

**Beeinflussung des Ertragspotentials von Gerste und Weizen
durch Modifikation ährenarchitektonischer Eigenschaften
mittels Cas-Endonuklease-vermittelter Mutagenese**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Christian Wolfgang Hertig, M.Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens Boch

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener

Tag der Promotion: 15.02.2023

Die vorliegende Arbeit wurde am
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben
in der Arbeitsgruppe
Pflanzliche Reproduktionsbiologie
angefertigt.

Für meine liebe Solmaz und meinen kleinen Engel Anita sowie meine Eltern.

In Memoriam meinem großen Vorbild und Mentor, meinem Opa Dr. Franz Pietschmann.

Kurzzusammenfassung

Schlagworte: Ährenphänotyp, generative Entwicklung, *Genome Engineering*, Gerste, Pflanzenarchitektur, Weizen, zielsequenzspezifische Mutagenese

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung des *Genome Engineerings* mittels RNA-vermittelter Cas9-Endonuklease in den Getreidearten Weizen und Gerste. Dieses neue Werkzeug der Pflanzenzüchtung ermöglicht, innerhalb eines kurzen Zeitraumes spezifische Veränderungen im Genom von Getreide zu induzieren und dadurch gezielt Merkmale der Pflanzen zu verändern.

Hierfür wurden zu verändernde Zielgene im Weizen-Gen *Branched head (Bh)/ Wheat frizzy panicle (Wfzp)* bzw. in den Gersten-Genen *Squamosa-promotor binding protein-like 14 und 17 (Spl14/Spl17)* ausgewählt und passende *guide* RNA(gRNA)/*cas9*-Konstrukte kloniert. Die Aktivität der gRNAs wurde in Epidermiszellen von Weizen bzw. Gerste und in Weizenprotoplasten untersucht. Die stabile Transformation erfolgte anhand unreifer Embryonen über ballistischen Gentransfer (Weizen) bzw. durch Agrobakterien-vermittelte Übertragung von T-DNA (Gerste). Die anschließend regenerierten Pflanzen wurden auf die Anwesenheit der T-DNA und induzierter Mutationen untersucht.

Im Weizen wurden mutierte Regenerate durch Selbstungen, Kreuzungen und die Anwendung von Haploidentechnologie in nachfolgende Generationen überführt und eine Kollektion von Pflanzen mit verschiedenen mutierten Allelen einschließlich Kombinationen mutierter homoeologer Allele zusammengestellt. Resultierende Pflanzen mit ein oder zwei mutierten *Bh/Wfzp*-Homoeoallelen waren T-DNA-frei und zeigten phänotypische Veränderungen der Ährenarchitektur, der Korngröße, der Kornanzahl und zum Teil auch bezüglich der Wurzeln. Das Vorhandensein von drei mutierten *Bh/Wfzp*-Homoeoallelen führte zum Teil zu sehr drastischen Veränderungen der Ähren, welche überzählige Ährchen und auch Verzweigungen ausbildeten. Jedoch führten diese Mutationen zu einem hohen Verlust an Fertilität. Insgesamt konnte die Bedeutung des Transkriptionsfaktors BH/WFZP für die Entwicklung der Ähre und der Körner sowie für die Wurzeln weiter erschlossen werden.

Die in Gerste induzierten Mutationen in *Spl14* führten grundsätzlich zu einer verzögerten generativen Entwicklung und teilweise zur Reaktivierung der Ausbildung der lateralen Ährchen. Die Ähren waren zudem verkürzt und bildeten weniger Körner. Die erzeugten Mutationen in *Spl17* beeinflussten nicht die generative Entwicklung, jedoch die Ährenlänge und Kornbildung. Pflanzen mit Doppelmutationen in *Spl14* und *Spl17* zeigten eine drastische Verschärfung des *spl14*-Phänotyps, wobei die generative Entwicklung so sehr gestört war, dass keine Ähren ausgebildet werden konnten. Dies legt den Schluss nahe, dass SPL14 eine zentrale Rolle für die frühe generative Entwicklung spielt und SPL17 dabei als Co-Faktor wirkt.

Abstract

Keywords: barley, generative development, genome engineering, plant architecture, spike phenotype, target sequence specific mutagenesis, wheat

This thesis describes the application of genome engineering using RNA-mediated Cas9 endonuclease in the cereal species wheat and barley. This new breeding tool makes it possible to induce specific changes in the genome of cereals within a short period of time, thereby specifically modifying plant characteristics.

For this purpose, target motifs were selected in the wheat gene *Branched head (Bh)/ Wheat frizzy panicle (Wfzp)* and in the barley genes *Squamosa-promoter binding protein-like 14 and 17 (Spl14/Spl17)* and suitable *guide RNA (gRNA)/cas9* constructs were cloned. The activity of the gRNAs was investigated in wheat and barley epidermal cells and in wheat protoplasts. Stable genetic transformation was carried out via ballistic gene transfer (wheat) or *Agrobacterium*-mediated introduction of T-DNA (barley) to immature embryos. The subsequently regenerated plants were examined for the presence of T-DNA and induced mutations.

In wheat, regenerated mutant plants were generatively propagated by selfing, crossing and the application of haploid technology, and a collection of individuals carrying various mutated alleles including combinations of mutated homoeologous alleles was deployed. Resulting plants with one or two mutant *Bh/Wfzp* homoeoalleles were T-DNA-free and showed phenotypic modifications in ear phenotype, grain size, grain number and partially in roots. The presence of three mutant *Bh/Wfzp* homoeoalleles typically led to very drastic changes in the ears, which formed supernumerary spikelets and were also branching, which was associated with a great loss in fertility. Overall, the importance of the transcription factor BH/WFZP for the development of the spike and the grains as well as for the roots was further elucidated in the present investigation.

The mutations in *Spl14* induced in barley led to delayed generative development and in some cases to the reactivation of lateral spikelet formation. In addition, the ears were shortened and formed fewer grains. The mutations produced in *Spl17* did not affect generative development, but did affect ear length and grain formation. Plants carrying double mutations in *Spl14* and *Spl17* showed a drastic aggravation of the *spl14* phenotype, with generative development severely disrupted so that no ears could be formed. This suggests that SPL14 exerts a major function in early generative development and SPL17 acts as a co-factor.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	V
Abstract	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Glossar	XIII
Tabellenübersicht.....	XVI
Abbildungsübersicht	XIX
1. Einleitung	1
1.1. Die Kulturpflanzen Gerste und Weizen	1
1.1.1. Gesellschaftliche Bedeutung.....	1
1.1.2. Genomschlüsselung.....	2
1.1.3. Aufbau des Blütenstandes	2
1.1.4. Steigerung des Weizenertrages	4
1.2. Gezielte Mutagenese mit spezifizierbaren Endonukleasen.....	6
1.2.1. Meganukleasen	6
1.2.2. Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs)	6
1.2.3. Transkriptionsaktivatorartige Effektor nuklease (TALEN).....	7
1.2.4. RNA-vermittelte Endonukleasen.....	7
1.2.5. Reparaturmechanismen pflanzlicher Zellen	20
1.3. Der Transkriptionsfaktor <i>BRANCHED HEAD / WHEAT FRIZZY PANICLE</i>	22
1.3.1. Struktur und Lokalisation von <i>Branched head</i> in hexaploidem Weizen	22
1.3.2. <i>Branched head / Wheat Frizzy panicle</i> -Orthologe in diploiden Süßgräsern	22
1.3.3. <i>Branched head</i> in tetraploidem Weizen	24
1.3.4. <i>Branched head/ Wheat frizzy panicle</i> in hexaploidem Weizen.....	26
1.4. Die Transkriptionsfaktoren <i>SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEIN-like 14 und 17</i>	28
1.4.1. <i>SQUAMOSA</i> und <i>SBPs/SPLs</i> im Allgemeinen.....	28
1.4.2. <i>SPL</i> -Gene in verschiedenen Pflanzenspezies.....	28
1.4.3. <i>SPL14</i> und <i>SPL17</i>	32
2. Zielstellung der Arbeit	38
3. Material & Methoden	39
3.1. Übersicht der verwendeten Plasmide	39
3.2. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	40
3.3. Nomenklatur von Genen und Proteinen	40
3.3.1. Bakterien.....	40
3.3.2. Weizen	40
3.3.3. Gerste.....	41
3.3.4. Weitere Spezies.....	41
3.4. Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Chemikalien	41
3.4.1. Allgemein	41

3.4.2. Enzyme	41
3.4.3. Antibiotika/Fungizide	42
3.4.4. Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen	42
3.5. Software	44
3.6. Pflanzenmaterial	44
3.6.1. Donormaterial	44
3.6.2. Anzucht des Donormaterials	45
3.6.3. Pflanzenanzucht im Gewächshaus	45
3.7. Bakterien	46
3.7.1. Bakterienstämme	46
3.7.2. Herstellung kompetenter Bakterien	46
3.7.3. Bakterientransformation	47
3.7.4. Glycerin-Stammkulturen	47
3.8. Molekulare Methoden	48
3.8.1. Gelelektrophorese	48
3.8.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
3.8.3. Restriktionsverdau	48
3.8.4. Reinigung von Fragmenten	48
3.8.5. Dephosphorylierung von PCR-Produkten	49
3.8.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
3.8.7. Hybridisierung von Oligonukleotiden	49
3.8.8. Vektor-Insert-Ligationen	49
3.8.9. Gibson-Assemblierung	49
3.8.10. Golden-Gate-Klonierung	49
3.8.11. TA-Klonierung von PCR-Produkten	50
3.8.12. Erstellung von A-Überhängen für TA-Klonierung	50
3.8.13. Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (Mini, Midi)	50
3.8.14. Sanger-Sequenzierung	50
3.9. Klonierung der Plasmide	51
3.9.1. Klonierung generischer Vektoren	51
3.9.2. Klonierung der Intermediärvektoren für Weizen und Gerste	53
3.9.3. Klonierung der Zielvektoren für den ballistischen Test	55
3.9.4. Klonierung der Binärvektoren	56
3.10. Ballistischer Aktivitätstest in Epidermiszellen von Weizen- und Gerstenblättern	56
3.11. Transformationsmethoden	57
3.11.1. Transfektion von Protoplasten	57
3.11.2. Sterilisation der Karyopsen	58
3.11.3. Ballistischer DNA-Transfer in Weizenembryos	58
3.11.4. Agrobakterien-vermittelter Plasmidtransfer in Gerstenembryonen	60
3.12. Extraktion von Nukleinsäuren	60
3.12.1. DNA-Extraktion aus Protoplasten	60
3.12.2. DNA-Extraktion aus Blättern	61
3.12.3. RNA-Extraktion aus Ährenmeristemen der Gerste	62
3.13. Auswertung Protoplastentests	62
3.13.1. Amplifikation & Reinigung	62
3.13.2. Tiefensequenzierung & Auswertung	63
3.13.3. Berechnung der Mutationsfrequenz	63
3.14. Genotypisierung der Pflanzen	63
3.14.1. Amplifikation	63

3.14.2. Reinigung der PCR-Produkte im Plattenformat	64
3.15. <i>Phänotypisierung</i>	64
3.15.1. Pflanzendokumentation	64
3.15.2. Automatische Weizenphänotypisierung	64
3.15.3. Messparameter	65
3.15.4. Statistische Auswertung der phänotypischen Parameter	66
3.16. <i>Doppelhaploide (DH) Pflanzen</i>	66
3.16.1. Antherenkultur	66
3.16.2. Ploidiemessung	67
3.16.3. Colchizinierung	67
3.17. <i>Kreuzungen</i>	67
3.18. <i>Expressionsstudie mittels qPCR</i>	68
4. Ergebnisse	70
4.1. <i>Generierung verschiedener Allelvarianten von Branched head (Bh) in Weizen</i>	70
4.1.1. <i>In silico</i> -Identifizierung und Validierung von <i>Bh</i> -spezifischen Zielmotiven	70
4.1.2. Validierung der hergestellten gRNA/ <i>cas9</i> -Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Weizenblättern	71
4.1.3. Validierung der Konstrukte in Weizen-Protoplasten mit anschließender Sequenzierung amplifizierter Zielregionen	72
4.1.4. Ballistische DNA-Übertragung in unreife Weizen-Embryonen	73
4.1.5. Genotypische Analyse der regenerierten Pflanzen (M1)	74
4.1.6. Genotypische Analyse von Selbstungsnachkommen	78
4.1.7. Genotypische Analyse von Nachkommen aus untereinander gekreuzten Primärmutanten	80
4.1.8. Genotypische Analyse von Nachkommen untereinander gekreuzter Mutanten und aus Rückkreuzungen mit dem Wildtyp	82
4.1.9. Genotypische Analyse doppelhaploider Nachkommen von Mutanten	84
4.1.10. Überblick aller mittels Cas9 generierten <i>Branched head</i> -Allele und deren Kombinationen	85
4.1.11. Durch Mikrohoming-vermittelte DNA-Endverknüpfung entstandene Mutationen	88
4.1.12. Modifikation der funktionellen Domäne von <i>Branched head</i> in mutierten Pflanzen	88
4.2. <i>Ermittlung der Ausprägung der Eigenschaften phänotypischer Parameter von Weizen mit modifizierten Branched head-Allelen</i>	91
4.2.1. Phänotypen der Ähre	91
4.2.2. Analyse des Phänotyps unter besonderer Berücksichtigung ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M5-/ F4-/ BC-F2-Generation	97
4.2.3. Analyse des Phänotyps unter besonderer Berücksichtigung ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M6-/ F5-/ BC-F3-Generationen und der DH-Nachkommen	98
4.2.4. Phänotypische Konsequenzen bei Funktionsverlust der A- bzw. B-Subgenomkopie von <i>Branched head</i>	103
4.3. <i>Erstellung und Charakterisierung von Gerstenpflanzen mit einem Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors Squamosa-promotor binding protein-like 14</i>	107
4.3.1. Ermittlung des Kandidatengens in Gerste	107
4.3.2. <i>In silico</i> -Identifizierung und Validierung von Gerste <i>Sp14</i> -spezifischen Zielmotiven RNA-vermittelter Cas9 im 2. Exon	108
4.3.3. Validierung der <i>Sp14</i> -spezifischen gRNA/ <i>cas9</i> -Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Gerstenblättern	109
4.3.4. Stabile Gerstentransformation durch Agrobakterien-vermittelten Transfer der binären gRNA/ <i>cas9</i> -Konstrukte in unreife Embryonen	110
4.3.5. Analyse der Primärmutanten (M1) mit Mutationen im Zielmotiv 2-1	111
4.3.6. Analyse der Primärmutanten (M1) mit Mutationen im Zielmotiv 2-4	111

4.3.7. Analyse der Nachkommen aus geselbsteten Mutanten mit gRNA2-4.....	112
4.3.8. Vergleichende Expressionsanalyse verschiedener Ährenarchitekturgene in <i>spl14</i> -Mutanten ..	119
4.4. Gezielte Mutagenese der Expressions-regulierenden <i>miR156</i>-Bindestelle in den	
Transkriptionsfaktorgenen <i>Squamosa-promotor binding protein-like 14</i> und <i>17</i> der Gerste.....	120
4.4.1. Beschreibung der <i>miR156</i> -Bindestelle in <i>Spl14</i> und <i>Spl17</i>	120
4.4.2. <i>In silico</i> -Analyse der Zielregion und Auswahl von Zielmotiven für gRNA/Cas9.....	120
4.4.3. Validierung der <i>Spl14/17</i> -spezifischen gRNA/ <i>cas9</i> -Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Gerstenblättern	122
4.4.4. Stabile Gerstentransformation durch Agrobakterien-vermittelten Transfer der binären <i>Spl14/17</i> -spezifischen gRNA/ <i>cas9</i> -Konstrukte in unreife Embryonen	122
4.4.5. Vergleich der Mutationseffizienz der gRNA3-2-Varianten.....	123
4.4.6. Analyse primär-mutierter Pflanzen im Zielmotiv 3-2.....	123
4.4.7. Genotypische Analyse der M2-Generation.....	124
4.4.8. Phänotypische Analyse der M2-Generation	125
4.4.9. Genotypische Analyse der M3-Generation.....	128
4.4.10. Phänotypische Analyse der M3-Generation	129
4.4.11. Gezielte Veränderung der <i>miR156</i> -Bindestelle durch Baseneditierung	136
5. Diskussion	138
5.1. <i>Methodische Aspekte</i>	138
5.1.1. Auswahl optimaler Zielmotive für die gezielte Mutagenese von Getreide	138
5.1.2. Auswahl geeigneter Promotoren für gRNAs und <i>cas9</i>	141
5.1.3. Vergleichende Betrachtung von Validierungsmethoden	143
5.1.4. Mutagenese von Gerste und Weizen ohne Integration der T-DNA	145
5.1.5. Frequenz und Bedeutung Homologie-basierter DNA-Endverknüpfung.....	147
5.1.6. Vererbung von Mutationen und Fixierung mutierter Allele	149
5.2. <i>Veränderung der Pflanzenarchitektur von Gerste und Weizen durch gezielte Mutagenese von</i>	
<i>Transkriptionsfaktoren</i>	152
5.2.1. Veränderung der Architektur und Steigerung des Ertragspotenzials von Getreide	152
5.2.2. Einfluss von BRANCHED HEAD/ WHEAT FRIZZY PANICLE auf die Architektur von Weizen	153
5.2.3. Einfluss der Transkriptionsfaktoren SPL14 und SPL17 für den Übergang zur generativen Entwicklung und die Ährenarchitektur in Gerste.....	161
Literaturverzeichnis.....	168
Anhang.....	180
Lebenslauf.....	214
Danksagungen.....	217

Abkürzungsverzeichnis

∞	Unendlichkeitszeichen
μ	Mikro
Δ	Deletion; entfernte Basen
+	Insertion; eingefügte Basen
ABA	Abscisinsäure (<i>Abscisic acid</i>)
<i>A. thaliana (At)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AP2	Domäne der <i>APETALA 2</i> -Genfamilie
BAP	Benzylaminopurin
BC-F1...F3	1.-3. Filialgeneration der Rückkreuzung (<i>Back crossing</i>)
BH	Transkriptionsfaktor BRANCHED HEAD
Bp	Basenpaar
BW	Bobwhite
Cas	<i>CRISPR associated</i> Endonuklease
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CLSM	Konfokales Laser-Rastermikroskop (<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C _T	Maß für die Anzahl der vorliegenden Anfangskopien einer PCR (<i>Cycle Threshold</i>)
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DH	doppelhaploid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxynukleotid-Triphosphat(e)
DSB	Doppelstrangbruch
E9-T	Terminator des Erbsen <i>rbcS-E9</i> -Gens
<i>E. coli (Ec)</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F1...F5	1.-5. Filialgeneration
FokI	TypII Restriktionsenzym aus <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
G	Gerste
<i>g</i>	relative Zentrifugalkraft als Vielfaches der Erdbeschleunigung <i>g</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
gRNA	<i>guide</i> RNA
h	Stunde
<i>H. vulgare (Hv)</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>hpt</i>	<i>hygromycinphosphotransferase</i>
HR	Homologe Rekombination
klx	Kilolux
M	Molar
M1...M6	1.-6. Mutierte Generation
mA	Milli Ampere
MAD	Absolute Abweichung vom Median (<i>Median Absolute Deviation</i>)
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
miR156	Mikro-RNA 156
MMEJ	Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung (<i>Microhomology mediated end-joining</i>)

Abkürzungsverzeichnis

nCas9	Nickase Cas9 Endonuklease mit mutierter RuvC-Nukleasedomäne
NHEJ	Nicht-Homologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end joining</i>)
nos-T	Terminator des <i>nopalinsynthase</i> -Gens aus <i>Agrobacterium</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
<i>O. sativa</i> (<i>Os</i>)	<i>Oryza sativa</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i> ; Bindemotiv von Cas-Endonukleasen
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
psi	Pfund pro Quadratzoll (<i>pound-force per square inch</i>)
px	Pixel
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RE	Restriktionsenzym
RGEN(s)	RNA-vermittelte Endonuklease(n)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
35S-P/-T	Promotor / Terminator des 35S-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
SBP	Domäne der <i>SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEIN</i> -Genfamilie
SDSA	Synthese-abhängige Strang-Annealing (<i>Synthesis-Dependent Strand Annealing</i>)
sfGFP	<i>super folder</i> GFP (kernlokalisiert)
SPL	Transkriptionsfaktor <i>SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEIN-LIKE</i>
<i>S. pyogenes</i> (<i>Sp</i>)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SSA	Einzelstrang-Annealing (<i>Single Strand Annealing</i>)
<i>T. aestivum</i> (<i>Ta</i>)	<i>Triticum aestivum</i>
TALE(s)	Transkriptionsaktivatorartige Effektorproteine (<i>Transcription activator-like effector</i>)
TALEN(s)	TALE-Nuklease(n)
T-DNA	Transfer-DNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U3/U6-P	Promotor des <i>U3</i> - bzw. <i>U6</i> -Gens
U3-T	Terminator des <i>U3</i> -Gens
UBI1-P	Promotor des <i>POLYUBIQUITIN1</i> -Gens
UTR	Untranslatierter Bereich eines Gens bzw. einer mRNA
V	Volt
<i>VRS</i>	<i>SIX-ROWED SPIKE</i> -Gene
W	Weizen
WFZP	Transkriptionsfaktor <i>WHEAT FRIZZY PANICLE</i>
WT	Wildtyp
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
zcas9	für Mais codon-optimiertes <i>cas9</i> -Gen
ZFN(s)	Zinkfinger-Nuklease(n)
ZM	Zielmotiv
<i>Z. mays</i> (<i>Zm</i>)	<i>Zea mays</i>

Glossar

Im Folgenden wird angegeben, wie die in der vorliegenden Arbeit benannten Termini gemeint und zu interpretieren sind. Dies entspricht nicht grundsätzlich der allgemein gültigen Definition. Die hier genannten Termini sind im laufenden Text der Arbeit durch (*) gekennzeichnet, wobei nur die Erstnennung pro Kapitel markiert ist.

Begriff	Definition/Erklärung
adult	Organismus erwachsen, Blütenbildung induziert
Ährchen	Teil eines zusammengesetzten Blütenstands von Süßgräsern mit einem oder mehreren Blütchen
Ähre	Blütenstand mit gestreckter Hauptachse, an deren Spindelstufen ungestielte Einzelblüten oder Ährchen sitzen
Akzession	Muster einer Pflanzenart, in Genbanken genutzt für Proben gleicher Arten aus verschiedenen Regionen
Allele	Zustandsformen von Genen, welche sich in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden
Allopolidie	Kombination aus verschiedenen Arten stammender Chromosomensätze in einem Organismus.
Ballistik	Auch als Biolistik bezeichnete Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen in Zellen durch Bindung dieser Moleküle an Goldpartikel. Diese beladenen Partikel werden mit hoher Geschwindigkeit in die Zellen geschossen und die gebundenen Moleküle lösen sich innerhalb der Zellen vom Gold.
Blattöhrchen	Kleine, paarige Anhängsel an der Basis der Blätter, welche den Blattstängel umfassen.
cDNA	Auch als <i>complementary</i> DNA bezeichnete Form der DNA, die durch Anwendung einer Reversen Transkriptase aus RNA synthetisiert wird.
Chimär	Zustand einer Pflanze, bei der sich Gewebesektoren durch unterschiedliche Allele oder Allelkombinationen eines oder mehrerer Gene unterscheiden
CRISPR/Cas	Abwehrsystem von Bakterien und Archeen, bei dem Abschnitte invadierender Phagen-DNA im CRISPR-Lokus integriert werden und als Lotsen-RNAs für Cas-Endonukleasen dienen. Bei erneuter Infektion durch den gleichen Phagen wird dessen DNA spezifisch und sehr effizient erkannt und abgebaut.
Deaminase	Enzyme, die durch Abspaltung einer Aminogruppe von Adenosin bzw. Cytosin zu Inosin bzw. Uracil. Diese werden in einer anschließenden DNA-Replikation als Guanin bzw. Thymin abgelesen, wodurch es zum Einzelbasenaustausch in der DNA kommt.
Deckblatt	Blatt, das in seiner Achsel einen Seitenspross trägt, auch als Tragblatt bezeichnet.
Deletion	Verlust einer oder mehrerer zusammenhängender DNA-Basen
doppelhaploid	Vorhandensein zwei völlig identischer Chromosomensätze, entstanden durch natürliche oder induzierte Verdopplung eines haploiden Chromosomensatzes (siehe Ploidie); Induktion z.B. durch Colchizin
dorsal	Rückseitig gelegen; am Korn ist der Embryo sichtbar
Endonuklease	DNA schneidendes Enzym, das einen Strangbruch (einzeln oder doppelt) innerhalb einer DNA-Sequenz induziert.
Elution	Herauslösen von DNA aus einem Gel oder einer Flüssigkeit.
Fahnenblatt	Das letzte gebildete Blatt der Gräser
Filament	Staubfaden des Staubblattes, trägt die pollenbildenden Antheren

Begriff	Definition/Erklärung
generative Entwicklung	Entwicklung des die reproduktiven Organe tragenden Blütenstandes
generisch	Synonym für allgemein anwendbar, Gegenstück zu spezifisch
Genom	Gesamtheit der in den Zellkernen enthaltenden genetischen Informationen eines Organismus
Genotyp	Exakte genetische Zusammensetzung eines Organismus
<i>guide</i> RNA	Auch als <i>single guide</i> RNA bezeichnete (Lotsen-) RNA, die aus einem 5' gelegenen zielmotivspezifischen und einem 3' gelegenen allgemeinen Sequenzabschnitt besteht. Dient der spezifischen Bindung von Cas-Endonukleasen an ein Zielmotiv innerhalb der DNA.
heterozygot	Auf identischen Abschnitten homologer Chromosomen liegende verschiedene Allele, wobei ein Wildtypallel und ein mutiertes Allel vorhanden sind.
Homoeoallel	Kopien eines Gens in verschiedenen Subgenomen polyploider Pflanzen, z.B. Weizen
homolog	Synonym für übereinstimmend
homozygot	Auf identischen Abschnitten homologer Chromosomen liegende identische Allele.
<i>In silico</i>	Am Computer durchgeführte Vorgänge, abgeleitet vom chemischen Element Silicium, das zur Herstellung von Computer-Chips verwendet wird.
<i>In vitro</i>	In einem Gefäß erfolgend
Insertion	Einfügung einer oder mehrerer zusammenhängender DNA-Basen
Internodien	Teil der Sprossachse zwischen zwei Nodien (Knoten)
juvenil	Organismus jugendlich, ab Keimling bis zur Induktion der Blütenbildung
Karyopse	Nussähnliche Schließfrucht der Gräser mit Verwachsung der Samenschale und des Perikarps, enthält Samen-analoge Organe wie Mehlkörper und Embryo.
Klonierung	Einbringung und erneute Kombination von DNA mittels geeigneter Vektoren in Einzelzellen und anschließende Vermehrung der DNA über Klone der Einzelzelle.
Korn	Siehe Karyopse
Meristem	Verband teilungsbereiter pflanzlicher Zellen, die zur Bildung eines Sprosses oder einer Wurzel führen können
Nickase	Eine Endonuklease, die nur einen der beiden DNA-Stränge schneidet.
ON-Target	DNA-Abschnitt, der modifiziert werden soll
OFF-Target	DNA-Abschnitt mit zum ON-Target gleicher oder ähnlicher Sequenz aber anderem Lokus
Oligonukleotide	Kurze Nukleotidsequenzen, die in der Regel 15-30 Nukleotide umfassen und als Primer oder Sonden genutzt werden
Orthologe Gene	Homologe Gene in unterschiedlichen Spezies
Paraloge Gene	Gene, die durch eine Genduplikation und unterschiedliche Weiterentwicklung entstanden sind und dadurch spezifische Funktionen erlangt haben
Pathogen	Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) oder Viren, die ihrem Wirt Schaden zufügen können
Phänotyp	Sichtbares Erscheinungsbild eines Individuums bezüglich eines oder mehrerer Merkmale
Plasmid	Zirkuläre doppelsträngige DNA, die nur wenig Gene enthält und unabhängig repliziert.
Ploidie	Anzahl der je Zellkern vorhandenen Chromosomensätze; ein (haploid), zwei (diploid), drei (triploid), vier (tetraploid), sechs (hexaploid)

Begriff	Definition/Erklärung
Polymerase	Enzyme, die die Synthese einer Nukleotidkette katalysieren, die zu einer Vorlage komplementär ist; technische Verwendung im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion
Primer	Oligonukleotid, welches als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dient
Primordium	lat. primordium ‚erster Anfang‘; bezeichnet die Anlage, also die erste sichtbare Struktur, eines pflanzlichen Organes
Promotor	Dem Gen vorgelagerter DNA-Abschnitt, der den Start und die Häufigkeit der Transkription der RNA festlegt.
Protoplasten	von der Zellwand befreite Zellen oder Sonderform von Zellen, die keine Zellwand ausbilden (z.B. Einzellen, Zentralzellen, Spermazellen)
Rachis	Hauptachse einer Ähre
Restriktion	Schutzmechanismus der Bakterien; DNA von Viren wird unter Verwendung von Restriktionsenzymen geschnitten; Anwendung in der Molekularbiologie zum zumeist Erkennungssequenz-spezifischen Schneiden von DNA
Spelze	Trockenhäutige Blätter der Blüten von Gräsern, welche die Ährchen und Blütchen bzw. die gebildeten Körner umschließen; werden in Deck-, Vor- und Hüllspelzen unterschieden; Englisch als Lemma, Palea und Glume bezeichnet.
Stem loop	Sekundärstruktur einzelsträngiger DNA oder RNA, welche durch intramolekulare Basenpaarungen entsteht und eine sog. Stamm-Schleife bildet.
Subgenom	Teilgenom bei polyploiden Organismen
Subklonierung	Überführung eines PCR-Amplifikat-Mixes in einen Vektor zur spezifischen Sequenzierung der verschiedenen Amplifikate
T-DNA	DNA-Abschnitt, der von Agrobakterien in pflanzliche Zellen übertragen wird, begrenzt durch <i>Left</i> und <i>Right Border</i> ; ebenfalls verwendet für stabil integrierte Plasmid-DNA beim ballistischen DNA-Transfer
Terminator	Sequenz, die als Signalstruktur im Zusammenspiel mit spezifischen Terminatorproteinen ein Ende der Polymerisation von DNA, RNA oder Proteinen einleitet.
Touchdown PCR	Variante der Polymerasekettenreaktion mit gesteigerter Spezifität, bei der der erste Zyklus eine erhöhte Bindetemperatur aufweist, die in den folgenden Zyklen bis zur optimalen Bindetemperatur verringert wird
transient	Vorübergehender, nicht dauerhafter Zustand
Transfektion	Veränderung von Zellen durch die Einbringung frei vorliegender DNA, RNA oder Proteine; erfolgt z.B. mit Hilfe von Polyethylenglykol
Transformation	Einschleusung von in vitro rekombinierter DNA in Zellen; bei Pflanzen mittels <i>Agrobacterium</i> oder Ballistik; bei Bakterien über Hitze- oder Elektroschock
Transkription	Ablesung der DNA und Umschreibung in einzelsträngige RNA
Transkriptionsfaktor	DNA-bindende Proteine, die die Transkription von Genen regulieren (fördern oder inhibieren)
Trichom	Haarähnliche, zelluläre Auswüchse der Epidermis von Pflanzen
vegetative Entwicklung	Blattbildung von Pflanzen vor der Induktion der Blütenstandsentwicklung
Vektor	Siehe Plasmid
ventral	Bauchseitig gelegen; beim Korn durch eine Furche erkennbar
Zielmotiv	DNA-Sequenz, die das PAM und die davor liegenden 19-21 bp umfasst
Zielregion	DNA-Bereich, der das Zielmotiv sowie vor- und nachgelagerte DNA-Abschnitte umfasst

Tabellenübersicht

Tabellennummer	Beschreibung	Seitenzahl
1	Verwendung von RNA-vermittelter Cas9 Endonuklease in Gerste	17
2	Verwendung von RNA-vermittelter Cas9 Endonuklease in polyploidem Weizen	18
3	miR156-Varianten in Gerste	32
4	Liste der verwendeten Plasmide	39
5	Verwendete Enzyme	41
6	Verwendete Antibiotika	42
7	Liste der verwendeten Medien, Puffer und Chemikalien	42
8	Verwendete Programme	44
9	Übersicht über die Zusammensetzung der 10µl-Reaktionen der verwendeten Polymerasen	48
10	Coating-Tabelle der ballistischen Weizentransformationen	59
11	Mathematisch berechnete Parameter der Phänotypisierung	65
12	Analysierte Zielmotive in allen drei Homoeoallelen von Weizen Branched Head mit Aktivitäts- und Off-Target-Werten	70
13	Berechnung des Anteils von Weizenepidermiszellen mit im Bh-Zielmotiv mutiertem Zielvektor gegenüber transformierten Zellen ohne YFP-Restitution	71
14	Ermittlung der Transfektionseffizienz in Weizenprotoplasten anhand GFP-positiver Zellen	72
15	Anhand des Anteils mutierter Sequenz-Reads abgeleitete gRNA-Aktivität für Branched head	72
16	Regenerationsvarianten der Weizentransformationen	74
17	Nachweis von mutierten Allelen in mit Wildtyp-DNA gemischten Proben	75
18	Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten der Bh-Homoeoallele in den beiden Zielmotiven (ZM) 4 und 5 und mittels PCR detektierte T-DNA in den Regeneraten der Transformation WCH1	76
19	Vergleich der Mutationen in Protoplasten und primärmutierten WCH1-Pflanzen	77
20	Kreuzungskombinationen und Anzahl der entstandenen Körner	78
21	Genotypisierung der Nachkommen aus untereinander gekreuzten Primärmutanten	80
22	Übersicht über die Kreuzungspartner der Rückkreuzung und die Bezeichnung der Kreuzungsprodukte	82
23	Auswahl der detektierten Genotypen der rückgekreuzten BC-F1-Pflanzen	83
24	Übersicht über die durch gezielte Mutagenese generierten vererbbaaren Allele von Branched head	85
25	Übersicht über die nicht vererbten, durch gezielte Mutagenese generierten Mutationen von Branched head	86
26	Genetisch fixierte Allelkombinationen von Branched head	87
27	Mikrohomologie-basierte Mutationen in Branched head-Homoeoallelen	88
28	Signifikante Unterschiede in der Phänotypisierung der M5-/ F4-/ BC-F2-Generation	97
29	Signifikante Unterschiede in der Phänotypisierung der M6-/ F5-/ BC-F3-Generation sowie der DH-Linien	99
30	Tendenzen und signifikante Unterschiede bei der Wurzelentwicklung der bh-A- und bh-B-KO-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp	104
31	Signifikante Unterschiede bei der Sprossentwicklung der bh-A- und bh-B-KO-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp	106
32	Ausgewählte Zielmotive (ZM) im 2. Exon von HvSPL14	108
33	Ausgewählte Spl14-Zielmotive im Paralog Spl17	109
34	Berechnung des Anteils transformierter Gerstenepidermiszellen mit im Spl14-Exon2-Zielmotiven mutiertem Zielvektor gegenüber transformierten Zellen ohne YFP-Restitution	110
35	Transfer Spl14-spezifischer gRNA/cas9-Binärkonstrukte in Gerstenembryos	110
36	Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten von Spl14 im Zielmotiv 2-1 und mittels PCR detektierte T-DNA in den ausgewählten Regeneraten	111
37	Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten von Spl14 im Zielmotiv 2-4 und mittels PCR detektierte T-DNA in den ausgewählten Regeneraten	112
38	Mutierte spl14-Allele auf DNA- und Proteinebene	113
39	Signifikante Unterschiede der im Zielmotiv 2-4 mutierten spl14-Selbstungsnachkommen der Primärmutanten E11, E12 und E20	113
40	Phänotypisierung von M3-Nachkommen der Primärmutanten E11, E12 und E20 im Vergleich zum WT E18 in den beiden Versuchsgruppen 1 (gestresst) und 2 (ungestresst)	115
41	Übersicht über die Gen-IDs und die miR156-Bindestellen der Gerste-SPL-Gene	120
42	Zielmotive (ZM) in der miR156-Zielregion von Spl14 und Spl17	121
43	Varianten der Spl14/17 spezifischen gRNA3-2	121
44	Berechnung des Anteils von Gerstenepidermiszellen mit im Spl14-Exon3-Zielmotiv mutiertem Zielvektor bezogen auf alle transformierten Zellen	122
45	Transfer Spl14/17-spezifischer gRNA/cas9-Binärkonstrukte in Gerstenembryos	123

Tabellenübersicht

Tabellennummer	Beschreibung	Seitenzahl
46	<i>Vergleich der Mutationseffizienz der Spl14/17-spezifischen gRNA3-2-Varianten</i>	123
47	<i>Subklonierung der PCR-Amplifikate der im Zielmotiv 3-2 bei Spl14 und Spl17 mutierten Pflanzen der gRNA3-2-Varianten und mittels PCR nachgewiesene T-DNA</i>	124
48	<i>Phänotypisierung der M2-Selbstungsnachkommen aller gRNA3-2-Varianten</i>	125
49	<i>Mutierte spl14- und spl17-Allele auf DNA- und Proteinebene</i>	128
50	<i>Phänotypisierung der M3-Selbstungsnachkommen aller gRNA3-2-Varianten</i>	130
51	<i>Phänotypisierung der spl14-Mutanten der M3-Selbstungsnachkommen</i>	132
52	<i>Phänotypisierung der spl17-Mutanten der M3-Selbstungsnachkommen</i>	134
53	<i>Stabile Gerstentransformation mit Spl14/17-spezifischen gRNA/ncas9/Cytidin-Deaminase-Binärkonstrukten</i>	136
Anhang		
A1	<i>Liste der verwendeten Oligonukleotide</i>	180
A2	<i>Klonierungsprogramme</i>	182
A3	<i>PCR-Programme zur Amplifikation der Branched head-Zielregionen von Weizenprotoplasten sowie der anschließenden Amplifikation zur Tiefensequenzierung</i>	182
A4	<i>PCR-Programme zur Amplifikation der Spl14/Spl17-Zielregionen von Gerstenprotoplasten sowie der anschließenden Amplifikation zur Tiefensequenzierung</i>	182
A5	<i>PCR-Programme zur Genotypisierung der Branched head-Mutanten in Weizen</i>	182
A6	<i>PCR-Programme zur Genotypisierung der Spl14/Spl17-Exon 2-Mutanten in Gerste</i>	183
A7	<i>PCR-Programme zur Genotypisierung der Spl14/Spl17-Exon 3-Mutanten in Gerste</i>	183
A8	<i>PCR-Programme zur Untersuchung auf die Anwesenheit der T-DNA</i>	183
A9	<i>Programm zur Untersuchung der Spezifität der qPCR-Primer und qPCR-Standardprogramm</i>	183
A10	<i>Verwendete Barcodes für die Tiefensequenzierung der Protoplastenversuche</i>	184
A11	<i>Barcode-Primer Kombination für die Protoplastenexperimente</i>	184
A12	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH1</i>	185
A13	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH2</i>	187
A14	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH3</i>	188
A15	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH4</i>	189
A16	<i>Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E6 und ausgewählter Nachkommen</i>	191
A17	<i>Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E101 und ausgewählter Nachkommen</i>	191
A18	<i>Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E111 und ausgewählter Nachkommen sowie DH-Pflanzen</i>	192
A19	<i>Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen</i>	192
A20	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 3 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen</i>	193
A21	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 4 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen sowie DH-Pflanzen</i>	193
A22	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 5 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen</i>	194
A23	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 3 aus der Kreuzung C2/A (WCH1-E111-4-2x(WCH1-E97xWCH1-E113)-5-5) und ausgewählter Nachkommen</i>	194
A24	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 1 aus der Kreuzung C3/A (WCH1-E101-9-1x(WCH1-E97xWCH1-E113)-5-3) und ausgewählter Nachkommen</i>	194
A25	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 4 aus der Kreuzung C4/A (WCH1-E101-1-1xWCH1-E111-4-2) und ausgewählter Nachkommen</i>	194
A26	<i>Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 1 aus der Kreuzung C6/A (Bobwhite x WCH1-E6-3-8) und ausgewählter Nachkommen</i>	194
A27	<i>Aufschlüsselung der mittels Antherenkultur erzeugten DH-Regenerate nach Linien, eingesetzten Antheren, Ploidiestatus und Fertilität</i>	195
A28	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit Spl14-gRNA2-1/Cas9-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes</i>	195
A29	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit Spl14-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes</i>	196
A30	<i>Analyse der Einzelpflanze 11 der mit dem Spl14-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	196
A31	<i>Analyse der Einzelpflanze 12 der mit dem Spl14-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	197
A32	<i>Analyse der Einzelpflanze 20 der mit dem Spl14-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	197
A33	<i>Relative Expression 2^(-ΔCT) von Spl14 und Vrs-Genen in Spl14-KO-Pflanzen (mit Spl14-gRNA2-4/ Cas9-Konstrukt transformiert)</i>	197
A34	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit Spl14-gRNA3-2A/Cas9-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes</i>	198
A35	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit Spl14-gRNA3-2G/Cas9-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes</i>	198

Tabellenübersicht

Tabellennummer	Beschreibung	Seitenzahl
A36	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit Spl14-gRNA3-2o1/Cas9-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes</i>	199
A37	<i>Analyse der Einzelpflanze 1 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	199
A38	<i>Analyse der Einzelpflanze 7 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	199
A39	<i>Analyse der Einzelpflanze 12 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A40	<i>Analyse der Einzelpflanze 1 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2G/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A41	<i>Analyse der Einzelpflanze 23 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2G/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A42	<i>Analyse der Einzelpflanze 2 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A43	<i>Analyse der Einzelpflanze 7 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A44	<i>Analyse der Einzelpflanze 14 der mit dem Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen</i>	200
A45	<i>Genotypisierung der regenerierten Pflanzen der mit Spl14-gRNA3-1 bzw. 3-3/APOBEC1-nCas9-UGI-Konstrukten durchgeführten Transformationsexperimente</i>	201

