

## Übersicht

*Camelina sativa* ist eine widerstandsfähige, selbstbestäubende Ölsaatenpflanze, die zur Kreuzblütlerfamilie der *Brassicaceae* gehört. Bis in die 1940er Jahre wurde sie auf der gesamten Nordhalbkugel zur Herstellung von Pflanzenöl weit verbreitet, später aber von ertragreicheren Raps- und Sonnenblumenkulturen verdrängt. Das Interesse an *Camelina*, auch Leindotter genannt, als alternative Ölquelle hat jedoch aufgrund seines hohen Ölgehalts, der reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Antioxidantien ist, sowie seiner Fähigkeit, auf marginalen Böden mit minimalen Anforderungen zu wachsen, wieder zugenommen. Aus diesem Grund beschloss unsere Gruppe, die bestehende (2011) Zentralsammlung des *National Genetic Resources Program* (NGRP) von *Camelina* auf ihre genetische Vielfalt zu untersuchen und eine phänotypische Bewertung der verfügbaren Sorten vorzunehmen. Zu den bewerteten Eigenschaften gehören Saatgut- und Öleigenschaften, Entwicklungs- und Reifemorphologien sowie der Chromosomengehalt. Es wurden auch selektierbare Markergene für eine mögliche Verwendung in der biotechnologischen Manipulation evaluiert. Die Daten werden in einem rohen, unverkürzten Format zur Verfügung gestellt, damit andere Forscher die unvoreingenommenen Informationen für ihre eigenen Studien analysieren können. Unsere Auswertung hat ergeben, dass die NGRP-Sammlung ein breites Spektrum an genetischem Potenzial sowohl für die Züchtung als auch für die biotechnologische Manipulation aufweist. Innerhalb der NGRP-Sammlung wurden Zugänge identifiziert, die ein wünschenswertes Saatgut-Erntegewicht (5,06 g/Pflanze) und einen Ölgehalt (44,1%) aufweisen. Andere Sorten wurden identifiziert, die Fettsäuremerkmale aufweisen, die für die Verwendung als Mahlzeit und/oder Lebensmittel geeignet sein können, wie z.B. ein niedriger (<2%) Erucasäuregehalt, der oft für einen gesunden Verzehr in Betracht gezogen wird und von einem hohen Gehalt von 4,79% bis zu einem niedrigen von 1,83% reicht. Es werden deskriptive Statistiken für eine breite Palette von Merkmalen aus 41 Beitritten sowie Rohdaten zur Verfügung gestellt, und wichtige Saatgutmerkmale werden weiter erforscht.

Die präsentierten Daten stehen der Öffentlichkeit zur Verfügung.

## Einleitung

Erneuerbare Energiequellen einschließlich veresterten Pflanzenöls (d.h. Biodiesel) wurden als eine mögliche Option vorgeschlagen, um die Treibhausgasemissionen (THG) im Verkehrssektor zu reduzieren. Zu den derzeit weit verbreiteten Ölsaaten zur Herstellung von Biokraftstoff gehören Raps-, Sonnenblumen- (Europa), Soja- (USA) und Palmöl (tropische Regionen). Im Vergleich zu diesen anderen Ölsaatenpflanzen weist *Camelina sativa* (L.) Crntz. (*Camelina*) einen sehr kurzen Lebenszyklus (52 bis 72 Tage) auf und ist wirtschaftlich auf kargen Flächen aufgrund minimaler Anforderungen an den Nährstoffeintrag. Darüber eignet sie sich sowohl für den Sommer- als auch für den Winteranbau. Die Pflanze ist in Nordeuropa und Südostasien beheimatet und gehört zur Familie der Senfgewächse (*Brassicaceae*). Diese alte Kulturpflanze wurde früher zum Kochen, für Kosmetika und Heizöl verwendet [1].

