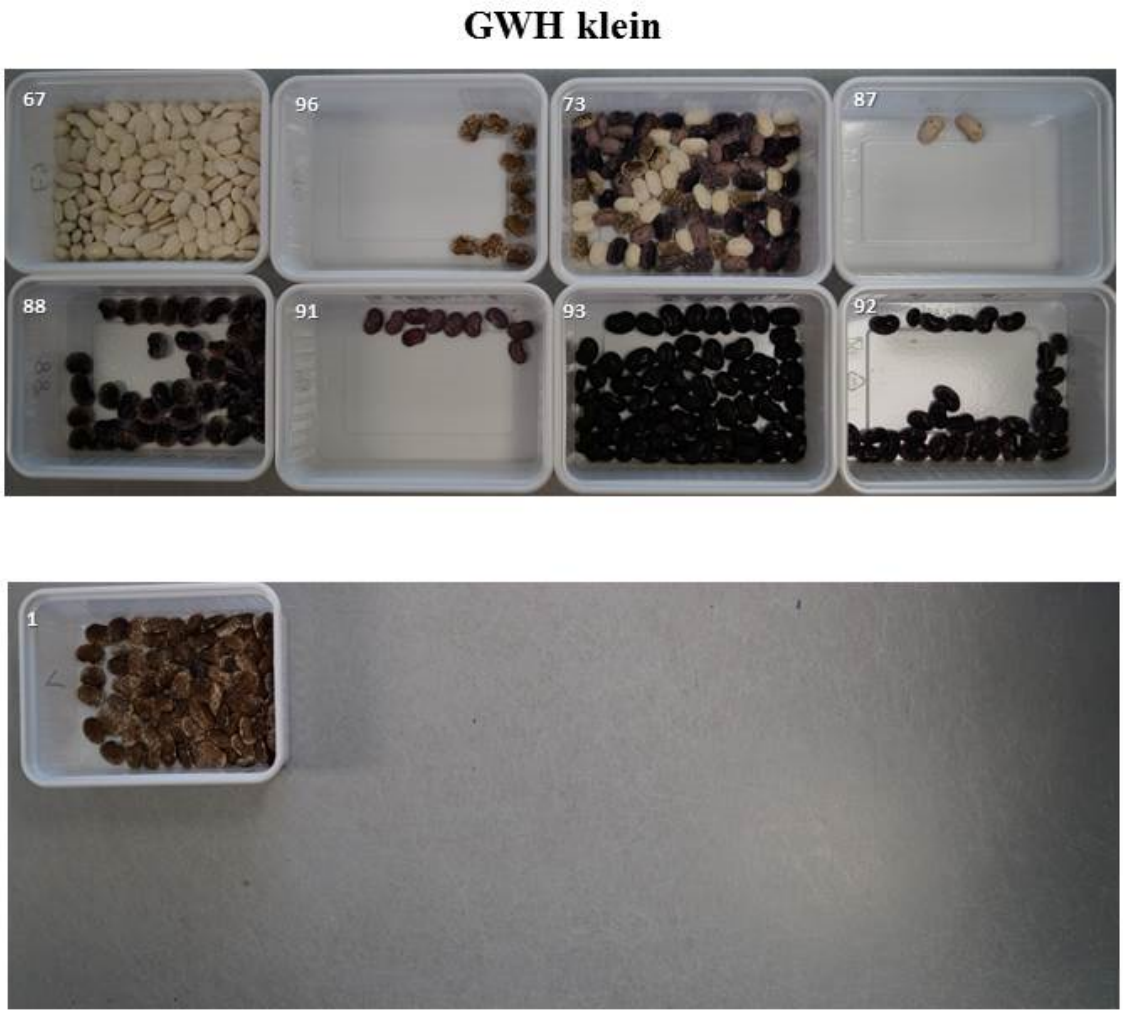


Abbildung 31: Geerntete Käferbohnen der unterschiedlichen Akzessionen und Sorten des kleinen Glashausabteils. Die Positionierung der Schalen erfolgte nach der Platzierung der Käferbohnen im Glashaus (s. Abbildung 1).

In den beiden obenstehenden Abbildungen sind die geernteten Käferbohnen aller 24 Akzessionen und Sorten des großen Abteils des Glashauses (Abbildung 30) und aller neun Akzessionen und Sorten des kleinen Abteils des Glashauses (Abbildung 31) entsprechend ihrer Position im Glashaus abgebildet. Auffällig sind dabei zum einen die großen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der geernteten Bohnen, welche von null Bohnen bei der Nummer 89 („Steirische Riesen“) bis hin zu 196 Bohnen bei der Akzession 67 rangieren, als auch die große Diversität beim phänotypischen Erscheinungsbild der Samen. Auch finden sich innerhalb einiger Akzession sehr unterschiedliche Farben und Musterungen bei den Samen, so stechen zum Beispiel die Akzessionen 63 und 73 mit einer Vielfalt an unterschiedlich ausgeprägten Bohnen heraus.

3.5 GENOTYPING-BY-SEQUENCING UND DATENAUSWERTUNG

Ziele der Genotypisierung der 84 Käferbohnen-Akzessionen und 10 Käferbohnen-Sorten waren 1) die Ermittlung der genetischen Diversität innerhalb der Akzession, 2) die Darstellung der Verwandtschaft der Akzessionen und Sorten basierend auf ihrer genetischen Diversität 3) die kombinatorische Analyse der genotypischen und phänotypischen Daten. Die Korrelation von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit phänotypischen Ausprägungen bildet die Grundlage für die Entwicklung molekularer Marker. Im Projekt CHARACCESS lag der Fokus auf Hitzetoleranz, daher wurden Blüten- und Hülsenmerkmale sowie Ertragsdaten berücksichtigt.

3.5.1 DATENQUALITÄT UND SNP CALLING

Die nach der RADSeq erhaltenen Sequenzdaten waren mit einem Phred Quality Score von 35 von hoher Sequenziergenauigkeit. Da die Rohdaten keine Adaptoren mehr aufwiesen, mussten sie diesbezüglich nicht weiter gefiltert werden.

Mittels ipyrad wurden insgesamt 11.506 Loci ermittelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Loci nach ipyrad Filter- und Analyseprozess.

	total_filters	applied_order	retained_loci
total_prefiltered_loci	151935	0	151935
filtered_by_rm_duplicates	4173	4173	147762
filtered_by_max_indels	287	287	147475
filtered_by_max_snps	871	81	147394
filtered_by_max_shared_het	1159	785	146609
filtered_by_min_sample	136188	132810	13799
filtered_by_max_alleles	13519	2293	11506
total_filtered_loci	**11506**	**0**	**11506**

Von den 11.506 Loci wurden 31 monomorphe Loci verworfen, da diese für die anschließende STRUCTURE-Analyse nicht verwendet werden konnten. Nach weiterer Filterung (s. Material und Methoden) wurden für die folgenden Analysen zwei Datensätze generiert:

- Datensatz I: 674 Individuen (94 Akzessionen) – 508 Loci.
- Datensatz II (phänotypisierte Individuen): 238 Individuen (33 Akzessionen) – 483 Loci.

3.5.2 ERMITTLUNG DER GENETISCHEN DIVERSITÄT INNERHALB DER AKZESSIONEN

Die genetische Diversität innerhalb einer Population kann mittels der “expected heterozygosity” bzw. „gene diversity“ ermittelt werden. Hier wurde eine Population mit einer Akzession gleichgesetzt. Die “expected heterozygosity” (Hexp) beschreibt jenen Anteil von heterozygoten Genotypen, welche unter dem Hardy-Weinberg Equilibrium erwartet werden. Sie wird mit folgender Formel (Nei 1978) berechnet: Hexp = (n/(n - 1))*(1 - sum(p^2)), wobei p die Allelfrequenz an einem Lokus und n die Anzahl der Allele pro Lokus darstellt. Individuen von Akzessionen mit einem niedrigen Hexp-Wert sind genetisch sehr ähnlich. Je höher der Hexp-Wert desto genetisch verschiedener sind die Individuen innerhalb einer Akzession.

Die Anzahl der analysierten Individuen pro Akzession oder Sorte (Abbildung 32) kann das Ergebnis der Hexp beeinflussen. Je höher die Anzahl der analysierten Individuen, desto korrekter das Abbild der genetischen Diversität der Akzession oder Sorte. In ähnlichen Arbeiten mit Nutzpflanzen in Bezug auf Akzessionen wurden meist zwischen einem (Zheng et al. 2018) und sechs (Hu et al. 2019) bis zwanzig Individuen pro Akzession analysiert. Für die Arbeiten im Projekt CHARACCESS waren im Projektplan für jede Akzession bzw. Sorte acht Individuen vorgesehen. Im Durchschnitt konnten für die Ermittlung der genetischen Diversität 7,2 Individuen pro Akzession oder Sorte bzw. zwischen zwei und acht Individuen für die einzelnen Akzession oder Sorte herangezogen werden (Abbildung 32). So konnten in der Akzession 31 nur zwei Individuen genetisch charakterisiert werden (Abbildung 33, roter Pfeil). Diese Akzession wurde als sehr schwach divers eingestuft. Hinter den Akzessionen 69, 85 und der Nummer 91 – „Hestia“ (Abbildung

33, schwarze Pfeile) stehen drei Individuen, alle weiteren Akzessionen oder Sorten haben mehr als vier Individuen.

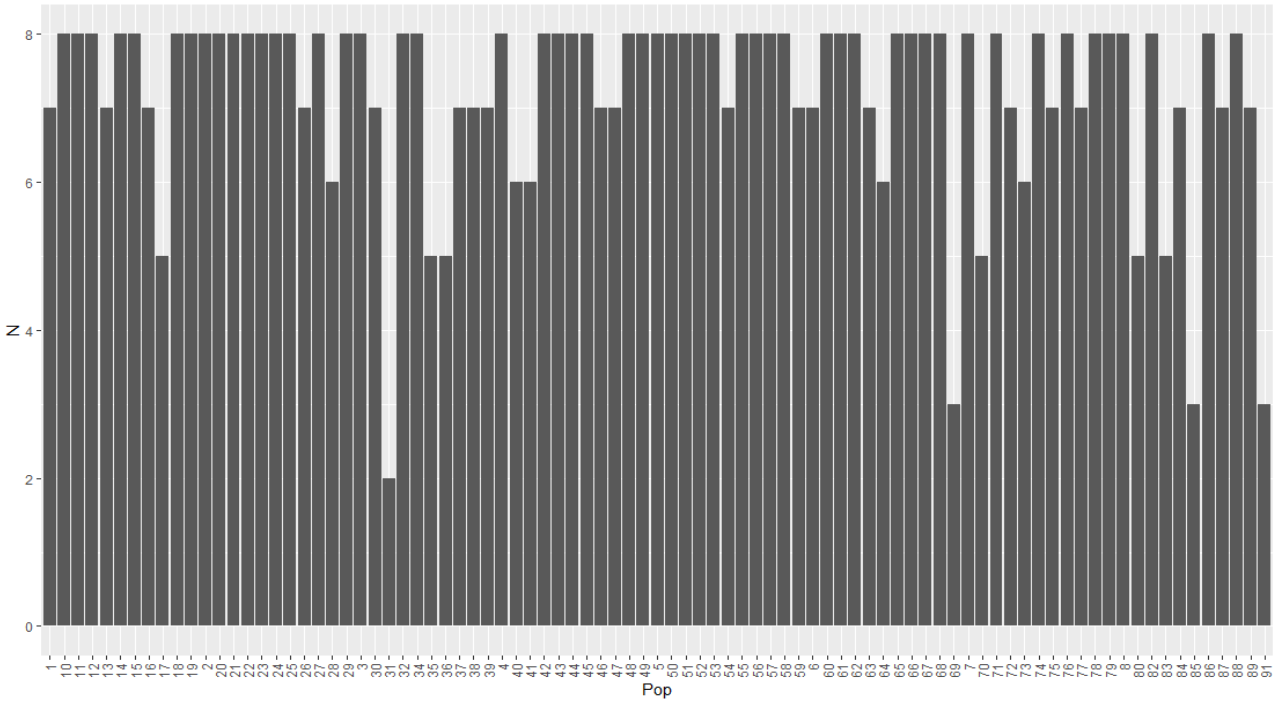


Abbildung 32: Anzahl der genetisch charakterisierten Individuen (N) pro Akzession (Pop). Durchschnittlich wurden 7,2 Individuen pro Akzession oder Sorte analysiert.

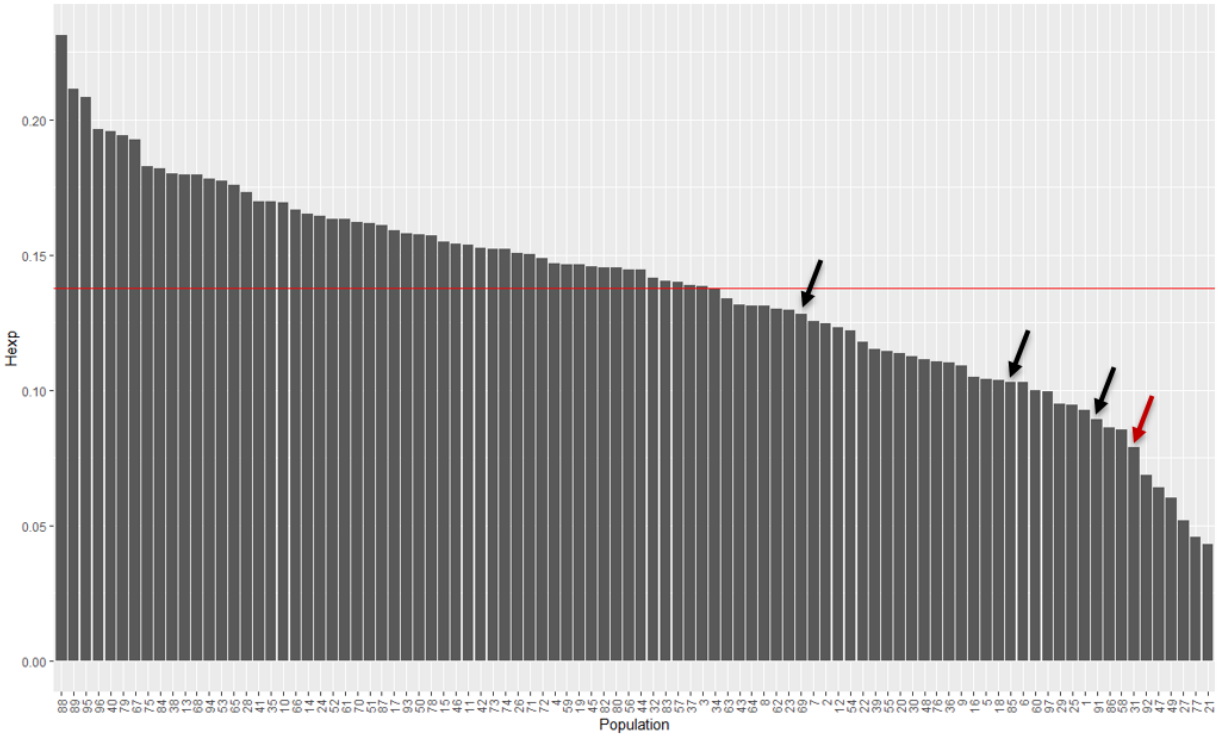


Abbildung 33: "Expected heterozygosity" (Hexp) für jede Akzession oder Sorte in absteigender Reihenfolge. Der rote Strich zeigt den Mittelwert der „expected heterozygosity" über alle Akzessionen oder Sorten an. Der rote Pfeil zeigt die Akzession, von welcher zwei Individuen, die schwarzen Pfeile jene Akzessionen, von welchen drei Individuen analysiert werden konnten.