Abbildungsübersicht

Abbildungsnummer	Beschreibung	Seitenzahl
1	Weltweite Geerntete Fläche und Produktionsmengen der Getreidearten Weizen, Gerste, Buchweizen, Foniohirse, Mais, Hirse, Hafer, Reis, Roggen, Sorghumhirse und Triticale	1
2	Schematische und mikroskopische Darstellung des Blütenstandes von zweizeiliger Gerste und Weizen	3
3	Vorhersage der gRNA-Sekundärstruktur	11
4	Reparaturmechanismen der Zelle nach DNA-Doppelstrangbruch	21
5	Veränderte Architektur der Wunderweizenähre mit Verzweigungen	25
6	Expression von <i>Gerste Spl14</i> und <i>Spl17</i> während der Ährenmeristementwicklung	37
7	Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (<i>gRNA scaffold</i>) sowie der <i>Bh</i> -gRNAs 1 bis 10	70
8	AP2-Domäne in BRANCHED HEAD mit markierten Bindemotiven für GCC-Boxen und veränderter Aminosäurefolge in den Mutationen ohne Leserahmenverschiebung im Zielmotiv 4 des B- und D-Homoeoallels	89
9	AP2-Domänenstruktur mutierter Proteinvarianten von BRANCHED HEAD	90
10	Phänotypen der primärmutierten Pflanze WCH1 E52	91
11	Phänotypen der primärmutierten Pflanze WCH1 E6	92
12	Veränderte Ährenstruktur der E6-Nachkommen	93
13	Veränderte Ährenstruktur weiterer Nachkommen primärmutierter WCH1-Pflanzen	94
14	Ährenphänotypen der Allelkombinationen von <i>Branched head</i>	95
15	Schematische Darstellung der verschiedenen Formen der Ähren und Rachisknoten mit Ährchen bei Pflanzen mit modifiziertem <i>Branched head</i> -Gen	96
16	Untersuchung Pflanzenarchitektur-bezogener und ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M6-, F5- und BC-F3-Generation und der DH-Linien	100
17	Berechnung des Kornertrages pro Ähre und Pflanze von Vertretern der M6-, F5- und BC-F3-Generation und der DH-Linien	102
18	Wurzelphänotypisierung; Bestimmung der Zahl der Verzweigungs- und Wurzelpunkte, der Wurzellänge und des Verhältnisses von Länge zu Volumen und die Biomasseparameter Wurzelvolumen und Wurzeloberfläche	105
19	Sprossphänotypisierung; Messung der Pflanzenhöhe in pixel (px) und der Oberfläche der oberirdischen Pflanzenteile in px ²	106
20	Bestimmung der Spross-Biomasse	106
21	Phänologische Analyse von SPL-Proteinen aus Gerste, Reis, Arabidopsis, Weizen, Mais und Sorghumhirse	108
22	Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (<i>gRNA scaffold</i>) sowie der <i>Spl14</i> -gRNAs 2-1 bis 2-9	109
23	Phänotypisierung der Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 von <i>Spl14</i> mutierten Pflanzen in der M2-Generation	113
24	Bestimmung von Pflanzenarchitektur-bezogenen und ertragsrelevanten Parametern der M2-Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 mutierten Pflanzen E11, E12 und E20 (<i>spl14</i>) im Vergleich mit Wildtyppflanzen (WT)	114
25	Bestimmung von Pflanzenarchitektur-bezogenen und ertragsrelevanten Parametern der M3- Nachkommen der im SPL14-Zielmotiv 2-4 mutierten E11, E12 und E20 (<i>spl14</i>) im Vergleich mit Wildtyppflanzen (WT) der Versuchsgruppen 1 und 2	116
26	Phänotypisierung der Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 von <i>Spl14</i> mutierten Pflanzen in der M3-Generation	117
27	Veränderungen des Sprossmeristems und der seitlichen Ährchen	118
28	Relative Expression der Ährenarchitekturgene <i>Spl14</i> , <i>Vrs1</i> , <i>Vrs2</i> , <i>Vrs3</i> , <i>Vrs4/Ra2</i> und <i>Vrs5/IntC</i> in Wildtyppflanze E18 und Nachkommen der <i>spl14</i> -KO-Pflanzen E11-8 und E12-7	119
29	Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (<i>gRNA scaffold</i>) sowie der gRNAs 3-1 bis 3-4	121
30	Ährenphänotyp der homo- und heterozygoten M2-Nachkommen der in <i>Spl14</i> oder <i>Spl17</i> durch gRNA3-2 und Cas9 mutierten regenerierten Pflanzen	126
31	Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in <i>Spl14</i> und/oder <i>Spl17</i> mutierten M2-Nachkommen	127
32	Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in <i>Spl14</i> oder <i>Spl17</i> mutierten M3-Nachkommen	131
33	Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in <i>Spl14</i> verschiedenen mutierten M3-Nachkommen	133
34	Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in <i>Spl17</i> verschieden mutierten M3-Nachkommen	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnisnummer	Beschreibung	Seitenzahl
35	Cytidin-Deaminase-Experiment – Schematische Darstellung der möglichen Basenaustauschpositionen der Zielmotive 3-1 und 3-3 in der <i>miR156</i> -Bindestelle in <i>Spl14</i> und <i>Spl17</i>	136
36	Adenosin-Deaminase-Experiment – Schematische Darstellung der möglichen Basenaustauschpositionen im Zielmotiv 3-2 in der <i>miR156</i> -Bindestelle in <i>Spl14</i> und <i>Spl17</i>	137
37	Kriterien für gRNA-Design	140
38	Darstellung der Mikrohomologie in <i>Wfzp-A</i> , welche die 14 bp-Deletion im <i>wfzp-A.1</i> -Allel induziert hat	148
39	Schematische Darstellung der angewendeten Techniken und analysierten Generationen bei der Herstellung neuer Allele von <i>Branched head</i>	150
40	Schematische Darstellung der Allelkombinationen von <i>Branched head</i> (<i>Bh</i>) und deren Phänotypen für die Ähren, Körner und Wurzelverzweigung	160
41	Modell des Einflusses von SPL14 und SPL17 und dem individuellen oder gemeinsamen Funktionsverlust beider Faktoren auf die Induktion der Blüte und der seitlichen Ährchen	167
Anhang		
A1	Ballistischer gRNA-Aktivitätstest in Epidermiszellen der Unterseite von Weizenblättern	202
A2	Kontrolle der Transfektionseffizienz von Weizenprotoplasten mittels sfGFP	202
A3	Untersuchung Pflanzenarchitektur-bezogener und ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M5-, F4- und BC-F2-Generation mit Mutationen in <i>Branched head</i>	203
A4	Schematische Darstellung der Expressionskassetten der verwendeten Konstrukte	204
A5	Plasmidkarten generischer Vektoren zum Austausch des <i>TaU6</i> -Promotors	205
A6	Plasmidkarten generischer Vektoren zum Austausch des Promotors für Cas9 und sfGFP-Konstrukt	206
A7	Plasmidkarten generischer Vektoren zur Erstellung der Cytidin-Deaminase-Konstrukte	207
A8	Plasmidkarten weiterer verwendeter Konstrukte	208
A9	Klonierungsschritte für Adenosin-Deaminase-Konstrukt pCH66 mit Modularem Vektorsystem	209
A10	Mittels Polymerasekettenreaktion erstellte Amplifikate der Zielregionen von <i>Branched head</i> (<i>Bh</i>) und <i>Squamosa-Promotor binding protein-like 14</i> und <i>17</i> (<i>Spl14/Spl17</i>) sowie von <i>Six-rowed spike 4</i> (<i>Vrs4</i>) und der T-DNA-Fragmente	210
A11	Untersuchung des Wurzel- und Sprossphänotyps <i>Bh</i> -mutierter Pflanzen; (A) Aussaat und Phänotypisierungsanlage	211
A12	Kodierende Sequenzen der Homoeoallele von <i>Branched head</i>	212
A13	Kodierende Sequenzen von <i>Spl14</i> und <i>Spl17</i>	213

1. Einleitung

1.1. Die Kulturpflanzen Gerste und Weizen

1.1.1. Gesellschaftliche Bedeutung

Seit mehr als 10.000 Jahren kultivieren Menschen Pflanzen, um sich selbst und ihre Nutztiere zu ernähren und um Rohstoffe und Energie zu gewinnen. Während dieser Zeit mussten sich die Pflanzen nicht nur an sich verändernde Umwelteinflüsse anpassen, sondern auch die züchterische Auslese erfolgte entsprechend der zeitlich und regional unterschiedlichen gesellschaftlichen Anforderungen. So besteht bei wachsender Bevölkerung auch ein höherer Bedarf an Kulturpflanzen festzustellen. Vor dem Hintergrund der aktuellen Entwicklung der Weltbevölkerung wird dieser Bedarf in den kommenden Dekaden weiterhin deutlich steigen (Baulcombe et al 2009, Ronald 2011). Gesellschaftlich wird hingegen erwartet, dass im Pflanzenanbau weniger Pestizide oder Dünger eingesetzt werden (Ronald 2011) und Produktqualität und -diversität weiter steigen, während sich die zur Verfügung stehende Anbaufläche stetig verringert. Um die Leistungsfähigkeit der Pflanzen zu steigern und das Problem der sinkenden Anbaufläche zu kompensieren ist ein erheblicher züchterischer Fortschritt nötig.

Eine besondere Bedeutung als Kulturpflanzen stellen die Vertreter der Pflanzenfamilie *Triticeae* dar, zu der die wichtigsten Getreidearten der gemäßigten Breiten Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gehören. Gerste ist das älteste domestizierte Getreide mit der weltweit viertgrößten Anbaufläche und Produktionsrate. Weizen wird auf der größten Anbaufläche angebaut und stellt die weltweit zweitgrößte Produktionsmenge (FAOSTAT 2019, Abbildung 1).

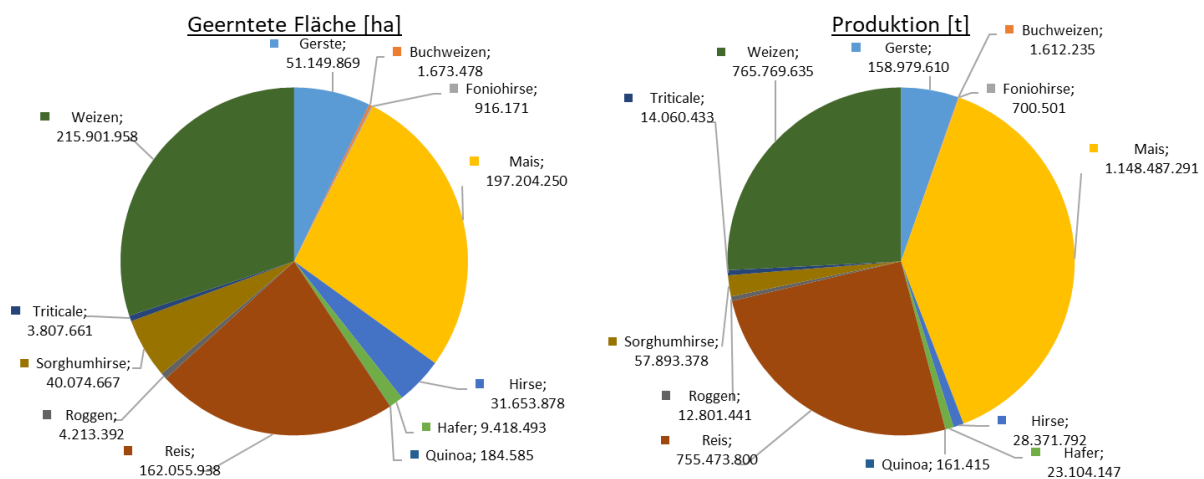


Abbildung 1 – Weltweite Geerntete Fläche und Produktionsmengen der Getreidearten Weizen, Gerste, Buchweizen, Foniohirse, Mais, Hirse, Hafer, Reis, Roggen, Sorghumhirse und Triticale; FAOSTAT, 2019

1.1.2. Genomentschlüsselung

Die diploide Gerste zeigt unter den Kulturpflanzen mit 5,1 Gb ein verhältnismäßig übersichtliches Genom^(*) und gilt daher als Modellpflanze für Getreide. Im Jahr 2012 wurde das weitgehend vollständige Genom vom Internationalen Gerstengenom-Sequenzierungs-Konsortium (IBSC) veröffentlicht (IBSC 2012) und seitdem weiter entschlüsselt (Mascher et al 2017, Monat et al 2019, Mascher et al., 2021). Mittlerweile stehen genomische Informationen verschiedener Genotypen^(*) zur Verfügung (Milner et al 2019).

Der Weizen entstand durch verschiedene Hybridisierungsschritte von diploiden und tetraploiden Vorfahren und erfuhr dadurch eine Allopoloidisierung^(*) mit schließlich 3 diploiden Subgenomen^(*) (Brenchley et al 2012). Es kam vor ca. 8.000 Jahren zur Hybridisierung des tetraploiden Weizens Emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*; AABB) mit dem diploiden Ziegengras *Aegilops tauschii* (DD) (Nesbitt und Samuel, 1996). Der tetraploide Emmer wiederum entstand durch Hybridisierung von *Triticum urartu* (Dvorak et al., 1993; AA) mit einem Vertreter der Sektion Sitopsis, vermutlich *Aegilops speltoides* (Bahrman et al., 1988; BB). Dementsprechend gilt Weizen als allohexaploid. Mit ca. 17 Gb ist das Genom sehr groß und mit 21 Chromosomen vergleichsweise komplex. Die annähernd komplette Sequenz wurde vom Internationalen Weizengenom-Sequenzierungs-Konsortium (IWGSC) entschlüsselt und verschiedene Versionen des Referenzgenoms veröffentlicht (IWGSC, 2018; Zhu et al., 2021). Ramirez-Gonzalez und Kollegen ergänzten die Genomsequenzen des Weizens mit umfangreichen Transkriptomdaten (Ramirez-Gonzalez et al., 2018). Diese umfassten Gewebe im Keimstadium, im Ein-, Drei- und Fünfblattstadium sowie der Bestockung und verschiedene Organe und Gewebe während verschiedener Stufen des Ährenschiebens, der Befruchtung der Ähre und der verschiedenen Stufen der Kornreifung. Proben wurden von Wurzeln (Stammachse, Meristem^(*) und Wurzelballen), vegetativen^(*) oberirdischen Organen (Sprossmeristem, Halme, Blattscheiden und Blattspreiten, Blatthäutchen, Internodien) und generativen^(*) Organen (Ähren, Ährchen^(*), Grannen, Spelzen^(*), Antheren, Narben, Fruchtknoten, Embryos, verschiedene Körnerstadien) entnommen.

1.1.3. Aufbau des Blütenstandes

Der Blütenstand wird bei Getreiden als Ähre^(*) bezeichnet. An der Rachis^(*), der zentralen Achse, befinden sich reihenförmig die Ährchen^(*), welche die Blütenmeristeme tragen aus denen die Körner hervorgehen. Jedes Ährchen wird von zwei basal sitzenden Hüllspelzen flankiert. Die Blüten mit Pistill und Antheren werden von der Deck- und der Vorspelze ummantelt und so geschützt. Die Deckspelze selbst bildet apikal die Grannen aus (Abbildung 2).

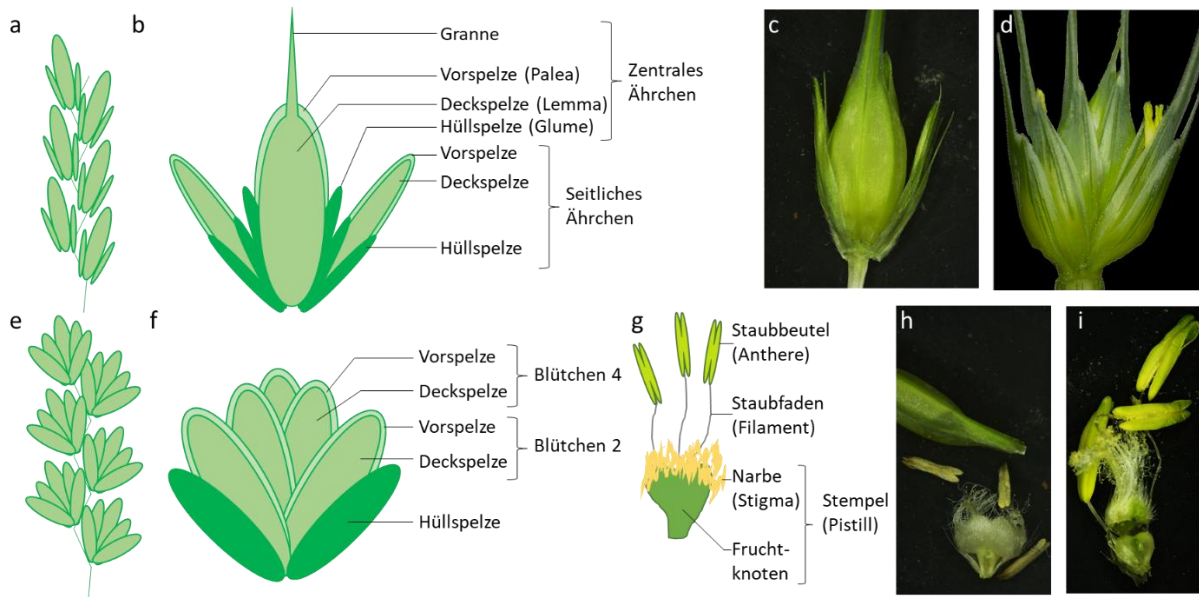


Abbildung 2 – Schematische und mikroskopische Darstellung des Blütenstandes von zweizeiliger Gerste (a-c, h) und Weizen (d-f, i); (a) Schematische Darstellung der Gerstenähre; (b) Schematische Darstellung des Ährchentriplets von Gerste; (c) Ährchentriplett zweizeiliger Gerste mit infertilen lateralen Ährchen; (d) Weizenährchen mit Grannen; (e) Schematische Darstellung der Weizenähre; (f) Schematische Darstellung des Weizenährchens mit 5 Blüten; (g) Schematische Darstellung des Blütchenaufbaus; (h) Gerstebütchen mit Stempel und Antheren; (i) Weizenblütchen mit Stempel und Antheren

a) **Gerste**

Gerste hat eine unverzweigte Ähre, welche wechselständig an jedem Rachisknoten ein zentrales und zwei seitliche Ährchen bildet und kein terminales Ährchen hat, (Forster et al 2007; Sreenivasulu und Schnurbusch, 2012). Es gibt zwei Ährenformen: bei der zweizeiligen Gerste sind nur die zentralen Ährchen fruchtbar, bei der sechszeiligen Gerste auch die seitlichen Ährchen (Mansfield, 1950). Entscheidend dafür sind entsprechende Allele^(*) von *SIX-ROWED SPIKE 1 (VRS1)*, einem Gen, das einen Transkriptionsfaktor^(*) codiert, der die Fruchtbarkeit der seitlichen Ährchen unterdrückt (Komatsuda et al., 2007). In zwei- und sechszeiliger Gerste wird pro Ährchen nur ein Blütchen gebildet und somit kann pro Ährchen auch nur ein Korn^(*) entstehen (Kirby und Appleyard, 1987). Die Entwicklung der Ähre beginnt am vegetativen Sprossspitzenmeristem mit der Ausbildung von jeweils zwei kammartigen Meristemen (*Double Ridge*-Stadium), wobei das untere jeweils für die Blattausbildung angelegt ist (*Leaf Ridge*) und das obere für die Ausbildung von möglichen Ährchen (*Spikelet Ridge*). In der weiteren Entwicklung setzt sich nach dem Phasenübergang zum generativen Wachstum das Ährchenmeristem durch und bildet drei hügelartige Strukturen aus (*Triple Mound Stadium*), welche für das zentrale und die beiden lateralen Ährchenmeristeme stehen. In den nächsten Schritten werden die Primordien^(*) der gepaarten Hüllspelzen (*Glume Primordium Stadium*), der Deckspelze (*Lemma Primordium Stadium*) sowie Vorspelze (*Palea*), der Staubgefäße (*Stamen Primordium Stadium*) und der Granne (*Awn Primordium Stadium*) gebildet. Wenn alle Primordien angelegt sind und die Ausbildung der Organe beginnt, erfolgt die weitere Unterscheidung anhand der Farbe der Antheren, welche

zunächst weiß und durchsichtig erscheinen (*White Anther Stadium*), später mehr grünlich (*Green Anther Stadium*) und schlussendlich nach der Meiose und abgeschlossener Pollenreife als reife Antheren gelblich gefärbt sind (*Yellow Anther Stadium*) (Kirby und Appleyard, 1987).

b) Weizen

Weizen hat ebenfalls eine unverzweigte Ähre, an deren Rachis zweizeilig und wechselständig Ährchen an den Rachisknoten ansitzen. Ein terminales Ährchen bildet das apikale Ende der Ähre (Dobrovolskaya et al 2009). Somit ist die Anzahl der Ährchen nach der Bildung des terminalen Ährchens festgelegt (Bonnet et al 1967; McMaster 1997). Ährenlänge und Ährchenzahl werden durch Umweltfaktoren wie Temperatur und Tageslänge beeinflusst (Friend 1965, Rawson 1971, Rawson und Richards 1993). In jedem Weizenährchen entstehen bis zu neun Blütchen, jedoch sind regulär je nach Genotyp nur 3-5 Blütchen fruchtbar und können Körner bilden (Kirby und Appleyard, 1987; Guo und Schnurbusch, 2015). Die Ährenentwicklung erfolgt ähnlich wie bei Gerste und beginnt am vegetativen Sprossmeristem mit der Ausbildung von 2 Kämmen (*Double Ridge Stadium*), wobei analog zur Gerste der untere Kamm für die Ausbildung von Blättern, der obere für die Ausbildung der Ährchen steht. Das Ährchenmeristem wird nach dem Phasenübergang dominant und seitlich davon bilden sich zunächst die Primordien für die gepaarten Hüllspelzen (*Glume Primordium Stadium*) und anschließend pro zukünftigen Blütchen die gepaarten Primordien der Deckspelze (*Lemma Primordium Stadium*) und der Vorspelze (*Palea*). Anschließend wird die Ausbildung der zahlreichen Blütchen sichtbar und es bilden sich mehrere Blütchenvorläufer (*Floret Primordium Stadium*) aus. Die weitere Entwicklung der Ähre wird durch die Bildung des terminalen Ährchens beendet (*Terminal Spikelet Stadium*). Die weitere Entwicklung der Blütchen wird analog zu Gerste mit der Farbe der Antheren bezeichnet, zunächst weiß (*White Anther Stadium*), dann grün (*Green Anther Stadium*) und bei Vorliegen reifen Pollens schließlich gelblich (*Yellow Anther Stadium*) (Kirby und Appleyard, 1987).

1.1.4. Steigerung des Weizenertrages

Die Steigerung des Weizenertrages ist eine essentielle Komponente der Sicherung der Nahrungsversorgung in den nächsten Dekaden (Ray et al., 2013). In der Vergangenheit konnte der Ertrag durch einen linearen Anstieg der Kornzahl pro m² gesteigert werden (Serrago et al 2013; Ferrante et al., 2017), während die Zahl der Ährchen, das Korngewicht und die Biomasse nahezu unverändert blieben (Royo et al., 2007; Alvaro et al., 2008; Sanchez-Garcia et al 2013). Durch die Einführung kurzstrohiger Varietäten wurde der Kornertrag mittels einer höheren Kornzahl pro Ähre jedoch ohne einer veränderten Anzahl der Ährchen gesteigert (Youssefian et al., 1992a,b; Thomas, 2017). In diesem Zusammenhang muss auf den durch die Kurzstrohigkeit beeinflussten Ernteindex hingewiesen werden, da das Verhältnis der Kornmasse zur Gesamtbiomasse inklusive des Strohs zugunsten der Körner verschoben ist.

Weitere Möglichkeiten der Ertragssteigerung durch eine Vergrößerung der Weizenähre wurden für folgende Ertragsparameter beschrieben, die miteinander in Konkurrenz um die begrenzte Anzahl an Ressourcen stehen: die Ährchenanzahl pro Ähre (Boden et al., 2015; Dobrovolskaya et al., 2015; Poursarebani et al., 2015; Dixon et al., 2018), die Anzahl der Blütchen und Körner pro Ährchen sowie die Korngröße (Debernardi et al., 2017; Greenwood et al., 2017; Guo et al., 2017; Sakuma et al., 2019).

1.2. Gezielte Mutagenese mit spezifizierbaren Endonukleasen

Die Nutzung zielspezifischer Endonukleasen^(*) stellt die Fortsetzung der klassischen Mutagenese dar. Diese nutzt die mutagenen Eigenschaften chemischer Substanzen oder von Gamma- und Röntgenstrahlung, um Veränderungen im Genom zu induzieren.

Der Nachweis, dass Mutationen durch Röntgenstrahlung entstehen können, erfolgte zunächst in *Drosophila melanogaster* (Muller, 1927) und bereits ein Jahr später zum ersten Mal in Pflanzen, genauer im Mais (Stadler, 1928). In den darauffolgenden Jahren wurden Mutationen im Weizen durch Strahlung induziert (Sapehin, 1930) sowie eine Mehltaresistenz in der Gerste erzeugt (Freisleben und Lein, 1942).

Erste Experimente mit chemischer Mutagenese wurden mittels Senfgas in Gerste durchgeführt (Gustafsson und Mac Key, 1948). Später setzte sich für die chemische Mutagenese vor allem das alkylierende Mittel Ethylmethansulfonat (EMS) durch, welches eine breite Anwendung in der Züchtung gewann (Pacher und Puchta, 2017). In allen diesen Fällen stellt sich das Problem, dass die Mutationen zufällig im Genom erfolgen und langwierige Rückkreuzungen nötig sind, um ein bestimmtes Merkmal zu erhalten. Durch die nachfolgend beschriebenen neuen Züchtungstechniken mittels spezifizierbarer Endonukleasen wurde ein Quantensprung in der Optimierung und Anpassung von Kulturpflanzen erreicht, indem zielgerichtete Mutationen in gewünschten Genen induziert werden.

1.2.1. Meganukleasen

Meganukleasen sind natürlich vorkommende Endonukleasen, welche verhältnismäßig lange >12 bp große DNA-Sequenzmotive erkennen und schneiden können. Die am häufigsten genutzte Meganuklease ist I-SceI aus *Saccharomyces cerevisiae* (Plessis et al., 1992; Pauwels et al., 2014). Bei Pflanzen wurde durch Puchta und Kollegen im Jahr 1993 zum ersten Mal der Gebrauch von I-SceI zur Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) beschrieben, genauer gesagt in Tabak-Protoplasten^(*). Meganukleasen sind sehr spezifisch und effizient, jedoch ist die Auswahl auf natürliche Zielregionen^(*) beschränkt und eine Entwicklung für andere Zielregionen sehr schwierig und begrenzt (Gao et al., 2010). Von daher wird diese Plattform wegen seiner eingeschränkten Nutzbarkeit nur in der Grundlagenforschung genutzt (Puchta und Fauser, 2014; Kouranova et al., 2016), unter anderem zur Klärung von DNA-Reparaturmechanismen (Vu et al., 2014).

1.2.2. Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs)

Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) sind Hybridproteine aus einer DNA-Erkennungsdomäne und mindestens drei Zinkfingern, welche mit der Restriktionsendonuklease^(*)-Domäne von FokI kombiniert sind (Kim et al., 1996). Jeder Zinkfinger interagiert dabei spezifisch mit 3 bp der genomischen Zielsequenz und

zusammen kann so eine DNA-Zielsequenz von 9-18 bp erkannt werden (Shukla et al., 2009; Voytas, 2013). Zinkfinger-Nukleasen müssen als Paar benutzt werden, da Fok1 nur als Dimer katalytisch aktiv ist (Kim et al., 1996). Zielmotive^(*) der DNA müssen so ausgewählt werden, dass die Zinkfinger-Monomere antiparallel orientiert sind und mit einem nötigen Abstand zueinander an die DNA binden. Zwischen den Bindestellen wird ein Doppelstrangbruch induziert (Smith et al., 1999; Doyon et al., 2008). Die Herstellung des Komplexes ist sehr aufwändig und die Auswahl der Zielregionen ist begrenzt. Weitere Probleme stellen nicht vorhersagbare Nebeneffekte zwischen gemeinsam verwendeten Zinkfingern und die DNA-Bindesepezifität dar (Puchta und Fauser, 2014).

1.2.3. Transkriptionsaktivatorartige Effektor-nuklease (TALEN)

Im Jahr 1989 wurde erstmals gezeigt, dass Transkriptionsaktivatorartige Effektorproteine (TALEs) von pathogenen^(*) Bakterien der Gattung *Xanthomonas* in Zellen der Wirtspflanzen übertragen werden (Bonas et al., 1989). Die Bindedomäne der TALEs beinhaltet bis zu 30 Kopien hochkonservierter (weitgehend identischer) Sequenzwiederholungen von typischerweise je 34 Aminosäuren. Die Aminosäure-Positionen 12 und 13 jeder Wiederholung sind nicht gleich und resultieren in der Spezifität für die Anbindung einer ganz bestimmten DNA-Base (Boch et al., 2009). Christian und Kollegen kombinierten TALEs mit der FokI-Endonuklease-Domäne zu TALENs. Diese agieren wie ZFNs als Dimere und induzieren Doppelstrangbrüche in der Zielregion (Christian et al., 2010). Jede der Sequenzwiederholungen erkennt nur eine Nukleobase der DNA-Zielsequenz und die Erstellung der Bindedomäne ist einfacher und vielfältiger als bei ZFNs (Boch et al., 2009). TALEN wurden bereits in Weizen verwendet, um eine Resistenz gegen Mehltau zu erzeugen (Wang et al., 2014).

1.2.4. RNA-vermittelte Endonukleasen

1.2.4.1. Allgemeine Informationen

Die auf RNA-vermittelten Endonukleasen (en. *RNA-guided Endonucleases*, RGENs) basierende Technologie wurde aus dem mikrobiellen Immunsystem *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/ CRISPR-associated (Cas)*^(*) entwickelt. RGENs bestehen aus zwei Komponenten: dem Cas-Protein und einer künstlichen *guide RNA*^(*) (gRNA). (Jinek et al., 2012). Die gRNA hat einen die Raumstruktur bestimmenden und einen variablen Teil, welcher 20 bp des 5' Endes umfasst, die spezifisch an die DNA mittels komplementärer Basenpaarung anbinden. Der 3'-Teil mit unveränderlicher Sequenz ist für die Bindung der gRNA mit dem Cas-Protein verantwortlich, was in der Ausbildung eines Ribonukleoproteinkomplexes resultiert. Das bei Pflanzen am häufigsten verwendete Cas-Protein ist die Cas9-Endonuklease von *Streptococcus pyogenes* (SpCas9; Xie und Yang, 2013; Shan et al., 2013), wobei auch Cas9-Orthologe^(*) anderer Bakterien, z.B. von *Staphylococcus aureus* (SaCas9; Steinert et al., 2015; Kaya et al., 2016) und *Streptococcus thermophilus* (StCas9; Steinert et al., 2015),

oder andere Cas-Proteine, z.B. Cas12a/Cpf1 (Tang et al., 2017) oder die RNA-bindende Cas13a (Aman et al., 2018a,2018b; Zhan et al., 2019; Zhang et al., 2019b) zum Einsatz gekommen sind. Außerdem wurde gezeigt, dass die in *Eubacterium rectale* identifizierte und weiterentwickelte Mad7-Endonuklease, auch als ErCas12a bezeichnet, welche besonders für T-reiche PAM-Sequenzen geeignet ist, Mutationen in Weizen und Reis induzieren konnte (Lin et al., 2021).

Der gRNA/Cas Komplex bindet an die komplementäre Zielregion im Genom, wobei sich das Zielmotiv aus dem von der gRNA gebundenen DNA-Sequenzabschnitt, im bakteriellen Immunsystem als *Protospacer* bezeichnet (Koeppel et al., 2019), und der von der Cas-Endonuklease erkannten und gebundenen DNA-Sequenz, dem *Protospacer adjacent motif* (PAM), zusammensetzt. Im Falle von SpCas9 muss NGG dem *Protospacer* unmittelbar nachgelagert sein (Jinek et al., 2012). Die katalytischen Einheiten der Cas9-Endonuklease, RuvC und HNH, induzieren 3 bzw. 4 Basenpaare vor dem PAM einen Doppelstrangbruch der DNA, wobei dabei 1 bp-Überhänge entstehen (Zuo und Liu, 2016). Da das 5'-Ende der gRNA entsprechend der gewünschten Zielregion relativ unkompliziert ausgetauscht werden kann und insgesamt eine hohe Effizienz und Zuverlässigkeit in höheren Organismen wie Pflanzen möglich ist, sind die RNA-vermittelten Endonukleasen eine sehr populäre Methode zur gezielten Veränderung von Zielgenen (Doudna und Charpentier, 2014; Kumlehn et al., 2018).

1.2.4.2. Komponenten

Solange man nicht auf DNA-freie Methoden wie Ribonukleoproteine ausweicht, ist es nötig, dass das Cas-Protein und die gRNA in ausreichender Menge in den Pflanzen produziert werden. Beim Erstellen der Expressionseinheiten für Cas-Endonukleasen sind verschiedene Anforderungen zu berücksichtigen. So wurde die Cas9 an den Gebrauch in Pflanzen angepasst, indem ein bis zwei Kernlokalisierungssignale integriert wurden und die Codon-Verwendung für Pflanzen optimiert wurde, sowohl allgemein, als auch spezifisch für Ein- und Zweikeimblättrige Pflanzen oder sogar artenspezifisch für Gerste und Weizen (Shan et al., 2013; Lawrenson et al., 2015; Liu et al., 2017a). Abhängig vom Organismus wurden bisher verschiedene Promotoren^(*) genutzt, um die Expression von *cas9* zu steuern, z.B. der doppelt-verstärkte 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (2x35S) in Testsystemen oder UBIQUITIN-Promotoren zur Erstellung vererblicher Modifikationen. Bei Gerste und Weizen wird in der Regel der *POLYUBIQUITIN 1*-Promotor aus Mais (*ZmUbi1*) eingesetzt (Shan et al., 2013; Upadhyay et al., 2013; Shan et al., 2014). Allerdings wurden auch schon selbst-replizierende Viruspartikel in Pflanzenzellen verwendet, welche eine hohe Gendosis erreichen können und insbesondere im Rahmen der DNA-Reparatur mittels homologer^(*) Rekombination nützlich sein können (Cermak et al., 2017). Unter anderem wurde das Weizen-Verzweigungsvirus, ein replikonbasiertes Geminivirus, modifiziert, um die gRNA und *cas9* in Weizen zu exprimieren, wobei keine Vererbbarkeit nachgewiesen wurde (Cermak et al., 2017; Gil-Humanes et al., 2017).

Die gRNA-Expression wird in der Regel durch Promotoren^(*) und Terminatoren^(*) gesteuert, die für nicht-proteincodierende RNAs verantwortlich sind. Diese Promotoren werden durch RNA-Polymerase III prozessiert. Als Terminationssignal kann in diesem Kontext ein aus 5 bis 7 Ts bestehendes DNA-Motiv verwendet werden, welches auch bakterielle CRISPR-RNAs terminiert (Shan et al., 2013; Gao et al., 2014). Vergleichende Tests anhand von Mais-Protoplasten ergaben, dass die U3-Promotoren von Weizen und Reis effizienter waren als der U6-Promotor von *Arabidopsis thaliana* (Xing et al., 2014). Dieser hat sich hingegen vor allem für zweikeimblättrige Pflanzen bewährt. Für Gerste und Weizen wurde meistens der Weizen-U6-Promotor genutzt (Upadhyay et al 2013; Wang et al., 2014; Holme et al., 2017), wobei auch der Gerste U3-Promotor in Gerste eine hohe Effizienz zeigte und dem Reis U3-Promotor überlegen war (Kumar et al., 2018). Bei der Klonierung von gRNAs mit U3- oder U6-Promotoren ist es wichtig, dass das erste transkribierte Nukleotid ein A bzw. G sein sollte. Durch dieses Erfordernis wird die Auswahl von Zielregionen auf AN₂₀GG bzw. GN₂₀GG eingeschränkt (Gao et al., 2014).

Alternativ könnte ein RNA-Polymerase II-Promotor genutzt werden, jedoch besteht hierbei das Problem der beidseitigen Prozessierung der RNA, wodurch die gRNA-Struktur verändert und die Bindung von Cas9 und gRNA beeinflusst wird (Gao et al., 2014). Es wurden bereits mehrere Systeme zur Expression mehrerer gRNAs entwickelt: gRNAs mit separaten Promotoren (Xing et al., 2014; Ma et al., 2015; Lowder et al., 2015) sowie die Expression mehrerer gRNAs unter einem Promotor, wobei ein Transkript abgelesen und dann post-transkriptionell^(*) geschnitten wird (Wang et al., 2018a). Die letztere Möglichkeit zeigte jedoch keine verbesserte Effizienz bezogen auf die individuellen genomischen Ziel motive (Gao et al., 2014; Tang et al., 2016; Cermak et al., 2017).

1.2.4.3. Auswahl von Zielmotiven bei Getreiden

Während die pflanzengenomische Zielsequenz des gRNA/Cas9-Komplexes aufgrund der für jeden Einzelfall anpassbaren Sequenz der gRNA prinzipiell frei wählbar ist, setzt die bisher bei Gerste und Weizen fast ausschließlich verwendete Cas9-Endonuklease bezüglich des von ihr gebundenen 3'-Endes der gesamten vom gRNA/Cas9-Komplex adressierten Zielsequenz die bereits genannten zwei unveränderbaren Guanine voraus. Aber auch bezüglich des verbleibenden, flexibel gestaltbaren Bereiches der Zielsequenz gibt es spezielle Anforderungen, die z.T. erheblichen Einfluss auf die Funktionalität des gRNA/Cas9-Komplexes haben. Entsprechend wurden vielfältige Versuche anhand diverser experimenteller Systeme unternommen, die Effizienz, aber auch die Spezifität der Cas-vermittelten Mutagenese zu verbessern. So wurde ermittelt, dass die so genannte *Seed* Region, also die dem Cas9-Enzym gebundenen Triplet (PAM) unmittelbar benachbarten sechs Nukleotide des Zielmotivs, einen GC-Gehalt über 50 % haben sollte, um eine besonders hohe Mutageneseeffizienz zu gewährleisten (Ren et al., 2014). Bezogen auf die gesamte Erkennungssequenz führt eine Anreicherung

von Guaninen und ein geringer Adenin-Anteil zu einer erhöhten Verlässlichkeit der Bindung und Aktivität des gRNA/Cas9-Komplexes (Moreno-Mateos et al., 2015).

Der zielequenzspezifische Teil der gRNA hat in der Regel eine Länge von 20 Nukleotiden (Jinek et al., 2012, Cong et al., 2013). Dieser sollte, wie bereits vorher beschrieben, eine passende Base an ihrem 5'-Ende, also ein A oder ein G, enthalten, die vom für die Expression verwendeten U-Promotor abhängig ist (Shan et al., 2014). In humanen Zelllinien und Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass die Länge des zielequenzspezifischen Teils der gRNA auf bis zu 17 Nukleotide verkürzt werden kann, was die Mutationseffizienz erst bei weniger als 18 Nukleotiden merklich verringert, die Spezifität des gRNA/Cas9-Komplexes bezüglich der Zielsequenz jedoch überraschenderweise sogar erhöht (Fu et al., 2014, Moreneo-Mateos et al., 2015, Zhang et al., 2016a). Auch für *Arabidopsis thaliana* wurde durch Osakabe et al. (2016) beschrieben, dass ein auf 18 bp verkürzter zielequenzspezifischer Teil der gRNA mit höherer Effizienz zu Mutationen geführt hat. Andererseits führte eine Verlängerung des zielequenzspezifischen Teils der gRNA auf über 20 Nukleotide hinaus zu einer verringerten Effizienz der Mutagenese (Cho et al., 2014).

Liang et al. (2016) stellten mittels experimenteller Ergebnisse Kriterien für das Design von gRNAs und damit die Auswahl von Zielsequenzen in Pflanzen auf. Sie untersuchten eine Vielzahl von getesteten gRNAs und empfahlen einen GC-Gehalt zwischen 30 und 80 %. Einen besonderen Fokus legen Liang et al. auf die Erhaltung der Sekundärstruktur, da diese für eine stabile und effiziente Bindung an das Cas-Protein notwendig ist. Sie fanden heraus, dass drei der im gRNA *Scaffold* auftretenden *Stem loops*^(*) für die Bindung mit der Cas-Endonuklease und damit für die Funktionalität des gRNA/Cas-Komplexes essentiell sind. Sie ermittelten zudem, dass 98 % der getesteten effizienten gRNAs nicht mehr als insgesamt 12 Basenpaarungen zwischen zielspezifischem und Cas-bindendem Abschnitt der gRNA und davon nicht mehr als 7 unmittelbar aufeinanderfolgende Basenpaarungen aufweisen. Allein innerhalb des zielspezifischen Teils der gRNA sollten zudem nicht mehr als insgesamt 6 Basenpaarungen auftreten.

Um diese experimentell etablierten gRNA *Features* bei der Auswahl geeigneter Zielmotive zu gewährleisten ist es empfehlenswert, die Sekundärstruktur in Frage kommender gRNAs gründlich zu untersuchen. Dafür bieten sich Plattformen zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen wie *mfold* (Zuker et al., 1998; Waugh et al., 2002; Zuker, 2003), *RNAstructure* (Reuter und Mathews, 2010) oder *RNAfold* (Gruber et al., 2008; Lorenz et al., 2011) an (Abbildung 3).

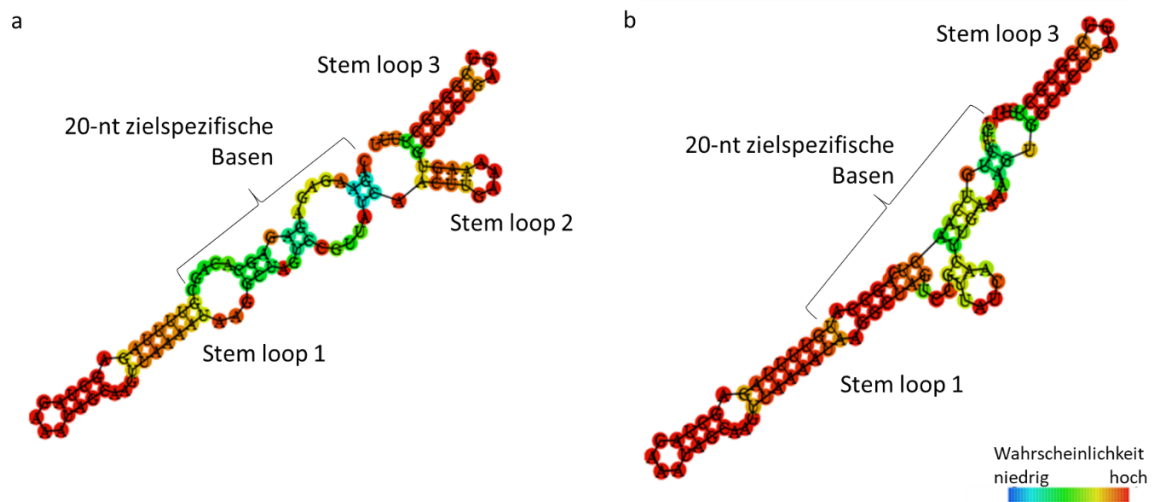


Abbildung 3 – Vorhersage der gRNA-Sekundärstruktur; (a) empfohlene gRNA, welche wenig Fehlpaarungen des zielspezifischen Abschnittes mit dem gRNA *Scaffold* zeigt und alle drei *Stem loops* bildet; (b) gRNA mit Fehlpaarungen der zielspezifischen Basen mit dem gRNA *Scaffold* sowie fehlendem *Stem loop 2*; Farben zeigen niedrige (blau), mittlere (grün/gelb) oder hohe (rot) Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung; Grafik erstellt mittels *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)

Für die Auswahl von gRNAs bzw. entsprechenden Zielmotiven wurden seit der Beschreibung der gezielten Mutagenese durch Cas-Endonukleasen (Jinek et al., 2012) eine Vielzahl von Algorithmen und entsprechende online-Plattformen entwickelt. Für die Anwendung speziell in Pflanzen entstand *CRISPR-Plant* (Lei et al., 2014, Liu et al., 2017b), welches eine große Auswahl an Genomen und verschiedene Cas-Varianten berücksichtigen kann. Für die Anwendung bei Gerste und Weizen ist dieses Tool jedoch limitiert, da die Genome von Getreiden nicht implementiert sind. Für die Auswahl von gRNAs in Getreiden bestand mit *DeskGen* eine sehr gut geeignete Alternative, da man hier die entsprechenden Genome auswählen kann. Dort wurde ein von Doench et al. (2014, 2016) entwickelter Algorithmus verwendet. Dieser wurde nach der Abschaltung von *DeskGen* von *Benchling* übernommen und steht dort mit allen seinen Möglichkeiten weiterhin zur Verfügung. Auch hier kann man zwischen einer Vielzahl von Cas-Nukleasen wählen und auch die Länge der gRNA in geeignetem Rahmen wählen. Allerdings beruht der Algorithmus in diesem Tool auf experimentellen Daten von Mensch und Maus. *CRISPOR* hingegen, das ebenfalls für Gerste und Weizen verwendet werden kann, umfasst eine große Auswahl an Cas-Orthologen und Varianten (Haeussler et al., 2016, Concordet und Haeussler, 2018). Alle drei Tools geben neben der Auswahl der gRNAs auch an, welche potentiellen *OFF-Targets*, also unerwünschte genomische Zielmotive ohne oder mit wenigen Basenfehlpaarungen, im Referenzgenom der zu bearbeitenden Pflanzenart vorliegen. *WU-CRISPR* wurde speziell für SpCas9 erstellt und basiert ebenfalls nur auf experimentellen Daten von Mensch und Maus. Dieses Tool ist sehr strikt und somit zur Auswahl geeigneter Zielmotive oder deren Bestätigung besonders gut

geeignet, solange die zu modifizierende Sequenz eine gewisse Größe hat und keine weitere Information zu *OFF-Targets* benötigt wird (Wong et al., 2015).