Archäologische Studien datieren ihren Anbau in die Bronzezeit [2,3]. Sie wurde in der folgenden Zeit vornehmlich in der nördlichen Hemisphäre verwendet, bis sie im 20. Jahrhundert durch die Hochertragskulturen Raps, Rüben und Soja [4,5] ersetzt wurde. Trotz seines Potenzials gibt es

aufgrund des Mangels an agronomischen Kenntnissen sowie begrenzter Informationen über die genetische Vielfalt im verfügbaren Keimplasma eine Beschränkung auf eine breitere Anwendung.

Gegenwärtig werden die Nutzpflanzen Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Palme in erster Linie für Nahrungsmittel verwendet, und ihre Verwendung zur Erzeugung von Öl für Biodiesel steht in direkter Konkurrenz zu ihrem Wert als Nahrungsmittel. Leindotter scheint eine ideale Alternativpflanze für Biodiesel zu sein, da sie nicht mit den derzeitigen Lebensmittelanwendungen konkurrieren würde, einen hohen Ölgehalt hat, der reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Tocopherolen ist, was ihr Stabilität gegen Oxidation verleiht. Aufgrund ihrer Ölzusammensetzung kann Camelina eine wertvolle erneuerbare Ressource für die Herstellung von Biodiesel, Hydrauliköl, Schmiermitteln und Düsentreibstoff sein [6-9]

Unter den Non-Food-Pflanzen eignet sich der Leindotter gut für gemäßigte Klimazonen mit schlechten Böden, da sie auf Grenzertragsböden angebaut werden können. Ihre vorteilhaften agronomischen und wirtschaftlichen Eigenschaften umfassen einen guten Ertrag unter Dürrebedingungen, geringer Düngemittelbedarf, Pestizidbedarf, Kompatibilität mit vorhandenem landwirtschaftlichem Gerät und einer kurzen Wachstumszeit [6-9]. Camelina zeigt auch Eigenschaften, die das Wachstum von Unkraut verhindern [10]. Diese allelopathische Natur ist auf die frühe Keimung und auf seine Fähigkeit, unter Frostbedingungen ausgesät zu werden, zurückzuführen und macht Camelina zu einer hervorragenden Kavalierspflanze. Dadurch und aufgrund der Tatsache, dass Leindotter die Erträge nachweislich die von Ölsaatenkulturen wie Flachs unter dürreähnlichen Bedingungen übertrifft, ist sie eine attraktive Kulturpflanze für die Produktion im Binnenland im pazifischen Nordwesten und die nordamerikanischen semi-ariden Prärien.

Des Weiteren liefert das Nebenprodukt aus der Ölsammlung eine protein- und vitaminreiche Mahlzeit, was wiederum Studien zur Verwendung als Aquakultur- und Tierfutterzusatz veranlasst hat [11-19]. Es hat sich gezeigt, dass die Saat aus 45% Protein, 13% Ballaststoffen, 5% Vitaminen und Mineralien sowie 10% Ölrückständen besteht [20]. Die Proteinzusammensetzung umfasst die Aminosäuren Glutamin, Asparagin, Arginin, Leucin, Glycin, Valin, Serin, Lysin und Prolin in einem mit Raps und Soja vergleichbaren Verhältnis. Studien haben jedoch gezeigt, dass die Verwendung des Leindottermehls in vielen Fällen die Zusammensetzung der Gewebefettsäuren verändert. Es enthält außerdem Glucosinolate und Phytate und sollte in entsprechend geringen Mengen verzehrt werden. Daher wird das aus zerkleinerten Samen gewonnene Mehl nur in begrenztem Umfang als Zusatz für Tierfutter [21,22] verwendet, wobei die Futterrationen für Geflügel und Masthühner maximal 10%, für Rindvieh bis zu 10%, für Schweine 2% und für die kanadische Aquakultur 3% betragen dürfen [23]. Die Zucht und/oder genetische Veränderung bietet jedoch Möglichkeiten, sowohl die Öl- als auch die Mehlezusammensetzung zu verbessern, um dem wachsenden Bedarf gerecht zu werden.