Den Höchstwert der Hexp weist mit 0,23 die Nummer 88 („Bonela“) auf. Auf Basis der errechneten Hexp lassen sich die Akzessionen 40, 67, 79, 88 („Bonela“), 89 („Steirische Riesen“), 95 („Hellviolette“) und 96 („Aldrian“) als divers charakterisieren (basierend auf der im Vergleich höheren „expected heterozygosity“, Hexp > 0,19, und verglichen mit allen anderen des Datensatz I), die Akzessionen 21, 27, 31, 47, 49, 77 und die Nummer 92 („Lady Di“) hingegen als vergleichsweise genetisch sehr einheitlich (Hexp < 0,08). Der Mittelwert über alle Akzessionen liegt bei 0,14; ein ähnlicher Wert (0,17) wurde auch bei *Phaseolus vulgaris* mittels 145 SNPs detektiert (Galeano et al. 2012).

3.5.3 PRIVATE ALLELE

Private Allele sind einmalig auftretende Allele, welche in dieser Studie als einmalig für eine Akzession oder Sorte anzusehen sind und nach eingehender Validierung auch als spezifische Marker verwendet werden können (z.B. zur Identifikation von Akzessionen bzw. Sorten). Die Analyse des Datensatz I ergibt in Summe 21 private Allele für 19 Akzessionen bzw. zwei Sorten (Abbildung 34).

Accession	Npa
05	1
06	1
09	1
15	1
23	1
25	1
39	1
43	1
46	1
48	1
55	1
61	1
65	2
72	1
74	1
79	1
80	1
91	1
97	2

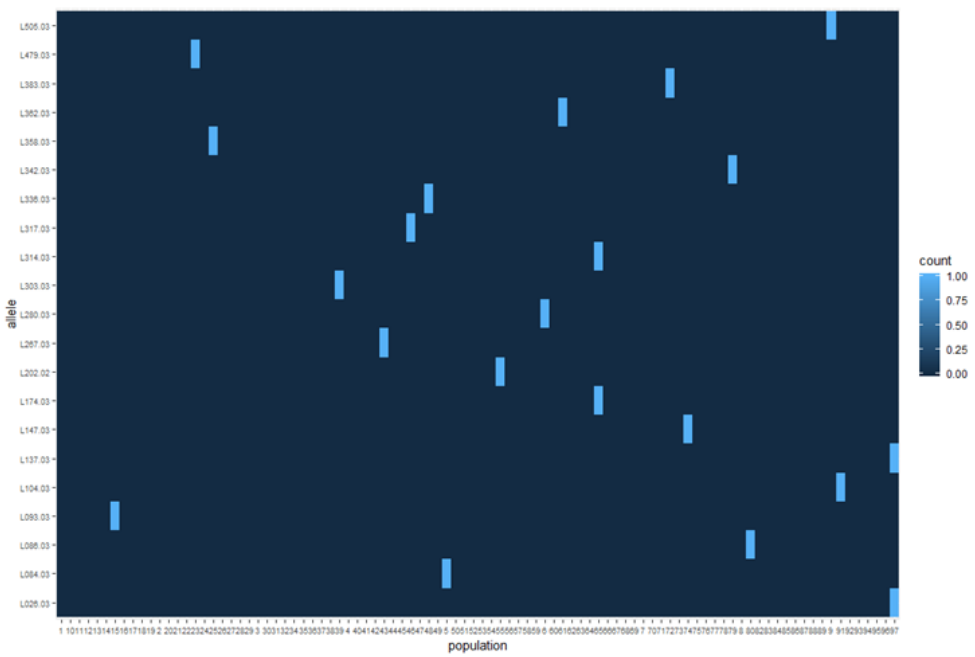


Abbildung 34: Die Tabelle links zeigt jene Akzessionen, welche private Allele aufweisen, wobei Akzession 65 und 97 („Prijswinner“) mit zwei privaten Allelen ausgestattet sind. Npa = Anzahl privater Allele. Die Grafik rechts ist eine Abbildung über das Vorkommen privater Allele über alle Akzessionen oder Sorten.

3.5.4 GENETISCHE STRUKTUR

Um die genetische Struktur aufzulösen, wurde die Software STRUCTURE angewendet. Die mögliche Anzahl von K, d.h. die Anzahl der genetisch unterscheidbaren Gruppen (genetische Cluster) wurde für den Datensatz I mit K = 4 definiert, basierend auf der Evanno-Methode (Evanno et al. 2005) und der visuellen Analyse der Plots. Basierend auf K = 4 ist im Datensatz I erkennbar, dass die Akzessionen 6, 20, 77 zusammen mit den Sorten 92 („Lady Di“) und 97 („Prijswinner“) einen ähnlichen genetischen Hintergrund besitzen (ersichtlich durch die rote Umrahmung in Abbildung 35) und somit in denselben Cluster fallen. Auch die Akzessionen 23-27 (blaue Umrahmung) sind genetisch sehr ähnlich, ebenso wie die Akzessionen 1-5, 7, 14, 15, 18, 19, 48, 49, 51, 76 und die Nummer 87 („Melange“).

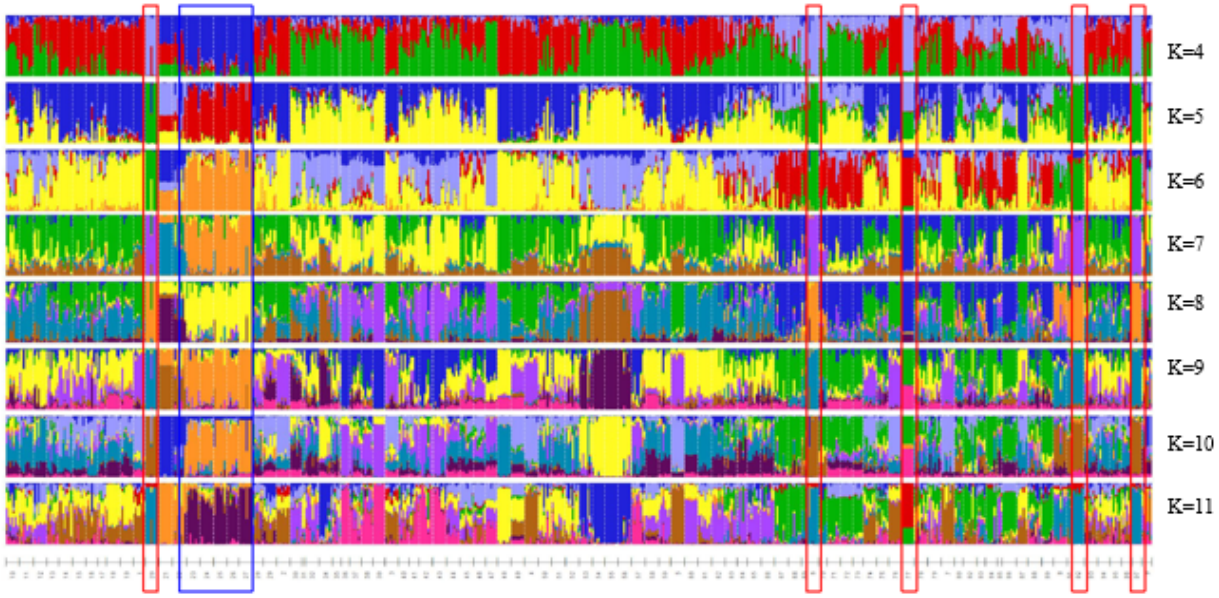


Abbildung 35: Genetische Struktur des Datensatz I unter der Annahme von K = 4 – 11 Cluster, wobei basierend auf der Evanno-Methode, 4 Cluster (K = 4) für den Datensatz I als wahrscheinlich angenommen werden können. Genetisch ähnliche Akzessionen und Sorten sind durch rote bzw. blaue Umrahmungen gekennzeichnet.

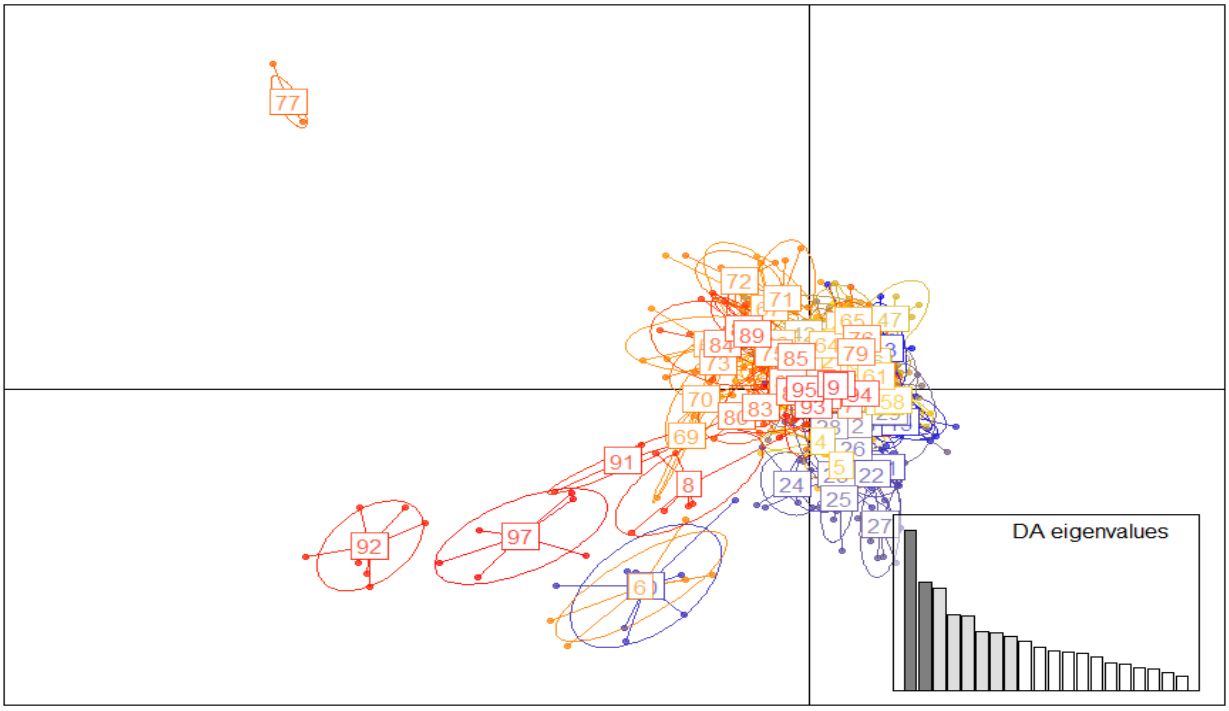


Abbildung 36: DAPC des gesamten Datensatz I. DA eigenvalues = data axis eigenvalues: die Eigenwerte der DAPC zeigen wieviel Varianz hinter jeder Hauptkomponente (aufgetragen auf der X-Achse) steckt.

Die mittels der Software STRUCTURE ermittelte genetische Struktur lässt sich mithilfe der DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components) detaillierter darstellen. In der DAPC des Datensatz I (Abbildung 36) ist erkennbar, dass sich die Akzessionen 6, 20, 77 und die Sorten 92 („Lady Di“) und 97 („Prijswinner“) aufgrund ihrer unterschiedlichen Genetik vom großen Cluster absetzen. Die Akzessionen 6 und 20 überlagern sich und weisen somit eine sehr ähnliche Genetik auf. Deutlich abgesetzt ist die Nummer 77, eine aus China stammende Akzession.

Neben STRUCTURE und der DAPC kann die genetische Struktur mit ihren Verwandtschaftsverhältnissen auch anhand eines Stammbaumes dargestellt werden (Abbildung 37).

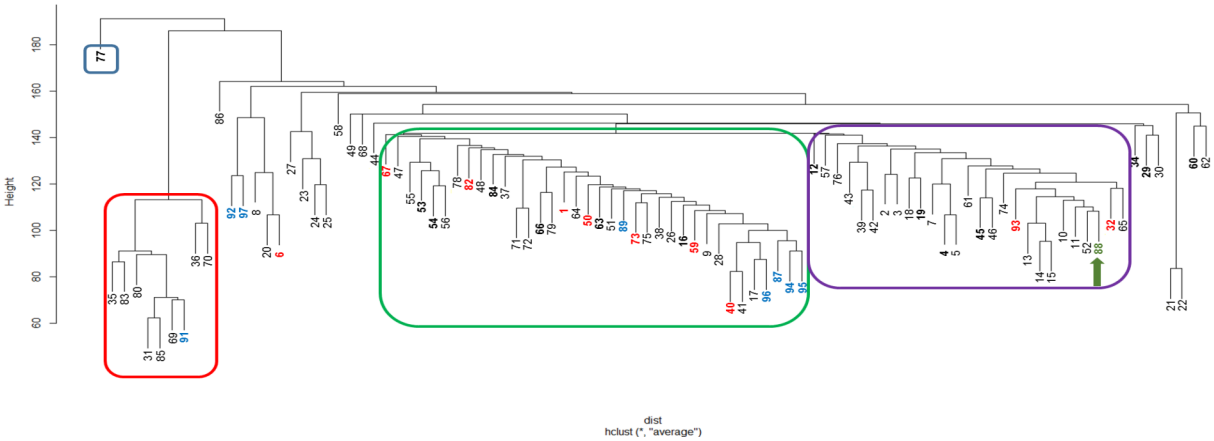


Abbildung 37: Cluster Dendrogram zur Darstellung der Verwandtschaftsstruktur der Akzessionen des Datensatz I. Fett und schwarz = phänotypisierte Akzession; Fett und rot = bessere Akzession bzw. Sorte im Vergleich zur Referenzsorte „Bonela"; Fett und blau = phänotypisierte Sorte; Grün = Referenzsorte „Bonela".