Da die für die Analyse der *OFF-Targets* zugrunde gelegten Referenzgenome und die experimentell verwendeten Genotypen zumeist verschieden sind, ist es bei Gerste und Weizen empfehlenswert, die Region, die verändert werden soll, auf SNPs zu kontrollieren. Da die Zielregionen nach der Mutagenese ohnehin amplifiziert und sequenziert werden müssen, um die erzielten Veränderungen zu charakterisieren, ist eine Überprüfung der Genotyp-spezifischen Wildtyp (WT)-Sequenz vorab ohne großen zusätzlichen Aufwand möglich.

Zusätzlich sollte aufgrund der vergleichsweise großen Genome von Gerste und Weizen eine besondere Sorgfalt bei der Auswahl von Zielmotiven beachtet werden, da gRNAs mit einer geringeren Aktivität sehr schnell gänzlich versagen können und zu einer arbeits- und zeitintensiven Wiederholung der Transformationsexperimente^(*) führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswahl einer geeigneten gRNA abhängig ist von der genomischen Zielregion (GC-Gehalt), vom Promotor, der für die Expression der gRNA verwendet wird, vom verwendeten Cas-Enzym und der RNA-Sekundärstruktur.

1.2.4.4. Analyse und Charakterisierung modifizierter Getreidepflanzen

Für die zielgerichtete Mutagenese ist es nötig, dass Cas9 und die gRNA funktionell in den Zellen vorhanden sind. Wenn gRNA und Cas-codierende Plasmid^(*)-DNA verwendet wird, kann es zu dessen vollständiger oder partieller Integration in das Genom kommen, was sowohl für den direkten Transfer von DNA als auch für die Agrobakterien-vermittelte Transformation^(*) gilt. Der Nachweis erfolgt in der Regel über PCR-Amplifikation der Transgen-codierenden Sequenzen unter Verwendung von aus Pflanzengewebe extrahierter genomischer DNA. Die Analyse auf Präsenz der Transgene sollte sowohl bei den primär-transgenen Pflanzen (T0) als auch in nachfolgenden Generationen durchgeführt werden.

Üblich ist es die Transgenität der Kandidatenpflanzen anhand des verwendeten Selektionsmarkergens zu bestimmen, wie z.B. *hygromycin phosphotransferase (hpt)* für die Hygromycin-Selektion oder die *phosphinothricin acetyltransferase* für den Nachweis der Bialaphos-Resistenz (*BAR*). Neben dem Selektionsmarker ist es nützlich, auch die Anwesenheit der codierenden Sequenzen für *cas9* und gRNA in den Zellen mittels PCR zu überprüfen, da es wichtig ist zu wissen, ob im Laufe der Pflanzenentwicklung und in Nachkommen weitere Mutagenese-Ereignisse möglich sind. In einigen Studien genügte den Autoren der Nachweis des *cas9*-Gens (Kapusi et al., 2017; Sánchez-León et al., 2018). Zusätzlich zur einfachen Amplifikation von DNA wurde z.B. durch Upadhyay et al. (2013) die Expression von gRNA und Cas9 mittels RT-PCR in transformierten Weizenzellen nachgewiesen, was

insbesondere bei der Methodenetablierung sehr aufschlussreich sein kann. Insbesondere nach ballistischem Gentransfer^(*), bei dem viele unterschiedliche Fragmente der pDNA integriert werden können ist daher zu erwägen beim Nachweis transgenfreier Pflanzen mehrere Abschnitte der verwendeten Plasmide in separaten Amplifikationen zu berücksichtigen. Sánchez-León et al. (2018) wiesen z.B. in einigen Pflanzen der T2-Generation immer noch diverse Fragmente des Plasmidhintergrundes nach, u.a. auch in Pflanzen, wo vollständige Transgen-Expressionseinheiten heraussegregiert waren.

Nach einer transienten^(*) oder stabilen Expression von Cas9 und gRNA werden die adressierten Zielbereiche auf Mutationen untersucht. Dafür wird das Zielmotiv weiträumig durch genomspezifische Primer^(*) zunächst mittels PCR amplifiziert und dann über verschiedene Methoden analysiert. Weit verbreitet ist ein Verdau des PCR-Produktes mit herkömmlichen Restriktionsenzymen^(*) (PCR/RE), wobei deren Restriktionsschnittstelle bereits bei der Auswahl der Zielmotive berücksichtigt werden und mit der Schnittstelle der RNA-navigierten Cas-Endonuklease überlappen muss. Im Falle einer Mutation ist es so möglich, dass das verwendete Restriktionsenzym nicht mehr schneiden kann (Shan et al., 2013). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass damit die Auswahl der Zielmotive eingeschränkt ist. Alternativ bietet sich auch der T7E1-Test an (Wang et al., 2014), bei dem im amplifizierten PCR-Produkt die Anwesenheit einer Mischung aus mutierten und Wildtyp-Allelen^(*) durch die Fehlpaarungs-sensitive T7 Endonuklease I ermittelt wird (Xie und Yang 2013). Dieser Test hat allerdings den Nachteil, dass die wenigen, aber zumeist besonders wertvollen homozygoten^(*) Mutationen nicht vom WT unterschieden werden können. Auch lässt sich nicht immer erkennen, ob Pflanzen heterozygot^(*) (ein mutiertes und ein WT-Allel), biallelisch (zwei verschieden mutierte Allele pro Zelle) oder chimär^(*) (unterschiedlich mutierte und WT-Allele in separaten Gewebesektoren) sind. Durch beide Tests lässt sich der Umfang der Pflanzen auf einige Kandidaten begrenzen, was von Vorteil ist, wenn mehr als genug Mutanten zur Verfügung stehen. Andererseits besteht dabei der ernstzunehmende Nachteil, dass ein beträchtlicher Anteil von Mutanten nicht identifiziert wird. Um dieses Problem zu umgehen verdauten Liang et al. (2018) die Zielmotiv-enthaltende amplifizierte DNA unter Verwendung der beiden eingesetzten Komponenten gRNA und Cas-Protein *in vitro*^(*). Wenn eine intakte Zielsequenz vorliegt, schneidet das Cas-Protein die DNA, was anhand der entstehenden Fragmente bei der Auftrennung im Gel sichtbar wird. Diese Methode benötigt im Gegensatz zu PCR/RE keine Restriktionsschnittstelle und wurde als sehr sensitiv beschrieben, da Mutationen selbst bei hohen Verdünnungen mit Wildtyp-DNA noch nachgewiesen werden konnten (Liang et al., 2018). Damit ist es möglich, mittels PCR/RNP auch Mutationen zu detektieren, die in der Sanger-Sequenzierung nicht mehr erfasst werden können. Nachteil dieser Methode ist jedoch, das rekombinantes Cas-Protein bislang noch recht teuer ist.

Informativer ist es hingegen, den genomischen Zielbereich der Kandidatenpflanzen zu sequenzieren. Im Chromatogramm der Sequenzierungsergebnisse sind bei heterozygot oder chimär mutierten Pflanzen an den einzelnen Basenpositionen Doppel- oder multiple *Peaks* zu sehen, die üblicherweise an der Schnittstelle der Cas-Endonuklease beginnend in einer Richtung fortlaufen. Diverse bioinformatische Tools wie *TIDE* (Brinkman et al., 2014) und *DSDecode* (Liu et al., 2015) geben die Möglichkeit, Doppelpeaks auszulesen und so die verschiedenen Allele zu ermitteln. Liang et al. (2018) zeigten, dass Doppelpeaks nur bis zu einer begrenzten Verdünnung detektiert werden. Zur genaueren Verifizierung ist es daher ratsam die PCR-Amplifikate von Kandidatenpflanzen über Klonierung^(*) mittels TA-Überhang in generische^(*) Sequenzierungsvektoren^(*) wie pGEM zu übertragen und mehrere Einzelklone per Sanger-Sequenzierung zu analysieren. So erhält man eine detaillierte Aufschlüsselung der in der verwendeten Zell- oder Gewebeprobe vorhandenen Mutationen. Darüber hinaus erhält man dabei auch eine Information über die Häufigkeit des jeweiligen Vorkommens der mutierten Allele. Verschiedene Tests können auch miteinander kombiniert werden, um einen größeren Informationsgewinn zu erzielen (Gil-Humanes et al., 2017, Holme et al., 2017). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu wissen, dass Mutationen in der Regel heterozygot vorliegen, oft auf Sektoren der Pflanze begrenzt vorkommen und die Detektion von Mutationen anhand von Blattproben nicht unbedingt repräsentativ für die ganze Pflanze sein müssen. Daher werden auch nicht alle detektierten Mutationen der T0-Pflanzen an folgende Generationen vererbt.

Zusätzlich zur normalen Sanger-Sequenzierung bietet sich auch eine Tiefensequenzierung von Amplikons zur Analyse von Mutationen in Einzelpflanzen an (Wang et al., 2018a, 2018b). Da Weizen drei Subgenome hat, ist der Aufwand bei der Amplifikation der Zielregionen verglichen zur Gerste deutlich höher. Deshalb wurden die homoeologen Zielbereiche in einigen Studien gemeinsam amplifiziert und beispielsweise mittels PCR/RE analysiert (Zhang et al., 2016b). Liang et al. (2017) schränkten so den Kreis der Kandidatenpflanzen ein und führten anschließend teilgenomspezifische Untersuchungen durch eine Amplifikation mittels Homoeolog-spezifischer Primer und Sanger-Sequenzierung durch.

Im Rahmen der molekularen Analyse der Kandidatenpflanzen stellt sich auch die Frage nach Fällen der mutativen Veränderung so genannter *OFF-Targets*. Diese können unerwünschte Nebeneffekte verursachen und durch Konkurrenz auch die Effizienz der Mutagenese beeinflussen. Kim et al. (2018) haben experimentell gezeigt, dass unspezifische Mutationen in Weizen-*OFF-Targets* bei der Analyse verschiedener gRNAs mittels Tiefensequenzierung von Amplikons nur im Bereich von unter 1 % der sequenzierten *Reads*/Ablesungen lagen. Im Gegensatz zu humanen Zellen stellt dies kein

ernstzunehmendes Problem dar, da innerhalb einer Pflanze so selten auftretende Mutationen zumeist nicht an Nachkommen weitergegeben werden. Darüber hinaus sind mögliche *OFF-Targets* aufgrund der hohen Spezifität des gRNA/Cas-Komplexes sehr gut vorhersagbar und können in Populationen von Nachkommen gezielt überprüft werden, um Segreganten mit unerwünschten Mutationen zu eliminieren oder unter Berücksichtigung dieser Mutationen zu untersuchen.

Neben der Untersuchung von Kandidatenpflanzen wurden bei Weizen zahlreiche Studien anhand von Protoplasten durchgeführt, wodurch Erkenntnisse über induzierte Mutationen vergleichsweise schnell vorliegen und damit eine besonders effiziente Möglichkeit für die Untersuchung von methodischen Aspekten gegeben ist. Alle hier beschriebenen Analysemethoden wurden auch anhand von Protoplasten erfolgreich angewendet (Kim et al., 2018, Liang et al., 2018).

Eine Analyse der Mutationen ist in nachfolgenden Generationen erforderlich, da primäre Mutanten oftmals chimär und/oder heterozygot sind und bei Vererbung der *cas9*- und gRNA-Transgene noch vorhandene WT-Allele auch weiterhin mutiert werden können. So ist es möglich, dass auch in der T1-Generation neu entstandene Allele gefunden werden (Kapusi et al., 2017). Außerdem wurde durch Kapusi et al. (2017) beschrieben, dass das Transgen und die Mutation erwartungsgemäß unabhängig voneinander unter den Nachkommen segregieren. Auch in Weizen und Gerste wurde gezeigt, dass auf diese Weise Transgen-freie, homozygote Mutanten erzeugt werden können (Lawrenson et al., 2015).

Entsprechend der Fragestellung jedes Anwendungsfalles ist eine entsprechende phänotypische^(*) Analyse der Pflanzen erforderlich, wie z.B. die Analyse der Körner oder Resistenztests. Allerdings ist es auch sinnvoll, die allgemeine Fitness der Pflanzen zu untersuchen und mögliche pleiotrope Effekte zu erfassen. Die primär-transgenen Pflanzen der T0-Generation sind, verursacht durch die Transformation und anschließende Regeneration, nicht so leistungsfähig wie die nachfolgenden Generationen (Hensel et al., 2017). Daher ist eine verlässliche phänotypische Analyse erst ab der T1-Generation möglich. Besonders solide phänotypische Analyseergebnisse ergeben sich aus dem unmittelbaren Vergleich gRNA/Cas-freier, homozygot mutierter mit WT-Segreganten des gleichen Experiments. Wahlweise können darüber hinaus heterozygot mutierte Segreganten in die Analysen einbezogen werden, um ggf. Gendosis-Effekte nachzuweisen. Bei Weizen ist es zudem auch oft von Interesse, den Effekt von Mutationen der einzelnen Homöoallele anhand einzelner und kombinierter Mutanten zu untersuchen. Selbstverständlich können die phänotypischen Daten um weitere Analysen des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms ergänzt werden, um Aufschluss über zugrundeliegende zelluläre Mechanismen zu erlangen.

1.2.4.5. Baseneditierung mittels Deaminase-Enzymdomänen

Eine Anwendung der RNA-vermittelten Endonukleasen erfolgt durch die Kombination der Cas9-Endonuklease mit einem Deaminase-Enzym^(*), welches entweder Cytosin zu Uracil bzw. Thymidin (Cytidin-Deaminase) oder Adenosin zu Inosin bzw. Guanin (Adenosin-Deaminase) durch Abspaltung einer Aminogruppe umwandelt. Das hierfür verwendete Cas9-Protein enthält in der Regel eine D10A-Mutation in der RuvC-Nuklease-Domäne wodurch diese nicht mehr funktionell ist und nur ein Einzelstrangbruch durch die verbliebene HNH-Nuklease-Domäne induziert wird. Diese mutierte Cas9 wird auch als Nickase^(*) bezeichnet (nCas9). Dieser Einzelstrangbruch sorgt für eine Entspannung der DNA-Struktur und eine bessere Anbindung der Deaminase-Enzyme.

Die Editierung von Cytidin zu Uracil wurde zunächst in humanen und Mauszellen beschrieben (Kumar et al., 2016). Für Pflanzen wurden verschiedene Cytidin-Deaminasen verwendet: APOBEC1 aus Ratten (*Rattus norvegicus*) in Reis (Lu und Zhu, 2017; Zong et al., 2017), Weizen und Mais (Zong et al., 2017), humane APOBEC3A in Weizen, Reis und Kartoffel (Zong et al., 2018), CDA1 aus *Petromyzon marinus* in Reis und Tomate (Shimatani et al., 2017) und modifiziertes humanes AID in Reis (Ren et al., 2018a). Zur Vermeidung der Glykosylierung und des Abbaus der zunächst durch die Deaminase entstandenen Uracil-Base wird in der Regel ein Uracil-Glykosylase-Inhibitor (UGI) eingefügt (Zong et al., 2017; 2018) wobei die Anwesenheit von UGI im pflanzlichen Gebrauch nicht unbedingt notwendig erscheint und sogar negative Effekte vermutet werden, wenn es stabil in das Genom integriert wird (Lu und Zhu, 2017). Im Rahmen der DNA-Replikation wird das entstandene Uracil erst in einem zweiten Schritt durch Thymidin ersetzt.

Die Adenosin-Deaminase *TadA* aus *Escherichia coli* wurde zunächst in humanen Zellen verwendet und dort mit einer modifizierten Variante ecTadA* zum heterodimer ecTadA-ecTadA* kombiniert (Gaudelli et al., 2017). Diese Variante wurde bereits in Reis (Hua et al., 2018, Li et al., 2018a) und Weizen (Li et al., 2018a) angewendet und mittlerweile so verändert, sodass nur noch die modifizierte Variante ecTadA* mit nCas9 verbunden ist. Dies führte zur Steigerung der Editierungseffizienz (Hua et al., 2020).

1.2.4.6. Anwendung RNA-vermittelter Endonukleasen in Gerste und Weizen

In den Kulturpflanzen Gerste und Weizen wurde bereits eine Vielzahl von Modifikationen mittels Cas-Endonukleasen durchgeführt. So wurden Mutationen sowohl in Protoplasten als auch in den meisten Fällen in Pflanzen der Gerstensorten Golden Promise, Aley und Igri induziert (Tabelle 1). In den Studien mit transformierten Pflanzen erfolgte in vielen Fällen eine Untersuchung der Nachkommen bis in die T2-Generation, wobei der Genotyp und mögliche Phänotypen analysiert wurden.

Tabelle 1 – Verwendung von RNA-vermittelter Cas9 Endonuklease in Gerste

Sorte/ Genotyp	Gen	Ergebnis- grundlage	Nachkommen	Phänotyp	Referenz
Golden Promise	<i>Pm19</i> (Plasmamembranprotein)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation		Lawrenson et al., 2015
Golden Promise	<i>Endo-N-acetyl-6-D-glucosaminidase</i> (<i>ENGase</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation		Kapusi et al., 2017
Golden Promise	<i>Mildew resistance locus O</i> (<i>Mlo</i>)	Protoplasten			Cermák et al., 2017
Golden Promise	<i>Cytokinin dehydrogenase 1</i> (<i>Ckx1</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Wurzel- und Sprossphänotyp	Holubová et al., 2018 Gasparis et al., 2018; 2019
Golden Promise	<i>Ckx3</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Wurzelpheänotyp	Gasparis et al., 2018; 2019
Golden Promise	<i>PHYTOENE DESATURASE</i> (<i>Pds</i>)	Regenerierte Pflanzen	Nur T0- Primärpflanzen	Photobleichung der Blätter	Howells et al., 2018
Golden Promise	<i>Microrchidia 1</i> (<i>Morc1</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Pilzresistenz	Kumar et al., 2018
Golden Promise	<i>Protein targeting to starch 1</i> (<i>Ptst1</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Kornphänotyp, ohne Stärkeeinlagerung keine Keimung	Zhong et al., 2019
Golden Promise	<i>Granule-bound starch synthase</i> (<i>GBSS1a</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Wachsartiger Phänotyp	Zhong et al., 2019
Golden Promise	<i>Albostrians</i> (<i>Ast/CMF7</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Blattfärbung verändert	Li et al., 2019
Golden Promise	<i>D-Hordein</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Kornphänotyp	Yang et al., 2020
Golden Promise	<i>Nudum</i> (<i>Nud</i>)	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Unbespelzte Körner	Gasparis et al., 2018; Gerasimova et al., 2020
Golden Promise	<i>β-1,3-Glucanase</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Kein Effekt auf Insektenresistenz	Kim et al., 2020
Golden Promise	<i>Caffeic acid O-methyltransferase 1</i> (<i>Comt1</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Zellwandveränderung durch Ligninverminderung	Lee et al., 2021
Golden Promise	<i>QTL for seed dormancy 1 & 2</i> (<i>Qsd1&2</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Verzögerung der Kornkeimung	Hisano et al., 2021
Golden Promise	<i>Squamosa-promotor binding protein-like 14</i> (<i>Spl14</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Veränderung der Pflanzenarchitektur	Thiel et al., 2021
Golden Promise	<i>Albostrians-like</i> (<i>Asl/CMF3</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Blattfärbung verändert	Li et al., 2021c
Golden Promise	Promotor des <i>Phytase gene A</i> (<i>PAPhy_a</i>)	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Verzögerung der Keimung	Holme et al., 2017
Aley	<i>Six-rowed spike</i> (<i>Vrs1</i>)	Protoplasten			Gerasimova et al., 2018
Aley	<i>Nudum</i> (<i>Nud</i>)	Protoplasten			Gerasimova et al., 2018
Igri	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i> (<i>Eif4E</i>)	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Virusresistenz	Hoffie et al., 2021

In Weizen wurden bereits verschiedene ertragsrelevante Gene bearbeitet und mittels Cas9 modifiziert (Tabelle 2). Dies führte beispielsweise zu Veränderungen der Pflanzenarchitektur, der Kornfüllung oder Fertilität aber auch zur Erhöhung oder Verringerung von Pathogenresistenzen^(*).

Tabelle 2 – Verwendung von RNA-vermittelter Cas9 Endonuklease in polyploidem Weizen

Sorte/ Linie	Gen	Ergebnis- grundlage	Nachkommen	Phänotyp	Referenz
	<i>Inositol oxygenase (INOX)</i>	Zellsuspension			Upadhyay et al., 2013
Fielder	<i>Phytoene desaturase (Pds)</i>	Zellsuspension & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2-Generation		Upadhyay et al., 2013 Howells et al., 2018
Kenong 199 Bobwhite Bobwhite208	<i>Mildew resistance locus O (Mlo)</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Primärpflanzen		Shan et al., 2013 Wang et al., 2014 Cermák et al., 2017
Kenong 199	<i>Lox-2</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation		Shan et al., 2014 Zhang et al., 2016 Zong et al., 2017; 2018
Bobwhite Kenong 199 Shimai 11 Yumai 4	<i>Gasr7</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Veränderung der Kornfüllung	Zhang et al., 2016 Hamada et al., 2018
Kenong 199	<i>Dep-1</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Änderung der Pflanzenhöhe	Zhang et al., 2016 Zong et al., 2018 Li et al., 2018a
Kenong 199	<i>Nac-2</i>	Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Primärpflanzen		Zhang et al., 2016
Kenong 199	<i>Pin-1</i>	Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Primärpflanzen		Zhang et al., 2016
Kenong 199 Bobwhite	<i>Grain width 2 (Gw2)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T3-Generation	Veränderung der Kornfüllung	Zhang et al., 2016 Liang et al., 2017 Li et al., 2018a Wang et al., 2018a; 2018b Zhang et al., 2019a
Bobwhite208	<i>Ubiquitin</i>	Protoplasten			Cermák et al., 2017
Bobwhite208	<i>5-Enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase</i>	Protoplasten			Cermák et al., 2017
Bobwhite208 TAH53 DP	<i>α-Gliadin</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T3-Generation	Verringerung des Gluten-Gehaltes	Sánchez-León et al., 2018
Kenong 199	<i>Enhanced disease resistance 1 (Edr-1)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Mehltau-resistenz	Zhang et al., 2017d
Fielder	<i>Zip4-B2</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Veränderung der Crossover-Frequenz	Rey et al., 2018
Fielder SBC0456D	<i>Male sterility 45 (Ms-45)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T4-Generation	Induktion männlicher Sterilität	Singh et al., 2018
Fielder	<i>Puroindoline b (Pinb)</i>	Protoplasten			Zhang et al., 2018

Einleitung

Sorte/ Linie	Gen	Ergebnis- grundlage	Nachkommen	Phänotyp	Referenz
Fielder	<i>Da-1</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Primärpflanzen		Zhang et al., 2018
Fielder	<i>Granule-bound starch synthase (WAXY)</i>	Protoplasten			Zhang et al., 2018
Kenong 199	<i>Als</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Pflanzen		Zong et al., 2018
Kenong 199	<i>Mtl</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Pflanzen		Zong et al., 2018
Fielder Gladius	<i>Male sterility 1 (Ms-1)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T3-Generation	Induktion männlicher Sterilität	Okada et al., 2019
Fielder	Transkriptions-repressor <i>NFXL1</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2-Generation	Veränderung der Pilzresistenz (<i>Fusarium</i>)	Cui et al., 2019 Brauer et al., 2020
Fielder	ABC-transporter <i>ABCC6</i>	Protoplasten			Cui et al., 2019
Fielder	Lipid-Transferprotein <i>LTP9.4</i>	Protoplasten			Cui et al., 2019
Fielder Haruyokoi Yumehikara Kitanokaori	<i>QTL for seed dormancy (Qsd-1)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2-Generation	Einfluss auf Keimungszeit	Abe et al., 2019 Liu et al., 2021
Bobwhite	<i>Reticulum Histidine-rich calcium binding protein (Hrc)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Veränderung der Pilzresistenz (<i>Fusarium</i>)	Su et al., 2019
Fielder	<i>Ckx-2-1</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T3-Generation	Veränderung der Kornzahl und Kornmasse	Zhang et al., 2019a
Fielder	<i>Glw-7</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T3-Generation		Zhang et al., 2019a
Fielder	<i>Gw-8</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation		Zhang et al., 2019a
Svevo	<i>Chloroform/Methanol mixture soluble protein 3 (CM3)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Verringerte Allergenmenge	Camerlengo et al., 2020
Svevo	<i>CM16</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Verringerte Allergenmenge	Camerlengo et al., 2020
Bobwhite W5 D6 D7	<i>Brassinosteroid-insensitive 1 (Bri-1)</i>	Regenerierte Pflanzen	Nur M1-Pflanzen		Budhagatapalli et al., 2020
Bobwhite K15 S96	<i>Semi-dwarf 1 (Sd-1)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur M2-Generation	Verringerte Pflanzenhöhe	Budhagatapalli et al., 2020
Fielder	<i>Q/Ap2L-A5</i>	Regenerierte Pflanzen	Nur T0-Pflanzen	Mehr Blüten pro Ährchen	Debernardi et al., 2020
CB037	<i>Np-1</i>	Protoplasten & Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1-Generation	Induktion männlicher Sterilität	Li et al., 2020b

Sorte/ Linie	Gen	Ergebnis- grundlage	Nachkommen	Phänotyp	Referenz
Zhangmai 7698 Bobwhite	<i>Sbella</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T1- Generation	Einfluss auf Pflanzenarchi- tektur und Kornfüllung	Li et al., 2021a
Cadenza	<i>Asparagine synthetase 2 (Asn-2)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Einfluss auf Kornfüllung	Raffan et al., 2021
Fielder	<i>Wheat frizzy panicle (Wfzp)</i>	Regenerierte Pflanzen	Bis zur T2- Generation	Veränderte Architektur der Ähre	Du et al., 2021

1.2.5. Reparaturmechanismen pflanzlicher Zellen

1.2.5.1. Nicht-homologe Endverknüpfung

Die nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *non homologous end-joining*, NHEJ) ist der am häufigsten vorkommende DNA-Reparaturmechanismus in somatischen Pflanzenzellen (Abbildung 4). Grundlage dafür stellt das Ku70/80 heterodimer dar, deren Komponenten an die freien DNA-Enden binden (Fell und Schild-Poulter, 2015), um sie vor einem Exonuklease-Verdau zu schützen (Boulton und Jackson, 1996). Die Enden werden anschließend durch den Ligase IV-XRCC4-Komplex miteinander verknüpft (West et al., 2001). Bei der Zielsequenz-spezifischen Mutagenese wird die Fehleranfälligkeit der DNA-Reparatur von gRNA/Cas9 induzierten Doppelstrangbrüchen genutzt, wobei meistens kleine Deletionen^(*) oder Insertionen^(*) entstehen. Größere Insertionen haben oftmals ihren Ursprung im Transgen oder im Genom selbst (Salomon und Puchta, 1988).

1.2.5.2. Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung

Die Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung (engl. *microhomology mediated end joining*, MMEJ), die in Fachkreisen irreführender Weise auch als alternatives NHEJ (aNHEJ) bezeichnet wird, stellt einen weiteren Mechanismus der DNA-Reparatur dar (Abbildung 4). MMEJ ist vergleichbar mit dem durch Puchta und Fauser beschriebenen Einzelstrang-*Annealing* (engl. *Single Strand Annealing*; SSA) (Puchta und Fauser, 2014). Grundlage sind kleine Homologien, die auf kurzen komplementären Sequenzen gegenüberliegender Stränge der beiden DNA-Enden beruhen, deren Hybridisierung als Ausgangspunkt der Neuverknüpfung des genomischen Stranges dienen. Die dabei ggf. entstehenden überschüssigen einzelsträngigen DNA-Enden werden vor der finalen DNA-Ligation abgebaut (Puchta und Fauser, 2014). Unter anderem sind PARP1 und XRCC1 in diese Vorgänge involviert (Jia et al., 2013; Charbonnel et al., 2010) wobei XRCC1 schon länger dafür bekannt ist, bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen eine Rolle zu spielen (Caldecott et al., 1994). Bei Vorlage von Mikrohomologien sind mögliche Deletionen (>2 bp) nach einem induzierten Doppelstrangbruch vorhersagbar (Bae et al., 2014) woraus sich die Möglichkeit ergibt, vorteilhafte Deletionen gezielt herbeizuführen (Tan et al., 2020). Auch in pflanzlichen Organellen wurde bereits eine MMEJ-basierte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beschrieben (Garcia-Medel et al., 2019). MMEJ birgt zudem das Potenzial präzise

Genomeveränderungen beliebiger Art zu erreichen, indem der Bereich zwischen zwei Zielmotiven durch ein synthetisches DNA-Fragment mit kompatiblen, endständigen Mikrohomologien ersetzt wird (Vu et al., 2021).

1.2.5.3. Auf homologer Rekombination basierende DNA-Reparatur

Die auf homologer Rekombination (HR) basierende DNA-Reparatur ist in Bakterien und in Hefe der dominierende Reparaturmechanismus, in somatischen Pflanzenzellen spielt sie jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Puchta, 2005) (Abbildung 4). In Epidermiszellen von GFP-transgenen Gerstenpflanzen konnte unter Induktion eines DNA-Doppelstrangbruchs durch TALENs mittels einer YFP-Reparaturvorlage das vorhandene GFP in ein YFP umgewandelt werden und so der Mechanismus bestätigt werden (Budhagatapalli et al., 2015). HR tritt während der S- und G2-Phase im Zellzyklus auf wobei homologe Sequenzen wie z.B. das Schwesterchromatid als Reparaturvorlage genutzt werden (Puchta et al., 2005). In generativen Zellen spielt HR während der Meiose eine besonders wichtige Rolle (Osman et al., 2011). Die HR kann auch als Synthese-abhängiges Strang-Annealing (engl. *Synthesis Dependend Strand Annealing*, SDSA) bezeichnet werden (Puchta und Fauser, 2014), welche fehlerfrei erfolgt. Die homologe Sequenz der Vorlage wird ohne Sequenzverlust in die Bruchstelle kopiert. SDSA ist 5-10x weniger effizient als SSA/MMEJ. Während eines SDSA wandert ein einzelner 3'-Überhang in den Doppelstrang der Reparaturvorlage und bildet mit dieser einen sogenannten „D-Loop“. Der Strang wird verlängert, löst sich aus der Vorlage und bindet an den zweiten 3'-Überhang der Bruchstelle. Die Lücken werden entsprechend komplementär gefüllt. Meist wird dabei das Schwesterchromatid als Vorlage genutzt, seltener das homologe Chromosom (Siebert und Puchta, 2002).

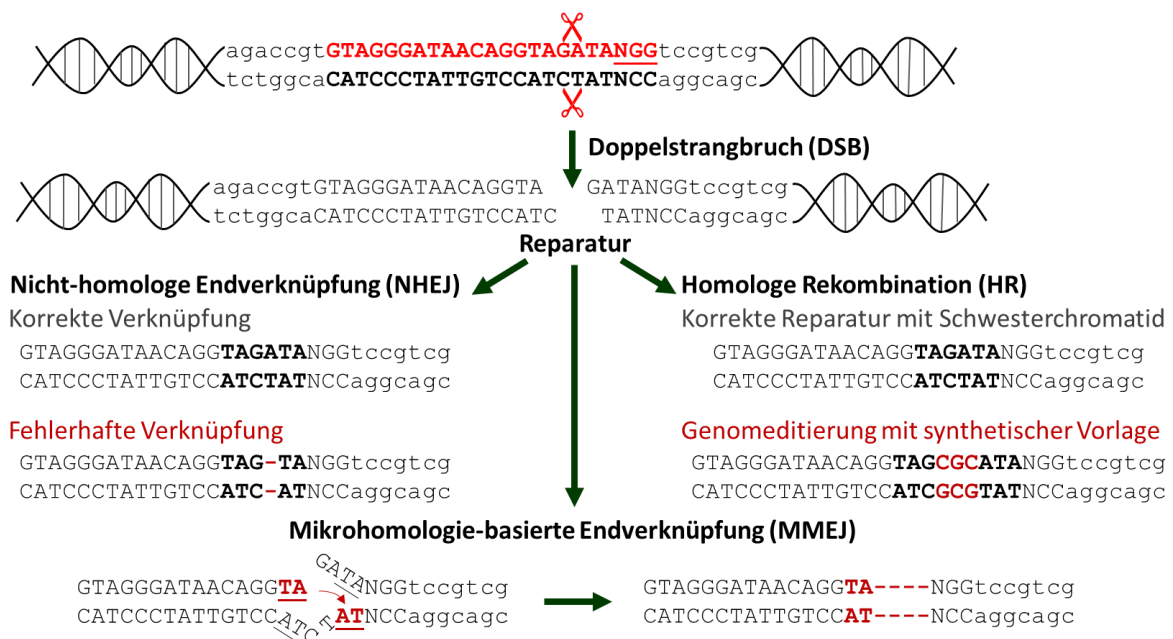


Abbildung 4 – Reparaturmechanismen der Zelle nach DNA-Doppelstrangbruch

1.3. Der Transkriptionsfaktor BRANCHED HEAD / WHEAT FRIZZY PANICLE

1.3.1. Struktur und Lokalisation von *Branched head* in hexaploidem Weizen

Der Transkriptionsfaktor^(*) BRANCHED HEAD (BH) bzw. WHEAT FRIZZY PANICLE (WFZP) bei Weizen gehört zur Familie der APETALA 2/ Ethylene response factor (AP2/ERF) Transkriptionsfaktoren und sein Gen besteht aus einem Exon. *Bh/Wfzp* liegt sich in allen drei Weizensubgenomen auf Chromosom 2S und ist unter den Gen-IDs TraesCS2A02G116900 (A-Kopie), TraesCS2B02G136100 (B-Kopie) und TraesCS2D02G118200 (D-Kopie) zu finden (Dobrovolskaya et al., 2015). Die kodierende Sequenz des Gens umfasst 900 bp (*Bh-A1*), 924 bp (*Bh-B1*) bzw. 942 bp (*Bh-D1*) (Abbildung A12). *Bh/Wfzp* wird organ- und entwicklungsspezifisch exprimiert. Unter anderem konnten Transkripte in jungen Ähren gefunden werden, vor allem während der frühen Blütenentwicklung (Dobrovolskaya et al., 2015). Die Position auf Chromosom 2 ist syntänisch in allen Vertretern der *Triticeae* und auch in verschiedenen Mitgliedern der *Poaceae*-Familie (Dobrovolskaya et al., 2015). Die Ährenform wird durch *Bh/Wfzp* als gemeinsames Hauptgen kontrolliert, wobei Mutationen zu lateralen Verzweigungen und so zu verzweigten Ähren führen (Poursarebani et al., 2015).

1.3.2. *Branched head* / *Wheat Frizzy panicle*-Orthologe in diploiden Süßgräsern

a) Gerste

Durch Poursarebani und Kollegen (2015) wurde das Gerstengen *COMPOSITUM 2* (*Com2*) beschrieben, welches ortholog^(*) zu Weizen *Bh/Wfzp* ist. *Com2* ist auf Chromosom 2HS gelegen und in *com2*-Mutanten kommt es zur verzweigten Ährenarchitektur mit geringerer Ährchen- und Blütchen-Fruchtbarkeit. Der Aminosäuretausch von Leucin zu Histidin an Position 228 führt zu einer erhöhten Unfruchtbarkeit. *Com2* wird in der Ährenentwicklung ab dem *Triple Mound*-Stadium exprimiert, während sich die verschiedenen Vorläufer der Ährchenorgane entwickeln. Die genaue Lokalisation ist an der Grenze zwischen dem Zentral- und den Seitenmeristemen. Während der weiteren Entwicklung verschiebt sich die Expression zwischen die Ährchenmeristeme und die Hüllspelzen. In Wildtyp-Ähren befindet sich die mRNA von *Com2* in der kompletten Achse der Ähre, womit *Com2* möglicherweise an der Entwicklung der Identität der Blütchenmeristeme beteiligt ist. In *com2*-Gerste ist die Expression vergleichbar zum Wildtyp, wobei die Proteinfunktion durch den Aminosäureaustausch möglicherweise verändert ist. Im *Lemma Primordium*-Stadium ist die Expression in *com2*-Gerste etwas erhöht, was zu vergrößerten Ährchenmeristemen führt, in den früheren Stadien jedoch verringert (Poursarebani et al., 2015).

b) Roggen

Bei Roggen (*Secale cereale* L.) wurde durch DeVries und Sybenga das *Bh/Wfzp*-Ortholog *MONSTROSUM EAR 1 (MO1)* beschrieben (DeVries und Sybenga, 1984). Der *MO1*-Locus liegt auf Chromosom 2RS und ist ein rezessives Allel (Benito et al., 1991; Dobrovolskaya et al., 2009).

c) Reis

Bei Reis (*Oryza sativa* L.) wurde das Ortholog *FRIZZY PANICLE (FZP)* bzw. *BRANCHED FLORETLESS 1 (BFL1)* beschrieben (Komatsu et al., 2003; Zhu et al., 2003). Der auf dem 7. Chromosom liegende AP2/ERF-Transkriptionsfaktor wurde als Schlüsselregulator für das Gleichgewicht zwischen der Bildung des Achsen- oder Blütenmeristems bezeichnet. *FZP* verringert die Bildung der Achsenmeristeme in den Ährchen von Reis (Komatsu et al., 2003). Eine Mutation in *FZP* ergibt eine höhere Zahl sekundärer Verzweigungen, wobei dabei keine normalen Ährchen entstehen (Komatsu et al., 2003; Yi et al., 2005; Kato und Horibata, 2012; Bai et al., 2016) und bewirkt neben den Sekundärverzweigungen weitere pleiotrope Effekte auf die Kornzahl, Kornlänge, den Anteil gefüllter Körner und somit auch auf das Tausendkorngewicht (Wang et al., 2020). Die Zahl der Sekundärverzweigungen pro Rispe wird durch eine Verringerung der *FZP*-Expression hervorgerufen, wodurch die Kornzahl erhöht wird, die Körner jedoch kleiner bleiben. Die primären Rispenverzweigungen sind dabei nicht beeinflusst (Wang et al., 2020). *FZP* ist in Reis hoch konserviert und zeigt natürliche Mutationen in der distalen Promotorregion, welche den Verzweigungsphänotyp bewirken (Wang et al., 2020). *FZP* als verantwortliches Gen für zwei Kornzahl-Loci in Reis identifiziert: *Small Grain and Dense Panicle 7 (SGDP7)* sowie *Control of Secondary Branch (COS1)* (Bai et al., 2017; Huang et al., 2018).

d) Mais

Bei Mais (*Zea mays* L.) wurde durch Chuck und Kollegen (2002) das *Bh/Wfzp* Ortholog *branched silkless 1 (bd1)* beschrieben, welches einen ERF-Transkriptionsfaktor kodiert und in verschiedenen Domänen des Ährchenmeristems exprimiert wird, speziell zunächst im äußeren, später im inneren Hüllspelzenmeristem und in nachfolgenden Entwicklungsstadien unterhalb des sich entwickelnden Blütchens. Mutanten zeigen die Ausbildung von zusätzlichen Ährchen in der (rein männlichen) Rispe und multiple Verzweigungen des Kolbens (Chuck et al., 2002).

e) Zwenke/ Brachypodium

Bei der zweiährigen Zwenke (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv) wurde das *Bh/Wfzp*-Ortholog *MORE SPIKELETS 1 (MOS1)* auf dem 1. Chromosom beschrieben (Derbyshire und Byrne, 2013). Es hat eine konservierte Sequenz in der ERF-Domäne und es wurden bereits Pflanzen mit Mutationen gefunden. In diesen *mos1*-Pflanzen liegt eine große Indel-Mutation (991 bp Insertion/10 bp Deletion)

ca. 170 bp stromaufwärts des ATGs in der 5'-UTR vor, wodurch ein auch im Vergleich zu Gerste, Reis, Mais und Hirse konservierter Bereich mit einer TATA-Box beschädigt ist (Derbyshire und Byrne, 2013). Dobrovolskaya und Kollegen (2015) beschrieben zusätzlich, dass ein Aminosäuretausch in *MOS1* zu einem Phänotyp mit überzähligen Ährchen führte, wobei die Körner normal entwickelt sind. Wenn ein Teil des Promotors deletiert wurde, kam es zur Verzweigung der ährenähnlichen Traube (Dobrovolskaya et al., 2015).

f) Sorghumhirse

Bei der Sorghumhirse (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) wurde das *Bh/Wfzp*-Ortholog *BRANCHED SILKLESS 1 (BD1)* auf Chromosom 2 beschrieben, welches eine AP2-Domäne enthält und zwischen dem Ährchenmeristem und dem Primordium der äußeren Hüllspelze exprimiert wird (Chuck et al., 2002; Zhou et al., 2019).

g) Diploider Weizen / Einkorn

Bei Einkorn (*Triticum monococcum* L., A^m-Genom), einer eng verwandten Art zum A-Genom-Spender *Triticum urartu*, wurde das *Bh/Wfzp* ortholog *Branched head (Bh^m)* identifiziert, welches auf Chromosom 2AS liegt und das Hauptgen für die Bildung verzweigter Ähren ist (Amagai et al., 2013). Eine Variante von *Bh^m* wird als *wfzp-A.2* Allel bezeichnet, welches einen Aminosäuretausch an Position 70 von Cystein zu Tyrosin (nicht wie bei Dobrovolskaya et al., 2017 beschrieben zu Threonin) durch einen Basenaustausch G>A beinhaltet und zu Ährenverzweigungen führt (Dobrovolskaya et al., 2017).