Während die meisten Ernährungsstudien für Tierfutter durchgeführt wurden, gibt es Studien, die darauf hindeuten, dass das Öl der Camelina, das der Ernährung einer Person zugesetzt wird, deren Serumlipidprofil verbessern könnte [24,25] und damit einen Weg für seine mögliche Verwendung in der menschlichen Nahrung bietet. Bestimmte Überlegungen, wie z.B. niedrige (<2%) Erucasäurewerte [6,26], müssten jedoch durch Screening, Züchtung oder Biotechnologie angegangen werden, bevor eine weit verbreitete Anwendung erfolgt. Da das Camelinaöl reich ist an Linolensäure und Omega-Tocopherolen, könnte es alternativ sowohl in Nahrungsergänzungsmitteln als auch in Kosmetika verwendet werden [27].

Camelina bietet eine Reihe von Vorteilen sowohl für den Produzenten als auch für den Konsumenten, daher scheint die Erkundung ungenutzter genetischer Reserven der nächste logische Schritt zu sein. Bis heute wurde eine begrenzte Anzahl von Leindotterlinien in Feldversuchen oder für biotechnologische Verbesserungen eingesetzt. Obwohl es eine große Anzahl von Sorten mit einem enormen genetischen Potenzial gibt, sind selbige schlecht charakterisiert und viele Qualitätsmerkmale überhaupt nicht bewertet worden [28]. Beispiele dafür sind die Variation des Gehalts an Camelina-Samenöl, von dem berichtet wurde, dass er zwischen 320 und 460 g pro kg liegt, sowie Konzentrationsschwankungen der Linolensäure zwischen 28 und 43%. Ergebnisse mit großsaatigen Genotypen haben gezeigt, dass es eine umgekehrte Korrelation zwischen 1000 Samengewicht und Ölgehalt gibt, weshalb diese Sorten als Ölquelle gegenüber kleinsaatigen Sorten als minderwertiger angesehen werden [7,29].

Variabilität besteht auch bei den Erträgen, die je nach Genotyp und Anbauort zwischen 0,336 t pro ha und 2,25 t pro ha liegen [7,30,31]. Obwohl diese Ergebnisse sowohl auf Umweltfaktoren als auch höchstwahrscheinlich auf genetische Umstände zurückgeführt werden können, sind weitere Studien unter Verwendung echter Zuchtpopulationen von Leindotter mit einem großen Satz bekannter QTLs (*Quantitative Trait Locus*, also ein Ort im Genom, der ein oder mehrere Gene enthält, die an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals beteiligt sind) zur Bestimmung erforderlich.

Gegenwärtig steht Leindotter an der Schwelle zu einer Vielzahl industrieller Anwendungen und einer möglichen Verwendung als Tierfutter. Über ihr offensichtliches einheimisches Potenzial hinaus ist darauf hinzuweisen, dass diese Art relativ einfach genetisch manipuliert werden kann [8,23,32-38]. Veröffentlichte Ergebnisse einer Auswahl von Keimplasma, das mit einer Mutagenesetechnik behandelt wurde, haben zu Sorten mit höherem Ölgehalt und verbesserter Fettsäurezusammensetzung geführt, wie z.B. die Sorte *Blaine Creek*, die mit Omega-3 Fettsäuren angereichert ist, und *Suneson*, die einen 2-3% höheren Ölgehalt mit erhöhter -Linolensäure gezeigt hat [39,40].

Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Gen-Modifikation mit Hilfe biotechnologischer Techniken. Als naher Verwandter der *Arabidopsis* (Acker-Schmalwand) stehen seit 30 Jahren molekularbiologische Techniken zur genetischen Modifikation zur Verfügung [41-43]. Bisher wurde die Genomveränderung zur Verbesserung des Stoffwechselweges für die Fettsäureproduktion eingesetzt, um das Produktionsniveau zu erhöhen [32,33,44-47]. Transkriptomanalyse und vergleichende Genomforschung haben eine Fülle von Informationen sowohl für Züchter als auch für biotechnologische Anwendungen geliefert [48-54]. Hochentwickelte molekulare Techniken zur Genomveränderung wie RNAi [21] und CRISPR [55] wurden zur Reduzierung oder Abschaffung der Genexpression eingesetzt, um den Fettsäure-Stoffwechselprozess zu verlagern. Während Techniken wie der Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch (RMCE) [56] oder die Genassemblierung in Agrobakterium durch Nukleinsäuretransfer unter Verwendung der Rekombinase-Technologie (GAENTRY) [57] für die Hinzufügung großer genetischer Pfade für neuartige Metabolic-Engineering-Projekte eingesetzt werden könnten. Diese Modifikationen könnten verwendet werden, um das Öl oder das Mehl der Camlina für spezifische Anwendungen maßzuschneidern [58-63]. Ein vorrangiges Ziel wäre es, dass das Öl dieser Pflanze eine Alternative zu nicht-nachhaltigen Produkten auf Erdölbasis als Treibstoff, Schmiermittel und Spezialchemikalien wird. Für eine Überprüfung der biotechnologischen Verbesserungen von Leindotter, siehe Bansal et al. [64].

Doch selbst mit den Fortschritten, die bei der molekularen Modifikation zu verzeichnen sind, fehlen immer noch einige grundlegende biotechnologische Werkzeuge, wie zum Beispiel selektierbare Markergene. Bis heute ist das Herbizidriegel-Selektionssystem die einzige robuste Selektionsmethode, die zur Verfügung steht. Andere Markergene wie Hygromycin (hptII) [43] und Acetolactat-Synthase (ALS) [42,63-65] wurden publiziert, erscheinen jedoch nicht so zuverlässig wie das Balkenselektionssystem und sind daher möglicherweise nur begrenzt als biotechnologisches Werkzeug einsetzbar.

Genetische und andere Hintergrundinformationen über den Ursprung bestimmter Camelina-Genotypen ist für die Initiierung von zielgerichteten Zuchtprogrammen unerlässlich [66], ist aber für die meisten Zugriffe zum Nationalen Programm für genetische Ressourcen (NGRP) nicht verfügbar oder wird nicht mit Querverweisen versehen. Das Ziel der gegenwärtigen Studie war die Erarbeitung eines Überblicks über die phänotypische Vielfalt des Leindotters innerhalb des NGRP Camelina Keimplasmasammlung, ab 2011. Wir versuchen, agronomisch wichtige Merkmale zu erfassen und darzustellen und diese Informationen mit zugänglichen und durchsuchbaren Beitritten von NGRP-Kameliden zusammenstellen. Die Daten von 41 Sorten, ihre Merkmale wie die Bandbreite der Keimungsraten, die Zeit bis zum Brechen, vererbare Saatgutmerkmale - wie z.B. die Samengröße, das 1000-Samen-Gewicht, der Ölgehalt oder die Fettsäurezusammensetzung - sowie die Chromosomenzahl werden aufgeführt. Darüber hinaus bieten wir Informationen über die Verwendung neuartiger Selektionsmarkergene für eine mögliche Nutzung in biotechnologischen Anwendungen. Die Daten werden in beiden Tabellen in einem unverkürzten Format dargestellt für Manuskriptbesprechung und als Rohdaten im XLS-Tabellenformat (Supplemental Tables S1-S4).

## Ergebnisse

Die Identifizierung von Qualitätsmerkmalen der Camelina-Pflanze und des Saatguts hinsichtlich wichtiger agronomischer Merkmale für die Vermarktung und Verarbeitung ist notwendig, um diese Kulturpflanze zu entwickeln, die in direkter Konkurrenz zu anderen derzeit produzierten Ölsaaten steht. Deshalb haben wir eine Reihe von Merkmalen gemessen, darunter 1000-Samen-Gewicht und Ölgehalt, und eine Analyse der Zusammensetzung durchgeführt. Auch die agronomischen Merkmale wurden unter kontrollierten Bedingungen auf die diversen Genotypen überwacht, um Umweltfaktoren zu minimieren, genetische Einflüsse zu bewerten und phänotypische Reaktionen zu katalogisieren. Unser Labor erhielt zunächst 38 Leindotter-Akzessionen vom NGRP zur Auswertung, aber bei vier der Linien wurde festgestellt, dass sie Mischsaatgut von zwei verschiedenen Sorten enthielten.