Hierbei lassen sich zwei Kern-Gruppen definieren, welche auf zwei getrennten Ästen zu liegen kommen:

Gruppe I (grün): 1, 9, 16, 17, 26, 28, 37, 38, 40, 41, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 59, 63, 64, 66, 67, 71, 72, 73, 75, 78, 79, 82, 84, 87 („Melange"), 89 („Steirische Riesen"), 94 („Choco"), 95 („Hellviolette"), 96 („Aldrian")

Gruppe II (violett): 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 32, 39, 42, 43, 45, 46, 52, 57, 61, 65, 74, 76, 88 („Bonela"), 93 („Hara")

Neben der an der Basis sehr außenstehenden Akzession 77 (blau), gibt es noch weitere Gruppen, die von den Kerngruppen entfernt sind. Die nächste Gruppe (rot) zur Basis ist aus neun Akzessionen und einer Sorte zusammengesetzt (31, 35, 36, 69, 70, 80, 83, 85, 91 „Hestia"), eine weitere Gruppe besteht aus fünf Akzessionen und zwei Sorten (6, 8, 20, 92 „Lady Di", 97 „Prijswinner"), zwei weitere aus jeweils vier Akzessionen (23, 24, 25, 27 und 21, 22, 60, 62), eine weitere aus drei Akzessionen (29, 30, 34). Die Akzessionen 44, 49, 58, 68, 86 lassen sich keiner der oben genannten Gruppen zuordnen.

3.6 PHÄNOTYP-GENOTYP-KORRELATION

Mit dieser Analyse sollen für bestimmte phänotypische Ausprägungen assoziierte genetische Marker charakterisiert werden. Die angewendete Methode (LFMM, s. Material und Methoden) benötigt zur Korrektur der im Hintergrund vorliegenden genetischen Struktur die Anzahl der zu erwartenden Cluster, die auf Basis der Evanno-Methode sowie der snmf-Funktion des R-Pakets LEA mit K = 4 festgelegt wurde. Pro getesteter Ausprägung (Blüten- und Ertragsmerkmale) konnten mit einer False Discovery Rate (FDR) der p-Werte von 0,01 bis zu 11 assoziierte Loci identifiziert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl der assoziierten Loci pro getesteter Ausprägung.

Ausprägung	Anzahl der assoziierten Loci
Durchschnittliches Gewicht pro Bohne pro Akzession	11
Gesamtanzahl der Bohnen pro Individuum	2
Gesamtanzahl der Blüten pro Individuum	10
Gesamtmaximalzahl der Blüten pro Akzession	2
Maximale Anzahl der Hülsen pro Akzession	3

4 DISKUSSION

4.1 GENOTYPISIERUNG

Für den Genotyping-by-Sequencing (GBS)-Ansatz im Projekt CHARACCESS wurde die RAD (Restriction site associated DNA)-Sequenzierung genutzt. In früheren Arbeiten wurde typischerweise nur mit wenigen Markern gearbeitet, hauptsächlich um Populationsstrukturen und Herkunft zu untersuchen (Mercati et al. 2015; Rodriguez et al. 2013; Sicard et al. 2005; Spataro et al. 2011). Eine Identifizierung neuer, an eine bestimmte Eigenschaft gekoppelte Marker ist hierbei nicht oder nur partiell möglich. Der Vorteil der GBS-Methode liegt darin, dass ein Teil des Genoms markerunabhängig sequenziert wird, Sequenzunterschiede zwischen Individuen miteinander verglichen werden und, im Falle einer Verbindung mit dem Phänotyp, putative Marker für eine bestimmte Eigenschaft entwickelt werden können. Zudem ist die Methode der GBS im Vergleich kostengünstig und wurde schon bei vielen wirtschaftlich genutzten Pflanzenarten angewendet (Kim et al., 2016). Die im Rahmen dieses Projekts gewählte Methode wurde bei *Phaseolus vulgaris* L. bereits eingesetzt, nicht jedoch für *Phaseolus coccineus* L. Sie bot gegenüber der Anwendung bisheriger molekularer Marker eine deutlich verbesserte Analysekraft.

Die erhaltenen Daten wurden gefiltert und aufbereitet, um zunächst die genetische Diversität der ausgewählten Käferbohnen-Akzessionen zu klären. Mithilfe des Hexp-Wertes konnten von den 84 untersuchten Akzessionen drei (40, 67, 79) als diverser und sechs (21, 27, 31, 47, 49, 77) als schwach divers im Vergleich zu den weiteren Akzessionen beschrieben werden. Interessant ist, dass die im Projekt inkludierten Sorten 88, 89, 95 und 96 („Bonela“, „Steirische Riesen“, „Hellviolette“ und „Aldrian“) zu den als besonders divers eingestuften Genotypen zu zählen sind, während in der schwach diversen Gruppe nur eine Sorte („Lady Di“) zu finden ist. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass häufigere Vermehrungszyklen zu einer höheren Diversität innerhalb eines Genotypen führen.

Um die Verwandtschaftsstruktur zwischen den Akzessionen aufzulösen, wurden drei verschiedene Vorgehensweisen angewendet: eine STRUCTURE-Analyse, eine DAPC sowie die Erstellung eines Stammbaumes. In der allgemeinen Betrachtung der Ergebnisse wird der Stammbaum herangezogen, da dieser die beste Auflösung darstellt. Betrachtet man den Datensatz I (Gesamtdatensatz) so lassen sich zwei Kern-Gruppen und weitere Klein-Gruppen erkennen. Ein Großteil der Akzessionen ist gemäß dieser Auswertung sehr ähnlich. Einzelne Akzessionen und Sorten zeigen eine große genetische Ähnlichkeit, was bei der Auswahl von Akzessionen für weitere Untersuchungen berücksichtigt werden kann. Datensatz II (bestehend aus den phänotypisierten Individuen) lässt sich ebenso in eine Kern-Gruppe, in eine weitere größere Hauptgruppe und weitere Klein-Gruppen aufteilen.

4.2 ÜBEREINSTIMMUNG VON GENOTYP UND PHÄNOTYP

Insgesamt wurden 33 Akzessionen bzw. Sorten phänotypisiert. Jene Akzessionen, die in den erhobenen Ertragsdaten (d.h. Anzahl der Hülsen und Bohnen) im Hitzestressversuch besser als die Sorte „Bonela“ abgeschnitten haben, stammen durchgehend aus wärmeren Anbauregionen: Süd- und Südoststeiermark, Südburgenland und Süditalien (Kalabrien). Die Akzession aus Italien lieferte insgesamt die besten Ergebnisse im Hitzestressversuch.

Nach der genetischen Untersuchung der Käferbohnen und der Darstellung der Ergebnisse in einem Dendrogramm wird ersichtlich, dass sich die meisten untersuchten Genotypen in einer großen genetischen Gruppe befinden – also grundsätzlich genetisch sehr ähnlich sind. Aufgrund der regionalen Schwerpunkte der Sammeltätigkeit für die Genbank ist dieses Ergebnis nicht sehr überraschend. Tendenziell fallen die im selben Ort gesammelten Akzessionen in dieselbe genetische Gruppe. Aufgrund der vorliegenden Daten lassen sich aber keine generellen Aussagen ableiten.

Obwohl in vielen Fällen die Herkünfte aus derselben Ortschaft in dieselbe genetische Gruppe fallen, sind dennoch auch abweichende Zuordnungen bei Akzessionen von derselben Sammelstelle erwähnenswert. Die vorhandenen phänotypischen Daten erlauben keine unmittelbaren Rückschlüsse auf den genetischen Hintergrund. Dass das phänotypische Erscheinungsbild der Bohnen nicht immer Rückschlüsse auf den genetischen Hintergrund zulässt, zeigt exemplarisch eine Vierergruppe von Akzessionen aus Vogau (Südsteiermark; Akzessionen 23, 24, 25, 27). Die Samenfarben werden als „hellbraun“, „rosa hell violett“, „marmoriert“ oder „fleckig“, sowie „weiß“ beschrieben.

Ebenfalls aus Vogau stammt die Akzession 26, die Bohnen mit dem für die Steirische Käferbohne typischen Erscheinungsbild zeigt. Diese Akzession gehört genetisch zur größten Gruppe, in der sich entsprechend auch 18 phänotypisierte Akzessionen (1, 16, 40, 50, 53, 54, 59, 63, 66, 67, 73, 82, 84) bzw. Sorten („Melange“, „Steirische Riesen“, „Choco“, „Hellviolette“, „Aldrian“) finden.

4.3 DIE „STEIRISCHE KÄFERBOHNE“ IN PHÄNOTYP UND GENOTYP UND IM HITZESTRESSEXPERIMENT

Von den ausgewählten Genotypen entsprechen 20 Akzessionen und die beiden Sorten „Bonela“ und „Lady Di“ dem für die Steirische Käferbohne typischen Samentyp, der mit „rosa hell violett“ und „marmoriert“ angegeben wird. Es bestätigt sich, dass diese phänotypische Ähnlichkeit keine Rückschlüsse auf die genetische Ähnlichkeit erlaubt. Die Akzessionen mit dem oben beschriebenen Erscheinungsbild „Steirische Käferbohne“ teilen sich aufgrund der genetischen Daten auf fünf verschiedene Gruppen auf. In der Stammbaumdarstellung erkennt man eine große Gruppe, in der sich der Großteil der Akzessionen, inklusive der Sorte „Bonela“, befindet und die sich in zwei Untergruppen aufteilt. Zusätzlich findet man drei kleinere Gruppen. Die Sorte „Lady Di“ befindet sich mit drei weiteren Käferbohnenakzessionen (6, 8 und 20) in einer Gruppe, die Akzessionen 29 und 31 (aus Maltschach bzw. Klausen) zählen zu unterschiedlichen Gruppen. Die Akzession 44 (aus Unterpurkla) lässt sich keiner Gruppe zuordnen.

Mit dem Hintergrund des Samentyps Steirische Käferbohne umfassen die beiden großen, ähnlichen Gruppen einerseits die Akzessionen 26, 37, 40, 41, 54, 73, 75 und 82 aus der Steiermark bzw. dem Burgenland, andererseits die Akzessionen 10, 13, 43, 45, 46, 65 aus der Steiermark und die Sorte „Bonela“.

Nach dem Hitzestress zeigten von 33 beobachteten Akzessionen neun bessere Ertragsergebnisse als die als Referenzsorte definierte „Bonela“. Die Ertragsdaten wurden besonders durch die Anzahl an Bohnen und den Gewichtsertrag definiert. Auch die früher gelistete Sorte „Hara“ zeigte im Hitzestressversuch bessere Ergebnisse als „Bonela“. Die Samenfarbe von „Hara“ ist als „schwarz“ beschrieben. Sie würde demnach nicht der Definition der „Steirischen Käferbohne g. U.“ entsprechen, die als „gefleckt“ oder „marmoriert“ festgelegt ist.

Bezieht man in die Betrachtung die genetischen Daten ein, fällt auf, dass die meisten Akzessionen, die im Hitzestressversuch ertraglich besser als die „Bonela“ waren (1, 40, 50, 59, 67, 73, 82) genetisch aus einer Untergruppe stammen. Neben den in Klammer angeführten Akzessionen, die dem Typ der Steirischen Käferbohne entsprechen, finden sich noch zwei weiße aus Süditalien (67) bzw. Groß St. Florian (59) und eine hellbraun marmorierte aus der Südsteiermark (50).

Ertraglich stachen die Akzession 67, die aus Süditalien stammt, und die Akzession 82 aus dem Burgenland hervor. Die übrigen Akzessionen mit im Versuch besseren Ertragsdaten als die „Bonela“ stammten aus der Süd- bzw. Südoststeiermark (1, 40, 50,59) und dem Südburgenland (73).

In der zweiten Untergruppe, in die auch die „Bonela“ fällt, lieferte eine Akzession (32; Südoststeiermark) mehr Ertrag als die „Bonela“. Die Grundfarbe der Samen dieser Akzession ist wie bei der „Bonela“ „rosa hell violett“, allerdings ist sie „fleckig“, im Gegensatz zu „Bonela“, die als „marmoriert“ beschrieben wird.

Zur selben genetischen Gruppe, die von der großen Gruppe abgesetzt ist, zählen die Akzessionen 6 (Südoststeiermark), 20 (Südoststeiermark) und 8 (Südsteiermark). Die nicht phänotypisierte Akzession 20 ist laut Genotypisierung sehr ähnlich mit der Akzession 6, die im Hitzestressversuch ertraglich besser als die Referenzsorte „Bonela“ war. Die beiden einander genetisch sehr ähnlichen Sorten 92 („Lady Di“) und 97 („Prijswinner“) finden sich auch in dieser Gruppe, jedoch schnitten beide im Hitzestressversuch schlechter als die „Bonela“ ab. Die Bohnen der Genotypen in dieser Gruppe, mit Ausnahme von „Prijswinner“, sind als „rosa hell violett“ und „marmoriert“ beschrieben. Sie entsprechen demnach der Beschreibung der Steirischen Käferbohne.

Der Hitzestressversuch zeigt, dass einige der Akzessionen in der Versuchsanordnung im Glashaus besser mit dem vierwöchigen Hitzestress zurechtkamen als die in der Steiermark verbreitet angebaute Sorte „Bonela“. Diese Akzessionen wurden in wärmeren Anbaugebieten gesammelt – besonders erwähnenswert ist die Akzession 67, die aus Süditalien stammt und auffallend gute Ertragsergebnisse lieferte.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich beim durchgeführten Versuch um ein durch viele Einflussparameter beeinflusstes System handelt. Es war notwendig, im Glashaus Bienen für die Bestäubung zuzustellen, die ihrerseits mit den speziellen Bedingungen im Glashaus zurechtkommen mussten. Zudem wurden die Käferbohnen in Töpfen kultiviert. Aufgrund der vorgesehenen Erhebungen war es nicht möglich, die Käferbohnen im Glashaus randomisiert aufzustellen, sodass Standorteffekte wahrscheinlich sind. Auch konnte aufgrund des Platzbedarfs nicht das gesamte Käferbohnensortiment im Glashaus überprüft werden. Es musste eine Einschränkung in der Zahl der Individuen vorgenommen werden.