1.3.3. *Branched head* in tetraploidem Weizen

Poursarebani und Kollegen (2015) konnten zeigen, dass das *Bh/Wfzp*-Ortholog *Branched head* bei tetraploidem Weizen *Triticum turgidum* L. (*Bh*) für die Verzweigung der Ähre verantwortlich ist (Poursarebani et al. 2015). Der Locus wurde bereits von Klindworth und Kollegen (1997) als *Bh^t*-Locus beschrieben. Poursarebani und Kollegen analysierten eine alte Landrasse, den tetraploiden Weizen *Triticum turgidum* convar. *compositum* (L.f.) Filat., ehemals *Triticum multiplici Spica*, der seit Jahrhunderten unter den Namen *Wunderweizen*, *Miracle wheat*, *Sicilianisches Korn*, *Blé de Miracle* oder *Blé d'Osiris* beschrieben ist (L'Obel, 1591; Zedler, 1743; Vilmorin-Andrieux et al., 1880; Tschermak, 1914; Sharman, 1944; Poursarebani et al., 2015) (Abbildung 5). Zedler beschreibt das *Sicilianische Korn* „ALS EINES AN EINEM STÄNGEL VIELE AEHREN AN EINANDER VORSTELLENDEN UND SEHR GROßKÖRNIGEN, SEHENSWÜRDIGEN GEWÄCHSES“. *Bh^t* wurde dabei als hauptverantwortliches Gen beschrieben, wobei das Homoeoallel^(*) auf Chromosom 2AS die Hauptfunktion übernimmt und das Homoeoallel auf Chromosom 2BS nur eine Nebenfunktion hat. Wunderweizen selbst hat eine verzweigte Blütenarchitektur mit Verzweigungen der basalen Ährenregion. Ein terminales Ährchen wird nicht ausgebildet. Die Trockenmasse der Ähre ist zum Zeitpunkt der Befruchtung erhöht und auch

die Kornzahl und der Kornertrag sind im Vergleich zu Eliteweizen erhöht. Die Kornbreite ist unverändert und das Korngewicht sowie die Kornlänge sind verringert (Poursarebani et al., 2015). Wolde und Kollegen konnten durch eine weitergehende Analyse zeigen, dass Wunderweizen eine richtige Ährenverzweigung zeigt, jedoch an den wechselseitig angeordneten Rachisknoten statt der Ährchen kleine ährenähnliche Verzweigungen gebildet werden (Wolde et al., 2019c). Die Ährenentwicklung erfolgt bis zum *Glume primordium* Stadium normal, jedoch werden nachfolgend statt der Ährchenmeristeme weitere Verzweigungsmeristeme angelegt, die dem Blütenstandsmeristem ähnlich sind. Dies bewirkt die ährenähnliche Struktur der Verzweigungen (Poursarebani et al., 2015). Die Verzweigungsmeristeme befinden sich zwischen Hüll- und Deckspelze (Zhang et al., 2017c). In Wunderweizen sitzen die sekundären Ährchen ventral^(*) zueinander (Wolde et al., 2019c). Dieser Phänotyp sollte jedoch nicht mit dem der „gepaarten Ährchen“ verwechselt werden, da dort die Ährchen dorsal^(*) zu ventral^(*) orientiert sind (Boden et al., 2015; Dixon et al., 2018)

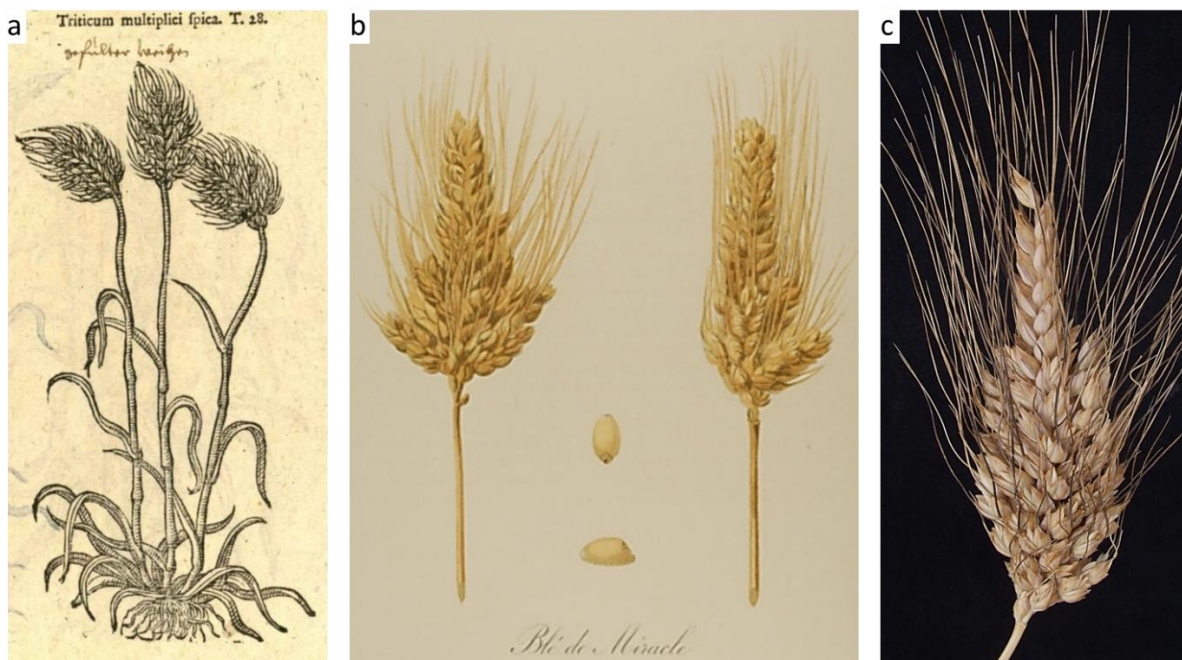


Abbildung 5 – Veränderte Architektur der Wunderweizenähre mit Verzweigungen; (a) *Triticum multiplici Spica* (L'Obel, 1591); (b) Blé de Miracle (Vilmorin-Andrieux et al., 1880); (c) *Triticum turgidum convar. compositum* (L.f.) Filat.

In verschiedenen Wunderweizen-Akzessionen wurde gezeigt, dass es einen Aminosäuretausch von Leucin zu Prolin (T>C) an Position 96 in der AP2/ERF-Domäne der *Bh^t*-A-Kopie gibt (Poursarebani et al., 2015), welches als *bh^t-A1*-Allel bezeichnet wird (Poursarebani et al., 2015). Auch in der tetraploiden *Triticum durum*-Linie R-107, welche Ährenverzweigungen zeigt, konnte das *bh^t-A1*-Allel gefunden werden (Dobrovolskaya et al., 2017). Nach Einbringung des *bh^t-A1*-Alleles in Eliteweizen konnten Verzweigungen auf sekundäre Ährchen beschränkt werden, die sich einen Rachisknoten teilen und bis

zu 7 zusätzliche Ährchen pro Ähre bilden (Wolde et al., 2019a). Die zusätzlichen Körner dieser Ähren sind in ihrer Größe und dem Gewicht gleich, woraus zu schließen ist, dass der Wunderweizen-Phänotyp auch durch andere Faktoren beeinflusst wird (Wolde et al., 2019c). Die Körner der sekundären Ährchen sind leichter und es werden weniger Körner pro Ährchen verglichen mit primären Ährchen gebildet. Wenn die Nebensprosse entfernt werden, wurden wiederum mehr Körner in den sekundären Ährchen gebildet (Wolde et al., 2019c). Eine weitere Mutation mit Aminosäuretausch an Position 61 von Glycin zu Serin führte dagegen nur zu schwachen Effekten (Poursarebani et al., 2015). Ebenfalls wurde eine weitere *Bh*-Variante beschrieben, in der ein Basenaustausch 1249 bp hinter der kodierenden Sequenz von *Bh-A* erfolgt (Zhang et al., 2017c). Im Falle eines Stopp-Codons an Position 14 (Q14X) in der B-Kopie von *Bh* konnte kein Phänotyp festgestellt werden, womit klar ist, dass die B-Kopie keine aktive Rolle bei den sekundären Ährenverzweigungen spielt (Poursarebani et al., 2015).

1.3.4. Branched head/ Wheat frizzy panicle in hexaploidem Weizen

Dobrovolskaya und Kollegen konnten zeigen, dass die verschiedenen Homoeoallele von *Branched head/ Wheat Frizzy panicle (Bh/Wfzp)* unterschiedliche Bedeutung in der Ährenentwicklung übernehmen. Der Phänotyp der überzähligen Ährchen (engl. *supernumerary spikelets*) ist vor allem mit Mutationen der A- und der D-Kopie von *Bh/Wfzp* assoziiert (Dobrovolskaya et al., 2015), wobei die D-Kopie auch als *Multirow spike 1 (Mrs1)* bezeichnet wird (Dobrovolskaya et al., 2008; 2009). Alle drei Homoeoallele von *Bh/Wfzp* werden in der frühen Wurzelentwicklung bis zum Bestockungsstadium (engl. *tillering stage*) und in späteren Wurzeln nach dem Ährenschieben sowie in den Wurzelspitzenmeristemen exprimiert. Zusätzlich zeigt die A-Kopie eine Expression im frühen Sprossmeristem und etwas später in der Sprossachse. Die D-Kopie wird nach der Bestockung im Sprossmeristem und der Sprossachse exprimiert (Wheat eFP Browser; Wheat Expression Browser expVIP; Winter et al., 2007; Borrill et al., 2016; Ramirez-Gonzalez et al., 2018). Die *Bh*-Homoeoallele befinden sich auf den Chromosomen 2A, 2B und 2D. Das *Bh-A1*-Allel ist unter den IDs *TraesCS2A02G116900* (IWGSC_v1.1) bzw. *TraesCS2A03G0239400* (IWGSC_v2.1) zu finden, *Bh-B1* unter *TraesCS2B02G136100* (IWGSC_v1.1) bzw. *TraesCS2B03G0329100* (IWGSC_v2.1) und *Bh-D1* unter *TraesCS2D02G118200* (IWGSC_v1.1) bzw. *TraesCS2D03G0248500* (IWGSC_v2.1).

Die Expression der A-Kopie erfolgte sowohl in Wildtyp-Pflanzen, als auch in Pflanzen mit überzähligen Ährchen. In Pflanzen mit überzähligen Ährchen wurde das *wfzp-A.1*-Allel beschrieben, welches eine 14 bp-Deletion 40 bp vor der AP2/ERF-Domäne des A-Homoeoallels zeigt (Dobrovolskaya et al., 2015). Die B-Kopie war insgesamt sehr schwach exprimiert, was insbesondere auf die Insertion eines in inverser Orientierung wiederholten transposablen Elementes in der Promotorregion zurückgeführt wird (Dobrovolskaya et al., 2015). Allerdings wurde in jüngeren Studien eine deutlich höhere Menge an mRNA der *Wfzp-A*- und *B*-Kopie in Weizen nachgewiesen (Li et al., 2021b). Dies lässt den Schluss zu,

dass die Expression von *Wfzp* abhängig vom Genotypen ist (Li et al., 2021b). Die auch als *Mrs1* bezeichnete D-Kopie von *Bh/Wfzp* zeigte eine unterschiedliche Expression in Wildtyp-Ähren und Ähren mit mutationsbedingt überzähligen Ährchen. Zwei mutierte Allele wurden für das D-Allel beschrieben: *wfzp-D.1* hat einen Aminosäuretausch an Position 76 von Glutaminsäure zu Lysin (G>A-Basenaustausch) und *wfzp-D.2* hat durch einen Basenaustausch (C>T) ein vorzeitiges Stopp-Codon an Position 95, wobei beide Mutationen innerhalb der AP2/ERF Domäne liegen. Außerdem wurden Pflanzen mit vollständiger Deletion der D-Kopie beschrieben (Dobrovolskaya et al., 2015). Ein besonders ausgeprägter Phänotyp mit überzähligen Ährchen konnte beobachtet werden, wenn in Kombination die *Bh-A*-Kopie als *wfzp-A.1* vorlag und die D-Kopie entweder vollständig fehlte oder als *wfzp-D.1*-Allel vorhanden war. Ein schwacher Phänotyp wurde beobachtet, wenn nur das *wfzp-D.2*-Allel vorhanden war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Homoeoallele auf den A- und D-Subgenomen zusammen für den Phänotyp der überzähligen Ährchen verantwortlich sind (Dobrovolskaya et al., 2015). Der in tetraploidem Weizen (siehe 1.3.3.) beschriebene Phänotyp des Wunderweizens (Poursarebani et al., 2015) wurde bei Dobrovolskaya und Kollegen nicht beobachtet, womit sich vermuten lässt, dass weitere Gene für diesen Phänotyp verantwortlich sind. Durch Wolde und Kollegen (2019b) wurde das *Q*-Gen als weitere für die Ährenarchitektur verantwortliche Komponente beschrieben, wobei dessen Funktion nicht mit *Bh/Wfzp* übereinstimmt (Wolde et al., 2019b). Das *Q*-Gen zeigt sich verantwortlich für die Anzahl entwickelter Blütchen sowie die Reduktion der Länge der Rachilla. Entsprechend wurden in *q*-Mutanten eine verlängerte Rachis und Rachilla sowie extra Blütchen beschrieben (Debernardi et al., 2017; Greenwood et al., 2017).

1.4. Die Transkriptionsfaktoren *SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEIN-like 14 und 17*

1.4.1. *SQUAMOSA* und *SBPs/SPLs* im Allgemeinen

SQUAMOSA (SQUA) ist ein Blütenmeristem-Identitätsgen, welches erstmals im Großen Löwenmaul (*Antirrhinum majus* L.) beschrieben wurde (Huijser et al., 1992). Durch Stubbe und Kollegen (1966) konnte beschrieben werden, dass eine homozygot-rezessive *squa*-Mutation in Pflanzen den Übergang vom vegetativen Sprossmeristem zum generativen Meristem stört und es daher zur Verzweigung des Blütenstandes kommt (Huijser et al., 1992). Es wurde eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die in der Lage waren, durch Bindung an den Promotor von *SQUA* dessen Expression zu regulieren. Sie wurden deshalb als *SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEINS (SBP)* bzw. *SBP-like (SPL)* bezeichnet und ebenfalls erstmals mit den Vertretern *SBP1* und *SBP2* im Großen Löwenmaul beschrieben (Klein et al., 1996). Die *SPL*-Proteine haben eine hochkonservierte Region von 76 Aminosäuren, die die sogenannte *SBP*-Domäne bilden (Liu et al., 2016) und zwei Zinkfinger-Bindestellen mit dem Motiven Cys3-His-Cys2-His-Cys bzw. Cys6-His-Cys beinhalten (Yamasaki et al., 2004). Sie zeigen ebenfalls ein GTAC-DNA-Bindemotiv in der *SBP*-Box (Birkenbihl et al., 2005). *SPLs* regulieren bei Pflanzen eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie die Blattenwicklung (Wu und Poethig, 2006); den Übergang von der vegetativen zur generativen Phase (Usami et al., 2009), die Blüten- und Fruchtentwicklung (Klein et al., 1996; Cardon et al., 1997; Wang et al., 2005; Manning et al., 2006), die Pflanzenarchitektur (Becraft et al., 1990; Jiao et al., 2010), die Sporogenese (Unte et al., 2003), die GA-Signalübertragung (Zhang et al., 2007), sowie Reaktionen auf Kupfer und Pilz-Toxine (Eriksson et al., 2004; Stone et al., 2005). In *Arabidopsis* sind 11 von 17 und in Reis 11 von 19 *SPL*-Vertretern durch die Mikro-RNAs *miR156* und *miR157* reguliert (Xie et al., 2006; Gandikota et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass *miR156* in Blättern, Wurzeln und in der Sprossspitze in früheren Stadien der Rispenentwicklung verringert exprimiert wird (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009) und eine Überexpression von *miR156* zu erhöhter Sprosszahl und reduzierter Ährchen- und Kornzahl in den Rispen von Reis führt (Miura et al., 2010).

1.4.2. *SPL*-Gene in verschiedenen Pflanzenspezies

a) Großes Löwenmaul (*Antirrhinum majus*)

Die beiden *SPL*-Vertreter *SBP1* und *SBP2* wurden als erste Vertreter ihrer Genfamilie in *A. majus* beschrieben (Klein et al., 1996). *SBP1* bindet stärker an den Promotor von *SQUA* als *SBP2*. Beide haben eine konservierte Region von 79 Aminosäuren, die als *SBP*-Domäne bezeichnet wird und im Vergleich dieser *SBPs* zu 84 % ähnlich und zu 75 % identisch ist. Die Expression von *SBP1* und *SBP2* beschränkt sich vor allem auf jüngere Blätter und die Blüte, wobei es hier Unterschiede in den Blütenorganen gibt. Die Expression ist stärker in den Blütenblättern und schwächer in den Kelch- und Fruchtblättern. Die

Staubgefäße zeigen keine Expression. *SBP1* wurde auch in Deckblättern gefunden während *SBP2* in apikalen und lateralen Meristemen und in vaskulären Bündeln exprimiert wird (Klein et al., 1996).

b) Grünalge und Moos

Bei Grünalgen (*Chlamydomonas*) wurde das SPL-Protein COPPER RESPONSE REGULATOR 1 (*CRR1*) gefunden, welches die Perzeption von Kupfer reguliert und dessen Genstruktur ähnlich zu den *Arabidopsis* SPL-Genen 1, 7 und 12 ist (Eriksson et al., 2004; Kropat et al., 2005).

In dem Moos (*Physcomitrella patens*) wurde *PpSBP3* beschrieben, welches eine *miR156*-Bindestelle enthält, an der die mRNA dieses Gens nachweislich geschnitten wird (Arazi et al., 2005).

c) Arabidopsis

Bei *Arabidopsis* konnte in zahlreichen Studien die Funktionen von Vertretern der SPL-Familie beschrieben werden und somit ein umfassender Überblick über deren Bedeutung ermittelt werden. So wurden in *Arabidopsis*-Pflanzen bisher 17 SPL-Proteine entdeckt (Cardon et al., 1999; Xing et al., 2010), deren Funktionen unterschiedlich sind. *AtSPL3,4* und 5 regulieren die Verteilung der Trichome^(*) und beeinflussen die Zellzahl und Zellgröße im ersten Blatt, jedoch nicht die Blattform (Wu und Poethig, 2006; Usami et al., 2009). *AtSPL3* bindet an die Promotoren von *LEAFY*, *FRUITFULL* und *APETALA1* und fördert über diese Gene die Expression von *FLOWERING LOCUS T (FT)*, womit der Phasenübergang von der vegetativen zur generativen^(*) Entwicklung induziert wird (Wu und Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007; Yamaguchi et al., 2009). Eine Überexpression von *AtSPL3* führt zu einem verfrühten Blühzeitpunkt (Cardon et al., 1997). *AtSPL2*, 10 und 11 kontrollieren die Entwicklung der lateralen Pflanzenorgane sowie die Lamellenform, die Trichomverteilung und auch die Sprossreife (Shikata et al., 2009). *AtSPL10* spielt eine dominante Rolle bei der Unterdrückung des Wachstums von Wurzelverzweigungen (Yu et al., 2015b). *AtSPL8* beeinflusst die Entwicklung von Mikrosporen und spielt eine Rolle in der Megasporogenese, Trichombildung am Kelchblatt und der Filamentlänge der Staubblätter (Unte et al., 2003). *AtSPL7* ist ortholog^(*) zu *CRR1* von Grünalgen und sein Protein aktiviert die Expression von *miR398* bei Kupfermangel. Auch andere Mikro-RNAs werden durch *AtSPL7* reguliert (Chen et al., 2010). *AtSPL9* und 15 beeinflussen ebenfalls die Blattform, wobei *SPL9* dominanter ist (Wu et al., 2009). Zusammen mit *AtSPL3* und 10 reguliert *AtSPL9* eine Vielzahl von Genen, die in den Übergängen vom juvenilen^(*) zum adulten^(*) Stadium bzw. von der vegetativen^(*) zur generativen^(*) Entwicklung aktiv sind (Fornara und Coupland, 2009). *AtSPL14* ist ein negativer Regulator für den Phasenübergang und ist an der Reaktion auf das Pilzgift Fumonisin B1 beteiligt, das einen programmierten Zelltod induziert (Stone et al., 2005). Generell sind einige *Arabidopsis*-SPL-Vertreter in die Regulation des Übergangszeitpunktes zur Blütenentwicklung involviert. Dies erfolgt abhängig aber auch unabhängig zum DELLA-Protein-Signalweg. DELLA-Proteine, deren Gemeinsamkeit das

Aminosäuremotiv DELLA ist, stellen eine Gruppe von Repressoren des Gibberellinsäure-Signalweges dar und verzögern die Blütenentwicklung durch Interaktion mit SPL-Vertretern, wodurch es zur reduzierten Expression von *miR172* und *AP2*-ähnlichen Vertretern kommt und nachfolgend das Blühinduktionsgen *FT* nicht aktiviert wird (Wang et al., 2009; Yu et al., 2012).

d) Tomate, Baumwolle und Sojabohne

Bei Tomaten (*Solanum lycopersicum* L., ehemals *Lycopersicon esculentum*) wurde mit *LeSPL-CNR* ein Ortholog zu *AtSPL3* beschrieben, welches eine zentrale Rolle bei der Regulation der Fruchtreife hat (Manning et al., 2006).

In der Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L.) konnten 24 *SPL*-Vertreter beschrieben werden, die vor allem in Blättern, Sprossen und Blüten exprimiert werden. Eine Überexpression von *GhSPL3* und *GhSPL18* hatte Einfluss auf die Entwicklung der Blätter und sekundärer Sprosse sowie auf den Blühzeitpunkt (Zhang et al., 2015 YU).

Bei Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) wurden 41 *SPL*-Gene beschrieben, wobei einige dieser Gene durch Genduplikationen entstanden (Tripathi et al., 2017).

e) Apfel, Birke und Pappel

Auch in Bäumen wurden bereits erste *SPL*-Gene beschrieben. Der Kulturapfel (*Malus domestica* BORKH) enthält nach derzeitigem Wissenstand 27 *SPL*-Gene, von denen 14 durch *miR156* reguliert werden (Jia et al., 2017).

In der Hänge-Birke (*Betula pendula* ROTH) wurde mit *BpSPL1* ein orthologes Gen zu *Antirrhinum SBP2* und *Arabidopsis SPL3* beschrieben, welches in Blüten, Sprossen und Blättern exprimiert ist (Lännenpää et al., 2004).

Darüber hinaus wurden in der Pappelart *Populus trichocarpa* HOOK bereits 28 verschiedene *SPL*-Gene beschrieben (Li und Lu, 2014).

f) Reis

Bei Reis wurden 19 *SPL*-Gene beschrieben, wobei nach jetzigem Wissensstand 11 durch *miR156* reguliert werden und für 8 ein alternatives *Splicing* nachgewiesen ist (Xie et al., 2006). *OsSPL7*, 12, 14, 16, 17 und 18 sind am stärksten in jungen Rispen exprimiert. *OsSPL2*, 4, 8, 10, 11 und 15 haben ihre höchste Expression im Halm und der Blattscheide und ebenfalls in jungen Rispen. *OsSPL1*, 3, 5, 6 und 13 sind eher ubiquitär exprimiert (Xie et al., 2006). Eine Überexpression von *OsSPL14* fördert die Verzweigung der Rispe und bringt einen höheren Kornertrag (Miura et al., 2010). *OsSPL16* reguliert die Größe, Form und Qualität von Körnern (Wang et al., 2012). *OsSPL13* kontrolliert das Gewicht, die Länge

und die Dicke von Körnern (Si et al., 2016). Eine Überexpression von *OsSPL7*, *14* und *17* ergibt jeweils eine reduzierte Sprosszahl, wobei der Effekt bei *SPL7* mit teilweise nur einem Spross am Stärksten ist. Auch die Rispenverzweigungen und die Ährchenzahl werden durch die erhöhte Expression von *SPL7*, *14* und *17* beeinflusst (Wang et al., 2015b).

g) Mais, Rutenhirse, Sorghumhirse und Brachypodium

Bei Mais wurden schon mehrere *SPL*-Gene beschrieben. So hat *liguleless 1 (lg1)* eine SBP-Domäne und weist Ähnlichkeit zu *Antirrhinum SBP1* und *2* auf. *LG1* beeinflusst die Entwicklung des Blatthütchens und Blattöhrchens^(*) (Moreno et al., 1997). Ein anderer Vertreter, *TEOSINTE GLUME ARCHITECTURE 1 (TGA1)* kontrolliert den phänotypischen Unterschied zwischen Mais und Teosinte (Wang et al., 2005). Die Transkriptionsfaktoren *UNBRANCHED 2* und *3 (UB2/3)* verändern die Pflanzenarchitektur und haben Einfluss auf verschiedene Ertragsparameter (Chuck et al., 2014).

Die Rutenhirse (*Panicum viratum* L.) hat mit *PvSPL4* einen *SPL*-Vertreter, dessen Expressionsänderung die Bildung von Achselknospen, Verzweigungen, den Biomassertrag und das Nachwachsen von Sprossen nach deren Entfernung beeinflusst (Gou et al., 2017).

Bei Sorghumhirschen wurden 18 *SBP*-Box-Gene entschlüsselt. *SbSBP3*, *12* und *15* sind ortholog zu Mais *tga1*, *lg1*, *ub2* und *ub3* und am höchsten in Blütenstandsmeristemen exprimiert. Im gleichen Gewebe zeigen auch *SbSBP9* und *17* die höchste Expression. *SbSBP5*, *8* und *18* zeigten dagegen erhöhte Expressionen als Antwort auf Abscisinsäure und Polyethylenglycol und sind in die Abwehr biotischen Stresses involviert (Chang et al., 2016).

In Brachypodium wurde mit *BdiSPL14L* ein Ortholog zu *OsSPL14* beschrieben, welches von *miR156* reguliert und dessen mRNA entsprechend an der *miR156*-Bindestelle geschnitten wird (Jeong et al., 2013).

h) Weizen

Bei Weizen konnten 56 *SPL*-Vertreter in den verschiedenen Subgenomen identifiziert werden (Li et al., 2020a). *Spl-8* zeigte einen Effekt auf die Blattwinkel in Verbindung mit Auxin und Brassinosteroiden (Liu et al., 2019b). Mehrere *SPL*-Vertreter bewirkten nach ektopischer Expression in anderen Organismen Veränderungen: *Spl-16* führt zu einem zeitigeren Blühzeitpunkt und vergrößerten Organen bei *Arabidopsis* (Cao et al., 2019), *Spl-20* und *-21* beeinflussen das Korngewicht im Reis (Zhang et al., 2017b) und die 2B-Kopie von *Spl-13* reguliert ertragsbezogene Parameter in transgenem Reis wie eine erhöhte Rispenlänge, Zahl und Länge primärer Verzweigungen und stimuliert eine erhöhte Zahl sekundärer Verzweigungen (Li et al., 2020a). Im Weizen wird *Spl-13* am höchsten in jungen Ähren exprimiert und ist an der Korn- und Ährenentwicklung sowie der Sprossentwicklung beteiligt. Die 2B-

Kopie von *Spl-13* zeigte eine große Ähnlichkeit zu *OsSPL13*. Eine Überexpression des 2B-Allels von *Spl-13* in der Weizen-Zuchtlinie Bobwhite führte zu mehr Blütenchen und Körnern pro Ähre und Ährchen sowie einem erhöhten Anteil fertiler Blütenchen (Li et al., 2020a). *Spl-15* ist in Ähren, Wurzeln, im Korn und im Spross zu finden. In Wurzeln wirkt SPL-15 zusammen mit den A- und B-Kopien von SPL-6 in biologischen anti-Stress-Prozessen (Li et al., 2020a). Eine verstärkte Expression von *Spl-1* findet sich in Blättern, von den A- und B-Allelen von *Spl-3* im Spross und von *Spl-7* in Blattöhrchen^(*) und Fahnenblatt^(*). *Spl-9* ist eher ubiquitär aber schwach exprimiert während SPL-16 im Spross aktiv ist (Li et al., 2020a). Die SPL-Gene *Spl-20*, -21 und -22 haben keine orthologen Gene in Reis (Li et al., 2020a).

i) Gerste

Bei Gerste wurden bisher 18 *SPL*-Gene beschrieben (Shahinnia et al., 2012; Tripathi et al., 2018). Bis auf *Spl9* haben alle weiteren *SPL*-Gene mindestens 3 und bis zu elf Exons. *Spl3*, 11, 16, 17, 18 und 23 haben eine *miR156*-Bindestelle in der kodierenden Sequenz, während diese sich bei *Spl13* in der 3' untranslatierten Region (UTR) befindet (Tripathi et al., 2018).

Von der mikro-RNA *miR156* sind in Gerste vier Varianten beschrieben, die in den Mikro-RNA Datenbanken miRbase (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) und mirEx2 (<http://www.combio.pl/mirex2/browse/>) zu finden sind (Tabelle 3). Die vier *miR156*-Varianten unterscheiden sich in der Vorläufersequenz, nicht aber in der reifen Sequenz (UGACAGAAGAGAGUGAGCACA) (Tripathi et al., 2018).

Tabelle 3 – *miR156*-Varianten in Gerste

ID	Referenzdatenbank	Akzessionsnummer miRbase
<i>hvu-miR156a</i>	miRbase	MI0016449
<i>hvu-miR156b</i>	miRbase & mirEx2	MI0030546
<i>hvu-miR156c</i>	mirEx2	
<i>hvu-miR156d</i>	mirEx2	

1.4.3. *SPL14* und *SPL17*

a) Reis

1) *OsSPL14*

Das Gen des Transkriptionsfaktors *OsSPL14* befindet sich mit der ID *Os08g0509600* auf Chromosom 8L und ist im Kern lokalisiert. *OsSPL14* wird im Sprossspitzenmeristem sowohl im vegetativen, als auch im generativen Stadium sowie in primären und sekundären Rispenverzweigungen (Jiao et al. 2010), aber auch in Blattprimordien^(*) während der vegetativen Phase und in den Primordien der Deckblätter und Rispen exprimiert (Luo et al., 2012). Verschiedene Allele von *OsSPL14* werden als *IDEAL PLANT ARCHITECTURE 1 (IPA1)*, Jiao et al., 2010) und *WEALTHY FARMERS PANICLE (WFP)*, Miura et al., 2010)

bezeichnet. *OsSPL14* hat 3 Exons und eine SBP-Box. Es wird durch die Mikro-RNA *OsmiR156* reguliert, die im 3. Exon an die *SPL14*-mRNA bindet, womit eine posttranskriptionelle Repression erfolgt (Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010). Eine Punktmutation innerhalb der *miR156*-Bindestelle an Position 874 bp bewirkt einen C>A Basentausch bzw. wird Leucin durch Isoleucin ersetzt (Jiao et al., 2010). Durch diesen Basenaustausch wird die Bindung von *miR156* an die mRNA von *SPL14* gestört und die nun erhöhte Expression von *OsSPL14* bewirkt eine landwirtschaftlich „ideale“ Pflanze (*IPA*) mit reduzierter Sprosszahl, stabilerem Halm und erhöhtem Kornertrag (Jiao et al., 2010). Li und Kollegen (2016) konnten mittels gezielter Mutagenese in der Nähe der *miR156*-Bindestelle durch Cas-Endonuklease mehrere phänotypische Hauptklassen ermitteln: (1.) Eine Leserahmenverschiebung bewirkte den Verlust der Proteinfunktion mit der Folge eines Zwergwuchses, verkürzten Rispen, weniger Blüten und einer erhöhten Sprosszahl. (2.) Eine große Deletion bei verbleibendem Leserahmen veränderte die Bindestelle und ergab einen *IPA1*-Phänotyp, wobei die Sprosszahl von 7-10 auf 2-4 verringert war, die Pflanzen länger waren und die Blütenzahl und Rispenlänge erhöht wurden. (3.) Bei kleinen Modifikationen bei verbleibendem Leserahmen waren die Pflanzen unverändert wie Wildtypen (Li et al., 2016). Eine erhöhte Expression von *OsSPL14* führt zudem zu einer kürzeren Wachstumsperiode, kurzen engen Fahnenblättern, dicken, grüneren Blättern mit mehr Chlorophyll a und b und Carotinoiden sowie zu einem veränderten Hormonlevel im Keimlings- und Reifestadium (Lian et al., 2020). Eine sehr starke Überexpression zeigte einen negativen Effekt auf die Rispenverzweigungen (Wang et al., 2015b). Eine Verringerung der *SPL14*-Expression durch RNAi sorgte für reduzierte Rispenverzweigungen und weniger Ährchen (Wang et al., 2015b).

Das *WFP*-Allel zeigt keinen Basenaustausch in der kodierenden Sequenz, jedoch ist die epigenetische Regulation verändert, da es weniger Methylierungen gibt, was wiederum dazu führt, dass die *SPL14*-Expression vor allem in jungen Rispen 9x höher ist als im Wildtyp (Miura et al., 2010). Grund für die reduzierte Methylierung im *SPL14*-Promotor sind drei *Tandem-Repeats* ungefähr 4 kb vor dem ATG-Start-Codon von *Spl14*, wodurch die Chromatinkonfiguration offener wird. Dadurch entsteht ebenfalls der *IPA*-Phänotyp mit weniger Sprossen und größeren Rispen (Zhang et al., 2017a).

Duan und Kollegen beschrieben, dass SHORT INTERNODE 1 (*OsSHI1*) mit *IPA1* interagiert und dadurch dessen DNA-Bindefähigkeit negativ beeinflusst (Duan et al., 2019). Wang und Kollegen konnten durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Co-Immunpräzipitation eine Interaktion von *SPL14* mit humaner OTUB1-Deubiquitinase zeigen, die einen erhöhten Kornertrag induziert, aber auch indirekt den Abbau von *SPL14* fördert (Wang et al., 2017b). Die Transkription von *IPA1* wird auch durch den Strigolacton-Repressor DWARF53 vermindert (Song et al., 2017). Das Proteinlevel von *OsSPL14* wird durch die RING-Finger E3 Ligase *IPA1* INTERACTING PROTEIN 1 (*IPI1*) in verschiedenen Geweben reguliert (Wang et al., 2017a). *OsSPL14* selbst reguliert verschiedene Gene durch Bindung an deren

Promotoren, wie z.B. *TEOSINTE BRANCHED 1 (OsTB1)*, als negativer Regulator des Sprossknospenwachstums, welcher die Seitensprossbildung verhindert (Takeda et al., 2003; Minakuchi et al., 2010). *OsSPL14* reguliert ebenfalls direkt und positiv *DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1)*, welches die Pflanzenhöhe und Rispenlänge sowie die Rispenarchitektur kontrolliert. *DEP1*-Mutanten zeigen eine erhöhte Kornzahl sowie mehr sekundäre Verzweigungen pro Rispe (Huang et al., 2009). *OsSPL14* ist in verschiedenen Signalwegen integriert und bewirkt in Sprossspitzen eine erhöhte Expression von Apoptose- und Verteidigungsgenen sowie eine Reduktion der Expression von Zellzyklus- und Zellteilungsgenen. In jungen Rispen ist die Expression von Genen der Transkription, Reaktion auf Umwelteinflüsse, Pflanzenhormonsignalen und der Kornreifung erhöht (Lu et al., 2013).

OsSPL14 ist auch für die Immunantwort der Pflanzen bedeutsam. So wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression zur Resistenz gegen die Reisbräune, hervorgerufen durch *Mangaportha oryzae*, führt, da es durch die Pathogeninduktion^(*) zur Phosphorylierung von *SPL14* an Position S163 kommt, wodurch *WRKY45* aktiviert wird. Eine Verringerung der *SPL14*-Expression durch RNAi bewirkte eine höhere Anfälligkeit gegenüber *M. oryzae* (Wang et al., 2018c). Auch eine Resistenz gegen die Weißblättrigkeit wurde bei erhöhter Expression beschrieben (Liu et al., 2019a).

Die Überexpression von *OsSPL14* führte, ebenso wie die Herunterregulation von *miR156*, zur erhöhten Expression von *FRIZZY PANICLE (FZP)*, des orthologen Genes von Weizen *Branched head (Bh)/Wheat frizzy panicle (Wfzp)*. Es zeigte sich in den *SPL14*-Überexpressionslinien eine erhöhte Expression von *FZP* in den Verzweigungsmeristemen, während Wildtyp-Pflanzen eine Expression in den Ährchenmeristemen hatten (Wang et al., 2015b). Somit vermuten Wang und Kollegen (2015b) die Kontrolle des Überganges vom Verzweigungs- zum Ährchenmeristem durch *SPL*-Gene.

2) *OsSPL17*

OsSPL17, ein Paralog^(*) von *OsSPL14*, ist auf Chromosom 9 mit der ID *Os09g0491532* gelegen. Es hat 4 Exons und neben der SBP-Box auch eine *miR156*-Bindestelle. *OsSPL17* zeigt eine hohe Expression in Rispen (Wang et al., 2010), vor allem im jüngeren Stadium, aber auch in der Sprossspitze, Rachis, Nodien, Blattscheide, Wurzeln und Internodien^(*) (Wang et al., 2015b). Eine Verringerung der Expression von *OsSPL17* durch RNAi führte zu reduzierten Rispenverzweigungen und weniger Ährchen, was bei gleichzeitiger Abregulierung von *SPL14* noch verstärkt wurde. Die Überexpression von *SPL17* führte zu einer reduzierten Sprosszahl und zur Reduktion der Rispenverzweigungen (Wang et al., 2015b).

b) *Arabidopsis*

Die Proteine *AtSPL9* und *15* zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *OsSPL14* und *17* (Yang et al., 2008) und kontrollieren gemeinsam den Phasenübergang vom juvenilen zum adulten^(*) Stadium (Schwarz et

al., 2008). *SPL9* zeigt die stärkste Expression in Blattprimordien und Vorläufern der Gefäße in jungen Blättern (Wang et al., 2009). Unter Langtags-Bedingungen konnte eine erhöhte Expression in Blättern und neu gebildeten Primordien entdeckt werden. *SPL9* wird transient^(*) in Blütenanlagen und sehr frühen Blütenprimordien hochreguliert, in weiteren Stadien der Blütenentwicklung aber reduziert (Wang et al., 2009). *AtSPL9* wird durch *miR156* kontrolliert und die Expression ist antagonistisch zur *miR156*-Expression (Wang et al., 2008; 2009). Einige Gene werden durch die Bindung von *SPL9* an deren Promotoren gesteuert. So wird beispielsweise die Sesquiterpensynthese *TPS21* aktiviert (Yu et al., 2015a), die Anthocyan-Akkumulation durch Destabilisierung des MYB-bHLH-WD50-Transkriptaktivierungskomplexes beeinflusst (Gou et al., 2011) und die Trichombildung durch Regulation von *TRICHOMELESS 1 (TCL1)* und *TRIPTYCHON (TRY)* kontrolliert (Yu et al., 2010). Auch wurde gezeigt, dass *AtSPL9* Einfluss auf die Expression der Mikro-RNA *miR172* nimmt, welche wiederum nachgelagerte Gene reguliert (Wu et al., 2009). Das ist zum Beispiel bei *TARGET OF EAT 1* und *2 (TOE1/2)* der Fall, welche die Alterung der Blattepidermis unterdrücken (Chen et al., 2010). Gleiches gilt für die in der Blütenentwicklung involvierten *AGAMOUS LIKE 42 (AGL42)* und *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, deren Proteine wiederum *FLOWERING LOCUS T (FT)* beeinflussen (Fornara und Coupland, 2009; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009).

c) Weizen

1) *SPL14*-Orthologe

Reis *SPL14* weist eine hohe phylogenetische Nähe zu den *SPL*-Genen *TuSpl-14* und *AeSpl-14* der Weizenvorläufer *Triticum urartu* (ID: TRIUR3_23872) und *Aegilops tauschii* (ID: AET7Gv20605000) auf (Wang et al., 2015a). Die Weizenorthologe *Spl-14* und *-17* stehen *OsSPL14* und *17* ebenfalls verwandtschaftlich sehr nah (Li et al., 2020a) wobei es verschiedene Bezeichnungen für *Spl-14* gibt: *TaSPL14-A/B/D* (Feng et al., 2017; Gupta, 2020); *TaASPL17/TaBSPL17/TaDSPL17* (Wang et al., 2015a) und *TaSBP13-ASa/BSa/DSa* (Song et al., 2019). Die Weizen-Orthologe von *OsSPL14* liegen auf den Chromosomenarmen *7AS* (ID: *TraesCS7A02G246500*), *7BS* (*TraesCS7B02G144900*) und *7DS* (*TraesCS7D02G245200*) und zeigen eine erhöhte Expression in Blättern und Primordien von Deckblättern^(*). Die Expression ist im *Double Ridge* Stadium der Ährentwicklung stark und nimmt im weiteren Entwicklungsverlauf ab (Feng et al., 2017). Außerdem wird *Spl-14* im apikalen Sprossmeristem, im Halm und in den Wurzeln exprimiert (Wheat eFP Browser und Wheat Expression Browser expVIP; Winter et al., 2007; Borrill et al., 2016; Ramirez-Gonzalez et al., 2018).

2) *SPL17*-Orthologe

Die Orthologe von *OsSPL17* sind paralog zu *Spl-14* und haben ebenfalls unterschiedliche Bezeichnungen erhalten: *TaSPL17-A/B/D* (Feng et al., 2017; Gupta, 2020), *TaSPL14-A/B/D* (Li et al.,

2020a) und *TaSBP7-ALa/BLa/DLa* (Song et al., 2019). Die *Spl-17*-Orthologe liegen auf den Chromosomen 5AL (*TraesCS5A02G265900*), 5BL (*TraesCS5B02g265600*) und 5DL (*TraesCS5D02G273900*) und zeigen Expression im Sprossmeristen, Halm, in den Wurzeln, Internodien sowie in Blütenorganen wie Hüllspelzen, Deckspelze und Grannen, im Embryo und in reiferen Körnern (Wheat eFP Browser und Wheat Expression Browser expVIP; Winter et al., 2007; Borrill et al., 2016; Ramirez-Gonzalez et al., 2018).

d) **Gerste**

1) *HvSpl14*

Das Gerstenortholog zu Reis *SPL14* liegt auf dem Chromosomenarm 7HS nahe des Zentromers (Shahinnia et al., 2012) und ist mit Pflanzenhöhe und dem Zeitpunkt des Ährenschiebens assoziiert (Alqudah et al., 2016). Es wird auch mit dem photoperiodischen und circadianen Blühsignalweg in Verbindung gebracht (He et al., 2019). *Spl14* ist in den Morex-Referenzgenomen wie folgt annotiert: im Referenzgenom v1 mit der ID *HORVU0Hr1G020810.1* (Mascher et al., 2017), im Referenzgenom v2 als *HORVU.MOREX.r2.7HG0564420.1* (Monat et al., 2019, kodierende Sequenz in Abbildung A13) sowie im Referenzgenom v3 als *HORVU.MOREX.r3.7HG0679980.1* (Mascher et al., 2021). Die Expression ist in sich entwickelnden Blütenständen, sowie in der Rachis und in Wurzeln erhöht (BARLEX; Colmsee et al., 2015). Im Ährenmeristem findet sich eine besonders starke Expression im *Double Ridge*-Stadium, v.a. im *Leaf Ridge*, sowie in den lateralen Ährchen und in der Rachis, wo es bis zum *Triple Mound*-Stadium exprimiert ist (Thiel et al., 2021) (Abbildung 6).

2) *HvSpl17*

Das auf dem Gerstenchromosom 5H gelegene *Spl17* steht seinem Reis-Ortholog *SPL17* (Tripathi et al., 2018) und den Weizengenen *Spl-14* (Li et al., 2020a) bzw. *Sbp-7* (Song et al., 2019) verwandtschaftlich nah. Die Annotation in den Morex-Referenzgenomen ist wie folgt: im Referenzgenom v1 mit der ID *HORVU5Hr073440.13* (Mascher et al., 2017), im Referenzgenom v2 unter *HORVU.MOREX.r2.5HG0406890.1* (Monat et al., 2019, kodierende Sequenz in Abbildung A13) sowie im Referenzgenom v3 als *HORVU.MOREX.r3.5HG0490900.1* (Mascher et al., 2021). Die Expression ist sehr stark in der Rachis, aber auch in sich entwickelnden Sprossen und Blütenständen, in der Deckspelze und in Wurzeln (BARLEX; Colmsee et al., 2015). Im Ährenmeristem wird es im *Double Ridge*-Stadium vor allem im *Leaf Ridge* und auch in den lateralen Ährchen im *Triple Mound*-Stadium exprimiert (Thiel et al., 2021) (Abbildung 6).

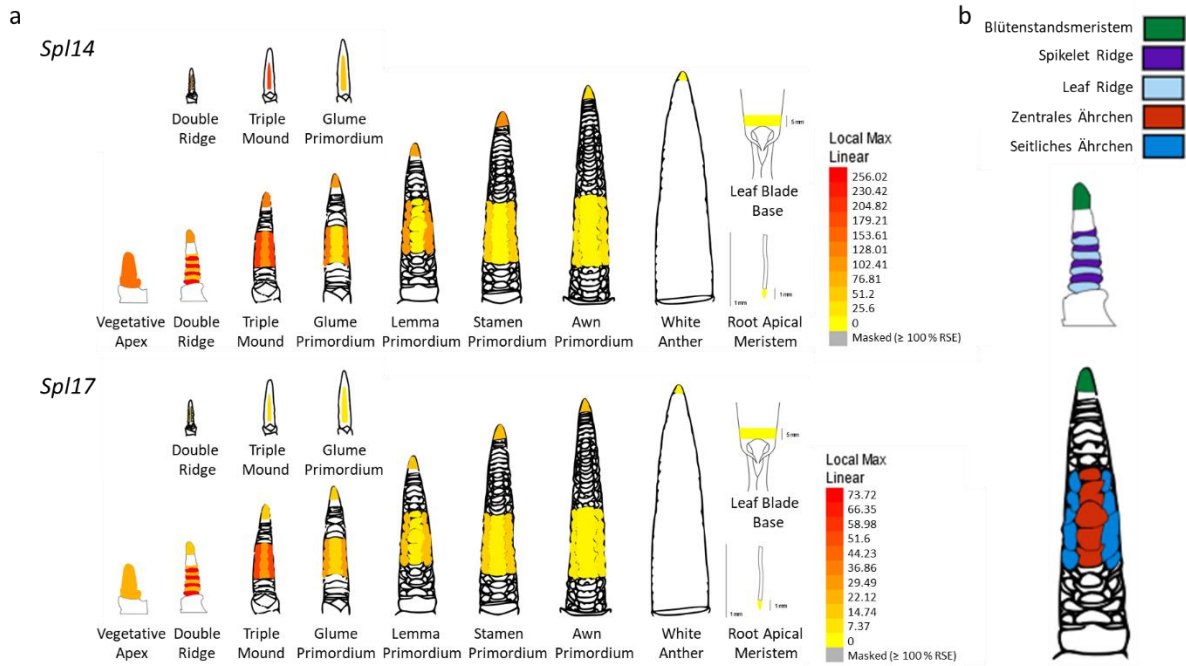


Abbildung 6 – Expression von Gerste *Spl14* und *Spl17* während der Ährenmeristementwicklung; (a) Stadien der Entwicklung des Ährenmeristems vom vegetativen Apex bis zum *White Anther*-Stadium sowie das Wurzelspitzenmeristem (*Root Apical Meristem*) und die Basis der Blattscheide (*Leaf Blade Base*), Farbgradient mit Expressionsstärke verläuft von gelb (keine Expression) nach rot (individuell ermittelter Wert der höchsten Expression); (b) Aufschlüsselung der eingefärbten Gewebeteile; erstellt über ePlant Barley (http://bar.utoronto.ca/eplant_barley/), (Thiel et al. 2021)

2. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der gRNA/Cas9 Technologie zur Modifikation der Ährenarchitektur und Beeinflussung ertragsrelevanter Eigenschaften in den Getreiden Weizen und Gerste. Die gRNA/Cas9-Technologie hat sich mittlerweile zu einer Standardtechnologie in der Grundlagenforschung der Pflanzen entwickelt und bekommt eine zunehmende Bedeutung in der weltweiten Züchtung von Kulturpflanzen, da man sehr gezielt und dennoch recht unkompliziert Modifikationen im Pflanzengenom durchführen kann.