Aus unserer phänotypischen Auswertung der 41 Leindotter-Akzessionen, die wir vom Zentrum des National Genetic Resources Program (NGRP) erhielten, identifizierten wir eine Reihe von Linien mit potenziell nützlichen Merkmalen. Zum Beispiel lieferte der Zuwachs PI 311735, während er nur eine durchschnittliche Anzahl von Samen pro Pflanze (4953) lieferte, mit 5,06 g pro Pflanze die höchsten Erträge im Gesamtsaatgutgewicht. Dieser Beitritt hatte mit 38,2% auch einen der höchsten mittleren Ölgehalte pro TSW und war schneller als der Durchschnitt für die Tage bis zur Reife und Trocknung. Da die Ergebnisse mit dieser Linie so ermutigend waren, wurde auch ihr Einsatz für biotechnologische Anwendungen untersucht. Es wurde beobachtet, dass dieser Beitritt mit Hilfe der traditionellen Flora-Dip-Technologie transformiert werden konnte und dass Glufosinat ein wirksames Mittel für die Saatgutauswahl war. Die Beobachtung deutet also darauf hin, dass der Beitritt PI 311735 eine potenzielle Linie sowohl für die Züchtung als auch für die biotechnologische Anwendung ist. Eine

weitere interessante Linie wurde durch die biochemische Analyse des Öls beobachtet, bei der festgestellt wurde, dass der Zugangs-PI 650141 eine Erucasäurekonzentration von 1,83% aufwies, was unter den 2% liegt, die für den Lebensmittelverzehr erforderlich sind. Dies ist eine weitere potentiell nützliche Linie für Züchtungsbemühungen. Interessant war die in der Camelina-Population beobachtete Aufteilung der Chromosomenzahl zwischen  $n = 19$  (24,3%) und  $n = 20$  (75,6%). Unsere Gruppe stellte die Hypothese auf, dass die Kamelie in ihrer gegenwärtigen Hexaploidieform möglicherweise aus zwei divergierenden, aber verwandten Bahnen entstanden sein könnte. Kurz gesagt könnten beide Ereignisse mit einer  $n = 6$  (*C. laxa*) und  $n = 7$  (*C. hispida*) Hybridisierung begonnen haben, die  $n = 13$  (*C. rumelica*) ähnliche Arten hervorbrachte. Dann divergierte mit der zweiten Hybridisierung von  $n = 13$  zu dem einen oder anderen ursprünglichen Elter, so dass  $n = 6 + 7 + 6$  (19) oder  $6 + 7 + 7$  (20). Aus den biotechnologischen Studien ging hervor, dass das codA-Gen sehr effizient bei der Verlangsamung des Leindotterwachstums in Anwesenheit von 5FC arbeitete.

Dies sollte eine wertvolle Ressource für Techniken wie RMCE oder CRISPR darstellen, bei denen die Entfernung von DNA eine erforderliche Komponente für beide Strategien ist. Schließlich, obwohl das Sull-Selektionsmarkergen nur eine einzige Pflanze produzierte, erwies sich diese als resistent gegen Herbizide auf Sulfabasis (Daten nicht gezeigt) und kann Landwirten unkrautbekämpfend bei der Kultivierung von Camelina mit konventionellen Behandlungen dienen. Die Daten sind in unverkürztem Format in beiden Tabellen für die Manuskript-Diskussion und als Rohdaten in der XLS-Tabelle (*Supplemental Tables S1-S4*) Format dargestellt. Angesichts der Variabilität, die innerhalb dieser Sammlung zu beobachten ist, hoffen wir, dass diese Informationen dazu beitragen werden, Zucht- oder biotechnologische Programme für die zukünftige Nutzung von Camelina als Biokraftstoff und/oder Schrot nachhaltige Kulturpflanzen zu erzielen.