4.4 ENTWICKLUNG VON MOLEKULAREN MARKERN FÜR HITZETOLERANZ

Durch den gewählten GBS-Ansatz konnten Sequenzunterschiede zwischen Individuen miteinander verglichen und mit dem Phänotyp in Verbindung gebracht werden. So konnten in der Phänotyp-Genotyp-Assoziationsanalyse potenzielle Marker für jene Eigenschaften identifiziert werden, die im vorliegenden experimentellen Ansatz mit Hitzetoleranz in Verbindung stehen. Getestet wurde die Korrelation von 483 Loci (von 238 Samples, 33 Akzessionen) mit sechs Ausprägungen. Als Ergebnis wurden 28 assoziierte Gene gefunden. Diese bilden nun die Basis für die weiteren Schritte in Richtung Entwicklung genetischer Marker, welche mit einer bestimmten Eigenschaft verbunden sind. Nach einer entsprechenden Validierungs-Phase an weiteren Akzessionen könnten diese Marker in weiterer Folge in Züchtungs- und Selektionsprozessen zur Anwendung kommen.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Projekt CHARACCESS wurde die genetische Diversität von 84 Käferbohnen-Akzessionen und 10 Käferbohnen-Sorten durch Genotyping-by-Sequencing identifiziert. Für 33 ausgewählte Akzessionen und Sorten wurde in einem Glashausversuch vier Wochen Hitzestress (35 °C/4 h/d) simuliert. Das Zustellen von Honigbienenvölkern gewährleistete die Bestäubung der Pflanzen. Ausgewählte phänotypische Merkmale wie Blütenbildung und Hülsenbildung der 33 Käferbohnen-Akzessionen und Sorten wurden über die gesamte Versuchsdauer bonitiert. Eine abschließende kombinatorische Analyse der genotypischen und phänotypischen Daten diente der Assoziation von Hitzetoleranz mit dazugehörigen Gen-Segmenten auf SNP-Basis. Vorrangige Ziele des Projekts waren die Beschreibung der Diversität von Sorten bzw. Akzessionen, die Erleichterung der züchterischen Arbeit mit der Käferbohne in Hinblick auf Hitzetoleranz und die Entwicklung von molekularen Markern.

Derzeit sind drei Sorten in der Österreichischen Sortenliste registriert: „Bonela“, „Melange“, und die „Ober-Wolfsbacher Feuerbohne“ (BAES 2019). Zwei weitere Sorten („Steirische Riesen“ und „Hara“) waren bisher in der Österreichischen Sortenliste eingetragen. „Bonela“ ist die flächenmäßig bei weitem am häufigsten angebaute Sorte. Die oben genannten Sorten, mit Ausnahme der „Ober-Wolfsbacher Feuerbohne“, von der leider kein Saatgut zur Verfügung stand, wurden im Projekt berücksichtigt. Der große Vorteil des untersuchten Genbankmaterials ist nicht nur die genetische Vielfalt, sondern im Fall der hier getesteten Akzessionen auch die regionale Herkunft. Das ist nicht zuletzt aufgrund der bisherigen Selektionsarbeit an den Käferbohnen von Relevanz. Tatsächlich ist die züchterische Beschäftigung mit der Käferbohne bis ins 19. Jahrhundert nachweisbar und basiert auf dem umfangreichen Wissen und der Erfahrung der regionalen Erzeuger in Bezug auf die Grundlagen und Methoden des Bohnenanbaus. So konnte eine Anpassung an das Klima und die Bodenverhältnisse im geografischen Gebiet erreicht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich im Genbankmaterial einige Akzessionen aus der Steiermark und dem Burgenland fanden, die trotz Hitzestress im Versuch höhere Erträge lieferten als die als Referenzsorte definierte „Bonela“. Von den in das Hitzestressexperiment einbezogenen Sorten war nur die Sorte „Hara“ besser als „Bonela“.

Aufgrund der Einschränkungen, die der experimentelle Ansatz im Glashaus mit sich brachte, wäre die Überprüfung der erhobenen wünschenswerten Phänotypen unter Praxisbedingungen empfehlenswert. Die Erkenntnisse aus dem Projekt geben wertvolle Hinweise, welche Genotypen für Folgeexperimente in Frage kommen. Es können auch noch nicht phänotypisierte Genotypen überprüft werden. Eine Möglichkeit ist die Beobachtung der in den genetischen Untersuchungen gefundenen ähnlichen Genotypen, die in diesem Projekt noch nicht untersucht werden können.

Vielversprechende Unterstützung ergibt sich durch die in den genetischen Untersuchungen gefundenen, potenziell mit Hitzetoleranz assoziierten genomischen Regionen. Diese müssen in weiterer Folge validiert werden. Dazu sind weitere Arbeiten zur Genotypisierung und Phänotypisierung an weiteren Akzessionen erforderlich, um zu überprüfen, ob die identifizierten genomischen Regionen tatsächlich mit der phänotypischen Ausprägung von Hitzetoleranz assoziiert sind. Am Ende stehen molekulare Marker, die in der praktischen Züchtung Anwendung finden können.

Da aufgrund der genetischen Charakterisierung des Materials auch Verwandtschaftsstrukturen vorliegen, können für weitere Versuche zusätzlich jene Akzessionen herangezogen werden, die eine entsprechende genetische Ähnlichkeit mit den hier als hitzetolerant beschriebenen Akzessionen haben. Teilweise entspricht bei diesen Akzessionen der Samentyp phänotypisch dem charakteristischen Erscheinungsbild der Steirischen Käferbohne, was die Züchtungsarbeit potenziell erleichtern kann.

Die Ergebnisse des Projekts CHARACCESS liefern wertvolle Hinweise, die für die Planung weiterführender Studien herangezogen werden können. Durch das Projekt konnte eine solide Grundlage für die weitere züchterische Bearbeitung der Hitzetoleranz bei der Käferbohne geschaffen werden.

6 DANKSAGUNG

Wir bedanken uns bei der Landesversuchsstation für Spezialkulturen, Wies (DI Doris Lengauer) und bei Naktuinbouw, Roelofarendsveen, Niederlande, für die Bereitstellung von Saatgut der im Projekt verwendeten Vergleichssorten.

Für Beratung und Unterstützung danken wir Herrn Dr. Rudolf Moosbeckhofer (AGES Wien). Für die kritische Durchsicht und wertvolle Hinweise sei Frau DI Dr. Noémie Prat (AGES Wien) gedankt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

BAES (Hrsg.) (2019). Österreichische Sortenliste 2019. Schriftenreihe 03/2019, ISSN 1560-635X.

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS One, 3(10), e3376. doi:10.1371/journal.pone.0003376

Beebe, S.E., Rao, I.M., Mukankusi, C., Buruchara R.A. (2012). Improving resource use efficiency and reducing risk of common bean production in Africa, Latin America, and the Caribbean. In: Hershey, Clair H. (ed.). Eco-Efficiency: From vision to reality. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 18 p. (über http://hdl.handle.net/10568/55608)

Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. Brief Funct Genomics, 9(5-6), 416-423. doi:10.1093/bfgp/elq031

Europäische Kommission (2016) Durchführungsverordnung (EU) 2016/1408 der Kommission vom 12. August 2016 zur Eintragung einer Bezeichnung in das Register der geschützten Ursprungsbezeichnungen und der geschützten geografischen Angaben (Steirische Käferbohne (g.U.))

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology, 14(8), 2611-2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Galeano, C. H., Cortes, A. J., Fernandez, A. C., Soler, A., Franco-Herrera, N., Makunde, G., Vanderleyden, J., Blair, M. W. (2012). Gene-based single nucleotide polymorphism markers for genetic and association mapping in common bean. BMC Genet, 13, 48. doi:10.1186/1471-2156-13-48

Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Rieu, I. (2013). Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. Plants (Basel, Switzerland), 2(3), 489–506. doi:10.3390/plants2030489

Hu, Y., Resende, M., Jr, Bombarely, A., Brym, M., Bassil, E., Chambers, A. H. (2019). Genomics-based diversity analysis of Vanilla species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By-Sequencing. Scientific reports, 9(1), 3416. doi:10.1038/s41598-019-40144-1

Kim, C., Guo, H., Kong, W., Chandnani, R., Shuang, L.-S., Paterson, A.H. (2016). Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. Genomics Breed 242:14–22. doi:10.1016/j.plantsci.2015.04.016.

Mercati, F., Catarcione, G., Paolacci, A.R., Abenavoli, M.R., Sunseri, F., Ciaffi, M. (2015) Genetic diversity and population structure of an Italian landrace of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.): inferences for its safeguard and on-farm conservation. Genetica 143(4), 473-85.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89(3), 583-590.

Porch, T.G., Bernsten, R., Rosas, J.C., Jahn, M. (2007). Climate change and the potential economic benefits of heat-tolerant bean varieties for farmers in Atlantida, Honduras. J. Agric. Univ. P.R. 91(3-4), 133-148.

Porch, T.G. und Jahn, M. (2001). Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. Plant Cell Environ 24, 723–731.

Rainey, K.M. und Griffiths, P.D. (2005). Differential response of common bean genotypes to high temperature. J Americ Soc Hort Sci 130(1):18-23.

Rodriguez, M., Rau, D., Angioi, S. A., Bellucci, E., Bitocchi, E., Nanni, L., Knüpffer, H., Negri, V., Papa, R., Attene, G. (2013). European *Phaseolus coccineus* L. landraces: population structure and adaptation, as revealed by cpSSRs and phenotypic analyses. PLoS One, 8(2), e57337. doi:10.1371/journal.pone.0057337

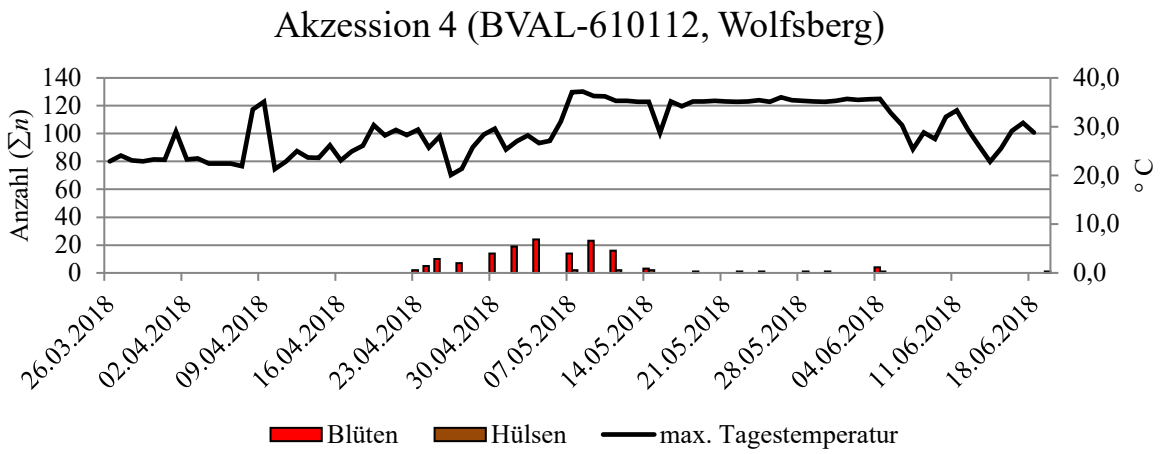
Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., Papa, R. (2005). Genetic diversity of Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus L. landraces in central Italy. Plant Breed 124, 464–472.

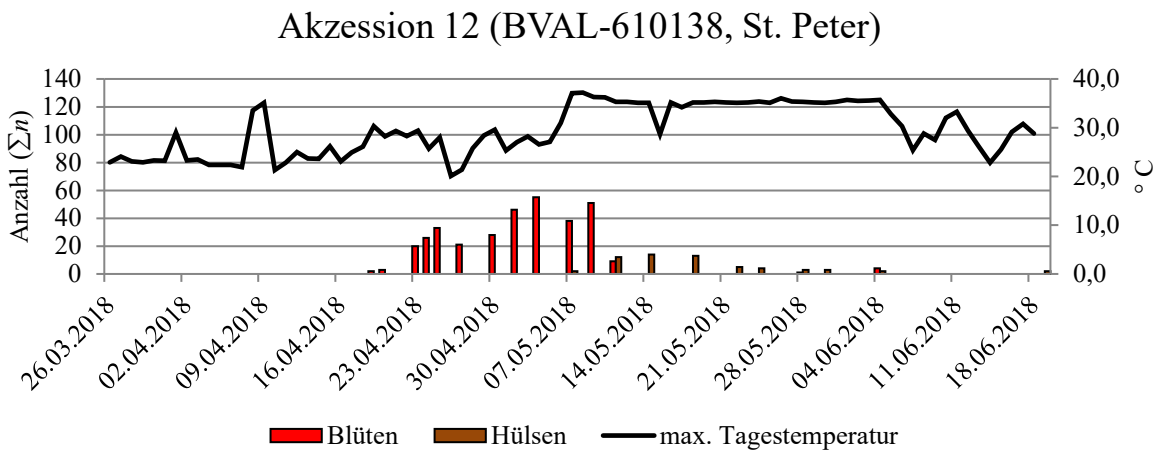
Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P., Negri V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of Phaseolus coccineus L. Theor Appl Genet 122(7), 1281-1291.