Zur Modifikation in hexaploidem Weizen sollte das Endogen *Branched head/ Wheat frizzy panicle (Bh/Wfzp)* ausgewählt werden, da dieses eine hauptverantwortliche Komponente des Wunderweizen-Phänotyps im tetraploiden Weizen darstellt. Zur gezielten Mutagenese sollten zunächst ausgewählte zielmotiv-spezifische gRNAs in Blättern und in Protoplasten validiert werden, um anschließend stabile Mutationen in Weizen nach ballistischem Gentransfer zu induzieren. Ziel war hierbei, eine Allelkollektion zu erzeugen, die für Züchter interessant ist und langfristig in aktuelle Zuchtlinien oder Sorten eingekreuzt oder darin nachgebildet werden kann. Hierfür sollten neben der Selbstbefruchtung auch Kreuzungen und die Herstellung doppelhaploider Nachkommen durch Antherenkultur genutzt werden, um eine größere Zahl von Allelkombinationen zu erhalten. Neben der phänotypischen Analyse der Ährenarchitektur soll ebenso eine Untersuchung der Wurzeln von ausgewählten mutierten Pflanzenfamilien erfolgen.

In Gerste sollte das Ortholog des in Reis beschriebenen *Squamosa-promotor binding protein-like 14 (Sp14)* modifiziert werden, dessen Genprodukt ebenfalls mit der Ährenentwicklung und dem Pflanzenphänotyp assoziiert wird. Dieses Gen ist in Gerste bisher kaum beschrieben und sollte durch gezielte Mutagenese auf seine Funktionalität untersucht werden. Ein besonderer Aspekt des Konzeptes war dabei die Modifikation einer in *Sp14* gelegenen Mikro-RNA-Bindestelle für *miR156*, um eine erhöhte Expression von *Sp14* zu erzeugen. Hierfür sollten einerseits die Mutagenese mittels Cas9 als auch verschiedene Varianten von Baseneditoren im Zusammenspiel mit Nickase-Cas9 angewendet werden. Dabei sollte auch das *Sp14*-Paralog *Sp17* modifiziert werden, was eine vergleichende phänotypische Analyse von *sp14*- bzw. *sp17*-Einzelmutanten sowie von *sp14/sp17*-Doppelmutanten ermöglicht.

3. Material & Methoden

3.1. Übersicht der verwendeten Plasmide

Tabelle 4 – Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid ^(*)	Beschreibung/Verwendung	Herkunft, Referenz
Allgemein		
p6i-d35S-TE9	Binärvektor 271p6i-2x35s-TE9 mit Hygromycin-Selektionsgen <i>hpt</i>	DNA Cloning Service, Hamburg
pIK5	CasCADE gRNA-Modul 1	Hoffie et al., 2023
pIK89	CasCADE gRNA-Assemblierungsvektor (1 gRNA)	
pIK48	CasCADE finaler Assemblierungsvektor	
pIK23	CasCADE <i>Dummy</i> -Modul mit MCS	
pNB1	<i>2x35Sp::YFP</i> für Zielvektoren des ballistischen Aktivitätstests	Budhagatapalli et al., 2016; KU705395 (NCBI)
pNB2	<i>2x35Sp::mCherry</i> für ballistischen Aktivitätstest	PRB*, N. Budhagatapalli, unveröffentlicht
pNB38	<i>TaU6p::gRNA_ZmUbi1p::cas9</i> -Vektor für Weizentransformation	PRB*, N. Budhagatapalli, unveröffentlicht
pSH121	<i>OsU3p::gRNA_ZmUbi1p::cas9</i> -Vektor für Gerstetransformation	Gerasimova et al., 2018; 2020; MW145140.1 (NCBI)
pSH179	<i>TaU6p::gRNA_2x35Sp::cas9</i> -Vektor für ballistischen Aktivitätstest	PRB*, S. Hiekel, C. Hertig, unveröffentlicht
pSH183	<i>ZmUbi1p::APOBEC1-ncas9-UGI</i> in pSH121	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht
pSH221	Intermediärvektor für sfGFP-Expression	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht
pSH273	CasCADE <i>ZmUbi1p::ecTadA-ecTadA*-ncas9</i>	Hoffie et al., 2023
Mutagenese von Weizen Branched head		
pCH2	<i>Bh</i> -gRNA4 (im pSH179-Vektor)	Vorliegende Dissertation
pCH3	<i>Bh</i> -gRNA5 (im pSH179-Vektor)	
pCH15	YFP-Zielvektor für <i>Bh</i> -gRNA4 (im pNB1-Vektor)	
pCH16	YFP-Zielvektor für <i>Bh</i> -gRNA5 (im pNB1-Vektor)	
pCH26	<i>Bh</i> -gRNA4 (im pNB38-Vektor)	
pCH27	<i>Bh</i> -gRNA5 (im pNB38-Vektor)	
pCH28	Binärkonstrukt <i>Bh</i> -gRNA4/ <i>cas9</i> aus pCH26 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
pCH29	Binärkonstrukt <i>Bh</i> -gRNA5/ <i>cas9</i> aus pCH27 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
Mutagenese von Gerste <i>Spl14/Spl17</i>		
pCH6	<i>Spl14</i> -gRNA2-1 (im pSH121-Vektor)	Vorliegende Dissertation
pCH9	<i>Spl14</i> -gRNA2-4 (im pSH121-Vektor)	Thiel et al., 2021
pCH12	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2A (im pSH121-Vektor)	Vorliegende Dissertation
pCH13	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2G (im pSH121-Vektor)	
pCH14	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2o1 (im pSH121-Vektor)	
pCH19	YFP-Zielvektor für <i>Spl14</i> -gRNA2-1 (im pNB1-Vektor)	
pCH22	YFP-Zielvektor für <i>Spl14</i> -gRNA2-4 (im pNB1-Vektor)	
pCH25	YFP-Zielvektor für <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2 (im pNB1-Vektor)	
pCH30	Binärkonstrukt <i>Spl14</i> -gRNA2-1/ <i>cas9</i> aus pCH6 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	

Plasmid ^(*)	Beschreibung/Verwendung	Herkunft, Referenz
pCH31	Binärkonstrukt <i>Spl14</i> -gRNA2-4/ <i>cas9</i> aus pCH9 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	Thiel et al., 2021
pCH32	Binärkonstrukt <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2A/ <i>cas9</i> aus pCH12 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	Vorliegende Dissertation
pCH33	Binärkonstrukt <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2G/ <i>cas9</i> aus pCH13 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
pCH34	Binärkonstrukt <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2o1/ <i>cas9</i> aus pCH14 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
pCH39	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-1 (im pSH183-Vektor)	
pCH40	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-3 (im pSH183-Vektor)	
pCH41	Binärkonstrukt <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-1/APOBEC- <i>ncas9</i> aus pCH39 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
pCH42	Binärkonstrukt <i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-3/APOBEC- <i>ncas9</i> aus pCH40 (im p6i-d35S-TE9-Vektor)	
pCH61	<i>Spl14/Spl17</i> -gRNA3-2-Modul (in CasCADE-Vektor pIK5)	
pCH64	gRNA-Assemblierung (pCH61 in CasCADE-Vektor pIK89)	
pCH66	finale Assemblierung (pCH64, pSH273 und pIK23 in CasCADE-Vektor pIK48)	

*Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie des IPK Gatersleben, wo die vorliegende Studie durchgeführt wurde

3.2. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide^(*) wurden von Metabion (metabion international AG, Planegg/Steinkirchen, Deutschland) und Biologio (Biologio B.V., Nijmegen, Niederlande) synthetisiert. Eine Zusammenstellung ist in Tabelle A1 (Anhang) zu finden.

3.3. Nomenklatur von Genen und Proteinen

3.3.1. Bakterien

Schreibweisen erfolgen gemäß der veröffentlichten vereinheitlichten Nomenklatur der Bakteriengenetik (Demerec et al., 1966). Beispiele:

Gensymbol für Wildtypallel:	<i>cas9</i>
Gen ausgeschrieben:	<i>CRISPR-associated 9</i>
Protein:	Cas9

3.3.2. Weizen

Die Nomenklatur erfolgt gemäß den empfohlenen Regeln für Weizen (McIntosh et al., 2013) und der nachfolgend veröffentlichten Ausgaben des *Annual Wheat Newsletter*, siehe *GrainGenes*-Datenbank für *Triticaeae* und *Avena* (<https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/awn/>). Beispiele:

Gensymbol für Wildtypallel:	<i>Bh</i>
Gensymbol mit Spezifikation des Homoeoallels:	<i>Bh-A1</i>
Gen ausgeschrieben:	<i>Branched head</i>
mutiert mit Funktionsverlust:	<i>bh</i>
mutiert mit (ggf. auch möglicher) Funktion:	<i>Bh</i>
Protein:	BH

Davon abweichend wurde Symbolik verwendet, wie in den jeweils angegebenen Referenzen angegeben.

3.3.3. Gerste

Die verwendete Nomenklatur folgt den aufgestellten Regeln für Gerste (Franckowiak & Lundqvist, 2010) sowie der nachfolgend veröffentlichten Ausgaben des *Barley Genetics Newsletter*, siehe *GrainGenes*-Datenbank für *Triticaeae* und *Avena* (<https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/>).

Beispiele:

Gensymbol für Wildtypallel:	<i>Sp14</i>
Gen ausgeschrieben:	<i>Squamosa-promotor binding protein-like 14</i>
mutiert mit Funktionsverlust:	<i>sp14</i>
mutiert mit (ggf. auch möglicher) Funktion:	<i>Sp14</i>
Protein:	SPL14

Davon abweichend wurden Symbolik verwendet, wie in den jeweils angegebenen Referenzen angegeben.

3.3.4. Weitere Spezies

Die Gen- und Proteinbezeichnungen weiterer Spezies erfolgten übereinstimmend mit den jeweils angegebenen Referenzen.

3.4. Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Chemikalien

3.4.1. Allgemein

Alle verwendeten Substanzen und Chemikalien wurden von den Firmen Ambion (Waltham, MA, USA), BIO-RAD (München, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland), Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande), Roche (Mannheim, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Ausnahmen hiervon werden im Text explizit benannt.

3.4.2. Enzyme

Die Schreibweise der verwendeten Restriktionsenzyme^(*) erfolgt gemäß der von Roberts et al. (2003) vorgeschlagenen Konvention. Die verwendeten Restriktionsenzyme (Tabelle 5) sind entweder konventionelle oder *fast digest* Enzyme der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) oder New England Biolabs (NEB) (Ipswich, MA, USA) und wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Andere Enzyme (Polymerasen, Ligasen, etc.) wurden nach Angaben der Hersteller von den Firmen Promega (Fitchburg, WI, USA), PCR Biosystems (London, UK) und QIAGEN (Venlo, NL) verwendet.

Tabelle 5 – *Verwendete Enzyme*

Enzym	Firma
Restriktionsenzyme	
BamHI (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD0054
BsaI/ Eco31I (konventionell)	Thermo Scientific, Best.-Nr. ER0291
BsaI	NEB, Best.-Nr. R3733
BsmBI/ Esp3I	NEB, Best.-Nr. R0734L
EcoRI (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD0274
HincII (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD0494
HindIII (konventionell, <i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. ER0501 bzw. FD0504
NotI (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD0594

Enzym	Firma
SacI (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD1133
SfiI (konventionell)	Thermo Scientific, Best.-Nr. ER1821
XhoI (<i>fast digest</i>)	Thermo Scientific, Best.-Nr. FD0694
<u>Polymerasen</u>	
GoTaq® G2 DNA Polymerase	Promega, Best.-Nr. M7848
PCR BIO HS VeriFi Polymerase	PCR BIOSYSTEMS, Best.-Nr. PB10.45-01
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB, Best.-Nr. M0491S
<u>Ligasen</u>	
Quick Ligase	NEB, Best.-Nr. M2200L
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Best.-Nr. EL0011 NEB, Best.-Nr. M0202L
<u>Sonstige</u>	
RNase A	QIAGEN, Best.-Nr. 19101
Thermosensitive Alkalische Phosphatase	Promega, Best.-Nr. M9910

3.4.3. Antibiotika/Fungizide

Die in Tabelle 6 angegebenen Antibiotika-Stammlösungen wurden, wenn nicht anders bezeichnet, mit ddH₂O angesetzt und mittels eines 0,2 µm Spritzenfilters steril-filtriert.

Tabelle 6 – *Verwendete Antibiotika*

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Benzimidazol	20 mg/ml	20 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	10 mg/ml	10 µg/ml
Hygromycin*	50 mg/ml	20 / 25 / 50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicin**	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Timentin	150 mg/ml	150 µg/ml

* fertige Stammlösung von Roche (Mannheim, Deutschland)

**in DMSO gelöst, nicht steril-filtriert

3.4.4. Übersicht der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 7 – *Liste der verwendeten Medien, Puffer und Chemikalien*

Puffer/Medium	Zusammensetzung
<u>Bakterienmedien</u>	
LB	10 g/400 ml LB Fertigmedium (Carl Roth, Best.-Nr. 6673) 14 g/400 ml LB Agar (Carl Roth, Best.-Nr. 6675)
MG/L	5 g/l Mannitol, 1 g/l L-Glutaminsäure, 250 mg/l KH ₂ PO ₄ , 100 mg/l NaCl, 100 mg/l MgSO ₄ , 5 g/l Trypton, 2,5 g/l Hefeextrakt pH 7; 1,2 % Bacto-Agar
SOB	2 g/100 ml Trypton, 0,5 g/100 ml Hefeextrakt, 0,2 ml/100 ml 5 M NaCl, 0,25 ml/100 ml 1 M KCl, 98 ml/100 ml steriles ddH ₂ O → autoklavieren Zugabe von 1 ml/100 ml 1 M MgSO ₄ und 1 ml/100 ml 1 M MgCl ₂ → steril-filtrieren
<u>Herstellung kompetenter E.coli XL1-blue</u>	
Lösung I (2x)	3 ml/100 ml 1 M KAc pH 7,5, 10 ml/100 ml 1 M KCl, 1 ml/100 ml 1 M CaCl ₂ pH 5,8 mit Essigsäure einstellen Zugabe von 15ml/100ml Glycerin und 496mg/100ml MnCl ₂ x4H ₂ O

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Lösung II	3 ml/40 ml 1 M CaCl ₂ , 6 ml/40 ml Glycerin, 1 ml/40 ml 0,4 M Na-PIPES mit pH 6,4
<u>Gelelektrophorese</u>	
5xTBE	54,5 g/l TRIS, 27,5 g/l H ₃ BO ₃ , 4,65 g/l EDTA
<u>Ballistischer Aktivitätstest</u>	
Blattmedium	1 % Phytoagar, 20 µg/ml Benzimidazol, 10 µg/ml Chloramphenicol
<u>Protoplastenisolation</u>	
Plasmolyselösung	0,6 M Mannitol
Enzymlösung	<i>Frisch herstellen, Lagerung bei 4 °C im Dunkeln</i> 0,25 M Saccharose, 0,15 M Sorbitol, 35 mM CaCl ₂ , 2 M KCl, 10 mM MES-KOH pH 5,7, 1,5 % Cellulase R10, 0,8 % Macerozyme R10
W5	1 % Glukose, 0,08 % KCl, 0,9 % NaCl, 1,84 % CaCl ₂ , 2 mM MES-KOH pH 5,7
Polyethylenglykol- (PEG)	<i>Frisch herstellen</i>
Lösung	2 g PEG4000 in 1 ml H ₂ O lösen, dann 0,2 M Mannitol (2,5 ml 1M/5 ml) und CaCl ₂ (0,5 ml 1M/5 ml) zugeben, schütteln und im Wasserbad erwärmen
MMG	1 M Mannitol, 1 M MgCl ₂ , 1 M MES-KOH pH 5,7
TPS	100 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 1 M KCl, pH 8
<u>Sterilisation der Karyopsen</u>	
2,4 % NaClO	200 ml/l 12 % NaClO mit 0,1 % Tween 20
<u>Ballistischer Gentransfer in unreife Weizenembryos mit Regeneration</u>	
Dunkelmedium	4,4 g/l MS-Medium (M0222), 36 g/l Maltose, 0,5 g/l Glutamin, 0,1 g/l Caseinhydrolysat, 0,5 ml/l CuSO ₄ (10 mM), 10 ml/l 2,4-D (2 mg/l), <u>optional</u> : Zugabe von 30 g/l (Vorkultur) bzw. 5 g/l (Kallusinduktion) Centrophenoxine, pH 5,8; 3,5g/l Phytigel, <u>optional</u> : Zugabe von 20 bzw. 50 mg/l Hygromycin (Kallusinduktion)
Osmoticum	4,4 g/l MS-Medium (M0222), 36 g/l Maltose, 63,75 g/l Mannitol (0,35M), 0,5 g/l Glutamin, 0,1 g/l Casein hydrolysat, 0,5 ml/l CuSO ₄ (10 mM), 10 ml/l 2,4-D (2 mg/l) pH 5,8; 3,5 g/l Phytigel
K4N-Makrosalze W (20x)	1,6 g/l NH ₄ NO ₃ , 40,4 g/l KNO ₃ , 6,8 g/l KH ₂ PO ₄ , 8,82 g/l CaCl ₂ x2H ₂ O, 4,92 g/l MgSO ₄ x7H ₂ O
K4N-Mikrosalze W (1000x)	1,12 g/100 ml MnSO ₄ x4H ₂ O, 0,31 g/100 ml H ₃ BO ₃ , 0,72 g/100 ml ZnSO ₄ x7H ₂ O, 12 mg/100 ml Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O, 2,5 mg/100 ml CuSO ₄ x5H ₂ O, 2,4 mg/100 ml CoCl ₂ x6H ₂ O, 16 mg/100 ml KI
Regenerationsmedium Spross	50 ml/l K4N-Makrosalze W (20x), 1 ml/l K4N-Mikrosalze W (1000x), 100 ml/l 1 M Maltose, 1 ml/l 75 mM NaFeEDTA, 1 ml/l B5-Vitamine (1000x, 112 g/l), 4 ml/l 0,25 M L-Glutamin, 490 µl/l 10 mM CuSO ₄ x5H ₂ O, 1 ml/l 1 mM 6-BAP pH 5,8; 3,5 g/l Phytigel, <u>optional</u> : Zugabe von 25 mg/l Hygromycin
Regenerationsmedium Wurzel	33,34 ml/l K4N-Makrosalze W (20x), 670 µl/l K4N-Mikrosalze W (1000x), 66,67 ml/l 1 M Maltose, 670 µl/l 75 mM NaFeEDTA, 670 µl/l B5-Vitamine (1000x, 112 g/l), 2,67 ml/l 0,25 M L-Glutamin, 330 µl/l 10 mM CuSO ₄ x5H ₂ O pH 5,8; 3,5 g/l Phytigel, <u>optional</u> : Zugabe von 20 mg/l Hygromycin
<u>Agrobakterien-vermittelter Plasmid-Transfer in unreife Gerstenembryonen mit Regeneration</u>	
BCCM (Co-Kultivierung)	4,3 g/l MS-Salze (MS221), 1 g/l Casein hydrolysat, 0,69 g/l Prolin, 0,25 g/l Myoinositol, 30 g/l Maltose, 1 ml/l Dicamba (2,5 g/l), 1 ml/l Thiamin-HCl (1 g/l), 800 mg/l L-Cystein pH 5,8; 500 µl/l Acetosyringon (196,2 g/l)
BCIM (Kallusinduktion)	4,3 g/l MS-Salze (MS221), 1 g/l Casein hydrolysat, 0,69 g/l Prolin, 0,25 g/l Myoinositol, 30 g/l Maltose, 1ml/l Dicamba (2,5 g/l), 1 ml/l Thiamin-HCl (1 g/l), 0,2 ml/l CuSO ₄ x5H ₂ O (1,25 g/l) pH 5,8; 1 ml/l Hygromycin (50 mg/ml), 1 ml/l Timentin (150 mg/ml), 3 g/l Phytigel
K4N-Makrosalze G (20x)	6,4 g/l NH ₄ NO ₃ , 72,8 g/l KNO ₃ , 6,8 g/l KH ₂ PO ₄ , 8,82 g/l CaCl ₂ x2H ₂ O, 4,92 g/l MgSO ₄ x7H ₂ O
K4N-Mikrosalze G (1000x)	0,84 g/100 ml MnSO ₄ xH ₂ O, 0,31 g/100 ml H ₃ BO ₃ , 0,72 g/100 ml ZnSO ₄ x7H ₂ O, 12 mg/100 ml Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O, 2,5 mg/100 ml CuSO ₄ x5H ₂ O, 2,4 mg/100 ml CoCl ₂ x6H ₂ O, 17 mg/100 ml KI

Puffer/Medium	Zusammensetzung
BRM (Regeneration)	50 ml/l K4N-Makrosalze G (20x), 1 ml/l K4N Mikrosalze G (1000x), 100ml/l Maltose, 1 ml/l 75 mM NaFeEDTA, 1 ml/l B5-Vitamine (1000x, 112g/l), 4 ml/l 0,25 M L-Glutamin, 196 µl/l 25 mM CuSO ₄ x5H ₂ O, 1 ml/l 1 mM 6-BAP pH 5,8; 3 g/l Phytigel
<u>Antherenkultur von Weizen</u>	
WAM1-Makroelemente (20x)	23 g/l KNO ₃ , 0,7 g/l KCl, 2 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4 g/l KH ₂ PO ₄ , 2 g/l Ca(NO ₃) ₂ x4H ₂ O, 2,5 g/l MgSO ₄ x7H ₂ O
WAM1-Eisenquelle (500x)	18,65 g/l Na ₂ EDTA, 13,9 g/l FeSO ₄ x7H ₂ O
WAM1	50 ml/l WAM1-Makroelemente (20x), 2 ml/l WAM1-Eisenquelle (500x), 7,5 ml/l 2,4-D (20 mg/100 ml), 1ml/l Kinetin (1000x, 50 mg/100 ml), 80 g/l Maltose, 100 g/l Ficoll Sigma PM400, <u>optional</u> : 4 ml/l K4N-Mikrosalze W (1000x) pH 5,8; 1 ml/l Thiamin-HCl (1g/l)
<u>DNA Isolation nach Waite (Palotta et al., 2000)</u>	
Extraktionspuffer R40	1 % N-Lauryl-Sarcosin, 100 mM TRIS-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl 40 µg/ml RNase in TE, 10:1, pH 8
<u>DNA Isolation nach Herren (Stein et al., 2001)</u>	
GTC Extraktionspuffer	1 M Guanidinthiocyanat, 2 M NaCl, 30 mM NaAc pH6, 0,2 % Tween 20, nicht autoklavieren
Waschpuffer	50 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH8, 1 mM EDTA, 700 ml Ethanol (100 %), auf 1000 ml mit sterilem ddH ₂ O auffüllen
Elutionspuffer TElight	0,1 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl pH 8

3.5. Software

Tabelle 8 – Verwendete Programme

Software	Firma	Firmensitz
AxioVision 3.0	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Clone Manager 9	Sci Ed Software LLC	Westminster, CO, USA
Endnote® X9	Clarivate	Philadelphia, PA, USA
GIMP 2.10.12	GIMP-Projekt	
IAP	IPK Gatersleben	Seeland, Deutschland
InkScape 0.92	Inkscape-Projekt	
Lasergene 16 SeqMan Pro	DNASTAR, Inc.	Regent St. Madison, WI, USA
MARViN	MARViTECH GmbH	Wittenburg, Deutschland
MEGA X	MEGA Software	
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
Paint.net v4.2.1	dotPDN LLC	
QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
R	R Studio	Boston, MA, USA
saRIA	IPK Gatersleben	Seeland, Deutschland
SigmaStat 4.0	Systat Software, Inpixon	Palo Alto, CA, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC	San Diego, CA, USA
ZEN 2.0 / 3.0	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland

3.6. Pflanzenmaterial

3.6.1. Donormaterial

Der Sommerweizen *T. aestivum* Zuchtlinie Bobwhite entstand in den frühen 1970ern während des Brotweizen-Programms vom CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*,

Internationales Mais und Weizen Forschungszentrum, Mexiko) durch Kreuzung von CM33203 mit der Rasse Aurora/Kalyan/Bluebird/Woodpecker, dessen Nachkommen eine hohe Variabilität hinsichtlich ihrer phänotypischen^(*) als auch agronomischen Eigenschaften aufweisen (Warburton et al., 2002). Für die Transformation^(*) verwendetes Bobwhite-Donormaterial wurde von der Universität von Florida (Institute of Food and Agricultural Science, IFAS, Gainesville, FL, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Sommergerstensorte Golden Promise (*H. vulgare* L.) entstand 1956 durch Gamma-Bestrahlung der Sorte Maythorpe (Sigurbjornsson & Micke, 1969; Forster, 2000) und wird aufgrund ihrer besonders guten Eignung bereits seit mehr als 25 Jahren für die Gerstentransformation verwendet (Wan & Lemaux, 1994).

3.6.2. Anzucht des Donormaterials

Die Anzucht von Weizen und Gerste erfolgte zunächst nach Aussaat im Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) in 150er Multitopfplatten (QuickPot) mit 33 cm³ Volumen pro Topf für 3 Wochen (Weizen) bzw. 2 Wochen (Gerste) im Klimaschrank (Heraeus Vötsch) bei 14 °C/ 12 °C (Tag/Nacht), 12 h Licht mit 400-470 µE sowie 80 % Luftfeuchtigkeit. Nach der Überführung der Pflanzen in 2 Liter-Töpfe mit Standard-Getreideerde, einem Erdgemisch im Verhältnis 2:2:1 von Substrat 2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland), Komposterde und Sand, wuchsen die Pflanzen für 10 Wochen bei 14 °C/ 12 °C (Tag/Nacht), 12 h Licht mit 400-470 µE sowie 80 % Luftfeuchte in einer Klimakammer (Heraeus Vötsch). Nach 2 Wochen erfolgte eine Düngung mit Plantacote Depot 4M-Festdünger (Manna). Anschließend wurden die Pflanzen für 3-4 Wochen in einer Gewächshauskabine mit 18 °C/ 16 °C (Tag/Nacht) und 16 h Licht mit 30 klx mit Schattierung ab 50 klx bis zur Ernte der unreifen Embryonen kultiviert. Dabei erfolgt eine wöchentliche Düngung mit Flüssigdünger Hakaphos rot (Combo Expert).

3.6.3. Pflanzenanzucht im Gewächshaus

Die Anzucht der transformierten Regenerate sowie deren Nachkommen erfolgte zunächst in 96er Multitopfplatten (QuickPot) mit 75 cm³ Volumen pro Topf im Substrat 1 in der Klimakammer (Tirabio TB11624.3) 14 °C/ 12 °C (Tag/Nacht), 12 h Licht (200 µE) und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 4-5 Wochen wurden die Pflanzen in 24 cm Töpfe in Standard-Getreideerde umgesetzt und standen im Gewächshaus bei 18 °C/ 15 °C (Tag/Nacht), 16 h Licht mit 40 klx und Schattierung ab 60 klx (Weizen) bzw. 18 °C/ 16 °C (Tag/Nacht), 16 h Licht mit 25 klx und Schattierung bei 50 klx (Gerste) bis zur Reifung der Ähren. Das Abreifen und Trocknen der Ähren fand bei 21 °C/ 19 °C (Tag/Nacht), 16 h Licht mit 30 klx und Schattierung bei 50 klx statt.

Die Anzucht der Pflanzen für den ballistischen Aktivitätstest der gRNAs in epidermalen Zellen von Weizen und Gerste erfolgte im Gewächshaus bei 22 °C/ 20 °C (Tag/Nacht), 16 h Licht mit 30 klx und Schattierung bei 50 klx.

Für die Anzucht von Pflanzenmaterial zur Protoplastenisolation^(*) wurden 35-40 Körner in Vermiculit (Kakteen Schwarz) ausgesät und bei 25 °C im Dunkeln gekeimt.

Die Anzucht der Pflanzen für die automatische Phänotypisierung der Wurzeln und des Sprosses erfolgte in Rhizotöpfen in Potgrond P Erde (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) im Gewächshaus bei 26 °C/ 20 °C (Tag/Nacht), 10 h Licht mit durchschnittlich 33 klx und maximal 68 klx sowie 33 % relativer Luftfeuchtigkeit.

3.7. Bakterien

3.7.1. Bakterienstämme

Escherichia coli Stamm XL1-blue (DNA Cloning Service, Hamburg, Deutschland)

Genotyp^(*): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

Agrobacterium Stamm AGL1 (aktuell *A. fabrum*, Lassalle et al., 2011)

Genotyp^(*): AGL0, sowie *recA::bla C58 pTiBo542ΔT Mop⁺ Cb^R* (AGL0 basierend auf EHA101 mit deletierter T-DNA^(*) und zusätzlicher Deletion des *aph* Gens) (Lazo et al., 1991)

Die taxonomische Einordnung der biotechnologisch verwendeten Agrobakterien unterliegt derzeit noch einer gewissen Dynamik, daher werden diese angesichts weiterer zu erwartender Revisionen in der vorliegenden Arbeit als *Agrobacterium* bezeichnet.

3.7.2. Herstellung kompetenter Bakterien

3.7.2.1. Herstellung hitzekompetenter *E. coli*

Zur Herstellung hitzekompetenter XL1-blue-Zellen erfolgte zunächst eine Vorkultur in 5 ml SOB bei 37 °C und 180 rpm über Nacht. Die sich anschließende Hauptkultur startete am nächsten Tag, wobei 0,5 ml der Vorkultur in 100 ml frisches SOB überführt wurden und für zwei Stunden bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀= 0,2, gemessen am Ultraspec 10 Photometer (Amersham BioSciences, Cytiva), inkubiert. Nach dem Erreichen der Dichte wurden die Bakterienzellen für 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 50 ml Lösung I aufgenommen, für 5 Minuten auf Eis gelagert und anschließend wieder für 10 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 2 ml Lösung II resuspendiert und die Zellen ruhten eine Stunde auf Eis. Anschließend wurden 100 µl der Bakterienlösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7.2.2. Herstellung elektrokompenter Agrobakterien

Zur Herstellung elektrokompenter Agrobakterien des Stamms AGL1 erfolgte zunächst eine Vorkultur in MG/L-Medium mit 50 µg/ml Rifampicin und 100 µg/ml Carbenicillin für 24 Stunden bei 28 °C und

160 rpm. Die Hauptkultur mit 500 ml MG/L-Medium mit Antibiotika und 0,5 ml der Vorkultur wurde für 20-24 Stunden bei 28 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1-1,5$, gemessen am Ultraspec 10 Photometer (Amersham BioSciences, Cytiva), inkubiert. Die Zellen ruhten anschließend für 15 Minuten auf Eis und wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Bakterienpellet 3x mit 80 ml 1mM Hepes pH 7 und 1x mit 80 ml 10 % Glycerin gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 0,5-1 ml 10 % Glycerin, je nach Menge der Zellen, aufgenommen und jeweils 45 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7.3. Bakterientransformation

3.7.3.1. Hitzetransformation von *E. coli*

Zur Transformation^(*) mittels Hitzeschock wurden Zellen von *E. coli* XL1-blue zunächst für 20 Minuten nach Zugabe des Plasmids^(*) auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und für 1 Stunde bei 37 °C in 350 µl flüssigem LB-Medium bei 450 rpm inkubiert bevor die Kultur auf LB-Festmedium mit Antibiotikum über Nacht bei 37 °C erfolgte. Kolonien wurden am folgenden Tag in 5ml Flüssigmedium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

3.7.3.2. Elektroporation von Agrobakterien

Zur Elektroporation wurde zunächst 1 µl 1:10 verdünntes Plasmid zu auf Eis gelagerten AGL1-Agrobakterien gegeben. Die Bakterien wurden anschließend in eine Elektroporationsküvette (BIO-RAD, Best.-Nr. 1652086) überführt und mittels eines Elektroschocks mit 2,5 kV Spannung, 20 µF Kapazität und 200 Ω Widerstand mittels GENE PULSER II (BIO-RAD) transformiert. Nach zügiger Zugabe von 400 µl MG/L-Medium erfolgte eine Inkubation bei 28 °C und 550 rpm für 2 h und anschließend die Überführung auf MG/L-Festmedium mit Antibiotika für 2 Nächte bei 28 °C. Ausgewählte Kolonien wurden in MG/L-Flüssigmedium mit Antibiotika über 1 Nacht bei 28 °C und 180 rpm kultiviert.

3.7.4. Glycerin-Stammkulturen

Zur langfristigen Lagerung der Bakterienkulturen wurden Glycerin-Stammkulturen erstellt. Für *E. coli* wurden 100 µl 100 % Glycerin mit 900 µl frischer Bakterienkultur im LB-Medium miteinander gemischt. Die Agrobakterien-Stammkulturen setzen sich aus einer Mischung von 250 µl 15 % Glycerin und 250 µl frischer Bakterienkultur in MG/L-Medium zusammen. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.8. Molekulare Methoden

3.8.1. Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Produkten einer Polymerasekettenreaktion (PCR) oder eines Restriktionsverdau erfolgte in der Regel bei 100-120 V und 160 mA für 20-30 Minuten über Agarose-Gele mit 1 % Agarose (SERVA, Best.-Nr. 11404.05) in 0,5 % TBE. Die Dokumentation fand am UVP Gelstudio PLUS (Analytik Jena) statt.

3.8.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurden verschiedene DNA-Polymerasen^(*) verwendet. Als Standard-Polymerase diente die *GoTaq® G2 DNA Polymerase*. Für Spezialanwendungen wurden die *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* und *PCRBIO HS VeriFi Polymerase* verwendet. Die PCR-Reaktionskomponenten wurden wie in Tabelle 9 beschrieben gemischt und die Reaktionen im Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) durchgeführt.

Tabelle 9 – Übersicht über die Zusammensetzung der 10 µl-Reaktionen der verwendeten Polymerasen

GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		Q5® HiFi DNA Polymerase (NEB)		PCRBIO HS VeriFi Polymerase (PCR BIOSYSTEMS)	
DNA	1 µl	DNA	1 µl	DNA	1 µl
Primer F (10 µM)	0,2 µl	Primer F (10 µM)	0,5 µl	Primer F (10 µM)	0,4 µl
Primer R (10 µM)	0,2 µl	Primer R (10 µM)	0,5 µl	Primer R (10 µM)	0,4 µl
5x GoTaq PCR Buffer	2 µl	5x Q5 buffer	2 µl	5x PCRBIO VeriFi buffer	2 µl
5% DMSO	0,5 µl	Q5 GC Enhancer	2 µl	10x VeriMax Enhancer	1 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl	dNTP (10 mM)	0,2 µl		
MgCl ₂ (50 mM)	0,2 µl				
GoTaq G2-Polymerase	0,1 µl	Q5-Polymerase	0,1 µl	PCRBIO HS VeriFi	0,1 µl
Wasser	5,6 µl	Wasser	3,7 µl	Wasser	5,1 µl

3.8.3. Restriktionsverdau

Der enzymatische Verdau mit einem oder zwei Restriktionsenzymen wurde, wenn nicht anders angegeben, für 30 Minuten bis 1 Stunde bei 37 °C nach Angaben des Herstellers und mit den empfohlenen Puffern durchgeführt.

3.8.4. Reinigung von Fragmenten

Die Reinigung der Produkte einer PCR oder eines Restriktionsverdau erfolgte entweder direkt mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 28106) bzw. GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Best.-Nr. K0702) oder aus einem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 28706) bzw. GeneJET Gel Extraction Kits (Thermo Scientific, Best.-Nr. K0692) nach Angaben des Herstellers.

3.8.5. Dephosphorylierung von PCR-Produkten

Um nach einem Restriktionsverdau mit nur einem Enzym eine Selbstligation des Vektors^(*) zu verhindern, erfolgte ein Dephosphorylierungsschritt mit Thermosensitiver Alkalischer Phosphatase (TSAP) für 15 Minuten bei 37 °C und eine Hitze-Inaktivierung von TSAP für 15 Minuten bei 74 °C. Der Ansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.8.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA, Plasmid-DNA und RNA erfolgte am NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Scientific, Best.-Nr. ND-2000C).

3.8.7. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die gRNA- und Zielvektor-Oligonukleotide^(*) besitzen 5'-Klonierungsüberhänge^(*). Für die gRNA-Oligonukleotide wurde zur Bindung an die BsaI-Schnittstellen am Vorwärtsprimer^(*) TGGC bei Verwendung des *OsU3*-Promotors^(*) bzw. CTTG im Falle des *TaU6*-Promotors angehängen sowie am Rückwärtsprimer AAAC. Bei den Zielvektoren wurden entsprechend der BamHI und EcoRI-Schnittstellen am Vorwärtsprimer ein GATC-Überhang und am Rückwärtsprimer ein AATT-Überhang angefügt. Beide auf 10 µM verdünnten Oligonukleotide wurden mittels des Programmes „Hybridisierung der gRNA-Oligonukleotide“ im Thermocycler (Eppendorf) miteinander hybridisiert (Tabelle A2). Für eine anschließende Ligation wurden 3 µl eingesetzt.

3.8.8. Vektor-Insert-Ligationen

Die Ligationen von Fragmenten in Vektoren erfolgte mittels Quick Ligase Kit oder T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C nach Angaben des Herstellers. Wenn nicht anders angegeben wurde für die Ligation ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 mit 50 ng Vektorplasmid verwendet. Die Berechnung der Mengen erfolgte mit Hilfe eines Online-Tools (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

3.8.9. Gibson-Assemblierung

Für die Gibson-Assemblierung wurde zunächst mittels NEBuilder® Assembly Tool (NEB, <https://nebuilder.neb.com/>) die Oligonukleotide mit Überhängen für die Assemblierung ausgewählt. Für die Assemblierungsreaktion wurden das Vektor- und das Insertfragment entsprechend ihrer Molaritäten mit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, Best.-Nr. E2621S) nach Angaben des Herstellers gemischt (<https://www.neb.com/protocols/2014/11/26/nebuilder-hifi-dna-assembly-reaction-protocol>). Die Reaktion für 2 Fragmente erfolgte für 15 Minuten bei 50 °C.

3.8.10. Golden-Gate-Klonierung

Die Golden-Gate-Klonierung vereint den Schritt des Restriktionsverdau mit der Ligation. Hierfür wurden 15 ng Zielvektor und je 75 ng der jeweiligen Modulvektoren mit 0,5 µl/ 10 µl-Ansatz

Restriktionsenzyme Bsal (NEB) oder Esp3I/BsmBI und 0,5 µl/ 10 µl-Ansatz T4 DNA Ligase (NEB) mit 0,5 µl 10 mM ATP und 1 µl 10x CutSmart-Puffer (NEB, Best.-Nr. B7204S) gemischt. Die Reaktion erfolgte mit dem Programm „Golden Gate Klonierung“ (Tabelle A2) im Thermocycler (Eppendorf).

3.8.11. TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei der Amplifikation von PCR-Produkten mittels einer Taq-Polymerase kommt es zur Hinzufügung nichtkomplementärer Desoxyadenosinnukleotide an den 3'-Enden des Fragmentes. Dies ermöglicht eine Ligation mit linearisierten Vektoren, die entsprechend komplementäre Überhänge besitzen. Für diese sogenannte TA-Klonierung wurden 50-100 ng PCR-Produkt mit 0,5 µl pGEM-T easy-Vektor (Promega, Madison, WI, USA) gemischt und mittels Quick Ligase ligiert. Nach der Transformation erfolgte die Selektion mit Ampicillin. Nach Auswahl der Klone wurde aus 0,2-0,5 µl Flüssigkultur mittels illustra™ TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, Best.-Nr. 25-6400-10) DNA amplifiziert und diese über Sanger-Sequenzierung (IPK Sequenzierservice, Gatersleben, Deutschland) auf Klonierungsfehler untersucht.

3.8.12. Erstellung von A-Überhängen für TA-Klonierung

Im Falle einer Amplifikation mit so genannten *High-Fidelity*-Polymerasen, welche eine besonders hohe Genauigkeit besitzen, kommt es nicht wie in 3.8.11. beschrieben zu einer Bildung von 3'-Überhängen mit einem Desoxyadenosinnukleotid. Um dies nachträglich an PCR-Produkte anzufügen wurden ca. 200 ng PCR-Produkt mit 1 µl dATP (10 mM) mit *GoTaq® G2 DNA Polymerase* und zugehörigem Puffer gemischt und für 2 Minuten bei 95 °C sowie 30 Minuten bei 72 °C inkubiert.

3.8.13. Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (Mini, Midi)

Zur Kontrolle der Plasmide nach erfolgter Transformation in Bakterien erfolgte eine Extraktion der Plasmid-DNA aus 2-4 ml Flüssigkultur mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 27106) bzw. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Best.-Nr. K0503) nach Angaben der Hersteller. Für Agrobakterien wurde das Volumen der zugegebenen Puffer (Resuspension, Lyse und Neutralisation) bei Verwendung des GeneJET-Kits verdoppelt.

Um größere Mengen Plasmids für die Übertragung in Pflanzenzellen oder –protoplasten zu erhalten, wurde das Plasmid aus 50 ml Bakterienkultur mittels Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Best.-Nr. 12143) oder ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research, Best.-Nr. D4200) extrahiert.

3.8.14. Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung von PCR-Fragmenten oder Plasmid-DNA erfolgte durch den internen IPK Sequenzierservice (Gatersleben, Deutschland) oder durch eine externe Firma (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland). Bei Letzterer wurde in der Regel der Modus *Ready2Run* mit vorpipettierten Primeren verwendet. Als Sequenzierprimer dienten für die genotypische Analyse der Pflanzen CH24

(*Bh-A*), CH29 (*Bh-B*), CH5 (*Bh-D*), CH57 (*Spl14* Exon 2), CH142 (*Spl17* Exon 2), CH144 (*Vrs4*), CH60 (*Spl14* Exon 3) und CH64 (*Spl17* Exon 3) (Tabelle A1). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels *SeqMan Pro* (DNASTAR Lasergene 16).

3.9. Klonierung der Plasmide

3.9.1. Klonierung generischer Vektoren

3.9.1.1. pSH121

Der gRNA/*cas9*-Vektor pSH121 (Abbildung A5c) wurde bereits vorher in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie am IPK Gatersleben erstellt (Gerasimova et al., 2018; 2020; GenBank-ID: MW145140.1).

3.9.1.2. pSH180 & pNB38

Der Erstellung des für die Weizentransformationen genutzten gRNA/*cas9*-Vektors pNB38 ging die Klonierung^(*) des gRNA-Vektors pSH180 voraus. Hierfür wurde der vorher in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie am IPK Gatersleben erstellte bisherige gRNA-Vektor pNB37 (Abbildung A5a) und der neu synthetisierte (GenScript Biotech (Netherlands) B.V., Leiden, Niederlande) *TaU6*-Promotor (Wang et al., 2014) mit HindIII verdaut, die Fragmente aus einem Agarosegel gereinigt und der pNB37-Rahmen anschließend dephosphoryliert. Danach erfolgte die Ligation des neuen *TaU6*-Promotors in 50 ng pNB37-Hintergrund zu pSH180 (Abbildung A5d). Nach durchgeführter *E. coli*-Transformation erfolgte die Selektion mittels Kanamycin. Das extrahierte Plasmid wurde mit HindIII zur Kontrolle der korrekten Ligation verdaut und für die Sequenzierung der Sequenzierprimers pSH91_S1 verwendet.