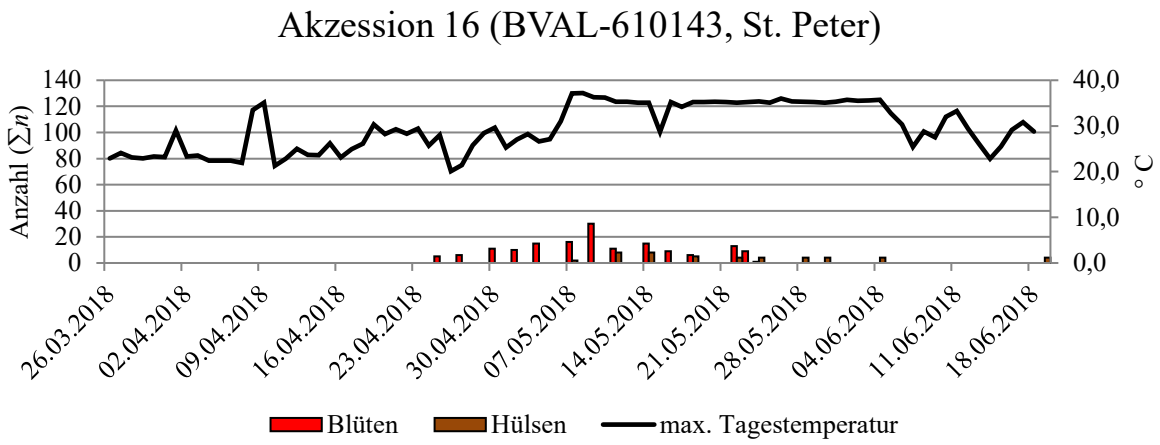
Zheng, Z., Sun, Z., Fang, Y., Qi, F., Liu, H., Miao, L., Du, P., Shi, L., Gao, W., Han, S., Dong, W., Tang, F., Cheng, F., Hu, H., Huang, B., Zhang, X. (2018). Genetic diversity, Population structure, and botanical variety of 320 global peanut accessions revealed through tunable genotyping-by-sequencing. Scientific Reports, 8(1), 14500. doi:10.1038/s41598-018-32800-9

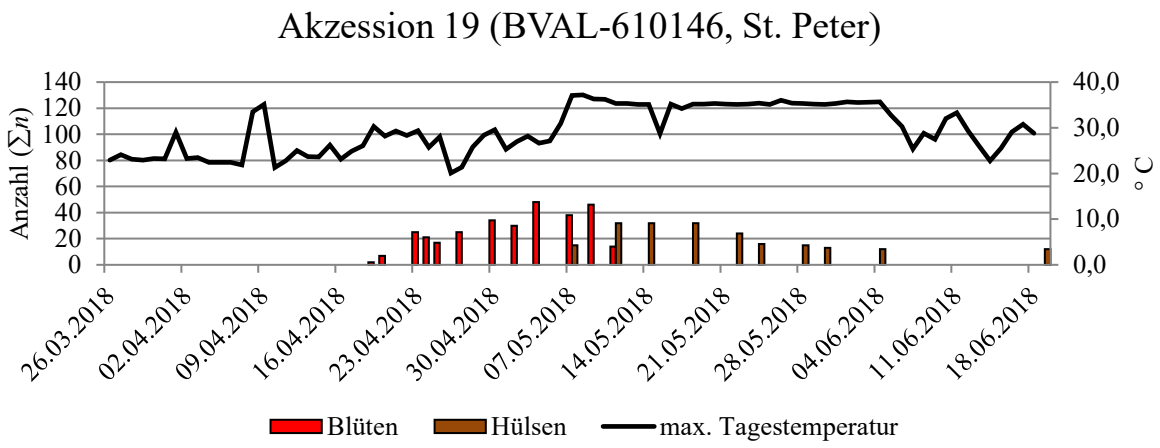
8 ANHANG

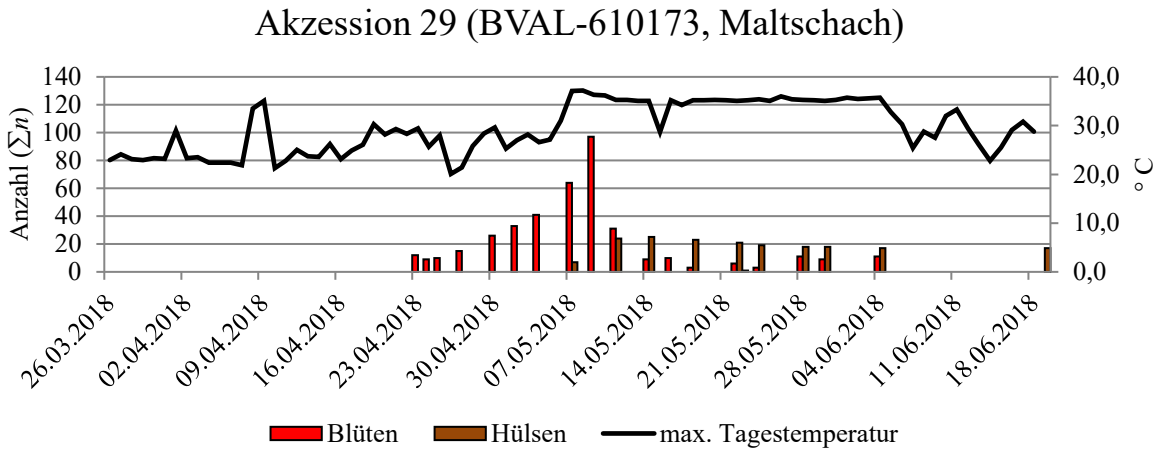
8.1 DIAGRAMME BLÜTEN UND HÜLSEN

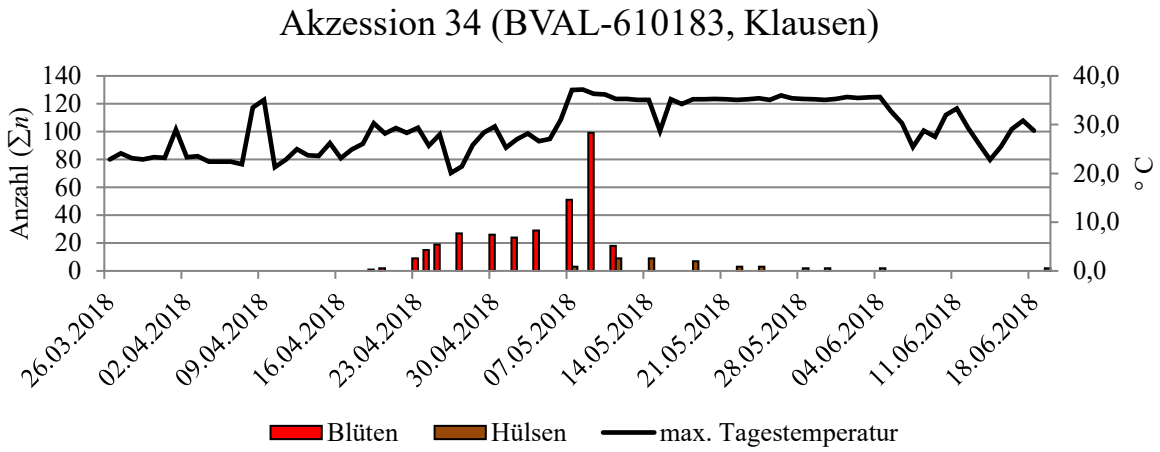


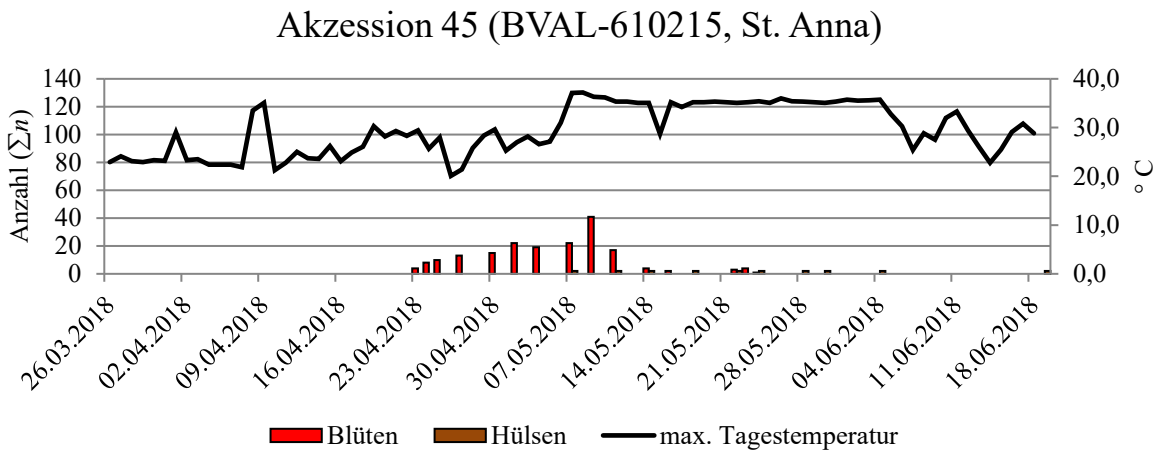


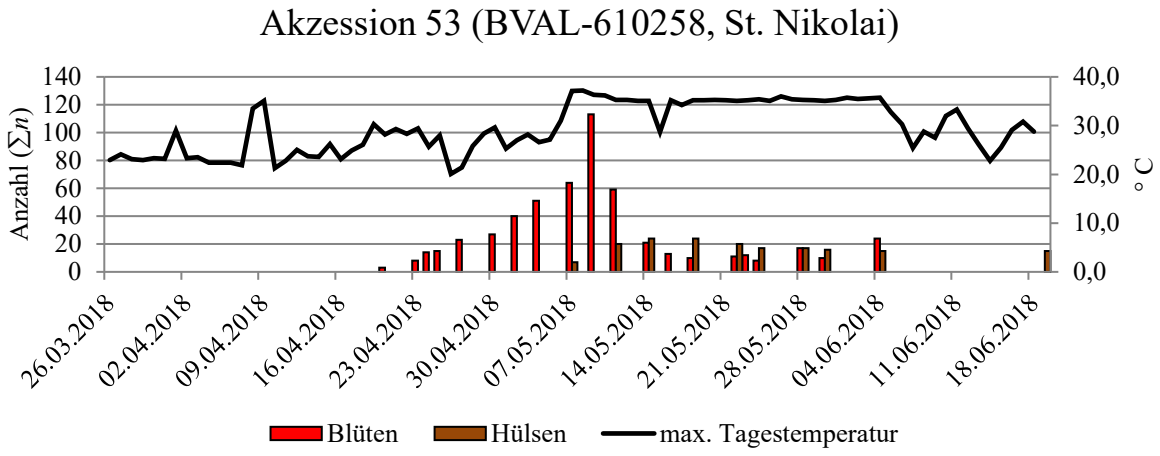


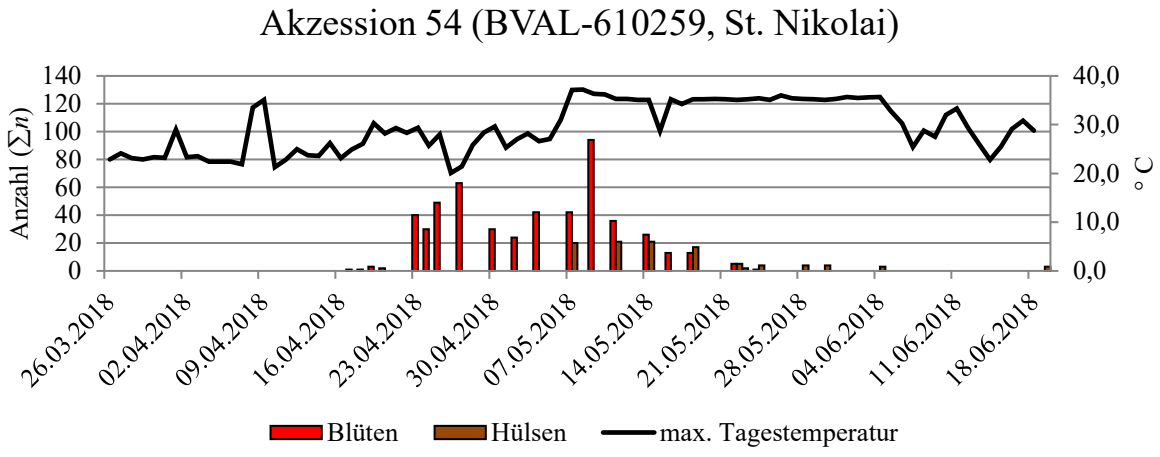

Akzession 19 (BVAL-610146, St. Peter)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

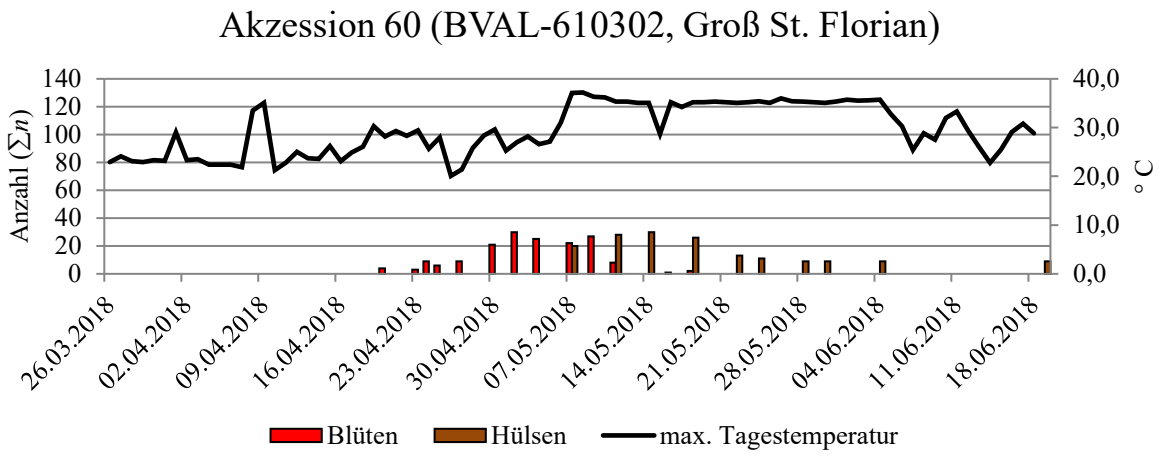

Akzession 29 (BVAL-610173, Maltschach)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

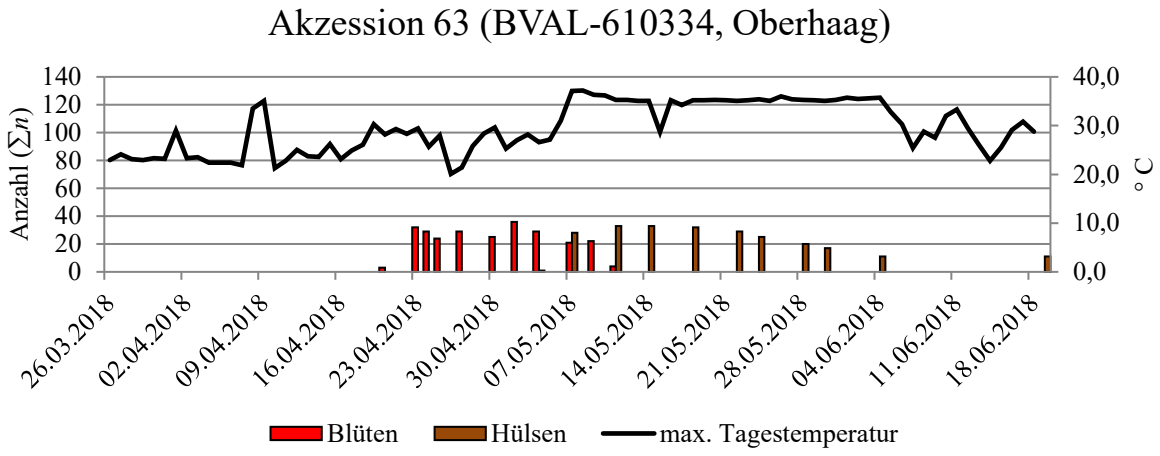

Akzession 34 (BVAL-610183, Klausen)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

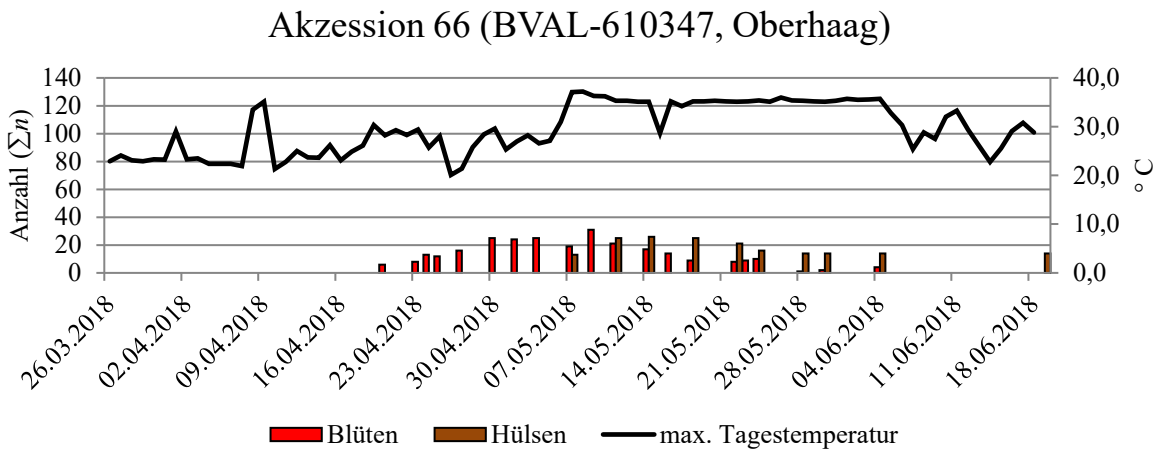

Akzession 45 (BVAL-610215, St. Anna)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

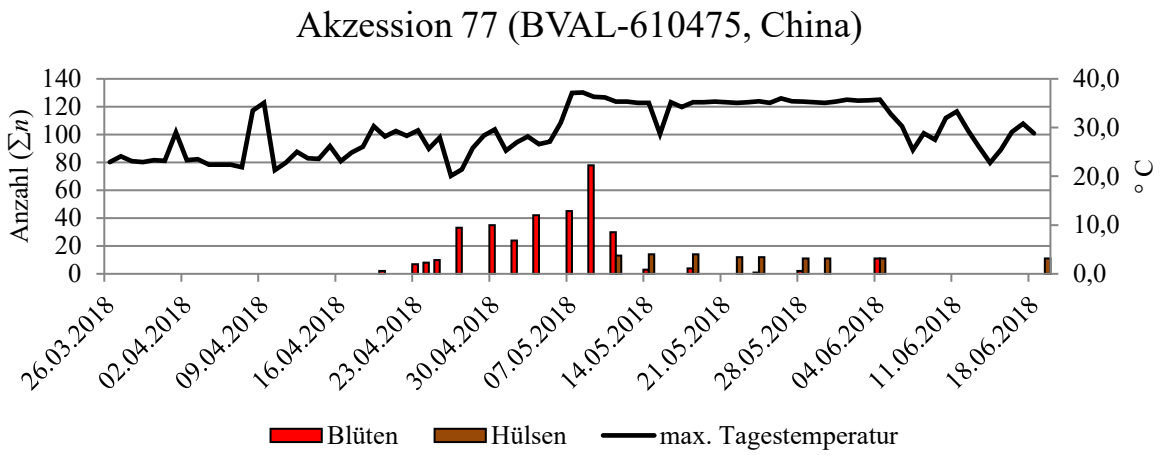

Akzession 53 (BVAL-610258, St. Nikolai)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

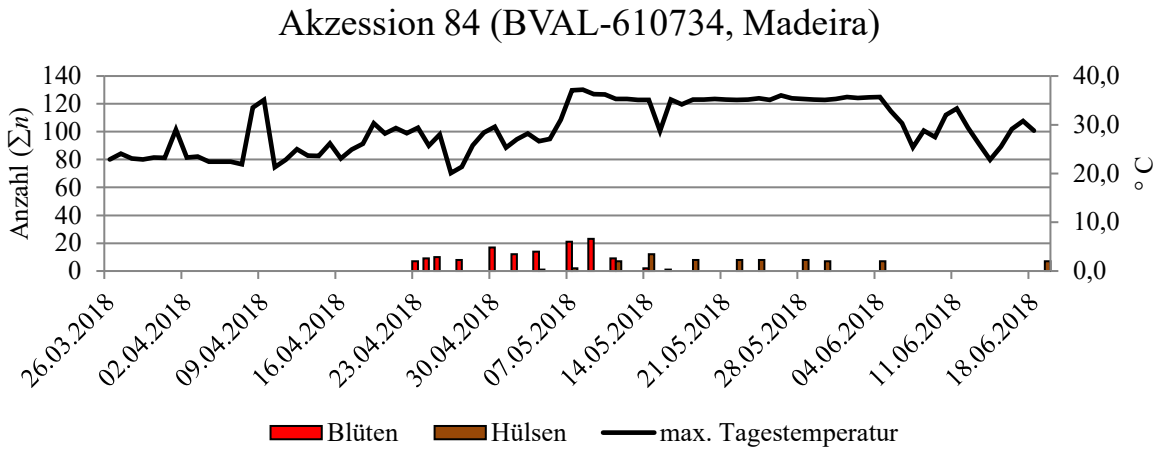

Akzession 54 (BVAL-610259, St. Nikolai)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

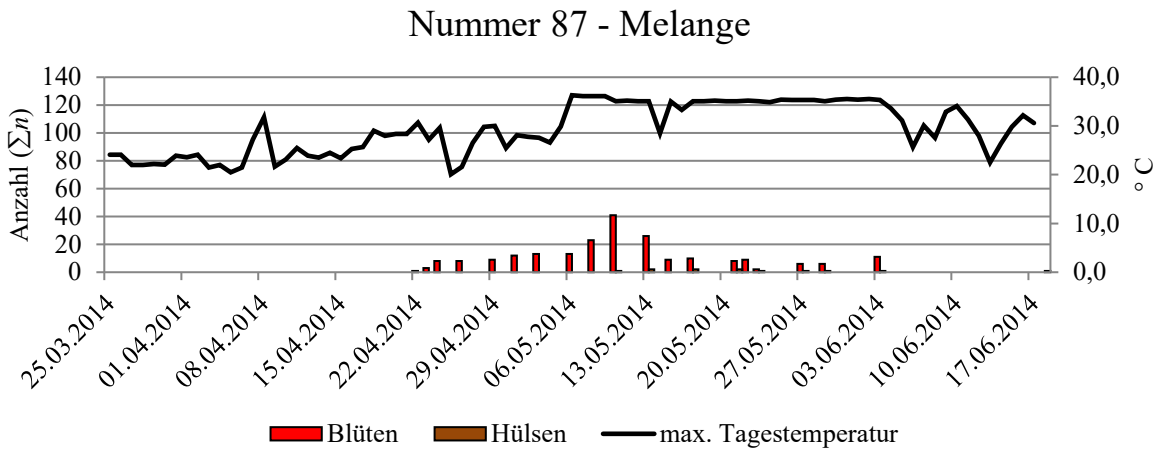

Akzession 60 (BVAL-610302, Groß St. Florian)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

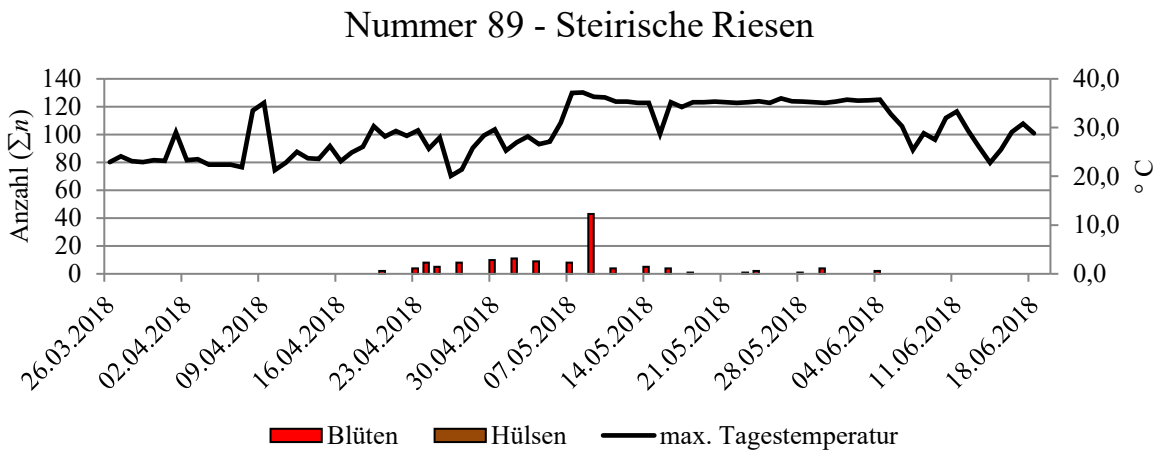

Akzession 63 (BVAL-610334, Oberhaag)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

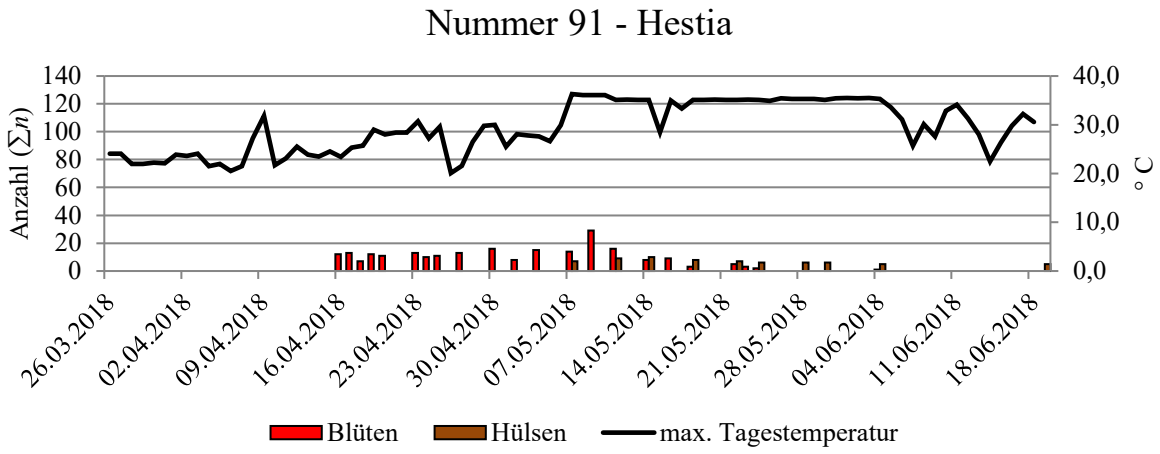

Akzession 66 (BVAL-610347, Oberhaag)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

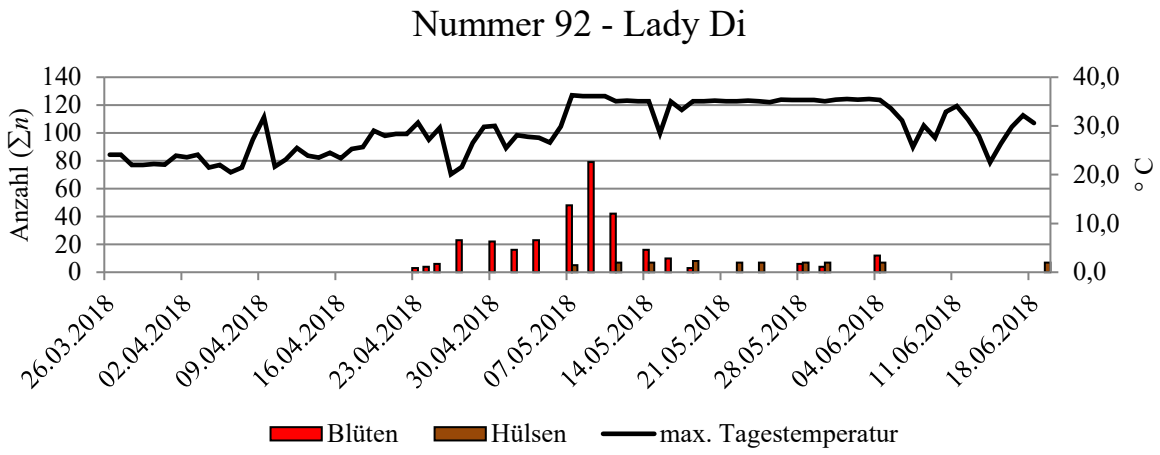

Akzession 77 (BVAL-610475, China)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