Um pNB38 (Abbildungen A4b, A5b) herzustellen wurden pSH180 und pSH121 mit dem HindIII-Enzym verdaut und das *TaU6*-gRNA-Fragment (pSH180) und das Fragment des Plasmidrahmens mit *cas9*-Kassette (pSH121) aus einem Agarosegel gereinigt. Das pSH121-Fragment wurde dephosphoryliert und beide Fragmente miteinander zu pNB38 ligiert. Der Testverdau erfolgte über HindIII und die Sequenzierung mit pSH91_S1.

3.9.1.3. pSH178 & pSH179

Für den generischen^(*) gRNA/*cas9*-Vektor pSH179 musste zunächst der Cas9-Vektor pSH178 zusammengesetzt werden. Dafür wurde der vorher in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie am IPK Gatersleben erstellte gRNA/*cas9*-Vektor pSH162 (Abbildung A6a) mittels der *Fast Digest* Enzyme HindIII und NotI verdaut um den Plasmidrahmen mit *cas9* zu erhalten. Parallel dazu erfolgte eine Amplifikation des doppelt-verstärkten *35S*-Promotors (*2x35S*) des Blumenkohlmosaikvirus vom mCherry-Vektor pNB2 (Abbildung A4d, A8b) über die Primer CH48 und CH49 mittels *Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase* und eine anschließende Reinigung des korrekten PCR-

Fragmentes aus dem Gel. Anschließend wurden mittels GoTaq® G2 DNA Polymerase Desoxyadenosin-Nukleotid-Überhänge an die 3'-Enden des Q5-PCR-Produktes hinzugefügt und das Produkt anschließend erneut gereinigt. Dieses wurde im Rahmen einer TA-Klonierung in einem pGEM-T easy-Vektor über die TA-Überhänge kloniert. Nach der Transformation in *E. coli* wurden die isolierten Plasmide mittels HindIII und NotI testverdaut sowie mit Hilfe des T7prom-Primers von LGC Genomics (Berlin, Deutschland) sequenziert. Unter Anwendung der Enzyme HindIII und NotI wurde das 2x35S-Promotor-Fragment herausgeschnitten, aus einem Agarosegel gereinigt und mit dem pSH162-Fragment ligiert, um pSH178 (Abbildung A6b) zu erhalten. Die Klone wurden mittels des pSH91_S1-Primers sequenziert.

Um pSH179 (Abbildung A4a, A6c) zu erhalten wurden pSH178 und pSH180 (siehe 3.9.1.2.) mit HindIII verdaut und die Fragmente des Plasmidrahmens mit *cas9* (aus pSH178) sowie die *TaU6*-gRNA-Kassette (aus pSH180) über ein Agarosegel gereinigt. Das pSH178-Fragment wurde anschließend dephosphoryliert und im Anschluss beide Fragmente miteinander ligiert. Der Testverdau erfolgte über HindIII und NotI und die Sequenzierung mit pSH91_S1.

3.9.1.4. pSH182 & pSH183

Die Herstellung des generischen Cytidin-Deaminase-Vektors pSH183 erfolgte bereits vorher in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie am IPK. Hierfür wurde zunächst der Vektor pSH181 (Abbildung A7a) durch Einsatz des synthetisierten (GenScript Biotech (Netherlands) B.V., Leiden, Niederlande) Fragmentes *SV40-NLS_APOBEC1_XTEN_Bsal_Bsal-SGGS_UGI_SV40-NLS* in pSH163, einem modifiziertem pUC57-Vektor, generiert. Außerdem wurde mittels PCR-Modifikation eine D10A-Mutation in der RuvC-Nuklease-Domäne von *cas9* gesetzt und der Vektor pSH149 (Abbildung A7b) erstellt. Diese Nickase^(*) (n)Cas9 kann nur noch Einzelstrangbrüche mittels der funktionellen HNH-Nuklease-Domäne induzieren. Die *ncas9*-Kassette aus pSH149 (mit pSH149_Gib-F und pSH149_Gib-R, Tabelle A1) und der pSH181-Rahmen (mit pSH181_Gib-F und pSH181_Gib-R, Tabelle A1) wurden mittels Q5® High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert und über ein Agarose-Gel gereinigt. Anschließend erfolgte eine Gibson-Assemblierung zu pSH182 (Abbildung A7c), welcher in *E. coli* transformiert wurde. Für die Selektion positiver Klone wurde Ampicillin verwendet. Die extrahierten Plasmide wurden mit SacI testverdaut und sequenziert.

Zur Erstellung von pSH183 (Abbildung A7d) wurden die Vektoren pSH182 und pSH121 mit SacI und NotI verdaut und der Plasmidrahmen mit gRNA-Kassette und *ZmUbi1*-Promotor (aus pSH121) sowie das APOBEC-*ncas9*-Fragment (aus pSH182) aus einem Agarosegel gereinigt und miteinander ligiert. Die Selektion der nach der Transformation entstandenen Klone erfolgte über Kanamycin. Für den Testverdau wurden SacI und XhoI verwendet und die Sequenzierung mit pSH91_S6 und pSH91_S11 durchgeführt.

3.9.1.5. Vektoren des modularen CasCADE Vektorsystems (CasCADE-Vektoren)

Diese Vektoren wurden in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie am IPK erstellt (Hoffie et al., 2023). Sie basieren auf einem modifizierten pUC57-Plasmidrahmen und beinhalten Restriktionsschnittstellen für Golden Gate Klonierungen. Verwendet wurden das gRNA-Modul für Position 1 (von 4) mit *TaU6*-Promotor (pIK5), der gRNA-Assemblierungsvektor für eine gRNA (pIK89), ein Modul mit der Adenosin-Deaminase *ecTadA-ecTadA** und *ncas9* unter Kontrolle des *ZmUbi1*-Promotors (pSH273), ein Modul mit multipler Klonierungsstelle (pIK23) und der finale Assemblierungsvektor (pIK48) (Abbildung A9). Die Verknüpfung der verschiedenen Module erfolgt durch passende Überhänge, die durch den Verdau der Modulvektoren mittels der Typ IIS Restriktionsenzyme BsaI (gRNA-Modul und finale Assemblierung), Esp3I/BsmBI (gRNA-Assemblierung) und SapI (*cas9*-Expressionsmodul) entstehen.

3.9.2. Klonierung der Intermediärvektoren für Weizen und Gerste

3.9.2.1. Kandidatengene & Auswahl von Zielmotiven

Die Sequenzinformationen zu Weizen *Branched head/ Wheat frizzy panicle* wurden *ENSEMBLE* (*ENSEMBLE Gramene*, <http://ensembl.gramene.org/index.html>) entnommen.

Die in Gerste vorhandenen orthologen^(*) Gene von Reis *SPL14* und *SPL17* wurden durch eine phylogenetische Analyse von verschiedenen *SPL*-Genen der Gerste im Vergleich zu Reis, Weizen, Arabidopsis, Sorghumhirse und Mais ermittelt. Die Proteinsequenzen der Gersten-*SPL*-Vertreter wurden der Plattform *BARLEX* (Colmsee et al., 2015; <https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>) entnommen. Die Aminosäuresequenzen der *SPL*-Vertreter anderer Spezies wurden über die Plattformen von *NCBI* (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Die phylogenetische Analyse wurde mittels *MEGA X* (Mega Software) durchgeführt.

Die Auswahl von Zielmotiven^(*) erfolgte *in silico*^(*) durch die Nutzung der *guide* (g)RNA-Aktivitäts-Vorhersageplattformen *DeskGen* (Doench et al., 2014; 2016; <https://www.deskgen.com/>) und *WU-CRISPR* (Wong et al., 2015; <http://crispr.wustl.edu/>) und die Analyse der gRNA-Sekundärstruktur mittels *RNAfold* (Gruber et al., 2008; Lorenz et al., 2011; <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

3.9.2.2. Vektoren zur zielspezifischen Mutagenese von Weizen und Gerste

Als generische Vektoren wurden die Konstrukte pSH179 (Abbildungen A4a, A6c) und pNB38 (Abbildungen A4b, A5b) für Weizen und pSH121 (Gerasimova et al., 2018; 2020; Abbildung A5c) für Gerste verwendet. Die Expression von gRNA bzw. *cas9* erfolgt in pSH121 über den *OsU3*-Promotor bzw. den Mais *POLYUBIQUITIN 1 (ZmUbi1)*-Promotor mit Intron im 5'-UTR. Die Vektoren pSH179 und

pNB38 besitzen beide einen *TaU6*-Promotor (Wang et al. 2014) für die Expression der gRNA. Zur Expression von *cas9* wird in pSH179 der doppelt verstärkte 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus verwendet, in pNB38 der *ZmUbi1*-Promotor.

pSH179/pNB38/pSH121 wurden mittels Bsal/Eco31I geschnitten und das gRNA/*cas9*-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert. Die beiden entsprechenden gRNA-Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert und mittels der Überhänge (*OsU3*-Promotor: TGGC, *TaU6*-Promotor: CTTG sowie am gRNA-Rahmen: AAAC) in den generischen Vektor ligiert. Die Selektion der Klone erfolgte über Kanamycin und die Sequenzierung der Klone unter Verwendung des Sequenzierprimers pSH91_S1. Die erstellten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

3.9.2.3. Baseneditierungsvektoren

a) Cytidin-Deaminase APOBEC1

Für die Klonierung des Cytidin-Deaminase-Konstruktes wurde der generische Vektor pSH183 verwendet (Abbildungen A4g, A7d). Dieser besitzt einen *OsU3*-Promotor zur Expression der gRNAs und einen *ZmUbi1*-Promotor für die *cas9*-Expressionskassette. Diese setzt sich wie folgt zusammen: *SV40-NLS_APOBEC1_XTEN-Linker_ncas9(D10A)_SV40-NLS_SGGS-Linker_UGI_SGGS-Linker_SV40-NLS*

Die Cytidin-Deaminase *APOBEC1* stammt aus der Ratte (*Rattus norvegicus*) und wurde für Pflanzen Codon-optimiert (Zong et al., 2017). Auch der XTEN-Linker und der Uracil-Glykosylierungsinhibitor (*UGI*) wurden wie bei Zong et al. (2017) beschrieben verwendet. Die Cas9-Endonuklease enthält eine D10A-Mutation und kann somit nur einen der DNA-Stränge schneiden.

Die hybridisierten gRNA-Oligonukleotide der Zielmotive *Sp14/17-gRNA3-1* und 3-3 (Tabelle 42) wurden in das Plasmid pSH183, welches vorher mit dem Enzym Bsal/Eco31I-verdaut und gereinigt wurde, ligiert. Nach Kanamycin-Selektion erfolgte die Kontrolle der Klone durch Sequenzierung mit pSH91_S1. Die beiden erstellten Plasmide sind pCH39 (*gRNA3-1*) und pCH40 (*gRNA3-3*).

b) Adenosin-Deaminase ecTadA

Zur Klonierung des Adenosin-Deaminase-Konstruktes wurde das modulare CasCADE-Vektorsystem genutzt (Hoffie et al., 2023). Die Klonierung des finalen Intermediärvektors erfolgt dabei in drei Schritten (Abbildung A9):

Schritt 1: Erstellung des gRNA-Moduls pCH61 (Sp14/17-gRNA3-2)

Der gRNA-Modulvektor pIK5 wurde mit Bsal verdaut und aus einem Agarosegel extrahiert. Die gRNA-Oligonukleotide für *Sp14/17-gRNA3-2* wurden miteinander hybridisiert und in pIK5 ligiert und in *E. coli* transformiert. Die Selektion der Klone erfolgte über Ampicillin und die Sequenzierung der Plasmide mit IK70.

Schritt 2: Erstellung des gRNA-Assemblierungsvektors pCH64

Im zweiten Schritt wurde eine Golden Gate-Reaktion durchgeführt, um das gRNA-Modul pCH61 in das gRNA-Assemblierungsmodul pIK89 einzufügen. In der Golden Gate-Reaktion erfolgte ein Restriktionsverdau mit Esp3I/BsmBI. Nach der Transformation in *E. coli*-Zellen wurde mittels Spectinomycin selektiert und die Untersuchung positiver Klone erfolgte durch eine Kolonie-PCR mit den Primern IK70 und IK71. Die extrahierten Plasmide wurden mittels HincII testverdaut und mit IK70 sequenziert.

Schritt 3: Erstellung des finalen Intermediärvektors pCH66

Die finale Assemblierung war erneut eine Golden Gate-Reaktion, wobei der Restriktionsverdau mit BsaI erfolgte. Als Assemblierungsvektor diente pIK48, in den das gRNA-Modul aus pCH64, das Adenosin-Deaminase-*ncas9*-Modul aus pSH273 und die Multiple Klonierungsstelle aus pIK23 eingesetzt wurden. Das Adenosin-Deaminase-*ncas9*-Modul umfasst den *ZmUbi1*-Promotor für die *ncas9*-Expression sowie folgendes Transkriptionsprodukt^(*), welches nahezu vollständig von Li et al., 2018a übernommen wurde: *ecTadA_32aa-Linker_ecTadA*_32aa-Linker_ncas9 (D10A)_SGGS-NLS_SGGS-NLS_SGGS_NGS*.

Für die Selektion der Klone wurde Ampicillin verwendet und für die sich anschließende Kolonie-PCR wurden Bie475- und zCas9-R1-Primer unter Verwendung des Cas-Test PCR-Programmes benutzt. Die nachfolgende Sequenzierung der Plasmide wurde mittels der Sequenzierprimer IK70 und IK71 durchgeführt. Der entstandene pCH66-Vektor ist in Abbildung A8c dargestellt.

3.9.3. Klonierung der Zielvektoren für den ballistischen Test

Für die Klonierung der Zielvektoren des ballistischen Aktivitätstests wurde der generische Vektor pNB1 verwendet (Budhagatapalli et al., 2016, GenBank-ID: KU705395; Abbildungen A4c, A8a). Dieser enthält ein synthetisches YFP, welches durch einen doppelt-verstärkten 35S Promotor des Blumenkohlmosaikvirus exprimiert wird und ein für das Endoplasmatische Retikulum gerichtetes Signalpeptid des Legumin B4-Gens von *Vicia faba* umfasst.

Zunächst erfolgte der Verdau von pNB1 mit den Fast Digest-Enzymen BamHI und EcoRI um das Zielmotiv vor YFP einzufügen. Das pNB1-Fragment wurde aus einem Agarosegel extrahiert. Die Zielmotiv-Oligonukleotide, die den zielspezifischen Abschnitt der gRNA, die zugehörige PAM und ein nachfolgend angefügtes C-Nukleotid zur Verschiebung des YFP-Leserahmens enthalten, wurden miteinander hybridisiert und über ihre Überhänge (BamHI: GATC, EcoRI: AATT) in das pNB1-Fragment ligiert. Die Selektion der Klone fand mittels Ampicillin statt und die extrahierten Plasmide wurden mit 2x35S_F1 sequenziert.

3.9.4. Klonierung der Binärvektoren

Als Binärvektor diente der Vektor p6i-d35S-TE9 (p6i, DNA Cloning Service, Hamburg, Germany, Abbildung A8d). Dieser umfasst das Hygromycin-Resistenzgen *hygromycin phosphotransferase (hpt)* mit dem portablen Intron 2 (PIV2) des Kartoffelgens *ST-LS1* (Vancanneyt et al., 1990) unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-Promotors *35S* sowie des Terminators^(*) der kleinen Untereinheit des Erbsen *RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATCARBOXYLASE (rbcS) E9-Gens (E9-T)*, ein Spectinomycin-Resistenzgen zur Bakterienselektion sowie Replikationsstarts für *E. coli* (ColE1) und *Agrobacterium* (pVS1).

Zunächst wurden die Intermediärvektoren und der p6i-Vektor mit dem Restriktionsenzym SfiI für 3-4 Stunden bei 50 °C verdaut, die Produkte (gRNA/*cas9*-Expressionskassetten sowie der p6i- Rahmen) aus einem Agarosegel extrahiert und deren Konzentration bestimmt. Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung des p6i-Fragments. Die Ligation der gRNA/*cas9* Expressionskassetten in 50 ng p6i fand über Nacht bei 4 °C statt. Mittels Spectinomycin wurden nach der Transformation positive Klone selektiert, die extrahierten Plasmide über einen Testverdau mit NotI und XhoI kontrolliert und mit CH159 und CH160 sequenziert (Abbildungen A4e, f, g).

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von Gerste wurden die Binärvektoren in den Agrobakterien Stamm AGL1 mittels Elektroporation transformiert. Die Selektion erfolgte über Rifampicin, Carbenicillin und Spectinomycin und der Testverdau der extrahierten Plasmide über die Restriktionsenzyme NotI und XhoI.

3.10. Ballistischer Aktivitätstest in Epidermiszellen von Weizen- und Gerstenblättern

Der ballistische Aktivitätstest wurde wie beschrieben durchgeführt (Budhagatapalli et al., 2016). Hierfür wurden 11 Tage junge Blätter im Zweiblattstadium geerntet, wobei für Weizen 11 Blätter und für Gerste 5-7 Blätter pro Petrischale nötig sind. Es wurde jeweils das zweite, jüngere Blatt verwendet. Für jedes zu testende gRNA/*cas9*-Plasmid wurden in der Regel 2 Petrischalen in 2 unabhängigen Experimenten verwendet. Die Blätter wurden mit der Blattunterseite nach oben auf 1 % Phytigel mit Benzimidazol und Chloramphenicol in Petrischalen gelegt und mittels zweier Stabmagneten fixiert, um das Aufrollen der Blätter zu verhindern (Abbildung A1c).

Für den Beschuss musste zunächst das Gold mit der Plasmid-DNA beschichtet werden. Für dieses *Coating* wurden zunächst 30 mg Goldpulver mit 1 µm Partikelgröße (BIO-RAD, Best.-Nr. 1652263) mit 1 ml reinem Ethanol überschichtet, zentrifugiert und in 1 ml frischem Ethanol resuspendiert. Die Goldpartikel wurden im Ultraschallbad getrennt und pro zu testendem gRNA/*cas9*-Konstrukt und vorbereiteter Platte 50 µl (entspricht 1,5 mg Gold) in jeweils ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, zentrifugiert und 3x mit 100 µl sterilem Wasser gewaschen. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Gold in einer vorberechneten Menge Wasser resuspendiert, welche abhängig

vom DNA-Volumen war. Die Partikel wurden kurz im Ultraschallbad getrennt und unter Schütteln erfolgte zunächst die Zugabe von DNA. Es wurden 7 µg für gRNA/*cas9*-Vektoren, Zielvektoren und pNB1 (Abbildung A8a) als YFP-Kontrolle verwendet sowie 2 µg von pNB2 (Abbildung A8b) als Transformationskontrolle, wobei das Gesamtvolumen mit dem für die Goldsuspension verwendeten Wassers nicht mehr als 30 µl betragen sollte. Die Positivkontrolle umfasste pNB1 und pNB2, die Negativkontrolle einen Zielvektor und pNB2. Für den Test wurden ein gRNA/*cas9*-Vektor, ein Zielvektor und pNB2 miteinander gemischt.

Anschließend wurden unter Schütteln der Goldlösung 25 µl 2,5 M CaCl₂ und 10 µl 0,1 M Spermidin zugegeben und die Mischung für weitere 2 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die beschichteten Goldpartikel abzentrifugiert, der Überstand entfernt und zweimal mit 1 ml reinen Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand komplett entfernt und das Goldpellet in 60 µl reinem Ethanol pro Petrischale resuspendiert. Eine kurze Behandlung im Ultraschallbad trennte die Goldpartikel voneinander.

Der Beschuss erfolgte mit einer PDS-1000/He-Partikelkanone (BIO-RAD), wobei 30 µl beschichtete Goldpartikel pro Beschuss verwendet wurden und auf 7 vorher mit 100 % Ethanol gewaschenen Makro-Carrier-Plättchen (BIO-RAD) verteilt wurden. Der Beschuss fand bei 1100 psi und einem Vakuum von 27 Zoll Quecksilbersäule mit Hilfe eines 7-Schusskanal-Adapters statt. Die Blätter wurden zweimal beschossen, um die Effizienz zu erhöhen.

Nach dem Beschuss mit Goldpartikeln wurden die Blätter für 2 Nächte im Dunkeln bei Raumtemperatur auf Blattmedium inkubiert. Die Auswertung des Experimentes auf transformierte Epidermiszellen erfolgte am Konfokalen Laser-Rastermikroskop (*Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM) LSM780 (Carl Zeiss) unter Verwendung der ZEN 2 Software (Carl Zeiss). Für die Untersuchung der YFP-Fluoreszenz wurde mittels eines 488 nm bzw. 514 nm Lasers angeregt, um Signale von 517-560 nm darzustellen. Für die mCherry-Fluoreszenz wurde 561 nm-Laser verwendet und die Signale von 570-620 nm dargestellt. Es wurden 5 Weizenblätter bzw. 3 Gerstenblätter pro Petrischale ausgewertet.

3.11. Transformationsmethoden

3.11.1. Transfektion von Protoplasten

Die Transfektion^(*) von Protoplasten^(*) erfolgte nach Shan et al. (2014) und Gerasimova et al. (2018). Weizen wurde 10 Tage vor der Ernte ausgesät, Gerste 7 Tage. 30 Keimlinge wurden geerntet, mit 70 % Ethanol abgesprüht und auf autoklavierten Papiertüchern getrocknet. Die Blätter wurden mittels einer Rasierklinge in kleinste Stücke geschnitten, wobei es vermieden wurde, das Gewebe zu zerreißen. Die Blattstücke wurden zunächst in 1,5 ml steriles Wasser in einer Petrischale mit 4 Filterscheiben überführt und anschließend in Plasmolyse-Lösung gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden die Blattstücke mittels eines 40 µm Nylon-Siebs von der Plasmolyse-Lösung getrennt und in 50

ml Enzymlösung überführt, welche frisch hergestellt wurde. Zunächst erfolgte eine Vakuuminfiltration mit der Enzymlösung für 30 Minuten bei 500 mbar in einem Vakuum-Exsikkator und anschließend eine Inkubation für 6 Stunden bei 25 °C und 60 rpm. Der enzymatische Verdau fand lichtgeschützt statt. Anschließend wurden 50 ml W5 zugegeben, die Zellsuspension durch einen 40 µm Nylon-Sieb in einen 250 ml Reaktionskolben gegeben und dreimal mit 50 ml W5 gespült. Die Suspension wurde auf sechs 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-one) verteilt und die restlichen Zellen mittels 50 ml W5 ebenfalls aus dem Enzymkolben gespült. Die 50 ml-Röhrchen wurden für 3 Minuten bei 80 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Protoplasten-Pellets in 500 µl W5 aufgenommen und in ein 7 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Protoplasten für mindestens 30 Minuten auf Eis gelagert, wobei sich die Zellen am Grund des Röhrchens absetzten. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgenommen und die Protoplasten in 1 ml MMG resuspendiert. 100 µl Protoplasten wurden in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und am *PrimoVert-Mikroskop* (Carl Zeiss) überprüft und gezählt. Anschließend wurden die Protoplasten in MMG auf eine Endkonzentration von $2,5 \times 10^6$ verdünnt. Für die anschließende Transfektion der Protoplasten wurden 500.000 Protoplasten (ca. 100-200 µl) mit 20 µl DNA (20 µg) in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und das gleiche Volumen frisch hergestellte Polyethylenglykol- (PEG) Lösung hinzugegeben. Die Protoplasten-DNA-PEG-Mischung wurde vorsichtig invertiert und angetippt, um die Komponenten gut miteinander für die Transfektion zu vermischen. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln, bevor das doppelte Volumen W5 zugegeben und erneut geschwenkt wurde. Die Protoplasten wurden 3 Minuten bei 80 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, in 1 ml W5 aufgenommen und in 3,5 cm oberflächenbehandelte Schalen (Greiner BioOne Cellstar RNAase & DNase free) mit breiter Pipettenspitze überführt. Anschließend wurden die Zellen für 48-72 h bei 21-23 °C im Dunkeln inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Dokumentation der Protoplasten mit Hellfeld und GFP-Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop *Axiocvert 200M* (Carl Zeiss) mit Axiocam 506 color und *ZEN3-Software* (Carl Zeiss) um die Transfektionseffizienz zu bestimmen (Anteil grün-fluoreszierender Zellen).

3.11.2. Sterilisation der Karyopsen

Zur Abtötung in der Zellkultur unerwünschter Bakterien und Sporen wurden die vorher auf Eis geernteten, unreifen Karyopsen^(*) von Gerste und Weizen zunächst für 3 Minuten in 70 % Ethanol gegeben und anschließend 15 Minuten schüttelnd in 2,4 % Natriumhypochlorit (NaClO) (Carl Roth) inkubiert. Zur Entfernung von NaClO wurden die Karyopsen 5-mal mit sterilem Wasser gewaschen.

3.11.3. Ballistischer DNA-Transfer in Weizenembryos

Die Weizen-Transformation wurde in Anlehnung an Ismagul et al. (2014) in modifizierter Form durchgeführt. Die unreifen Embryonen wurden mittels Lanzettadel aus oberflächensterilisierten Karyopsen isoliert und mit dem Scutellum nach oben auf Dunkelmedium gegeben, wobei die Hälfte

der Embryonen der Experimente WCH1, WCH2 und WCH3 auf Dunkelmedium mit zusätzlichen 30 mg/l Centrophenoxin überführt wurden. Die Vorkultivierung erfolgte für 5 Tage im Dunkeln bei 24 °C mit 50 Embryonen pro Platte, bevor diese auf Osmotikum-Platten überführt wurden. Diese Behandlung dient dem Wasserentzug aus den Zellen, damit diese beim anschließenden ballistischen DNA-Transfer nicht zerreißen. Die Inkubation verlief für 4-6 h im Dunkeln bei 24 °C. Die 50 Embryonen wurden wegen des folgenden ballistischen DNA-Transfers zentral in der Mitte der Platte angeordnet.

Die Beschichtung der Goldpartikel, das *Coating*, wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt (Tabelle 10): 25 µl Gold mit 0,6 µm Partikelgröße (BIO-RAD, Best.-Nr. 1652262) aus einer Glycerin-Stammlösung mit 60 mg/ml Gold (entspricht 1500 µg Gold pro *Coating*) wurden mit 25 µl 50 % Glycerin, Plasmid-DNA, 20 µl Spermidin und 50 µl CaCl₂ gemischt und für 4 Minuten geschüttelt. Die Menge der eingesetzten Plasmid-DNA entspricht 2,5 µg für WCH2 und WCH3, 4 µg für WCH1 und WCH4A/1 und 8 µg für WCH4A/2. Danach wurden die Goldpartikel kurz abzentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und 140 µl 70 % Ethanol dazugegeben. Nach kurzer Zentrifugation und Entfernen der Flüssigkeiten wurden 140 µl reinen Ethanols dazugegeben und 1 Minute bei 20000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut abgesaugt und die DNA-beschichteten Goldpartikel in 60 µl (WCH1, WCH4) bzw. 75 µl (WCH2, WCH3) reinem Ethanol aufgenommen. Allgemein wurden pro Schuss 5 µl beschichtetes Gold eingesetzt. Der Beschuss erfolgte an einer *PDS-1000/He*-Partikelkanone (BIO-RAD) bei einem Vakuum von 27 Zoll Quecksilbersäule und einem Beschussdruck von 1100 psi.

Tabelle 10 – *Coating-Tabelle der ballistischen Weizentransformationen*

Experiment	Plasmide	µg DNA pro Coating	Endvolumen Coating [µl]	µg Gold pro Schuss	µg DNA pro Schuss
WCH1	pCH28/pCH29	4 (je 2)	60	125	0,33 (0,17+0,17)
WCH2	pCH28	2,5	75	100	0,17
WCH3	pCH29	2,5	75	100	0,17
WCH4A/1	pCH28/pCH29	4 (je 2)	60	125	0,33 (0,17+0,17)
WCH4A/2	pCH28/pCH29 +p326PSY +pHOR CRTI (visuelle Marker)	8 (je 2)	60	125	0,66 (4x0,17)

Nach dem ballistischen DNA-Transfer wurden die Embryonen weiter auf Osmotikum über Nacht im Dunkeln bei 24 °C inkubiert und am nächsten Tag auf Dunkelmedium überführt, wobei die Hälfte der Embryonen der Versuche WCH1, WCH2 und WCH3 während der gesamten nachfolgenden Kallusinduktion auf Dunkelmedium mit zusätzlich 5 mg/ml Centrophenoxin gegeben wurden. Die Platten mit je 25 Embryonen wurden für 7 Tage im Dunkeln bei 24 °C kultiviert. Anschließend wurden die Embryonen auf frisches Dunkelmedium mit 20 mg/l Hygromycin (außer WCH4) überführt und 14 Tage im Dunkeln bei 24 °C kultiviert bevor sie für 7 Tage auf neues Dunkelmedium mit 50 mg/l Hygromycin (außer WCH4) unter gleichen Bedingungen übertragen wurden. Die Kallus-bildenden Embryonen wurden anschließend auf Regenerationsmedium Spross überführt, welches außer bei

WCH4 25 mg/l Hygromycin enthielt. Die Kultur von je 16 Embryonen pro Platte erfolgte bei 24 °C und 10 Stunden Licht/Tag für 6 Wochen, wobei alle 2 Wochen das Medium gewechselt wurde. Sprossbildende Kallusformationen wurden anschließend für 2 Wochen bei Licht und 24 °C auf Regenerationsmedium Wurzel gegeben, welches außer bei WCH4 20 mg/l Hygromycin enthielt. Wurzelbildende Pflänzchen wurden in Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) gepflanzt und in einer Klimakammer weiter kultiviert.

3.11.4. Agrobakterien-vermittelter Plasmidtransfer in Gerstenembryonen

Die Transformation von Gerste erfolgte nach Marthe et al. (2015). Die verwendeten Agrobakterien-Stammkulturen wurden in 10 ml MG/L-Medium ohne Selektionsdruck über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Parallel erfolgte die Isolation der unreifen Embryonen mittels Lanzettadel und Pinzette. Die Coleoptile wurde entfernt und 30 frisch isolierte Embryonen in 3 ml frisches BCCM-Medium überführt. Anschließend wurde das BCCM abgesaugt und 600 µl Agrobakterienkultur mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 2$ bis 2,5, gemessen am Ultraspec 10 Photometer (Amersham BioSciences, Cytiva), hinzugefügt. Es erfolgte eine Vakuuminfiltration in einem Exsikkator für 1 Minute bei 600 mbar und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Die Embryonen wurden anschließend mit 2,5 ml BCCM gewaschen, das Medium abgesaugt und neues BCCM hinzugefügt. Die Inkubation fand bei 21 °C im Dunkeln für 48-72 h statt. Im Anschluss wurden die Embryonen mit dem Scutellum zum Medium gerichtet auf BCIM-Platten überführt, wobei 10 Embryonen pro Platte kultiviert wurden. Die Inkubation war für 4 Wochen bei 24 °C im Dunkeln, wobei nach 2 Wochen eine Überführung der Embryonen auf frisches BCIM-Medium erfolgte. Die Kallus-bildenden Embryonen wurden anschließend auf BRM-Platten überführt und bei 24 °C und 136 µE Photonenflussdichte für 16 h inkubiert. Die Kallusformationen wurden alle 14 Tage auf frisches BRM-Medium umgesetzt bis Sprosse gebildet wurden. Anschließend wurden die Sprosse mit 2-3 cm Blattlänge in eine Plastikbox mit 80 ml BRM überführt um die Wurzelentwicklung zu induzieren. Nach erfolgter Wurzelbildung wurden die Pflänzchen in Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) überführt und entwickelten sich in einer Klimakammer weiter.

3.12. Extraktion von Nukleinsäuren

3.12.1. DNA-Extraktion aus Protoplasten

Die in 3.9.1. erstellte Protoplastensuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend die Schale mit 500 µl W5 ausgespült und dies ebenfalls überführt. Die Zellen wurden 3,5 Minuten bei 16.100 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Protoplastenpellet wurde anschließend in 300 µl TPS resuspendiert und 15 Sekunden über einem Reaktionsgefäßständer gezogen, um die Zellen mechanisch zu zerstören. Es folgte eine Inkubation für 3 Minuten bei 50 °C. Die freigewordene DNA wurde nach Zugabe von 300 µl Isopropanol und 20 Minuten Inkubation bei

Raumtemperatur durch Zentrifugation bei 16.100 *g* für 20 Minuten pelletiert und mit 1 ml 70 % Ethanol schüttelnd gewaschen. Nach einer erneuten 5-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 20 µl TE-Puffer mit RNase über Nacht bei 4 °C gelöst.

3.12.2. DNA-Extraktion aus Blättern

3.12.2.1. Einzelgefäß-Methode nach Waite

Die DNA-Extraktion der Primärregenerate erfolgte wie beschrieben (Palotta et al., 2000). Hierfür wurde ein 8-10 cm langes Blattstück von ca. 10 Tage alten Gerstenpflanzen bzw. 15 Tage alten Weizenpflanzen in kleine Abschnitte in ein 2ml-Reaktionsgefäß mit 2 Stahlkugeln gegeben, in flüssigen Stickstoff gefroren und mit einer Schwingmühle *Retsch*® *MM400* (Retsch) pulverisiert. Das Pflanzenmaterial wurde in 800 µl Extraktionspuffer gelöst und 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:14:1, PanReac, AppliChem ITW Reagents) hinzugegeben. Nach erneutem starken Mischen erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 80 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 sowie 800 µl Isopropanol hinzugegeben. Das Gefäß wurde geschwenkt und bei 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 800 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und erneut bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde für 30 Minuten getrocknet und in 100 µl R40 über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Die langfristige Lagerung erfolgt bei -20 °C.

3.12.2.2. 96well-Methode (Stein et al., 2001)

Zur effizienten DNA-Extraktion einer größeren Anzahl von Pflanzen erfolgte diese im 96-well-Format wie beschrieben (Stein et al., 2001). Dafür wurden 6 cm Blattmaterial in 2 cm Stücke in 8er-Gefäß-Streifen (Corning® 96 Polypropylene Cluster Tubes, 8-Tube Strip Format, Corning, Best.-Nr. 4408) mit zwei 4 mm-Glaskugeln gegeben, die Reaktionsgefäße durch Corning® 96 Well Polypropylene Cluster Tube 8-Cap Strips (Corning, Best.-Nr. 4418) verschlossen und in flüssigen Stickstoff gefroren. Das Blattmaterial wurde anschließend in einer Schwingmühle *Retsch*® *MM400* (Retsch) bei maximaler Geschwindigkeit vollständig pulverisiert. Danach wurden 600 µl auf 65 °C vorgeheizter GTC-Extraktionspuffer dazugegeben, die Streifen verschlossen und geschüttelt, um das Blattpulver in den Puffer zu überführen. Die Streifen wurden kurz bei 500 rpm herunterzentrifugiert und für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren des Blattmaterials für 10 Minuten bei 2.500 rpm und 10 °C. Danach wurden 240-900 µl Blattextrakt in eine AcroPrep Advance 96-well Filterplatte (Pall, Best.-Nr. 8183) überführt, welche auf eine QIAvac 96 Vakuumkammer (QIAGEN, Best.-Nr. 19504) gesetzt wurde. Der Blattextrakt wurde mittels 600 mbar Vakuum auf die Filterplatte gesaugt. Es wurden 900 µl Waschpuffer pro Gefäß zugegeben und mittels Vakuum durchgesaugt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde die Filterplatte auf eine 96-well Mikrotiterplatte

(QIAGEN, Best.-Nr. 19581) überführt und bei 2500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, um den Rest des Waschpuffers zu entfernen. Die Filterplatte wurde auf eine neue Mikrotiterplatte gestellt und 100 µl Elutionspuffer TElight pro Gefäß hinzugegeben. Nach 3-5-minütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 2500 rpm und die langfristige Lagerung der isolierten DNA bei -20 °C.

3.12.3. RNA-Extraktion aus Ährenmeristemen der Gerste

Zur Isolation der RNA aus isolierten Ährenmeristemen der Gerste wurden 400 µl TRI-Reagent (Zymo Research) sowie 2 Stahlkugeln zu den bei -80 °C gelagerten Meristemen gegeben und diese in einer Schwingmühle *Retsch® MM400* (Retsch) für 2x45 Sekunden mit einer Frequenz von 25 pulverisiert. Danach wurde der Extrakt für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben, gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C für 15 Minuten und die wässrige obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde das gleiche Volumen reinen Ethanols zugegeben. Die weitere Extraktion erfolgte durch das Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Best.-Nr. R2051) mit DNase-Verdau und die Elution^(*) in 50 µl Nuklease-freiem Wasser.

3.13. Auswertung Protoplastentests

3.13.1. Amplifikation & Reinigung

Um Mutationen in den Zielmotiven der in 3.9.1. transfizierten Protoplasten zu detektieren wurde die in 3.10.1. extrahierte Protoplasten-DNA zunächst in einem ersten Schritt als Vorlage für eine Amplifikation der Zielregionen^(*) verwendet. Für Weizen *Branched head* wurden die Programme „BH-A Proto“ (Primer CH24 und CH26), „BH-B Proto“ (Primer CH29 und CH31) und „BH-D Proto“ (Primer CH5 und CH6) mit der PCRBIO HS VeriFi™ Polymerase (PCR BIOSYSTEMS) durchgeführt (Tabelle A3). In Gerste erfolgte die Amplifikation von *Spl14* und *Spl17* mittels der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und der Programme „SPL14 Exon 3 Proto“ (Primer CH60 und CH63) und „SPL17 Exon 3 Proto“ (Primer CH64 und CH66) (Tabelle A4). Die PCR-Produkte wurden über ein 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und daraus extrahiert.

Im zweiten Schritt wurde das gereinigte PCR-Produkt als Vorlage für die Amplifikation der Proben für die Tiefensequenzierung verwendet, wobei Barcodes (Tabelle A10) am 5'-Ende der Primer verwendet wurden. In Weizen wurde das Programm „Bh-NGS“ (Primer F CH161/162/163 und Primer R CH164/165/166) mit der die GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega) verwendet (Tabelle A3). Die Barcodes 1-6 und 25-27 wurden wie in Tabelle A11 gezeigt an die Primer CH161-166 angefügt. In Gerste erfolgte die Amplifikation mittels Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und den Programmen „SPL14 Exon 3 NGS“ (Primer CH155 und CH156) sowie „SPL17 Exon 3 NGS“ (Primer CH157

und CH158) (Tabelle A4). Die Barcodes 3-4 und 28-30 wurden an die Primer 155-158 angefügt (Tabelle A11).

3.13.2. Tiefensequenzierung & Auswertung

Die Untersuchung auf Mutationen in den Zielmotiven von *Branched head* in Weizen und *Spl14/Spl17* in Gerste erfolgte mittels Illumina Next-Generation Sequenzierung via *MiSeq* der Amplikons mit einer maximalen Größe von 250 bp (*Paired-End*) (GENEWIZ Germany GmbH, Leipzig, Deutschland). Zu diesem Zwecke wurden gemischte Proben mit einer Gesamt-DNA von 500 ng in 100 µl ddH₂O erstellt. Für den Protoplastentest der gRNA/*cas9*-Konstrukte pCH26 und pCH27 in Weizen wurden alle 18 Proben miteinander gemischt, wobei 28 ng pro Probe verwendet wurden. Für die Untersuchung der Aktivität der Adenosin-Deaminase in Gerste mit dem Konstrukt pCH66 wurden die 6 Proben mit 85 ng DNA pro Probe miteinander gemischt.

Die Entfernung der Barcodes und Zuordnung der erstellten Reads erfolgte unter Verwendung der Software *R* (R Studio, Boston, USA) mittels eines R-Scripts (Max Haase und Anja Hartmann, unveröffentlicht).

3.13.3. Berechnung der Mutationsfrequenz

Für die Berechnung der Mutationsfrequenz wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Anzahl mutierter Reads}}{(\text{Gesamtzahl der Reads} \times \text{Transfektionseffizienz})} \times 100$$

3.14. Genotypisierung der Pflanzen

3.14.1. Amplifikation

Die Genotypisierung der primären Regenerate und ihrer Nachkommen erfolgte mittels GoTaq® G2 DNA Polymerase. In Weizen wurden die *Touchdown*-PCR^(*)-Programme „*Bh-A*“ (Primer CH24 und CH26), „*Bh-B*“ (Primer CH29 und CH31) und „*Bh-D*“ (Primer CH5 und CH6) für die genom-spezifische Amplifikation der drei Homoeoallele^(*) von *Branched head* verwendet (Tabelle A5). Das PCR-Programm „*Bh-ABD*“ (Primer CH96 und CH97) wurde für die gemeinsame Analyse der drei *Bh*-Homoeoallele im Versuch WCH4 verwendet (Tabelle A5). In Gerste erfolgte die Amplifikation der Zielregion von *Spl14* im 2. Exon über das PCR-Programm „*Spl14* Exon 2“ (Primer CH57 und CH58). Zur Untersuchung sogenannter *OFF-Targets* in *Spl17* und *Vrs4* wurden die Programme „*Spl17* Exon 2 (OFF)“ (Primer CH142 und CH143) und „*Vrs4* (OFF)“ (Primer CH144 und CH145) verwendet (Tabelle A6). Die Zielregion im 3. Exon von *Spl14* wurde in der T0-Generation über das Standard-PCR-Programm „*Spl14* Exon 3“ und ab der T1-Generation über das *Touchdown*-Programm „*Spl14* Exon 3“ amplifiziert. Für das 3. Exon von *Spl17* wurde das PCR-Programm „*Spl17* Exon 3“ verwendet (Tabelle A7).

Die Anwesenheit der T-DNA^(*) wurde ebenfalls per PCR überprüft. Mittels GoTaq® G2 DNA Polymerase wurden die gRNA, *cas9* und *hygromycinphosphotransferase (hpt)* amplifiziert. Für gRNAs unter Expression des *TaU6*-Promotors wurde das Programm „gRNA (TaU6)“ (Primer TaU6-F und jeweiliger Rückwärtsprimer der gRNA-Oligonukleotide) verwendet. Entsprechend erfolgte für gRNAs, die mittels *OsU3*-Promotor exprimiert wurden, die Amplifikation mit dem Programm „gRNA (OsU3)“ (Primer OsU3-F und Rückwärtsprimer der gRNA-Oligonukleotide). Die Anwesenheit von *cas9* wurde mittels des Programms „*cas9*-Test“ (Primer Bie475 und zCas9-R1) untersucht und *hpt* durch die Programme „*hpt*-Test“ (Primer 35S-F2 und Hyg-R5) bzw. „*hpt*-Test A“ (Primer IK273 und IK274) nachgewiesen (Tabelle A8; Abbildung A10).

3.14.2. Reinigung der PCR-Produkte im Plattenformat

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte über NucleoFast 96 PCR Plates (Macherey&Nagel) mit einer QIAvac 96 Vakuumkammer (QIAGEN, Best.-Nr. 19504). Das PCR-Produkt wurde auf die NucleoFast-Platten gegeben und mittels Vakuum von 600 mbar auf den Filter gesaugt. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit 30 µl sterilem Wasser. Die finale Elution^(*) erfolgte in 30 µl EB-Puffer (QIAGEN), welcher für 5 Minuten auf dem Filter gegeben wurde um die gebundene DNA zu lösen und anschließend in eine neue Platte pipettiert wurde. Die gereinigten Produkte wurden anschließend sequenziert (siehe 3.8.14.).

3.15. Phänotypisierung

3.15.1. Pflanzendokumentation

Für die Dokumentation der Pflanzen und reifen Ähren wurde die Digitalkamera *FinePix S100FS* (FUJIFILM) verwendet. Detailaufnahmen wurden mittels der Stereomikroskope *Leica MZFLIII* (Leica) und *Stemi 2000-C* (Carl Zeiss) mit der Software *AxioVision 3.0* (Carl Zeiss) oder am Digital-Mikroskop *Keyence VHX 5000* (Keyence) durchgeführt.