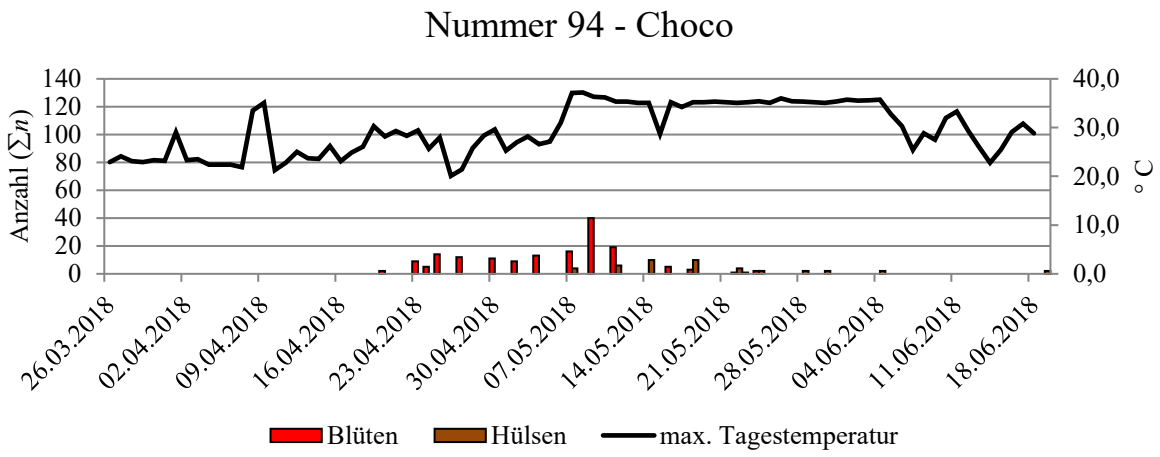

Akzession 84 (BVAL-610734, Madeira)
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

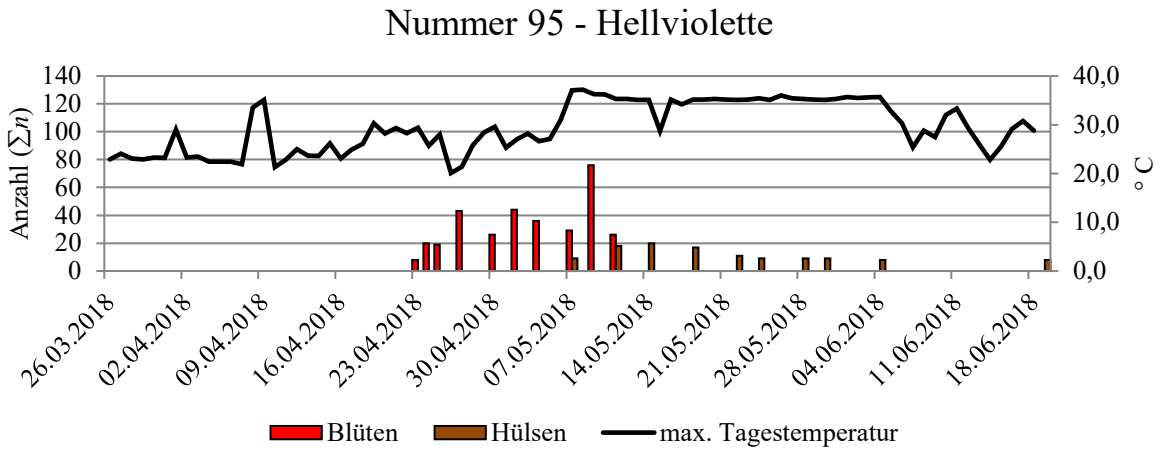

Nummer 87 - Melange
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
25.03.2014
01.04.2014
08.04.2014
15.04.2014
22.04.2014
29.04.2014
06.05.2014
13.05.2014
20.05.2014
27.05.2014
03.06.2014
10.06.2014
17.06.2014
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

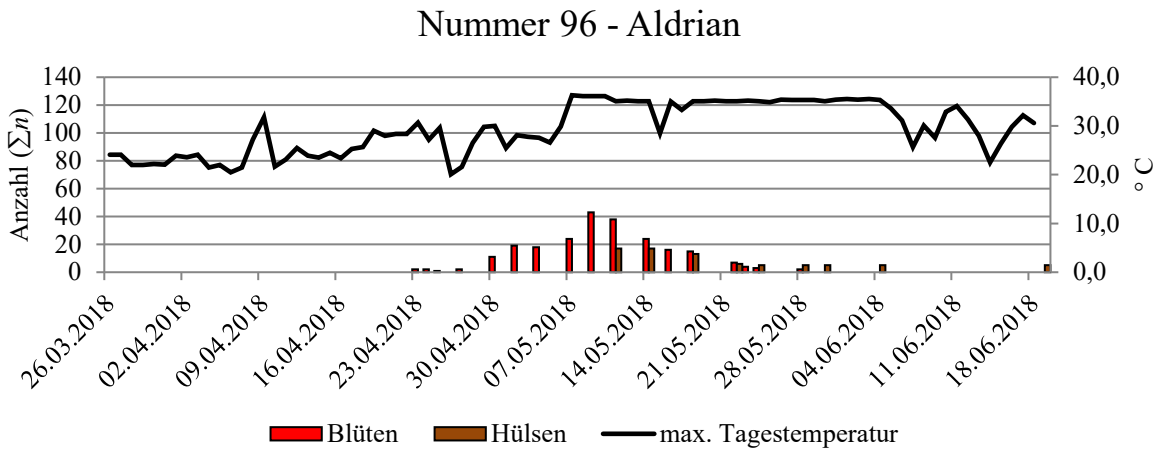

Nummer 89 - Steirische Riesen
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

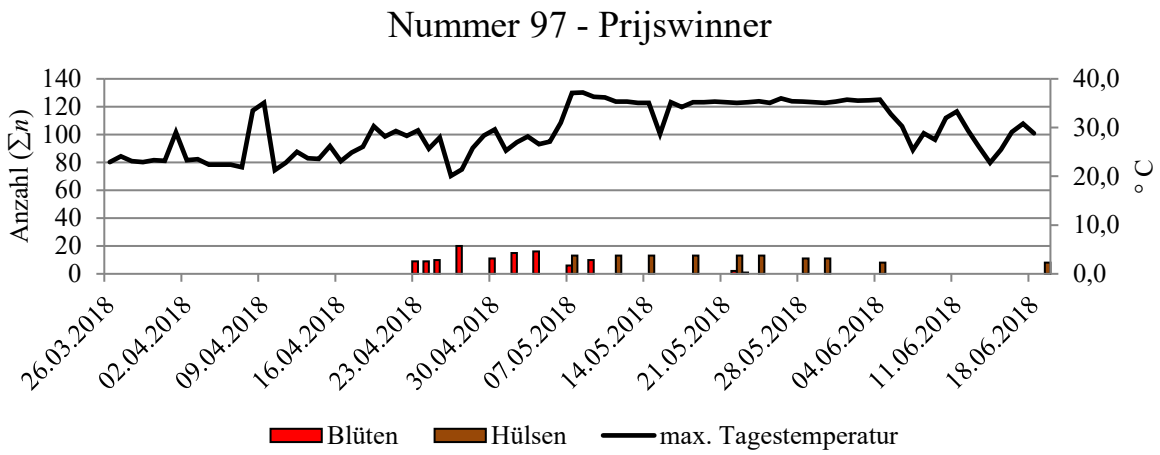

Nummer 91 - Hestia
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur


Nummer 92 - Lady Di
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur


Nummer 94 - Choco
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur


Nummer 95 - Hellviolette
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur


Nummer 96 - Aldrian
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur


Nummer 97 - Prijswinner
Anzahl (∑n)
140
120
100
80
60
40
20
0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
° C
26.03.2018
02.04.2018
09.04.2018
16.04.2018
23.04.2018
30.04.2018
07.05.2018
14.05.2018
21.05.2018
28.05.2018
04.06.2018
11.06.2018
18.06.2018
Blüten
Hülsen
max. Tagestemperatur

8.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE WICHTIGSTEN GENETISCHEN GRUPPEN AUS DER STAMMBAUMDARSTELLUNG UND IHRE HERKUNFT

Gruppe	Akzession/Sorte	Herkunft (Land)	Herkunft (Bundesland)
Blau (Außengruppe)			
	77	CHN	Sichuan
Rot (Außengruppe)			
	31	AUT	Steiermark
	35	AUT	Steiermark
	36	AUT	Steiermark
	69	DDR	?
	70	?	?
	80	AUT	Burgenland
	83	AUT	Steiermark
	85	AUT	Steiermark
	91 (Hestia)	NLD	
Grün (Kerngruppe)			
	1	AUT	Steiermark
	9	AUT	Steiermark
	16	AUT	Steiermark
	17	AUT	Steiermark
	26	AUT	Steiermark
	28	AUT	Steiermark
	37	AUT	Steiermark
	38	AUT	Steiermark
	40	AUT	Steiermark
	41	AUT	Steiermark
	47	AUT	Steiermark
	48	AUT	Steiermark
	50	AUT	Steiermark
	51	AUT	Steiermark
	53	AUT	Steiermark
	54	AUT	Steiermark
	55	AUT	Steiermark
	56	AUT	Steiermark
	59	AUT	Steiermark
	63	AUT	Steiermark
	64	AUT	Steiermark
	66	AUT	Steiermark
	67	ITA	Kalabrien
	71	AUT	Burgenland
	72	AUT	Burgenland
	73	AUT	Burgenland
	75	AUT	Steiermark
	78	AUT	?

Gruppe	Akzession/Sorte	Herkunft (Land)	Herkunft (Bundesland)
	79	AUT	Steiermark
	82	AUT	Burgenland
	84	PRT	Madeira
	87 (Melange)	AUT	
	89 (Steirische Riesen)	AUT	
	94 (Choco)	AUT	
	95 (Hellviolette)	AUT	
	96 (Aldrian)	AUT	
Violett (Kerngruppe)			
	2	AUT	Steiermark
	3	AUT	Steiermark
	4	AUT	Kärnten
	5	AUT	Kärnten
	7	AUT	Steiermark
	10	AUT	Steiermark
	11	AUT	Steiermark
	12	AUT	Steiermark
	13	AUT	Steiermark
	14	AUT	Steiermark
	15	AUT	Steiermark
	18	AUT	Steiermark
	19	AUT	Steiermark
	32	AUT	Steiermark
	39	AUT	Steiermark
	42	AUT	Steiermark
	43	AUT	Steiermark
	45	AUT	Steiermark
	46	AUT	Steiermark
	52	AUT	Steiermark
	57	AUT	Steiermark
	61	AUT	Steiermark
	65	ITA	Steiermark
	74	AUT	Steiermark
	76	AUT	Steiermark
	88 (Bonela)	AUT	
	93 (Hara)	AUT	

8.3 ÜBERSICHT ÜBER DIE AKZESSIONEN UND SORTEN

Die folgende Übersicht listet die im Projekt untersuchten Akzessionen und Sorten mit ihrer Herkunft und wichtigen Samenmerkmalen auf. Die Farben zeigen die Zuordnung zu genetischen Gruppen. Weiß unterlegte Akzessionen konnten keiner Gruppe zugeordnet werden.

Lauf_Nr.	ACCENUMB	GENUS	SPECIES	/Sortenname	ORIGCTY	COLLSITE/Sammelort	HKM g	medianer Längsschnitt	mittlerer Querschnitt	Farben	Hauptfarbe	Vert.Sekundär-farbe	Weiß-aderung	Nabel-umrandung
1	BVAL-610108	Phaseolus	coccineus		AUT	Breitenfeld	145	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
2	BVAL-610109	Phaseolus	coccineus		AUT	Breitenfeld	158	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
3	BVAL-610110	Phaseolus	coccineus		AUT	Breitenfeld	153	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
4	BVAL-610112	Phaseolus	coccineus		AUT	Wolfsberg	178	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
5	BVAL-610113	Phaseolus	coccineus		AUT	Wolfsberg	150	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
6	BVAL-610124	Phaseolus	coccineus	Rosenbohnen	AUT	Mettersdorf	156	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
7	BVAL-610125	Phaseolus	coccineus		AUT	Mettersdorf	140	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
8	BVAL-610130	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	156	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
9	BVAL-610131	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	134	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
10	BVAL-610135	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	124	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
11	BVAL-610137	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	147	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
12	BVAL-610138	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	173	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		gleiche Farbe
13	BVAL-610140	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	125	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
14	BVAL-610141	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	137	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
15	BVAL-610142	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	169	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		andere Farbe
16	BVAL-610143	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	169	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
17	BVAL-610144	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	144	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
18	BVAL-610145	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	143	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
19	BVAL-610146	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	166	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
20	BVAL-610147	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Peter	129	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
21	BVAL-610150	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	100	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
22	BVAL-610151	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	134	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
23	BVAL-610158	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	117	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
24	BVAL-610159	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	125	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		gleiche Farbe
25	BVAL-610160	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	149	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	mittel	gleiche Farbe
26	BVAL-610161	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	131	breit elliptisch	kreisförmig	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
27	BVAL-610162	Phaseolus	coccineus		AUT	Vogau	109	elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
28	BVAL-610172	Phaseolus	coccineus		AUT	Eichberg	141	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
29	BVAL-610173	Phaseolus	coccineus	Rosenbohne	AUT	Maltschach	195	breit elliptisch	kreisförmig	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		andere Farbe
30	BVAL-610174	Phaseolus	coccineus		AUT	Maltschach	150	nierenförmig	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
31	BVAL-610180	Phaseolus	coccineus		AUT	Klausen	131	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
32	BVAL-610181	Phaseolus	coccineus		AUT	Klausen	139	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		andere Farbe
34	BVAL-610183	Phaseolus	coccineus		AUT	Klausen	129	breit elliptisch	schmal elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
35	BVAL-610184	Phaseolus	coccineus		AUT	Klausen	136	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
36	BVAL-610192	Phaseolus	coccineus		AUT	Feldbach	137	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
37	BVAL-610194	Phaseolus	coccineus		AUT	Feldbach	113	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
38	BVAL-610195	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	153	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	mittel	gleiche Farbe
39	BVAL-610196	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	135	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
40	BVAL-610197	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	162	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
41	BVAL-610198	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	143	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
42	BVAL-610199	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	141	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		andere Farbe
43	BVAL-610200	Phaseolus	coccineus		AUT	Misselsdorf	139	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
44	BVAL-610204	Phaseolus	coccineus		AUT	Unterpurkla	100	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
45	BVAL-610215	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Anna	145	breit elliptisch	kreisförmig	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
46	BVAL-610216	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Anna	145	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
47	BVAL-610218	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Anna	119	elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
48	BVAL-610248	Phaseolus	coccineus		AUT	Lebring	110	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
49	BVAL-610249	Phaseolus	coccineus		AUT	Lebring	105	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
50	BVAL-610250	Phaseolus	coccineus		AUT	Lebring	224	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe

Lauf_Nr.	ACCENUMB	GENUS	SPECIES	/Sortenname	ORIGCTY	COLLSITE/Sammelort	HKM g	medianer Längsschnitt	mittlerer Querschnitt	Farben	Hauptfarbe	Vert.Sekundär-farbe	Weiß-aderung	Nabel-umrandung
51	BVAL-610251	Phaseolus	coccineus		AUT	Lebring	166	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
52	BVAL-610252	Phaseolus	coccineus		AUT	Lebring	152	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		andere Farbe
53	BVAL-610258	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	165	elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
54	BVAL-610259	Phaseolus	coccineus	Rosen-Käferbohnen	AUT	St. Nikolai	166	elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
55	BVAL-610260	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	173	breit elliptisch	schmal elliptisch	eine	Hellbraun	#	#	gleiche Farbe
56	BVAL-610261	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	159	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
57	BVAL-610274	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	152	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
58	BVAL-610285	Phaseolus	coccineus		AUT	St. Nikolai	116	nierenförmig	elliptisch	eine	Weiß	#	mittel	gleiche Farbe
59	BVAL-610301	Phaseolus	coccineus		AUT	Groß St. Florian	158	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
60	BVAL-610302	Phaseolus	coccineus		AUT	Groß St. Florian	129	breit elliptisch	kreisförmig	eine	Weiß	#	mittel	gleiche Farbe
61	BVAL-610303	Phaseolus	coccineus		AUT	Unterbergla/Gross St. Florian	150	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
62	BVAL-610329	Phaseolus	coccineus		AUT	Oberhaag	142	nierenförmig	elliptisch	eine	Hellbraun	#	#	gleiche Farbe
63	BVAL-610334	Phaseolus	coccineus		AUT	Oberhaag	158	elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
64	BVAL-610342	Phaseolus	coccineus		AUT	Oberhaag	84	breit elliptisch	schmal elliptisch	zwei	violett	fleckig		andere Farbe
65	BVAL-610345	Phaseolus	coccineus		AUT	Oberhaag	146	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
66	BVAL-610347	Phaseolus	coccineus	Weisse Käferbohne	AUT	Oberhaag	143	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
67	BVAL-610348	Phaseolus	coccineus		ITA	Santuario Madonna di Polsi	121	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
68	BVAL-610349	Phaseolus	coccineus		?		102	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		gleiche Farbe
69	BVAL-610350	Phaseolus	coccineus	Preisgewinner; Prijswinner	DDR		131	nierenförmig	elliptisch	zwei	violett	fleckig		andere Farbe
70	BVAL-610351	Phaseolus	coccineus	Hammonds Dwarf Scarlet	?		122	nierenförmig	elliptisch	zwei	violett	fleckig		andere Farbe
71	BVAL-610386	Phaseolus	coccineus		AUT	Stadtschlaining	103	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
72	BVAL-610387	Phaseolus	coccineus		AUT	Stadtschlaining	105	schmal elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
73	BVAL-610388	Phaseolus	coccineus		AUT	Stadtschlaining	142	elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
74	BVAL-610468	Phaseolus	coccineus		AUT	Löffelbach	154	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
75	BVAL-610469	Phaseolus	coccineus		AUT	Löffelbach	147	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
76	BVAL-610470	Phaseolus	coccineus		AUT	Löffelbach	109	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
77	BVAL-610475	Phaseolus	coccineus		CHN	Chengdu, Sichuan	77	elliptisch	schmal elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
78	BVAL-610487	Phaseolus	coccineus	schwarz	AUT	?	163	breit elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
79	BVAL-610547	Phaseolus	coccineus		AUT	Styria	155	breit elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
80	BVAL-610635	Phaseolus	coccineus		AUT	Burgenland	113	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		andere Farbe
82	BVAL-610637	Phaseolus	coccineus		AUT	Burgenland	135	elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
83	BVAL-610675	Phaseolus	coccineus		AUT	Deutschlandsberg	128	schmal elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
84	BVAL-610734	Phaseolus	coccineus		PRT	Funchal, Madeira	105	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
85	BVAL-610750	Phaseolus	coccineus	Selection of 610342	AUT	Oberhaag	117	elliptisch	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
86	BVAL-610776	Phaseolus	coccineus	schwarz	AUT	Leonding	153	elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
87	WIES-G126	Phaseolus	coccineus	Melange	AUT	Wies	186	nierenförmig	elliptisch	zwei	Hellbraun	fleckig		gleiche Farbe
88	WIES-G20	Phaseolus	coccineus	Bonela	AUT	Wies	208	breit elliptisch	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
89	WIES-G128	Phaseolus	coccineus	Steirische Riesen	AUT	Wies	199	nierenförmig	elliptisch	eine	Weiß	#	gering	gleiche Farbe
91	Standard	Phaseolus	coccineus	Hestia	NL	Holland Select Research BV	77	nierenförmig	schmal elliptisch	zwei	violett	fleckig		andere Farbe
92	Standard	Phaseolus	coccineus	Lady Di	NL	Holland Select Research BV	82	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	marmoriert		gleiche Farbe
93	WIES-G71	Phaseolus	coccineus	Hara	AUT	Wies	158	breit elliptisch	elliptisch	eine	schwarz	#	#	gleiche Farbe
94	WIES-G22	Phaseolus	coccineus	Choco	AUT	Wies	177	breit elliptisch	elliptisch	eine	Hellbraun	#	#	gleiche Farbe
95	WIES-G127	Phaseolus	coccineus	Hellviolette	AUT	Wies	173	nierenförmig	elliptisch	zwei	Rosa hell violett	fleckig		andere Farbe
96	WIES-G21	Phaseolus	coccineus	Aldrian	AUT	Wies	168	elliptisch	elliptisch	zwei	Hellbraun	marmoriert		andere Farbe
97	Standard	Phaseolus	coccineus	Prijswinner	NL	zugel. NL u. UK	119	schmal elliptisch	elliptisch	zwei	violett	fleckig		andere Farbe

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zeitpunkt zu dem 50 % der Pflanzen einer Akzession oder Sorte mindestens eine Blüte ausgebildet hatten. 20
Tabelle 2: Erhobene Ertragsparameter der verschiedenen Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten nach der Hülsenernte am 19.06.2018. Die Referenzsorte „Bonela“ ist rot markiert. Höchstwerte der erhobenen Parameter sind fett markiert. N/A=nicht anwendbar 30
Tabelle 3: Loci nach ipyrad Filter- und Analyseprozess. 33
Tabelle 4: Anzahl der assoziierten Loci pro getesteter Ausprägung. 37

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lageplan der 33 im Glashaus WSP aufgezogenen Käferbohnen-Akzessionen und -Sorten. Die Aufstellung erfolgte in zwei unterschiedlich großen Abteilen in zufällig verteilten Achtergruppen. 8
Abbildung 2: Maximale gemessene Tagestemperatur in den beiden Abteilen des Glashauses WSP sowie der Wetterstation WSP in unmittelbarer Nähe des Glashauses während des gesamten Experimentverlaufs. An Tagen mit starken Abweichungen zwischen Innen- und Außentemperatur zeigen die Temperaturkurven einen ähnlichen Verlauf. Hitzestress (Temperatur 35° C) wurde für den Zeitraum vom 07.05.2018 bis inkl. 04.06.2018 künstlich erzeugt. 9
Abbildung 3: Hypogäische Keimung der Käferbohnen im Glashaus in Linz. 14
Abbildung 4: Die Käferbohnen im Glashaus Linz am Tag der Überführung nach Wien (22.03.2018). 15
Abbildung 5: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 17.04.2018 vor dem Hitzestress. Die Pflanzen verwenden die Rankhilfen, um in die Höhe zu wachsen. Nur die Sorte „Hestia“ rankte als Buschtyp kaum. Links im Bild ist der Bienenstock zu erkennen. 16
Abbildung 6: Beispiele für die an den Käferbohnen ausgebildeten verschiedenfarbigen Blüten. Rote Blüte (links), weiße Blüte (mittig), rote Fahne und weiße Flügel (rechts). 17
Abbildung 7: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 11.05.2018 im Zeitraum des künstlichen Hitzestresses. Die Pflanzen haben stark an Biomasse zugenommen und blühen. Die im Bild erkennbaren Blüten wurden zu diesem Zeitpunkt aktiv von den Bienen beflogen. 17
Abbildung 8: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 08.06.2018 nach Ende des künstlichen Hitzestresses. Die Pflanzen verwendeten zunächst die Rankhilfen um in die Höhe zu wachsen. Nachfolgende Seitensprosse benutzten auch nebenstehende Pflanzen als Rankhilfe, vereinzelt wurden auch Konstruktionen des Glashauses (Deckenlampen, Schattierungen, etc.) zur Fixierung verwendet. Der rote Pfeil markiert eine sich noch in der Entwicklung befindende Hülse. 18
Abbildung 9: Pflanzenentwicklung der Käferbohnen im kleinen Abteil des Glashauses WSP am 18.06.2018 nach Ende des künstlichen Hitzestresses. Der rote Pfeil markiert eine ausgereifte Hülse. 19
Abbildung 10: Unreife Käferbohnen-Hülsen (links) und ausgereifte Käferbohnen-Hülsen zweier unterschiedlicher Akzessionen, fotografiert an unterschiedlichen Terminen. Die Verdickungen der Hülsen zeigen die Anzahl der sich in der Hülse befindenden Bohnen an. Zu sehen sind auch die zwecks Wiedererkennung an den Hülsenansatz montierten Fähnchen (rosa und gelb) und Farbmarkierungen (gelbe Acrylfarbe). 19
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der dokumentierten ersten Blüte und ersten Hülse größer als 5 cm an mindestens einem Individuum aller 33 im Glashaus aufgestellten Akzessionen und Sorten. Die Daten veranschaulichen die gleichmäßige und rasche Entwicklung. 21
Abbildung 12: Kumulative Gesamtanzahl der ausgebildeten Blüten und Hülsen für alle 264 individuellen Pflanzen der 33 im Glashaus aufgestellten Akzessionen und Sorten. Der Beginn des Hitzestresses (07.05.2018) ist mit einem schwarzen, das Ende (04.06.2018) mit einem blauen Strich markiert. 22
Abbildung 13: Aufgrund des Hitzestresses abgeworfene Blüten und Hülsen der Käferbohnen auf dem Boden des Glashauses. Der Hitzestress hatte keinen Einfluss auf die Bienensterblichkeit. Altersbedingt gestorbene Bienen wurden im üblichen Ausmaß beobachtet. 22

Abbildung 14: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 24
Abbildung 15: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 1 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 24
Abbildung 16: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 6 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 24
Abbildung 17: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 25
Abbildung 18: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 32 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 25
Abbildung 19: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 40 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 25
Abbildung 20: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 26
Abbildung 21: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 50 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 26
Abbildung 22: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 59 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 26
Abbildung 23: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 27
Abbildung 24: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 67 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 27
Abbildung 25: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 73 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 27
Abbildung 26: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der im Projekt verwendeten Referenzsorte „Bonela“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 28
Abbildung 27: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Akzession 82 an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 28
Abbildung 28: Kumulierte Anzahl von Blüten (rote Balken) und Hülsen (braune Balken) der acht im Glashaus aufgestellten Individuen der Käferbohnen-Sorte „Hara“ an den unterschiedlichen Boniturterminen. Die schwarze Linie gibt die maximale Tagestemperatur (° C) im Glashaus an. 28
Abbildung 29: Anzahl (± Standardfehler) der von den 33 unterschiedlichen Akzessionen und Sorten ausgebildeten Hülsen und Bohnen zum Zeitpunkt der Hülsenernte am 19.06.2018. Die Referenzsorte „Bonela“ ist rot markiert. 29
Abbildung 30: Geerntete Käferbohnen der unterschiedlichen Akzessionen und Sorten des großen Glashausabteils. Die Positionierung der Schalen erfolgte nach der Platzierung der Käferbohnen im Glashaus (s. Abbildung 1). 31

Abbildung 31: Geerntete Käferbohnen der unterschiedlichen Akzessionen und Sorten des kleinen Glashausabteils. Die Positionierung der Schalen erfolgte nach der Platzierung der Käferbohnen im Glashaus (s. Abbildung 1). 32
Abbildung 32: Anzahl der genetisch charakterisierten Individuen (N) pro Akzession (Pop). Durchschnittlich wurden 7,2 Individuen pro Akzession oder Sorte analysiert. 34
Abbildung 33: "Expected heterozygosity" (Hexp) für jede Akzession oder Sorte in absteigender Reihenfolge. Der rote Strich zeigt den Mittelwert der „expected heterozygosity" über alle Akzessionen oder Sorten an. Der rote Pfeil zeigt die Akzession, von welcher zwei Individuen, die schwarzen Pfeile jene Akzessionen, von welchen drei Individuen analysiert werden konnten. 34
Abbildung 34: Die Tabelle links zeigt jene Akzessionen, welche private Allele aufweisen, wobei Akzession 65 und 97 („Prijswinner") mit zwei privaten Allelen ausgestattet sind. Npa = Anzahl privater Allele. Die Grafik rechts ist eine Abbildung über das Vorkommen privater Allele über alle Akzessionen oder Sorten. 35
Abbildung 35: Genetische Struktur des Datensatz I unter der Annahme von K = 4 – 11 Cluster, wobei basierend auf der Evanno-Methode, 4 Cluster (K = 4) für den Datensatz I als wahrscheinlich angenommen werden können. Genetisch ähnliche Akzessionen und Sorten sind durch rote bzw. blaue Umrahmungen gekennzeichnet. 36
Abbildung 36: DAPC des gesamten Datensatz I. DA eigenvalues = data axis eigenvalues: die Eigenwerte der DAPC zeigen wieviel Varianz hinter jeder Hauptkomponente (aufgetragen auf der X-Achse) steckt. .. 36
Abbildung 37: Cluster Dendrogram zur Darstellung der Verwandtschaftsstruktur der Akzessionen des Datensatz I. Fett und schwarz = phänotypisierte Akzession; Fett und rot = bessere Akzession bzw. Sorte im Vergleich zur Referenzsorte „Bonela"; Fett und blau = phänotypisierte Sorte; Grün = Referenzsorte „Bonela". 37

Bundesministerium
Nachhaltigkeit und Tourismus

Das Land Steiermark

AIT AUSTRIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY

SZG SAATZUCHT GLEISDORF Gesellschaft m.b.H.

AGES