3.15.2. Automatische Weizenphänotypisierung

Die automatische Phänotypisierung^(*) des Wurzel- und Sprosswachstums von Weizen erfolgte auf einem LemnaTec Scanalyzer System (LemnaTec AG, Aachen, Deutschland) für mittlere bis große Pflanzen (APPP-C) in speziellen Rhizo-Töpfen für Wurzelanalysen. Hierfür wurden drei Körner pro Topf ausgesät, wobei drei Genotypen (Wildtyp, *bh-A*-Mutante, *bh-B*-Mutante) mit jeweils sieben Töpfen analysiert wurden. Die Bewässerung umfasste nach der Aussaat zunächst 500 ml Wasser/ Tag/ Topf. Nach drei Tagen wurden zwei der ausgesäten Körner bzw. deren Keimlinge entfernt, damit die Phänotypisierung auf eine Pflanze beschränkt ist. Die automatische Phänotypisierung begann am 3. Tag und dauerte bis zum 44. Tag nach Aussaat, wobei das Wurzelwachstum an 16 Tagen mittels Nahinfrarotlicht dokumentiert wurde, während das Sprosswachstum an 17 Tagen mit sichtbarem Licht

aufgenommen wurde. Die Bewässerung wurde zunächst auf 150 ml Wasser/ Tag/ Topf reduziert, ab dem 6. Tag nach Aussaat wieder auf 500 ml erhöht und nach 10 Tagen auf 250 ml Wasser/ Tag/ Topf reduziert. Ab dem 16. Tag nach Aussaat erfolgte eine automatische Bewässerung nach Gewicht mit 120-220 ml Wasser/ Tag/ Topf. Nach der letzten automatischen Messung der Parameter wurde das Sprossmaterial zur Ermittlung des Frischgewichts geerntet. Das Sprossmaterial wurde anschließend für 7 Tage bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend das Trockengewicht gemessen.

3.15.3. Messparameter

Die verschiedenen Messparameter wurden manuell, halbautomatisch und automatisch ermittelt. Die manuell ermittelten Parameter der mutierten Genotypen umfassen Messwerte der Pflanzenarchitektur sowie der Ährenarchitektur. Als Pflanzenarchitekturparameter wurden die Pflanzenhöhe (in cm), die Anzahl der Sprosse und die Trockenmasse des Sprossmaterials (in g) bestimmt. Die Anzahl der Sprosse wurde teils unterschieden in Sprossgesamtzahl, Anzahl produktiver Sprosse mit Ähren bzw. unproduktiver Sprosse ohne Ährenbildung. Im Bereich der Ährenarchitektur wurde die Anzahl der Ähren und die Anzahl steriler Ähren bestimmt, die Länge der Ähren (in cm) gemessen sowie die Zahl der Ährchen pro Ähre und die Zahl der Körner pro Ähre bestimmt. Außerdem wurden einige Parameter mathematisch errechnet (Tabelle 11).

Tabelle 11 – Mathematisch berechnete Parameter der Phänotypisierung

Parameter	Formel	Information
Körner pro 1cm Ähre	$\frac{\text{Körner pro Ähre}}{\text{Ährenlänge}}$	Kornzahl unabhängig von Ährenlänge
Körner pro Ährchen	$\frac{\text{Körner pro Ähre}}{\text{Ährchen pro Ähre}}$	Ausgebildete Körner pro Weizenährchen
Kornertrag pro Ähre	$\frac{\text{Tausendkorngewicht} * \text{Körner pro Ähre}}{1000}$	Hinweis auf Ertrag
Kornertrag pro Pflanze	$\text{Anzahl der Ähren} * \text{Kornertrag pro Ähre}$	Hinweis auf Ertrag

Die Korneigenschaften wurden halbautomatisch mittels eines *MARVin Seed Analyzer* (MARViTECH) untersucht und umfassen die Länge, Breite und Fläche der Körner (in mm/mm²) sowie das Tausendkorngewicht (in g).

Bei der automatischen Phänotypisierung des Wurzel- und Sprosswachstums (siehe 3.13.2.) wurden als Wurzelparameter die Anzahl der Verzweigungs- und Wurzelendpunkte, sowie die Wurzellänge (Summe der Hauptachsenlängen der einzelnen Wurzelobjekte), das Wurzelvolumen (Summe der Volumina der einzelnen Wurzelobjekte) und die Wurzeloberfläche (Summe der Oberfläche der einzelnen Wurzelobjekte) in mm und Pixel (px) bestimmt sowie die Wurzellänge pro Wurzelvolumen. Als Sprossparameter wurden die Pflanzenhöhe und die Sprossoberfläche in px gemessen. In diesem

Zusammenhang erfolgte die manuelle Bestimmung der Biomasse nach der automatischen Phänotypisierung als Frischgewicht und Trockengewicht (jeweils in g).

Für die Auswertung der Wurzelparameter wurde *Semi-automated Root Image Analysis (saRIA;* Narisetti et al., 2019) und für die Sprossmesswerte *Integrated Analysis Platform (IAP;* Klukas et al., 2014) verwendet.

3.15.4. Statistische Auswertung der phänotypischen Parameter

Um Ausreißer-Werte auf mathematischer Basis auszuschließen wurde zunächst die *Absolute Medianabweichung (Median absolute deviation; MAD)* pro Parametermessreihe ermittelt:

$$MAD_{Parameter} = Median(|x_i - Median(x)|)$$

Anschließend wurde dieser MAD-Wert mit 2,5 multipliziert, um die 2,5-fache Absolute Medianabweichung zu erhalten. Anschließend erfolgte die Berechnung der MAD von jedem Einzelmesswert eines Parameters:

$$MAD_{Einzelmesswert} = |x_i - Median(x)|$$

Alle Einzelmesswerte, deren MAD-Wert größer war als die 2,5-fache MAD der Parametermessreihe wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Untersuchung auf signifikante Abweichungen vom Wildtyp oder zwischen verschiedenen Mutanten erfolgte mittels der Statistik-Software *SigmaStat 4.0* (Systat Software, Inpixon) mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way analysis of variance, one-way ANOVA*) und *Holm-Sidak-Test* zum Vergleich mit einer Kontrollgruppe.

3.16. Doppelhaploide (DH) Pflanzen

3.16.1. Antherenkultur

Die Herstellung doppelhaploider^(*) Weizenpflanzen erfolgte mittels einer Antherenkultur. Dafür wurden Ähren ausgewählter, mittels Cas9-Endonuklease modifizierter Weizenpflanzen im späten Mikrosporen-Stadium mit zugehörigem Fahnenblatt^(*) geerntet und für 2 Wochen bei 4 °C in Wasser stehend und mit einem Polyethylenbeutel umschlossen inkubiert. Anschließend wurden die Blattspreiten entfernt, die Oberflächen der Ähren durch Besprühen mit 70 % Ethanol sterilisiert und mit sterilem Haushaltskrepp abgetrocknet. Die Antheren von zwei Ähren wurden in 2,5 ml WAM1 überführt und für drei Tage bei 32 °C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 6 frisch isolierten und längs halbierten Stempeln der Akzession Bobwhite (Lippmann et al., 2015) und 2,5 ml frischem WAM1-Mediums mit K4N-Mikrosalzen W (1000x). Die Antheren wurden anschließend für 4-6 Wochen bei 25 °C im Dunkeln kultiviert, wobei es zur Kallusbildung mit embryogenen Strukturen kam. Diese embryogenen Kallusformationen wurden auf Regenerationsmedium Spross überführt, 2-3 Tage zunächst mit Papier abgedeckt im Lichtschrank bei 22 °C zur Anpassung inkubiert bevor das Papier entfernt wurde. Die Inkubation im Licht erfolgte solange, bis Spross und Wurzel gebildet waren. Die

bewurzelten Regenerate wurden anschließend in Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) zur weiteren Entwicklung im Gewächshaus ausgepflanzt.

3.16.2. Ploidiemessung

Für die Messung der Ploidie^(*) der Regenerate wurden 3-5 cm lange Blattstücke in 15 ml Reaktionsgefäße (Greiner Bio-one) mit 2 ml Wasser gegeben und auf Eis gelagert. Die Blattproben mussten dabei am Tag der Messung oder frühestens einen Tag davor entnommen werden. Zusätzlich wurden drei Blätter der Akzession Bobwhite als Referenz verwendet. Die Blattstücke wurden in eine Petrischale gelegt und mit 2,9 ml SYSMEX CyStain UV Ploidie-Puffer (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland, Best.-Nr. 05-5001) benetzt. Anschließend wurde das Blattmaterial mittels einer Drahtbürste zerrieben und der Extrakt über einen Filteraufsatz Cell Tric 30 µm (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland, Best.-Nr. 04-0042-2313) in ein 3,5 ml Röhrchen (Sarstedt AG&Co, KG, Nümbrecht, Deutschland, Best.-Nr. 55.484) überführt. Die Proben wurden bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Ploidie erfolgte am CyFlow®Ploidy Analyzer (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland) mit Durchflussgeschwindigkeit 0,5 gemessen. Zunächst wurde mittels der Bobwhite-Referenz der Standard allohexaploid eingestellt und anschließend die Ploidie aller Regenerate bestimmt.

3.16.3. Colchiziniierung

Die Colchiziniierung erfolgte wie beschrieben (Otto et al., 2015) mit den 3-6 Wochen alten Pflanzen, die laut Ploidiebestimmung nur einen einfachen Chromosomensatz aufwiesen, also trihaploid bzw. allotriploid waren. Diese Pflanzen wurden einen Tag vor der Behandlung bei 4 °C inkubiert, um Meristemzellen anzureichern, die in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert sind, damit sie später unter dem Einfluss von Colchizin die folgende Mitose durchlaufen. Am Tag der Colchiziniierung wurden die Pflanzen aus der Erde entnommen, die gesamte Erde entfernt und die Wurzeln mittels Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Wurzeln auf 3 cm und die Blätter auf 5 cm Länge gekürzt und die Pflanzen in 50 ml Röhrchen mit 25 ml Colchizinlösung (1 g/l, SERVA, Best.-Nr. 77120.01) überführt, in der sie für 6 Stunden bei 21 °C im Licht inkubiert wurden. Danach wurden die Pflanzen ausgiebig mit Wasser gespült, in Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) gepflanzt und im Gewächshaus bei 18 °C/ 16 °C (Tag/Nacht) und 16 h Licht mit 30 klx inkubiert. Die Akklimatisierung der Pflanzen erfolgte zunächst auf einem Tablett mit transparentem Deckel, damit sie nicht austrockneten bevor neue Wurzeln gebildet waren.

3.17. Kreuzungen

Für die Kreuzung der Weizengenotypen wurden zunächst die Mutterpflanzen emaskuliert. Hierfür wurden die Antheren im grünen Antherenstadium (*Green anther stage*) vor der Freisetzung der Pollen entfernt. Innerhalb der nächsten drei Tage fächerten sich die Narben der Mutterpflanzen auf, sodass

sie mit Pollen der Vaterpflanzen bestäubt werden konnten. Pro Blütchen der Mutterpflanze wurde dazu eine gerade für die Pollenfreigabe geöffnete Anthere oberhalb der Narbe platziert. Die bestäubten Ähren wurden mit Folienbeuteln vor Fremdbestäubung und zu starkem Wasserverlust geschützt.

3.18. Expressionsstudie mittels qPCR

Zur Ermittlung der Expression verschiedener Ährenarchitekturgene in der Gerste erfolgte die Isolation von 7 bis 10 Apikalmeristemen (*) im Stadium primordialer Grannen (*Awn primordia stage*) pro biologischem Replikat. Es wurden drei Replikate pro Genotyp verwendet und drei Genotypen miteinander verglichen. Die Meristeme wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Extraktion der RNA erfolgte wie in 3.12.3. beschrieben. Mittels iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Best.-Nr. 1708890) wurde 1 µg RNA nach Angaben des Herstellers in cDNA(*) umgeschrieben.

Die verwendeten qPCR-Primer wurden über eine PCR (Programm „qPCR-Test“) mittels der GoTaq® G2 DNA Polymerase anhand genomischer DNA, RNA und cDNA auf ihre Spezifität vorvalidiert, um für die folgende Anwendung Kontaminationen durch Amplifikate von verbliebener RNA in der cDNA auszuschließen (Tabelle A9). Die verwendeten qPCR-Primer für *Spl14*, *Spl17*, *Vrs1*, *Vrs2*, *Vrs3*, *Vrs4/Ra2* und *Vrs5/IntC* sind in Tabelle A3 aufgelistet. Der Test ergab spezifische Banden für alle Primerpaare bei Verwendung von genomischer DNA und cDNA. Ausgehend von RNA konnte hingegen kein PCR-Produkt detektiert werden.

Für die sich anschließende qPCR wurde die cDNA 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und mit jeweils 2 µl 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 5 µl GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Best.-Nr. A6001) und 0,1 µl CXR Reference Dye (Promega) gemischt und in eine Applied Biosystems™ MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical 384-Well Blue Reaction Platte (Thermo Scientific, Best.-Nr. 4483320) pipettiert, wobei pro biologischem Replikat drei technische Replikate verwendet wurden. Für die Berechnung der Primer-Effizienz der *Spl14*-Primer wurde Wildtyp-cDNA in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 verwendet. Zusätzlich wurden Wasserproben für alle Primerkombinationen als Negativkontrollen mitgeführt. Die Platte wurde mittels ThermalSeal RTS™ Sealing Films (Sigma, Best.-Nr. Z734438-100EA) verschlossen.

Die qPCR wurde am Applied Biosystems® QuantStudio™ 6 FLEX (Thermo Scientific) durchgeführt (Tabelle A9) und die C_T-Werte und die Schmelzkurven mittels der Software *QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1* (Thermo Scientific) ermittelt. Die Auswertung der Schmelzkurven ergab mehrere Spitzenwerte für das *Spl17*-Primerpaar, weshalb diese nicht weiter analysiert wurden. Die weitere Analyse der C_T-Werte erfolgte mit Microsoft Excel.

Zur Berechnung der Primer-Effizienz wurden zunächst die C_T -Werte gegen den Logarithmus der cDNA-Verdünnung in einem Diagramm dargestellt und eine Trendlinie eingefügt. Die Funktion der Trendlinie lautet:

$$y = mx + b$$

Die Berechnung der *Spl14*-Primereffizienz erfolgte wie von Rudledge und Cote (2003) beschrieben mit folgender Formel:

$$E = (10^{(-1/m)} - 1) * 100$$

Die restlichen qPCR-Primerpaare wurden nicht auf ihre Effizienz E getestet, da sie bereits veröffentlicht sind (Tabelle A1).

Die relative Expression Exp_{rel} wurde durch Vergleich der C_T -Werte der mutierten Pflanzen mit den Wildtyp- C_T -Werten wie folgt ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008):

$$Exp_{rel} = 2^{-(\Delta C_T)}$$

4. Ergebnisse

4.1. Generierung verschiedener Allelvarianten von *Branched head* (*Bh*) in Weizen

4.1.1. *In silico*-Identifizierung und Validierung von *Bh*-spezifischen Zielmotiven

Die Homoeoallele^(*) des Transkriptionsfaktor^(*) *Branched head* (*Bh*) sind in hexaploidem Weizen *Triticum aestivum* (L.) in allen drei Subgenomen^(*) zu finden. Diese zeigen eine hohe Übereinstimmung miteinander: die Basenübereinstimmung in der kodierenden Sequenz des A-Allels zum B-Allel beträgt 92,7 %, A zu D sind 90,3 % und B zu D sind 93,7 % übereinstimmend. Durch Verwendung der Auswahltools DeskGen (Doench et al., 2014, 2016) und WU-CRISPR (Wong et al., 2015) wurden 10 Zielmotive^(*) (ZM) ausgewählt, die in allen drei Homoeoallelen von *Bh* konserviert sind und für deren Modifikation in Betracht gezogen wurden (Tabelle 12, Abbildung A12). Die Sekundärstruktur der möglichen *guide* RNAs^(*) (gRNAs) wurde mittels des Vorhersagewerkzeugs RNAfold (Gruber et al., 2008; Lorenz et al., 2011) untersucht (Abbildung 7).

Tabelle 12 – Analytierte Zielmotive in allen drei Homoeoallelen von Weizen *Branched Head* mit Aktivitäts- und Off-Target-Werten; * ausgewählte Motive; ^a: ausgehend von genomischer DNA ab Translationsstart gezählt

Zielmotiv	Sequenz inklusive PAM	DNA-Strang	Position im <i>Bh</i> -A1-Allel ^a [bp]	DESKGEN-ON-Target Aktivität	DESKGEN-OFF-Target Aktivität	WU-CRISPR Aktivität
ZM1	CGGAGTTGTCGTCGGCGCTGGGG	-	645-623	61	62	85
ZM2	ATGGTGGCCGGCTTCTGGGGCGG	+	783-805	55	46	98
ZM3	TGGAACGGCGCGAGGAAGGGCGG	-	394-372	52	45	96
ZM4*	GCGACCCGACCACCAAGGAGCGG	+	223-245	62	74	100
ZM5*	GGGCGGGTAGTTGTTGTAGGCGG	-	377-355	64	81	96
ZM6	GACATGGTCGCCTCGTCGCAGGG	+	834-856	57	68	89
ZM7	GGCGTGCGCCGGCGGCCGTGGGG	+	180-202	50	18	82
ZM8	GCGTGAACGGCGCGAGGAAGGG	-	397-375	52	61	89
ZM9	CTCCGGGTACCTGAGCAGCGTGG	+	641-663	70	76	98
ZM10	GATACGCGACCCGACCACCAAGG	+	218-240	65	92	98

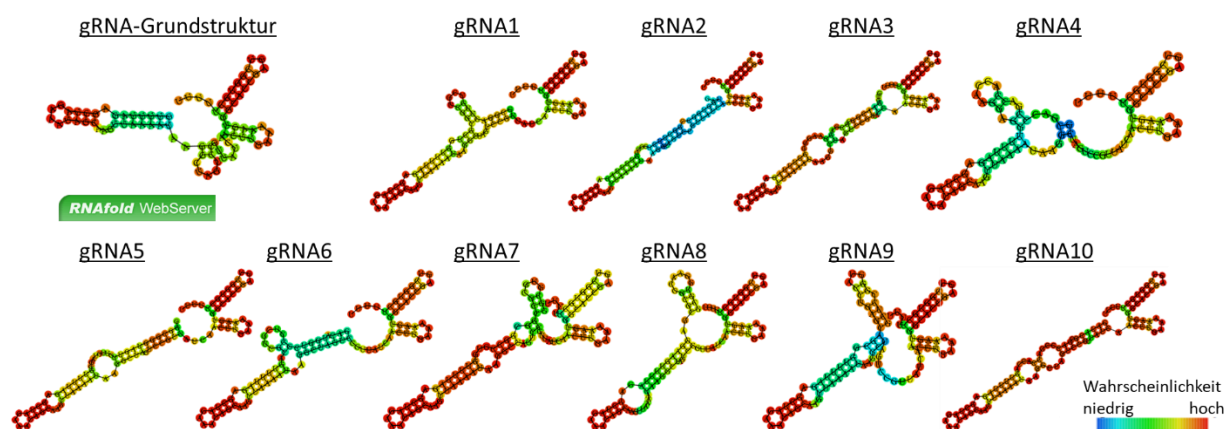


Abbildung 7 – Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (*gRNA scaffold*) sowie der *Bh*-gRNAs 1 bis 10 (RNAfold Webserver: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>); blau-grün: geringe / gelb-rot: hohe Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung

Basierend auf den Aktivitätswerten, der gRNA-Sekundärstruktur und der Lage im Gen wurden die Zielmotive 4 und 5 zur gezielten Mutagenese von *Branched head* unter Verwendung der Cas9-Endonuklease^(*) verwendet (Abbildung A12).

4.1.2. Validierung der hergestellten gRNA/cas9-Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Weizenblättern

Für die Validierung der gRNA-Aktivität wurden die Sequenzen der Zielmotive (ohne PAM) mittels BsaI-Schnittstellen in den gRNA/cas9-Vektor^(*) pSH179 eingefügt (siehe 3.9.2.2., Abbildung A4a, A6c). Die Validierung der Konstrukte erfolgte nach Budhagatapalli et al. (2016) und wie in 3.10. beschrieben. Die gRNA/cas9-Konstrukte pCH2 (gRNA4) bzw. pCH3 (gRNA5) wurden mit auf pNB1-basierenden Zielvektoren pCH15 (gRNA4) bzw. pCH16 (gRNA5) (Tabelle 4; siehe 3.9.3., Abbildung A4c, A8a) und einem mCherry-beinhaltenen Konstrukt pNB2 zur Transformationskontrolle (Abbildung A4d, A8b) gemischt und für den ballistischen^(*) Transfer an Goldpartikel gebunden (*coating*).

Nach erfolgtem Beschuss der Blätter war die Zahl der überlebenden, transformierten Zellen in den Experimenten und auf den jeweiligen Blättern pro Platte sehr unterschiedlich. So wurden beim gRNA4-Experiment insgesamt 458 transformierte (rot fluoreszierende) Zellen gefunden, von denen 169 eine durch gRNA und Cas9 hervorgerufene Mutation im Zielvektor aufwiesen, die zu einer Restitution des gelb-fluoreszierenden Protein-Gens (*YFP*) führte (Abbildung A1). Die gRNA5-Experimente zeigten jedoch nur 258 transformierte Zellen, von denen 97 ein YFP-Signal zeigten. Somit bewirken die *Branched head*-spezifischen gRNAs in diesem Assay Mutationsraten von 37 bzw. 38 % (Tabelle 13) und wurden daher auch für die stabile Transformation^(*) (siehe 4.1.4.) verwendet.

Tabelle 13 – Berechnung des Anteils von Weizenepidermiszellen mit im Bh-Zielmotiv mutiertem Zielvektor (*YFP*-Signal) gegenüber transformierten Zellen ohne *YFP*-Restitution (*mCherry*-Signal)

gRNA	Experiment	Platte	Zellen mit mCherry	Zellen mit YFP	gRNA-Aktivität als Häufigkeit YFP-fluoreszierender Zellen von der Gesamtzahl der transformierten Zellen
gRNA4	1	1	37	11	37 %
		2	146	42	
	2	1	146	60	
		2	129	56	
	<i>Gesamt</i>		458	169	
gRNA5	1	1	166	58	38 %
		2	42	18	
	2	1	14	6	
		2	36	15	
	<i>Gesamt</i>		258	97	

4.1.3. Validierung der Konstrukte in Weizen-Protoplasten mit anschließender Sequenzierung amplifizierter Zielregionen

Für die Validierung der gRNA/cas9-Konstrukte in Protoplasten^(*) wurden die Zielmotive über BsaI-Schnittstellen in den generischen^(*) Vektor pNB38 eingefügt (siehe 3.9.2.2., Abbildung A4b, A5b). Die Protoplastentransformation erfolgte wie in 3.11.1. beschrieben. Die gRNA/cas9-Konstrukte pCH26 (gRNA4) und pCH27 (gRNA5) wurden einzeln in Weizenprotoplasten übertragen. Es erfolgte eine Co-Transfektion^(*) mit dem Markerkonstrukt pSH221 (Abbildung A6d), welches das Gen eines modifizierten „superfolder“ grün-fluoreszierenden Proteins (*sfGFP*) enthält (Pédélecq et al., 2006) und ein spezifisches GFP-Signal in den Zellkernen der Protoplasten zeigt (Abbildung A2). Im gRNA4-Experiment zeigten 72 % der Zellen eine GFP-Fluoreszenz, im gRNA5-Experiment 80,2 % (Tabelle 14).

Tabelle 14 – Ermittlung der Transfektionseffizienz in Weizenprotoplasten anhand GFP-positiver Zellen

gRNA	Replikat	Gesamtzahl gezählter Zellen	Zahl der GFP-Zellen	Effizienz [%]
gRNA4	1	380	302	72,0 %
	2	151	125	
	3	633	411	
	<i>Gesamt</i>	<i>1164</i>	<i>838</i>	
gRNA5	1	666	534	80,2 %
	2	657	485	
	3	816	696	
	<i>Gesamt</i>	<i>2139</i>	<i>1715</i>	

Nach erfolgter DNA-Isolierung aus den Protoplasten wurden die Zielregionen^(*) mittels PCR amplifiziert. Die verschiedenen Amplifikate wurden gemischt und mittels *Amplikon Deep Sequencing* sequenziert. Für Protoplasten mit dem gRNA4/Cas9-Konstrukt konnten insgesamt 11.085 *Reads* erstellt werden, für die Zellen mit gRNA5/Cas9-Konstrukt 27.501 *Reads*. Beide gRNAs waren in der Lage, Mutationen im Genom^(*) der Protoplasten zu induzieren (Tabelle 15). Dabei wurden sehr unterschiedliche Mutationsfrequenzen für die gRNA4 (21 %) und gRNA5 (0,42 %) bestimmt (siehe 3.13.3.).

Tabelle 15 – Anhand des Anteils mutierter Sequenz-Reads abgeleitete gRNA-Aktivität für Branched head

gRNA	Subgenom	WT Reads	Mutierte Reads	gRNA-Aktivität als Häufigkeit mutierter Reads von der Gesamtzahl der Reads
gRNA4	A	160	1.187	21 %
	B	2.582	268	
	D	6.667	221	
	<i>Gesamt</i>	<i>9.409</i>	<i>1.676</i>	
gRNA5	A	9.963	87	0,42 %
	B	14.736	6	
	D	2.709	0	
	<i>Gesamt</i>	<i>2.7408</i>	<i>93</i>	

4.1.4. Ballistische DNA-Übertragung in unreife Weizen-Embryonen

Zur Transformation von Weizen wurden Binärvektoren mit den Expressionseinheiten gRNA4 oder gRNA5, *cas9* und *hygromycinphosphotransferase (hpt)* innerhalb der T-DNA^(*) verwendet. Die *hpt*-Einheit diente dabei der Selektion transformierter Pflanzen mittels Hygromycin. Für die beiden *Branched head*-spezifischen gRNAs 4 und 5 wurden die Binärvektoren pCH28 bzw. pCH29 verwendet (Tabelle 4, Abbildung A4e). Die Transformation erfolgte wie in 3.11.3. beschrieben mittels ballistischer^(*) DNA-Übertragung in unreife Embryonen des Sommerweizens Bobwhite (BW). Insgesamt wurden vier Haupttransformationsexperimente durchgeführt (Tabelle 10), wobei die Experimente WCH1-3 mit Hygromycin-Selektion erfolgten. Das Experiment WCH4 erfolgte ohne Selektionsdruck und bei Variante 2 wurden zusätzlich zu den gRNA/*cas9*-Konstrukten zwei Vektoren zur visuellen Darstellung T-DNA-enthaltender Kalli verwendet (Tabelle 10). Diese Art der Visualisierung von Transformationsereignissen war jedoch nicht erfolgreich und hatte daher im weiteren Verlauf der Pflanzenanalyse keinerlei Bedeutung.

In den Experimenten WCH1 und WCH4 erfolgte eine Co-Transformation der beiden gRNA/*cas9*-Konstrukte pCH28 und pCH29, wohingegen in den Experimenten WCH2 und WCH3 eine Einzeltransformation von pCH28 bzw. pCH29 stattfand. Die Experimente WCH1, 2 und 3 erfolgten bezüglich der Auxin-Behandlung während der Kallusinduktion in zwei Varianten. In der ersten Variante wurde 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) als synthetisches Auxin verwendet. Die zweite Variante enthielt jeweils zusätzlich zu 2,4-D das synthetische Auxin Centrophenoxin. Bezogen auf die eingesetzte Zahl der Embryonen führte die zusätzliche Gabe von Centrophenoxin zu deutlich weniger Regeneraten als wenn nur 2,4-D hinzugegeben wurde (Tabelle 16). Jedoch war der Anteil transgener bzw. mutierter Pflanzen bezogen auf die Zahl der Regenerate höher in den Teilversuchen der Experimente WCH1 und WCH2, in denen Centrophenoxin dazugegeben wurde (Tabellen A12, A13).

Außerdem war die Zahl der Regenerate bezogen auf die Zahl der eingesetzten Embryonen in den Einzeltransformationen im Vergleich mit den Co-Transformationen deutlich geringer (Tabelle 16), was an der geringeren Qualität des für die Transformation eingesetzten Donormaterials liegen könnte. Für das Co-Transformationsexperiment WCH1 stand sehr gut entwickeltes, gesundes und unbehandeltes Material zur Verfügung. Für die Einzeltransformationsexperimente WCH2 und WCH3 wurde Pflanzenmaterial genutzt, welches von Mehltau befallen war und bereits dagegen behandelt worden war. Dadurch kann die Regenerationsfähigkeit von Pflanzen aus Kallusgewebe beeinflusst werden. Im Versuch WCH4 wurde das Donormaterial vorher „geschwefelt“ und mit UV-C-Licht bestrahlt, um eine Mehltauinfektion zu vermeiden. Diese Behandlung reduzierte die Mehлтаubelastung jedoch nur begrenzt.

Tabelle 16 – Regenerationsvarianten der Weizentransformationen; *-Anzahl der Regenerate ohne Geschwister bezogen auf Embryonenzahl; **-generell erhöhte Regenerationsrate durch fehlende Selektion

Experiment/ Variante	Plasmide (*)	Anzahl Embryonen	Hygromycin- Selektion	Auxin zur Kallusinduktion	Regenerate	Regenerations- rate [%]*
WCH1/1	pCH28/29	600	Ja	2 mg/l 2,4-D	93, davon 25 Geschwister	11,3
WCH1/2	pCH28/29	600	Ja	2 mg/l 2,4-D + 5 mg Centropheno- xin	33, davon 4 Geschwister	4,8
WCH2/1	pCH28	420	Ja	2 mg/l 2,4-D	34, davon 4 Geschwister	7,1
WCH2/2	pCH28	375	Ja	2 mg/l 2,4-D + 5 mg Centropheno- xin	8	2,1
WCH3/1	pCH29	390	Ja	2mg/l 2,4-D	22, davon 4 Geschwister	4,6
WCH3/2	pCH29	315	Ja	2 mg/l 2,4-D + 5 mg Centropheno- xin	11	3,5
WCH4A/1	pCH28/29	139	Nein	2 mg/l 2,4-D	390	(280,6)**
WCH4A/2	pCH28/29 + Marker	137	Nein	2 mg/l 2,4-D	84	(61,3)**

4.1.5. Genotypische Analyse der regenerierten Pflanzen (M1)

4.1.5.1. Ermittlung mutierter Allele

Um Allele^(*) mit induzierten Mutationen zu ermitteln, erfolgte in den Experimenten WCH1, WCH2 und WCH3 eine Homoeoallel-spezifische Amplifikation (Abbildung A10) der Zielregion in den Subgenomen A, B und D und eine anschließende Sanger-Sequenzierung der Amplifikate (Oligo-Sequenzen siehe Tabelle A1; PCR-Programme siehe Tabelle A5).

Im Falle einer großen Anzahl von zu untersuchenden Pflanzen kommt diese Analyse jedoch an ihre Grenzen. Daher wurde ein Versuch durchgeführt, um zu bestimmen, bis zu welcher Verdünnung mit Wildtyp-Allelen ein mutiertes Allel noch in der Sanger-Sequenzierung ermittelt werden kann. Dies dient dazu, gemischte Proben, also entweder mehrere Pflanzen oder mehrere Homoeoallele, auszuwerten. In diesem Versuch wurde amplifizierte DNA von fünf mutierten Pflanzen jeweils mit amplifizierter Wildtyp-DNA (Bobwhite) in den Verhältnissen 1:3, 1:5, 1:7 und 1:10 gemischt. Die Proben E52-A, -B und -D waren dabei heterozygot^(*)/chimär^(*) mutiert, die Proben E97-A und E101-B heterozygot. In vier von fünf Fällen konnte bei einer 1:3-Verdünnung im Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung eine Mutation detektiert werden, was einer gemeinsamen Amplifikation aller drei Homoeoallele entsprechen würde. In einem Fall (E97-A) wurde die Mutation ausschließlich in der unverdünnten DNA gefunden. Für die Pflanze E101-B wurde die Mutation nach einer 1:5-Vermischung mit Wildtyp-DNA ebenfalls nachgewiesen (Tabelle 17). Damit wurde gezeigt, dass eine Mischung der Homoeoallel-Amplifikate für die Analyse von Regeneraten mit einer akzeptablen Rate an nicht-

detektierten Mutationen erfolgen kann. Die Verwendung gemeinsamer Amplifikate (Abbildung A10, Tabelle A5) für die Genotypisierung^(*) wurde bei der Auswertung des selektionsfreien Versuches WCH4 angewendet, jedoch aufgrund von Fehleranfälligkeiten und mangelhafter Unterscheidung der Homoeoallele nicht bei der Untersuchung der Nachkommen angewendet.

Tabelle 17 – Nachweis von mutierten Allelen in mit Wildtyp-DNA gemischten Proben

Pflanzenprobe	Reine DNA	1:3 mit WT	1:5 mit WT	1:7 mit WT	1:10 mit WT
E52-A	X	X			
E52-B	X	X			
E52-D	X	X			
E97-A	X				
E101-B	X	X	X		

4.1.5.2. Übertragung eines einzelnen gRNA/cas9-Konstruktes und Regeneration unter Selektionsdruck

Alle 42 (WCH2) bzw. 33 (WCH3) regenerierten Pflanzen der Einzeltransformationen wurden mittels PCR auf Anwesenheit von T-DNA und auf Mutationen über die Amplifikation der Zielregionen auf den einzelnen Subgenomen untersucht. Dabei wurden keine Pflanzen mit Mutationen entdeckt.

Im Experiment WCH2 (Tabelle A13) wurden in zwei regenerierten Pflanzen partiell oder vollständig die gRNA/cas9/hpt-Expressionseinheiten nachgewiesen. Die Pflanze E12 zeigte die Anwesenheit von gRNA4-, cas9- und hpt-DNA; die Pflanze E19 nur die gRNA4- und cas9-DNA. Damit enthielten 2 von 42 Pflanzen T-DNA, was 4,8 % der Regenerate entspricht.

Im Experiment WCH3 (Tabelle A14) wurde in der Pflanze E23a die gRNA5-DNA nachgewiesen, jedoch kein cas9 oder hpt. Somit zeigte eine von 33 Pflanzen die Anwesenheit von T-DNA, was 3 % der Regenerate entspricht.

In beiden Experimenten wurden keine Mutationen nachgewiesen.

4.1.5.3. Simultane Übertragung von zwei gRNA/cas9-Konstrukten und Regeneration unter Selektionsdruck

Insgesamt wurden aus dem Experiment WCH1 126 regenerierte Pflanzen gewonnen (Tabelle A12). Eine partielle oder vollständige Integration der gRNA/cas9/hpt-Expressionseinheiten (T-DNA) wurde in 14 Pflanzen durch PCR nachgewiesen (entspricht 11,1 % der Regenerate). In sieben Pflanzen wurden durch Analyse der Subgenomkopien funktionelle Mutationen gefunden, was 5,6 % der Regenerate entspricht. Eine Subklonierung^(*) der mutierten Amplifikate zeigte die Art der Mutationen, welche durch die Aktivität von gRNA4, gRNA5 und Cas9 induziert wurden (Tabelle 18).

Tabelle 18 – Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten der *Bh-Homoeoallele* in den beiden Zielmotiven (ZM) 4 und 5 und mittels PCR detektierte T-DNA in den Regeneraten der Transformation WCH1

Pflanze	<i>Bh-A</i>	<i>Bh-B</i>	<i>Bh-D</i>	PCR-detektierte T-DNA
E108 (WT)				
mutiert, mit stabil-integrierter T-DNA				
E6	3/4: Δ20 bp (ZM4) 1/4: Δ1 bp (ZM5)		2/8: Δ15 bp (ZM4) 2/8: Δ64 bp (ZM5)	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E52	7/8: Δ1 bp (ZM4) 3/8: Δ7 bp (ZM5)	4/9: Δ11 bp (ZM4) 3/9: Δ22 bp (ZM5) 2/9: Δ10 bp (ZM4) 1/9: +1 bp (ZM4)	3/5: Δ16 bp (ZM4) 1/5: Δ2 bp (ZM4) 1/5: Δ58/+7 bp (ZM5) 1/5: Δ3 bp (ZM5) 1/5: Δ9/+6 bp (ZM5)	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E111	6/8: Δ1 bp (ZM4)			gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E113	1/4: Δ11 bp (ZM4)			gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
mutiert, ohne stabil-integrierte T-DNA				
E97	1/4: +1 bp (ZM5)			gRNA4
E101		3/9: +1 bp (ZM4)		
E110	1/8: Δ1 bp (ZM4) 1/8: +1 bp (ZM4)			
E111	1/8: Δ1 bp (ZM5)			gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
nicht mutiert, mit stabil-integrierter T-DNA				
E9a				gRNA4, <i>cas9</i>
E32a				<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E45b				gRNA5
E56				gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E61				gRNA5
E81				gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E91				gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E115				gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
E123				gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

In den Pflanzen E97, E101, E110 und E111 entstanden Mutationen durch transiente^(*) Expression von gRNA und *cas9*. Die Pflanze E111 zeigte dabei eine dominante Mutation, hervorgerufen durch die stabile Integration des gRNA4-Gens, und eine untergeordnete Mutation im Zielmotiv 5, welche transienten Ursprungs war. In den Pflanzen E101 und E110 wurde keine T-DNA nachgewiesen, jedoch waren beide Pflanzen mutiert.

Die beiden Pflanzen E6 und E52 waren hochgradig chimär bezüglich der beiden Zielmotive und mehrerer Homoeoallele von *Branched head*. Da die Pflanze E52 keine Körner produzierte, erfolgte keine weitere Untersuchung der Nachkommen.

4.1.5.4. Simultane Übertragung von zwei gRNA/cas9-Konstrukten und Regeneration ohne Selektionsdruck

Im Versuch WCH4 (Tabelle A15) wurden 474 Regenerate auf Mutationen analysiert, wobei alle drei Subgenom-Kopien von *Branched head* gemeinsam amplifiziert und sequenziert wurden. Die Sanger-Sequenzierung zeigte Unregelmäßigkeiten im Chromatogramm von 10 Pflanzen:

- Variante A/1: E34, E51, E67, E94, E104, E156, E247, E385
- Variante A/2: E59, E60

Eine Analyse der Einzelgenomkopien von *Branched head* konnte keine Mutation bestätigen. Die Analyse auf Anwesenheit der Expressionseinheiten für *cas9* und *hpt* ergab jeweils 13 Pflanzen mit T-DNA in den Varianten A/1 und A/2. Somit zeigten 5,5 % der Regenerate die Anwesenheit von T-DNA.

4.1.5.5. Vergleich der Mutationsmuster in Protoplasten und M1-Pflanzen

Die in 4.1.3. beschriebene Transfektion von Protoplasten mit den beiden *Branched head*-spezifischen gRNAs 4 und 5 gab bereits einen Hinweis auf die Möglichkeit, damit auch Mutationen in Pflanzen induzieren zu können. So konnten im A-Genom die 1 bp- und 20 bp-Deletionen^(*) der gRNA4 sowie die 1 bp-Deletion der gRNA5 erwartet werden, im B-Genom die 1 bp-Insertion^(*) und im D-Genom die 15 bp-Deletion (Tabelle 19).

Tabelle 19 – Vergleich der Mutationen in Protoplasten und primärmutierten WCH1-Pflanzen

gRNA	Sub-genom	Mutationen in Protoplasten und WCH1-M1-Pflanzen	Mutationen nur in Protoplasten	Mutationen nur in WCH1-M1-Pflanzen
gRNA4	A	$\Delta 1$ bp, $\Delta 20$ bp		+1 bp
	B	+1 bp	$\Delta 20$ bp, $\Delta 6$ bp, $\Delta 2$ bp; $\Delta 1$ bp	$\Delta 11$ bp, $\Delta 10$ bp
	D	$\Delta 15$ bp	$\Delta 20$ bp, $\Delta 4$ bp, $\Delta 1$ bp;	$\Delta 16$ bp, $\Delta 2$ bp
gRNA5	A	$\Delta 1$ bp		$\Delta 7$ bp
	B		$\Delta 2$ bp, $\Delta 1$ bp	$\Delta 22$ bp, +1 bp
	D			$\Delta 64$ bp, $\Delta 58/+7$ bp, $\Delta 3$ bp

Die durch gRNA4 und Cas9 induzierten 1 bp- und 20 bp-Deletionen im A-Genom und die 15 bp-Deletion im D-Genom wurden an nachfolgende Generationen vererbt.

4.1.5.6. Kreuzungen von Primärmutanten

Um die Anzahl neuer Allele zu erhöhen und neue Mehrfachmutanten zu erhalten wurden verschiedene primärmutierte WCH1-Pflanzen miteinander gekreuzt (Tabelle 20). Da die Pflanzen zum Zeitpunkt der Kreuzung bereits sehr fortgeschritten in ihrer Entwicklung waren, konnten nur für einen Teil der Kreuzungen, d.h. 97x113 und 108x81, Körner geerntet und neu ausgesät werden.

Tabelle 20 – Kreuzungskombinationen und Anzahl der entstandenen Körner

♀		♂		Körner
Pflanze	Genotyp	Pflanze	Genotyp	
E97	A heterozygot/chimär	x E113	B heterozygot/chimär gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	11
E108	WT	x E81	WT gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	2
E101	B heterozygot/chimär	x E111	A heterozygot/chimär gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	0
E101	B heterozygot/chimär	x E110	A heterozygot/chimär	0
E113	B heterozygot/chimär gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	x E111	A heterozygot/chimär gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	0
E113	B heterozygot/chimär	x E110	A heterozygot/chimär	0

4.1.6. Genotypische Analyse von Selbstungsnachkommen

4.1.6.1. M2-Generation

a) WCH1

Zur Analyse der Vererbbarkeit induzierter Mutationen wurden Nachkommen von sowohl primär-mutierten Pflanzen (E6, E97, E101, E110, E111 und E113) sowie von T-DNA-transgenen Pflanzen (E45b und E81) und der aus der Transformation entstandene Wildtyp E108 weiter untersucht. Viele Pflanzen zeigten chimäre Mutationen in allen drei Subgenomen, jedoch wurden in einigen Nachkommen der Pflanzen E6 (Tabelle A16), E101 (Tabelle A17) und E113 (Tabelle A19) homozygote^(*) Mutationen in einzelnen Subgenomen gefunden. Die Nachkommen der Pflanzen E45b, E81, E108 und E110 waren Wildtypen und ohne T-DNA. Die E97-Nachkommen zeigten nicht die in 4.1.5.3. beschriebene Mutation im Zielmotiv 5, aber in 5 von 9 Nachkommen wurde weiterhin die gRNA4-DNA nachgewiesen. Die Nachkommen der Pflanze E101 zeigten eine T-DNA-freie und teils homozygote 1 bp-Insertion in der B-Kopie von *Branched head*. Heterozygot-chimäre Mutationen waren in den Nachkommen der Pflanze E111 sichtbar (Tabelle A18). Die Pflanze E6-6 zeigte als einziger Nachkomme Mutationen im Zielmotiv 5 im A- und im D-Genom.

In den nachfolgenden Generationen wurden somit die Pflanzenfamilien 6, 101, 111 und 113 weiter untersucht, wobei sich die Pflanzenfamilie 6 auf die Nachkommen der Pflanze E6-3 beschränkt, die als einzige Vertreterin der M2-Nachkommen Körner gebildet hat. Die Pflanzen E101-1 und E101-5 erwiesen sich bereits als stabile *knockout* (KO)-Pflanzen für die B-Kopie von *Branched head*, da keine T-DNA vorhanden war.

b) WCH2

Es erfolgte eine Analyse von 9-10 Nachkommen der WCH2-Primärpflanzen E12 und E19. Dabei konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Sechs von 9 Nachkommen der E12 besaßen gRNA4- und *cas9*-DNA. Es wurde keine weitere Untersuchung nachfolgender Generationen durchgeführt.

4.1.6.2. M3-Generation

In der M3-Generation wurden 8 Nachkommen von ausgewählten WCH1-M2-Pflanzen untersucht, wobei keine Pflanze Mutationen in der Zielregion 5 besaß. Neben den bereits stabilen Nachkommen der Pflanze E101 (Tabelle A17), die eine 1 bp-Insertion im B-Genom aufwies, konnten mit den Pflanzen E111-4-2 und E113-7-1 zwei weitere stabil mutierte Pflanzen gefunden werden, die KO-Mutationen im A-Genom (E111, Tabelle A18) und im D-Genom (E113, Tabelle A19) trugen. Auch zeigten mehrere Nachkommen der Pflanze E6 homozygote Mutationen in allen drei Subgenomen, jedoch hatten diese Pflanzen noch die T-DNA der gRNA5 und waren somit noch nicht genetisch stabil (Tabelle A16).

Um eine größere Auswahl von Homoeoallelkombinationen zu erhalten und bestehende Mutationen durch die Entfernung der T-DNA zu stabilisieren, erfolgten Rückkreuzungen mit dem Wildtyp (E6-3-8), sowie Kreuzungen zwischen stabilen Einzelgenommutanten für *Branched head* (siehe 4.1.8.) um Pflanzen mit zwei mutierten Homoeoallelen zu erzeugen (E101-1-1, E101-9-1, E111-3-4, E111-4-2 und E111-4-8). Außerdem wurden von einigen Pflanzen doppelhaploide(*) Nachkommen (siehe 4.1.9.) zur genetischen Fixierung der Mutationen erstellt (E6-3-2, E6-3-4, E101-2-2, E111-1-7, E111-4-3, E111-4-7, E111-4-8, E113-3-1 und E113-3-5).

4.1.6.3. M4-Generation

Um weitere stabile Homoeoallelkombinationen zu erzeugen wurden die Nachkommen der M3-Generation erneut näher untersucht. Dabei wurden stabil-mutierte Nachkommen der Pflanze E6 (Tabelle A16) gefunden, die zwar noch T-DNA mit gRNA4, *cas9* und *hpt* enthielten, jedoch Mutationen im Zielmotiv 4 aller drei Subgenome aufwies, wodurch dort keine weiteren Doppelstrangbrüche initiiert werden können. Die gRNA5-DNA war in diesen Pflanzen heraussegregiert. Diese beiden Nachkommen E6-3-2-2 und E6-3-4-5 unterschieden sich in der Größe der Deletionen im B-Genom.

Die stabile 11 bp-Deletion im B-Genom in den Pflanzen E113-7-1-1 und -5 (Tabelle A19) führte wie in E101-Nachkommen (Tabelle A17) zur Leserahmenverschiebung und wurde nicht für weitere Analysen verwendet. Außerdem konnte in der Pflanze E113-3-1-2 ein mutiertes B- und D-Allel gefunden werden. Dieser Zustand war jedoch noch nicht genetisch stabil, da durch die Anwesenheit von *cas9* und gRNA4-DNA noch eine Mutation im A-Genom erfolgen konnte.

4.1.6.4. M5-Generation

Um eine erste Phänotypisierung^(*) (siehe 4.2.2.) verschiedener Homoeoallelkombinationen durchzuführen, wurden jeweils 5 bis 10 Nachkommen von M4-Pflanzen ausgesät. Die Genotypen der M4-Generation wurden dabei bestätigt (Tabellen A16, A17, A18). Neu hinzugekommen waren genetisch-stabile Pflanzen als Nachkommen von E113-3-1-2, die keine nachweisbares T-DNA mehr aufweisen, jedoch eine Mutation im B- und im D-Subgenom zeigten (Tabelle A19).

4.1.6.5. M6-Generation

In der bislang finalen M6-Generation wurden die homozygoten und stabil mutierten Genotypen vorheriger Generationen bestätigt und phänotypisch analysiert (siehe 4.2.3.). Es lagen zwei Pflanzenfamilien mit drei mutierten Homoeoallelen, eine BD-Mutante sowie je eine Einzelgenommutante für das A- und das B-Subgenom vor.

4.1.7. Genotypische Analyse von Nachkommen aus untereinander gekreuzten Primärmutanten

4.1.7.1. F1-Generation

Die aus der Kreuzung der Primärmutanten (siehe 4.1.5.6., Tabelle 19) hervorgegangenen Körner wurden, da sie teils sehr klein und verschrumpelt waren, auf MS-Medium gekeimt und die Keimlinge anschließend in Erde überführt. Es wurden 7 Pflanzen der 97 x 113-Kreuzung sowie beide Vertreter der 108 x 81-Kreuzung auf ihren Genotyp untersucht. In den vier 97 x 113-Kreuzungsnachkommen 3, 4, 5 und 6 konnte T-DNA nachgewiesen werden, wobei in der Pflanze 5 nur die Anwesenheit der gRNA4-codierenden Expressionseinheit mittels PCR bestätigt werden konnte. Pflanze 3 zeigte chimäre Mutationen im B-Genom, Pflanze 4 im A-Genom und Pflanze 5 im D-Genom, jeweils im Zielmotiv 4. Pflanze 6 besaß ausschließlich WT-Allele für alle drei Subgenom-Kopien von *Branched head* (Tabelle 21). Die anderen gekeimten Pflanzen zeigten weder die Anwesenheit von T-DNA noch Mutationen in der Zielregion.

Tabelle 21 – Genotypisierung der Nachkommen aus untereinander gekreuzten Primärmutanten

Pflanzen-ID	<i>Bh-A</i>	<i>Bh-B</i>	<i>Bh-D</i>	T-DNA
97x113-3	WT	heterozygot/ chimär	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
97x113-4	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
97x113-5	WT	WT	heterozygot/ chimär	gRNA4
97x113-6	WT	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

Die Tochterpflanzen 3, 4 und 5 wurden geselbstet und in nachfolgenden Generationen näher untersucht.

4.1.7.2. F2-Generation

Es wurden jeweils 8 Nachkommen der primären Kreuzungsnachkommen auf Mutationen im Zielmotiv 4 untersucht. Die Nachkommen der ursprünglichen Pflanzen 3 (Tabelle A20) und 4 (Tabelle A21) wiesen einen hohen Anteil an chimären Mutationen in den verschiedenen Subgenom-Kopien von *Branched head* auf. Zwei Nachkommen der Pflanze 5 zeigten eine homozygote KO-Mutation im D-Genom und waren bereits stabil, da keine T-DNA nachgewiesen wurde (Tabelle A22).

Die Pflanzen 97x113-3-1, -4-3, -5-3 und -5-5 wurden über Selbstung in die nächste Generation überführt. Die Pflanzen 97x113-4-3 und -4-8 wurden ausgewählt, um doppelhaploide^(*) Pflanzen zur Stabilisierung der chimären Mutationen zu erzeugen (siehe 4.1.9.). Die beiden *Bh*-D-KO-Pflanzen 97x113-5-3 und -5-5 wurden mit *Bh*-A- bzw. -B-KO-Pflanzen der M3-Generation (siehe 4.1.6.2.) gekreuzt, um Pflanzenvertreter mit zwei mutierten Homoeoallelen zu erhalten (siehe 4.1.8.).

4.1.7.3. F3-Generation

Zur Stabilisierung verschiedener Allele wurden Selbstungsnachkommen der vorhergehenden F2-Generation auf ihre Genotypen untersucht. Neben den bestehenden genetisch-stabilen *Bh*-D-KO-Pflanzen der Kreuzungsfamilie 5 (Tabelle A22) konnte mit der Pflanze 97x113-3-1-2 eine stabile *Bh*-B-Mutante gefunden werden, in der eine Kombination aus Insertion und Deletion insgesamt eine 3 bp-Insertion im Zielmotiv 4 der B-Kopie von *Branched head* verursachte (Tabelle A20). Somit war der Leserahmen des Proteins nicht beeinflusst. In dieser Pflanze war die gRNA4-Transgensequenz nicht mehr nachweisbar, wodurch keine weiteren Doppelstrangbrüche durch Cas9 induziert werden können.

Die Nachkommen der Kreuzungspflanze 4 (Tabelle A21) waren in hohem Maß heterozygot und chimär, nur die Pflanze 97x113-4-3-4 war vollständig und stabil mutiert, mit einer sehr großen Deletion verbunden mit einer Insertion im A-Genom, einer Deletion kombiniert mit einer großen Insertion im B-Genom und einer 1 bp-Deletion im D-Genom. Alle drei Mutationen führten zu einer Leserahmenverschiebung, welche offenbar dazu führte, dass diese Pflanze keine Körner bilden konnte. Die Pflanze 97x113-4-3-6 zeigte eine 24 bp-Deletion in der B-Subgenomkopie von *Branched head*.

4.1.7.4. F4-Generation

Die F4-Generation diente der Bestätigung der Genotypen sowie der anschließenden Phänotypisierung^(*) der Nachkommen der Kreuzungspflanzen 3 und 5 (siehe 4.2.2.) sowie der weiteren Untersuchung der Segregation der F3-Pflanze 97x113-4-3-6, um weitere Allelkombinationen zu erhalten (Tabelle A21). Zwei Nachkommen der Kreuzungspflanze 4, die Pflanzen 97x113-4-3-6-4 und -6-5, zeigten KO-Mutationen im A- und im D-Genom sowie die in 4.1.7.3. bereits beschriebene 24 bp-

Deletion im B-Genom, welche den Leserahmen nicht verschiebt. Beide Pflanzen bildeten jedoch keine Körner. Lediglich die im D-Genom noch chimär-mutierte Pflanze 97x113-4-3-6-6 war in der Lage, Körner zu bilden. In der bereits homozygoten B-Mutante 97x13-3-1-2-3 wurde nur noch *cas9*-DNA nachgewiesen werden (Tabelle A20). Ansonsten zeigte die Sequenzierung keine neuen Mutationen in den Nachkommen der Kreuzungspflanzen 3 und 5.

4.1.7.5. F5-Generation

Zur finalen Phänotypisierung (siehe 4.2.3.) wurden die Pflanzen 97x113-3-1-2-3 und 97x113-5-3-1-1 erneut ausgepflanzt und auch die Nachkommen der Pflanze 97x113-4-3-6-6 wurden auf kornbildende *Bh*-Allelkombinationen untersucht. Nur der Nachkomme 97x113-4-3-6-6-9 war homozygot mit KO-Mutationen des A- und des D-Genoms sowie einer Mutation mit Erhalt des *Bh*-Leserahmens im B-Genom (Tabelle A21).

4.1.8. Genotypische Analyse von Nachkommen untereinander gekreuzter Mutanten und aus Rückkreuzungen mit dem Wildtyp

Die Nachkommen aus Selbstbestäubungen (siehe 4.1.6.2.) und Kreuzungen von Primärmutanten (siehe 4.1.7.2.) wurden untereinander gekreuzt, um KO-Mutanten für zwei (C2, C3, C4) bzw. drei Homoeoallele (C1) zu erzeugen. Die Kreuzung C5 wurde durchgeführt, um die Expression der vorhandenen T-DNA zu reaktivieren. In der Kreuzung C6 erfolgte eine Rückkreuzung der in allen drei Homoeoallelen mutierten Pflanze E6-3-8 mit dem Wildtyp Bobwhite, um eine in mehreren Allelen mutierte Pflanze ohne T-DNA zu erhalten. Eine Übersicht über die Elternpflanzen der verschiedenen Kreuzungen ist in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22 – Übersicht über die Kreuzungspartner der Rückkreuzung und die Bezeichnung der Kreuzungsprodukte

	♀	x	♂		
Pflanze	Genotyp		Pflanze	Genotyp	Bezeichnung
E111-4-8	A: heterozygot/chimär, D: heterozygot/chimär, gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	x	E101-5-1	B: +1 bp	C1/A
E101-5-1	B: +1 bp	x	E111-4-8	A: heterozygot/chimär, D: heterozygot/chimär, gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	C1/B
E111-4-2	A: Δ1 bp bp	x	97x113-5-5	D: Δ11/+1 bp	C2/A
97x113-5-3	D: Δ11/+1 bp	x	E111-4-2	A: Δ1 bp	C2/B
97x113-5-5	D: Δ11/+1 bp	x	E111-4-2	A: Δ1 bp	C2/C
E101-9-1	B: +1 bp	x	97x113-5-3	D: Δ11/+1 bp	C3/A
97x113-5-3	D: Δ11/+1 bp	x	E101-9-1	B: +1 bp	C3/B
E101-1-1	B: +1 bp	x	E111-4-2	A: Δ1 bp	C4/A
E111-3-4	A: Δ1 bp, gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	x	E111-4-2	A: Δ1 bp	C5/A
BW	WT	x	E6-3-8	A: Δ20 bp; B: Δ6 bp; D: Δ15 bp, gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	C6/A

Die Kreuzung C1/A ergab keinen Kornansatz und die Körner der Kreuzung C5/A wurden wegen der übereinstimmenden Mutation im A-Genom nicht weitergeführt.

4.1.8.1. BC-F1-Generation

Die Hybriden aus den Kreuzungen C1, C2, C3, C4 und C6 wurden auf ihren Genotyp untersucht (Tabelle 23). Dabei waren die Pflanzen der C2-, C3- und C4-Kreuzung wie erwartet heterozygot, wodurch unter deren Nachkommen homozygote KO-Mutationen in zwei Subgenomen erwartet wurden. Die C6-Kreuzungspflanzen waren ebenfalls heterozygot und zeigten keine neuen Mutationen im gRNA5-Zielmotiv. Da die Nachkommen der C1-Kreuzung in sehr hohem Maße chimär waren, wurden sie nicht weitergeführt.

Tabelle 23 – Auswahl der detektierten Genotypen der rückgekreuzten BC-F1-Pflanzen

Pflanzen-ID	<i>Bh-A</i>	<i>Bh-B</i>	<i>Bh-D</i>	T-DNA
C1/B-3	heterozygot/chimär	WT//+1 bp	WT	
C1/B-8	WT	WT//+1 bp	WT	
C1/B-10	WT	WT//+1 bp	heterozygot/chimär	
C2/A-3	WT//Δ1 bp	WT	WT//Δ11/+1 bp	
C3/A-1	WT	WT//+1 bp	WT//Δ11/+1 bp	
C4/A-4	WT//Δ1 bp	WT//+1 bp	WT	
C6/A-1	WT//Δ20 bp	WT//Δ6 bp	WT//Δ15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

4.1.8.2. BC-F2-Generation

Die durch Selbstung erstellten Nachkommen der BC-F1-Generation wurden auf ihre *Bh*-Allelkombinationen untersucht. Dabei wurden homozygote BD-KO-Mutationen mit den Pflanzen C3/A-1-2 und -7 gefunden (Tabelle A24). Die Nachkommen der C2- (Tabelle A23) und C4-Kreuzung (Tabelle A25) waren in einem Subgenom noch heterozygot und benötigen eine weitere Generation, um homozygote AD bzw. AB-KO-Mutanten zu generieren. Die C6-Kreuzung ergab verschiedene Einzelpflanzen mit unterschiedlichen Allelkombinationen (Tabelle A26). Pflanze C6/A-1-15 wies Mutationen in den A- und B-Subgenomen auf, wobei B bei Erhalt des *Bh*- Leserahmens mutiert war. Die Schwesterpflanze C6/A-1-17 war homozygot im A- und heterozygot im D-Subgenom mutiert, wobei D keine KO-Mutation besaß. Die Pflanze C6/A-1-19 entsprach der ursprünglichen E6-3-8-Elternpflanze und enthielt die vollständige T-DNA der beiden gRNAs, von *cas9* und *hpt*, wohingegen Pflanze C6/A-1-20 das Potenzial hatte, T-DNA-freie, in allen drei Homoeoallelen mutierte Nachkommen hervorzubringen. Die Pflanzen wurden auf phänotypische^(*) Besonderheiten untersucht (siehe 4.2.2.)

Um homozygote Mutationen zu erhalten war eine weitere Selbstung nötig, wobei dafür nur Nachkommen T-DNA-freier Pflanzen verwendet wurden.

4.1.8.3. BC-F3-Generation

In der BC-F3-Generation wurde eine abschließende Phänotypisierung durchgeführt (siehe 4.2.3.), wobei entsprechend der Genotypisierung überwiegend homozygot-mutierte Pflanzen vorlagen. Die Pflanze C2/A-3-2-8 erwies sich als AD-KO-Mutante (Tabelle A23) und die Pflanze C4/A-9-4 wies KO-Mutationen im A- und B-Subgenom auf (Tabelle A25). Aus der C6-Kreuzung wurden verschiedene Allelkombinationen gewonnen (Tabelle A26): Pflanze C6/A-1-15-15 hatte eine B-Mutation ohne Leserahmenverschiebung, 1-15-13 war eine AB-Mutante, wobei A eine KO-Mutation und B eine Mutation mit Erhalt des Leserahmens war. C6/A-1-17-16 zeigte Mutationen im *Bh*-A- und im -D-Allel, wobei D ohne Leserahmenverschiebung mutiert war. Pflanze C6/A-1-20-5 wies eine KO-Mutation im *Bh*-A-Allel auf, während die Schwesterpflanzen C6/A-1-20-6 und -8 in allen drei *Bh*-Homoeoallelen mutiert waren, wobei B bzw. D noch heterozygot vorlagen.

4.1.9. Genotypische Analyse doppelhaploider Nachkommen von Mutanten

Eine Auswahl von Nachkommen aus Selbstbefruchtungen (siehe 4.1.6.2.) und Kreuzungen von Primärmutanten (siehe 4.1.7.2.) wurden zur Herstellung von doppelhaploiden^(*) (DH) Nachkommen verwendet, um die mutierten Allele genetisch zu fixieren. Hierfür wurden von den Kandidatenpflanzen Antheren im Mikrosporenstadium kultiviert und Pflanzen über Pollenembryogenese regeneriert (siehe 3.16.1.; Tabelle A27). Die Regeneration ergab 82 Pflanzen, von denen nach Bestimmung der Ploidiestufe^(*) 44 als allohexaploide Pflanzen identifiziert wurden. Siebenunddreißig Pflanzen hatten nur einen einfachen tri(hap)loiden Chromosomensatz, sodass versucht wurde, eine Genomduplikation mittels Colchizin zu erreichen. Dies führte jedoch nur in drei Fällen zu Pflanzen mit Körnern. Zusätzlich war 1 Pflanze nonaploid und bildete entsprechend auch keine Körner aus (Tabelle A27). Von der Gesamtzahl der Pflanzenregenerate sind 27 Pflanzen abgestorben. Die Auswertung der DH-Regenerate zeigte einen hohen Grad an Chimärität bei Vorhandensein von gRNA und *cas9*, wenn Wildtyp-Allele von *Branched head* vorlagen. In 13 DH-Pflanzen wurden chimäre Mutationen nachgewiesen.

4.1.9.1. DHs der M3-Generation nach Selbstung von Mutanten

Die DH-Linien, welche ausgehend von der M3-Generation (siehe 4.1.6.2.) hergestellt wurden, zeigten in den meisten Fällen die bereits bekannten Mutationen der Ursprungspflanzen, jedoch konnten zwei neue Allele aus der Ursprungspflanze E111-4-8 hergestellt werden (Tabelle A18). Die Pflanze E111-4-8-DH1 wies eine Kombination aus Deletion und Insertion in der D-Kopie von *Branched head* auf, welche zu einem KO führt. Die gleiche Mutation wurde auch an die Pflanze E111-4-8-DH3 weitergegeben, wobei hier auch das A-Genom eine KO-Mutation aufweist. Beide Pflanzen enthalten keine T-DNA und die vorhandenen Allele von *Branched head* sind somit in genetisch stabilem Zustand.

4.1.9.2. DHs der F2-Generation nach Kreuzung von Primärmutanten

Ein Großteil der aus der F2-Generation (siehe 4.1.7.2.) hergestellten DH-Regenerate ist im Verlauf der Entwicklung abgestorben, jedoch konnten vier doppelhaploide Pflanzen aus der Ursprungspflanze 97x113-4-3 gewonnen werden (Tabelle A21). In diesen wurden mittels PCR weiterhin gRNA4 und *cas9* nachgewiesen, jedoch waren bereits die Zielmotive von gRNA4 in allen drei Homoeoallelen von *Branched head* mutiert, wodurch keine weiteren Veränderungen zu erwarten waren. Die Pflanzen 97x113-4-3-DH4 und -DH5 zeigen KO-Mutationen in allen drei Subgenomen und bildeten keine Körner. Die Pflanzen 97x113-4-3-DH8 und -DH10 besaßen neben den KO-Mutanten im A- und im B-Subgenom eine Mutation mit Erhalt des Leserahmens im D-Subgenom, jedoch brachte nur die DH8 Körner hervor. Die Pflanze 97x113-4-3-DH10 wies eine Deletion im D-Subgenom auf, die zum Verlust von 8 Aminosäuren führte und keine Körner bildete.

4.1.9.3. Analyse der Nachkommen von DHs

Die aus einer Selbstung erstellten Nachkommen der DH-Pflanzen E111-4-8-DH1, -DH3 und 97x113-4-3-DH8 zeigten keine Veränderungen im Genotyp und wurden zur abschließenden Phänotypisierung^(*) verwendet (siehe 4.2.3.).

4.1.10. Überblick aller mittels Cas9 generierten *Branched head*-Allele und deren Kombinationen

Insgesamt wurden durch eine gezielte Mutagenese mittels der Cas9-Endonuklease^(*) und anschließende Selbstungen, Kreuzungen sowie die Herstellung doppelhaploider Pflanzen 14 vererbare Mutationen in allen drei *Bh*-Homoeoallelen generiert, die aufgrund von Leserahmenverschiebungen entweder sicher zum Funktionsverlust des jeweiligen *Bh*-Allels führten oder der *Bh*-Leserahmen blieb erhalten (Tabelle 24).

Tabelle 24 – Übersicht über die durch gezielte Mutagenese generierten vererbaren Allele von *Branched head*; * Mutation ohne Leserahmenverschiebung; grün: *Bh*-Zielmotiv 4 (PAM unterstrichen); gelber Hintergrund: Schnittstellen der Cas9 Endonuklease 3-4 bp vor der PAM, rot: Mutation

<i>Bh</i> -Allel	Mutation	DNA-Sequenz der Zielregion
		5' 3'
<i>Bh-A1</i>	WT	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA GGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA-GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ20 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGA-----CTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
<i>Bh-B1</i>	WT	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA GGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	+1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA GGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ6 bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACC-----GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ11 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCA-----TGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ36 bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCA-----AG
	Δ39 bp*	AC-----TGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG

<i>Bh</i> -Allel	Mutation	DNA-Sequenz der Zielregion 5'-----3'
	Δ10/+13bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCG CGCACGTCCAGGA AGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ5/+31 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCT TCGACACGGCCTACGACCACCTCGTGGCAG GCGGCACTGGCTC
<i>Bh-D1</i>	WT	ACGCGGCCGAGATAC GCGACCCGACCACCAAGGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA -GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ15 bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGA-----GCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ18/+7 bp	ACGCGGCCGAGATACGCG----- GCCGTGG -----GGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ11/+1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACC----- A -----GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ8/+2 bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACC----- CG -----GCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG

Dazu kam eine Vielzahl von Mutationen in allen drei *Bh*-Homoeoallelen in beiden Zielmotiven 4 & 5, die nicht in nachkommende Generationen weitergegeben wurden (Tabelle 25).

Tabelle 25 – Übersicht über die nicht vererbten, durch gezielte Mutagenese generierten Mutationen von Branched head; * Mutation ohne Leserahmenverschiebung; grün: *Bh*-Zielmotiv 4 und 5 (PAM unterstrichen); gelber Hintergrund: Schnittstellen der Cas9 Endonuklease 3-4 bp vor der PAM, rot: Mutation

ZM/ <i>Bh</i> -Allel	Mutation	DNA-Sequenz der Zielregion 5'-----3'
ZM4/A	WT	ACGCGGCCGAGATAC GCGACCCGACCACCAAGGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	+1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA AGGAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ11 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCA----- TGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ14 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACC----- CGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ129/+17bp	ACG----- TAGACGCGACCCGGTAC -----
ZM4/B	WT	ACGCGGCCGAGATAC GCGACCCGACCACCAAGGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ10 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCC----- GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ24 bp*	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGAC----- CACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ9/+13 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCC GCCGAGATAAGCCGAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
ZM4/D	WT	ACGCGGCCGAGATAC GCGACCCGACCACCAAGGAGCGG CACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	+1 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA GGGAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ2 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCA -GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ16 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACC----- GGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ24 bp	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGAC----- CACCTTCGACACGGCGCAG
	Δ32 bp	ACGCGGC----- ACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAG
ZM5/A	WT	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAG CCGCCTACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	+1 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCGCCTACAAC AACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ1 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCGCC -ACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ7 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCG----- CAACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ30/+48 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCGCTA GCCGCTACGCGCGTCTCGGCCATGCCGTACGGCGGCCAGCAGCAG
ZM5/B	WT	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAG CCGCCTACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	+1 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCGCCT ACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ22 bp	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAC----- CCTTCCTCGCGCCGTTCC
ZM5/D	WT	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAG CCGCCTACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ3 bp*	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCAGCCG -ACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ58/+7 bp*	AGGC----- CGCCCA -----CCGTTCC
	Δ64 bp	----- CAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC
	Δ9/+6 bp*	AGGCGCGCACCAACTTCGTCTACGCGC -GCGCGG-ACAACA ACTACCCGCCCTTCCTCGCGCCGTTCC

Die generierten vererbten *Bh*-Allele (Tabelle 24) bilden miteinander diverse Allelkombinationen, wobei entweder ein, zwei oder alle drei *Bh*-Homoeoallele mutiert sind (Tabelle 26). Pflanzen mit Funktionsverlust-Mutationen in allen drei Kopien von *bh* waren nicht in der Lage, Körner zu bilden (Tabelle 26, Pflanze 97x113-4-3-DH5). Auch die Kombination von KO-mutierten A- und D-Allelen mit einem im verbleibendem Leserahmen mutiertem B-Allel von *Bh* führte zur Infertilität der Pflanze (Tabelle 26, Pflanze 97x113-4-3-6-6-9). Im Gegensatz dazu waren Pflanzen mit Funktionsverlust-Mutationen im A- und B-Homoeoallel und einer Mutation mit verbleibendem Leserahmen der D-Kopie von *Bh* in der Lage, Körner zu bilden (Tabelle 26, Pflanze 97x113-4-3-DH8).

Tabelle 26 – Genetisch fixierte Allelkombinationen von *Branched head*; blau: nicht phänotypisch analysiert, rot: keine Kornbildung, grün: Mutation mit Erhalt des Leserahmens

Pflanzen-IDs	<i>Bh</i> -A	<i>Bh</i> -B	<i>Bh</i> -D	T-DNA	Generation mit genetisch fixiertem Zustand
E108	wt	wt	wt		M1
<i>Pflanzen mit einem mutierten Homoeoallel</i>					
E111-4-2-1-1	Δ1 bp	wt	wt		M3
C6/A-1-17-1; C6/A-1-17-4; C6/A-1-20-5; C6/A-1-20-12	Δ20 bp	wt	wt		BC-F3
E101-1-1-1-2	wt	+1 bp	wt		M2
E113-3-7	wt	Δ11 bp	wt		M3
97x113-3-1-2-3	wt	Δ10/+13	wt		F3
C6/A-1-15-1; C6/A-1-15-4; C6/A-1-15-12; C6/A-1-15-15	wt	Δ6 bp	wt		BC-F3
97x113-5-3-1-1	wt	wt	Δ11/+1		F2
E111-4-8-DH1	wt	wt	Δ18/+7		DH
<i>Pflanzen mit zwei mutierten Homoeoallelen</i>					
C4/A-4-9	Δ1 bp	+1 bp	wt		BC-F3
C6/A-1-15-10; C6/A-1-15-13; C6/A-1-15-18; C6/A-1-15-19; C6/A-1-15-20	Δ20 bp	Δ6 bp	wt		BC-F3
E113-3-1-2-2	wt	Δ39 bp	Δ1 bp		M5
C3/A-1-2	wt	+1 bp	Δ11/+1		BC-F2
C2/A-3-2-8	Δ1 bp	wt	Δ11/+1		BC-F3
C6/A-1-17-8; C6/A-1-17-16	Δ20 bp	wt	Δ15 bp		BC-F3
E111-4-8-DH3	Δ1 bp	wt	Δ18/+7		DH
<i>Pflanzen mit drei mutierten Homoeoallelen</i>					
E6-3-2-2-1	Δ20 bp	Δ6 bp	Δ15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	M5
E6-3-4-5-10	Δ20 bp	Δ36 bp	Δ15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	M5
97x113-4-3-DH8	Δ1 bp	Δ5/+31	Δ8/+2	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	DH
97x113-4-3-DH5	+1 bp	Δ5/+31	Δ2 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	DH
97x113-4-3-6-6-9	Δ14 bp	Δ24 bp	Δ1 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>	F5

4.1.11. Durch Mikrohomologie-vermittelte DNA-Endverknüpfung entstandene Mutationen

Die meisten verursachten Mutationen in den Pflanzen gehen auf den DNA-Reparaturmechanismus der nicht homologen^(*) Endverknüpfung (NHEJ) zurück (siehe 1.2.5.1.). Einige Mutationen entstanden jedoch durch das Vorhandensein von kleinen homologen Sequenzen in der Nähe des Doppelstrangbruchs (Tabelle 27; siehe 1.2.5.2.). Die Anwesenheit dieser Mikrohomologien führte zu Deletionen von 10 bis 39 bp, wobei in drei von sechs Fällen eine Mutation mit Erhalt des *Bh*-Leserahmen erfolgte. Die Mikrohomologien umfassten zwei bis fünf Nukleotide.

Tabelle 27 – Mikrohomologie-basierte Mutationen in *Branched head*-Homoeoallelen; grün: Zielmotiv 4 (PAM unterstrichen), gelb hinterlegt: Mikrohomologien, senkrechte Striche: von Cas9 induzierte Schnittstellen

Pflanzenfamilie	Mutation	Genomische Sequenz mit DNA-Schnittstellen und Mikrohomologien
WT		ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA
E52	-10 bp (<i>bh</i> -B)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGAC----- - -----GCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA
97x113-4	-14 bp (<i>bh</i> -A)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA ACGCGGCCGAGATACGCGACCCG----- - -----GCACTGGCTCGGCACCTTCGA
E6	-15 bp (<i>Bh</i> -D)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA ACGCGGCCGAGATACGCGAC----- - -----GCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA
97x113-4	-24 bp (<i>Bh</i> -B)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCCACC----- - -----TTCGA
97x113-4	-32 bp (<i>bh</i> -D)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA ACGCGGC----- - -----ACTGGCTCGGCACCTTCGA
E113	-39 bp (<i>Bh</i> -B)	ACGCGGCCGAGATACGCGACCCGACCACCAA G GAGCGGCCTGGCTCGGCACCTTCGA AC----- - -----TGGCTCGGCACCTTCGA

4.1.12. Modifikation der funktionellen Domäne von *Branched head* in mutierten Pflanzen

Die 57 Aminosäuren große AP2/ERF-Domäne von *Branched head* wurde mittels der „conserved domain database“ von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>, ID: cd00018) untersucht. Diese beinhaltet mehrere Bindemotive für GCC-Boxen im Bereich um das gRNA4-Zielmotiv (Abbildung 8), welche teilweise durch die induzierten Mutationen verändert oder entfernt sind. Damit ist die Bindung an durch BH regulierte Gene möglicherweise beeinträchtigt.

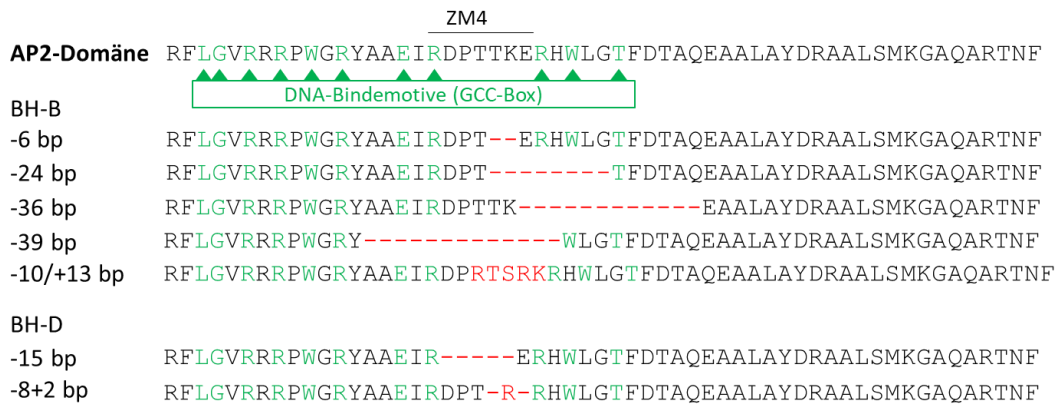


Abbildung 8 – AP2-Domäne in BRANCHED HEAD mit markierten Bindemotiven für GCC-Boxen (grün) und veränderter Aminosäurefolge in den Mutationen ohne Leserahmenverschiebung im Zielmotiv 4 des B- und D-Homoeoallels (rot)

Durch Verwendung eines Vorhersagemoduls zur Proteinfaltung für funktionelle Domänen (SWISS-MODEL; <https://swissmodel.expasy.org>) wurden die durch die verschiedenen Mutationen hervorgerufenen Veränderungen in der Faltung der AP2/ERF-Domäne von BRANCHED HEAD untersucht (Abbildung 9). Hinzugezogen wurden ebenfalls die veröffentlichten *Bh*-Allele *bh^t-A1* (Abbildung 9a; Poursarebani et al., 2015), *wfzp-D.1* und *wfzp-D.2* (Abbildung 9c, f; Dobrovolskaya et al., 2015).

Alle bekannten und neu generierten Mutationen mit Erhalt des Leserahmens in den drei Homoeoallen führten zwar zu minimalen Veränderungen, jedoch blieb die grundsätzliche Domänenstruktur im Anfangs- und Endbereich der Domäne erhalten (Abbildung 8; Abbildung 9a, b, c). Die KO-Mutationen führten in allen Fällen zu einer vollständigen Zerstörung des C-Terminalen Domänenabschnitts (Abbildung 9d, e, f), wobei die veränderten Aminosäuren im Vorhersagemodul in der Darstellung der Domänenstruktur nicht mehr berücksichtigt wurden.

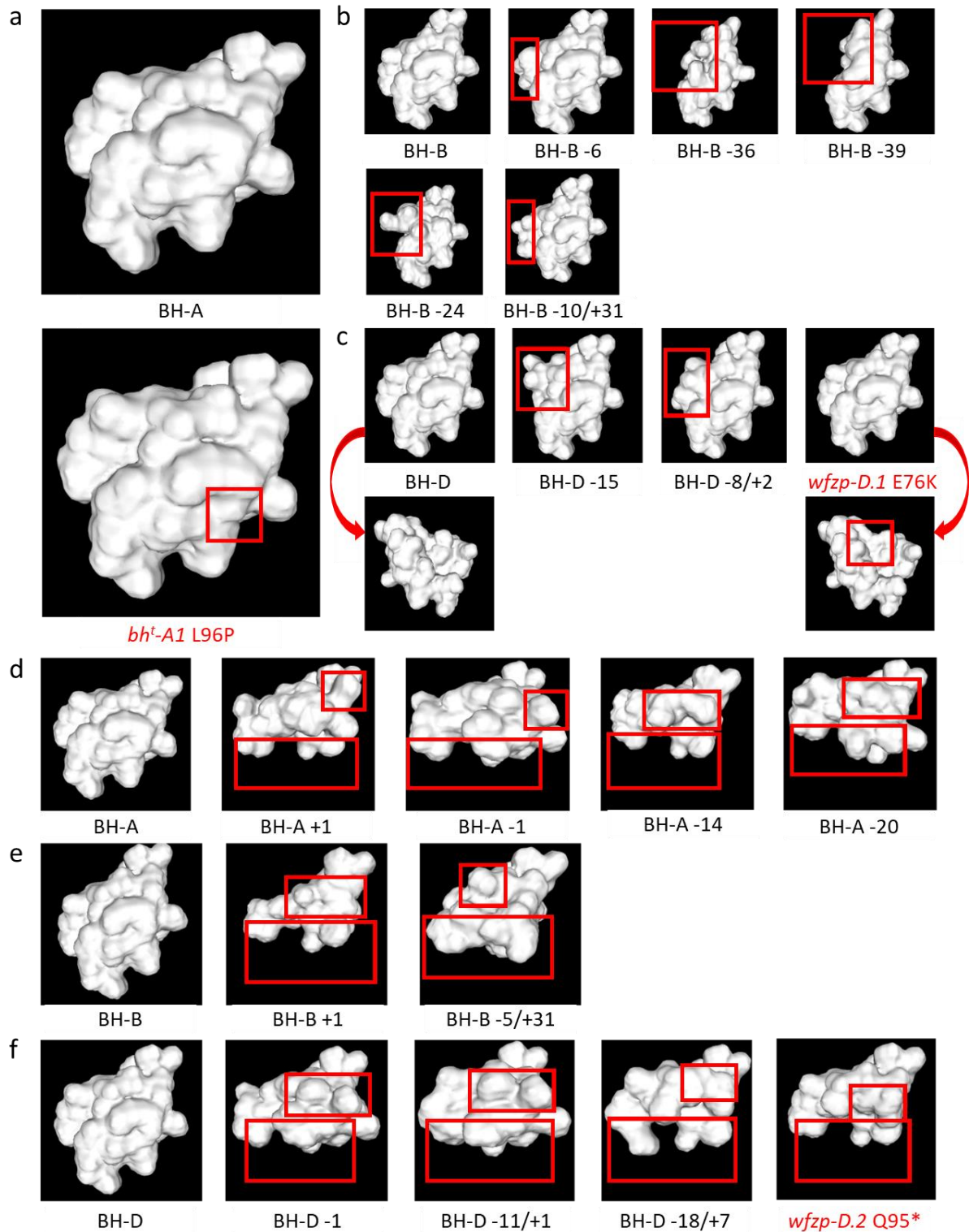


Abbildung 9 – AP2-Domänenstruktur mutierter Proteinvarianten von BRANCHED HEAD; (a) Vergleich von *Bh-A* in hexaploidem Weizen und dem Wunderweizen-Allel *bh^t-A1* aus Poursarebani et al., 2015; (b) Mutationen mit Erhalt des Leserahmens im *Bh-B*-Allel; (c) Mutationen mit Erhalt des Leserahmens im *Bh-D*-Allel, rote Pfeile zeigen Vorder- und Rückseite der Domäne, hinzugefügt wurde das *wfzp-D.1*-Allel von Dobrovolskaya et al., 2015; (d,e,f) KO-Mutationen von *bh* im A-Allel (d), B-Allel (e) und D-Allel (f), hinzugefügt wurde das *wfzp-D.2*-Allel von Dobrovolskaya et al., 2015; rote Boxen zeigen Veränderungen in der Struktur gegenüber den WT-Domänen

4.2. Ermittlung der Ausprägung der Eigenschaften phänotypischer Parameter von Weizen mit modifizierten *Branched head*-Allelen

In diesem Kapitel sollen die phänotypischen Eigenschaften der Weizenpflanzen beschrieben werden, die die in 4.1. generierten Allele von *Branched head* und deren Kombinationen aufweisen. So stehen Veränderungen des Phänotyps der Ähre im Vordergrund, aber auch auf Veränderungen im Spross, der Wurzel und der gebildeten Körner wird eingegangen.

4.2.1. Phänotypen der Ähre

4.2.1.1. Einzelpflanze 52

Wie in 4.1.5.3. beschrieben, war die Einzelpflanze 52 aus dem Experiment WCH1 hochgradig chimär^(*)/heterozygot^(*) bezüglich beider Zielmutive^(*) und aller drei Homoeoallele^(*). Trotz dieses genetischen Zustandes und der Fehleranfälligkeit der Phänotypisierung^(*) von Primärmutanten, hervorgerufen durch die Stressreaktion der Pflanzen auf die Transformation^(*) und anschließende Regeneration (Hensel et al., 2017), konnte in dieser Pflanze ein zum Kandidatengen passender Phänotyp beobachtet werden. Die gebildeten Ähren zeigten eine deutliche Entwicklungsstörung, da keine generativen^(*) Blütenorgane in den Ährchen^(*) gebildet wurden und auch die schützenden Spelzen^(*) nur unzureichend vorhanden waren (Abbildung 10).



Abbildung 10 – Phänotypen der primärmutierten Pflanze WCH1 E52 mit Verzweigungen in der Ähre (rote Dreiecke) und Fehlentwicklung der Ährchen- und Blütenmeristeme

Statt eines Ährchens entstand an mehreren Rachis^(*)-Nodien eine neue, rachisähnliche Verzweigung, an der jedoch keine normalen Ährchenmeristeme^(*) und Primordien^(*) gebildet wurden. Zusätzlich zu den Verzweigungen entstanden Ansätze für überzählige Ährchen, auch *supernumerary spikelets* genannt. Aufgrund der Schwere der phänotypischen Abweichungen wurden keine Körner gebildet und

somit konnten keine Nachkommen der Einzelpflanze 52 untersucht werden. Diese Pflanze zeigte anschaulich, dass ein nahezu vollständiger Funktionsverlust von BRANCHED HEAD Verzweigungen in der Ähre bewirkt, die jedoch nicht mehr fähig sind, Ährchen- und Blütenmeristeme auszubilden.

4.2.1.2. Einzelpflanze 6 und deren Nachkommen

Die primäre Einzelpflanze 6 aus dem Experiment WCH1 zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie die Einzelpflanze 52, besaß also an den Rachis-Nodien ebenfalls Verzweigungen und überzählige Ährchen (Abbildung 11). Im Unterschied zur Pflanze 52 waren nur das A- und das D-Homoeoallel von *Branched head* mutiert und im D-Allel bestand eine Mutation ohne Verschiebung des Leserahmens. Diese Unterschiede führten dazu, dass diese Pflanze augenscheinlich normale Körner bilden konnte.



Abbildung 11 – Phänotypen der primär mutierten Pflanze WCH1 E6, Bildung überzähliger Ährchen und kleine Ährenverzweigungen

Einige Selbstungsnachkommen dieser Pflanzen zeigten ebenfalls den oben beschriebenen Phänotyp (Abbildung 12), wobei - wie in 4.1.6.1. beschrieben – auch in diesen Fällen alle drei Homoeoallele mutiert waren. In Abhängigkeit von der Kombination der Allele konnte nur die Pflanze E6-3 Körner bilden und in den folgenden Generationen weitergehend untersucht werden. Die nachfolgenden Generationen bestätigten den Phänotyp, wobei trotz der Verzweigungen deutlich weniger Körner als im Wildtyp gebildet wurden (Abbildung 12). Viele der regulären und überzähligen Ährchen waren nicht vollständig entwickelt und somit steril. Verzweigungen der Ähre waren meist nur sehr klein und undeutlich sichtbar, lediglich die im B-Genom noch chimäre und/oder heterozygote Pflanze E6-3-6 bildete in einer Ähre vier große Verzweigungen, die jeweils einer neuen Ähre ähnlich waren. In den Ährchen dieser Verzweigungen wurden Körner gebildet. In der M5-Generation konnte bestätigt werden, dass die stabilen Mutationen zu einer deutlichen Störung der Ährchen- und

Blütchenentwicklung führen. Die Kombination der mutierten Allele von *Branched head* ist seit der M3-Generation stabil, der Phänotyp variiert jedoch und so kommt es innerhalb einer Pflanze immer zu überzähligen Ährchen, jedoch nicht in allen Fällen zu Verzweigungen. Auch die Kornbildung war in den Nachkommen unterschiedlich. Auch zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Pflanzenfamilien E6-3-2 und E6-3-4 der Folgegeneration, in denen nur die Mutationen in der B-Kopie variierten. Die Vertreter der E6-3-4-Familie wiesen eine 36 bp-Deletion^(*) im B-Genom auf und bildeten deutlich weniger Körner aus als die Vertreter der E6-3-2-Familie. Verzweigungen und überzählige Ährchen wurden auch in DH-Pflanzen und Nachkommen der Rückkreuzung von E6-3-8 mit dem Wildtyp (C6/A) beobachtet.

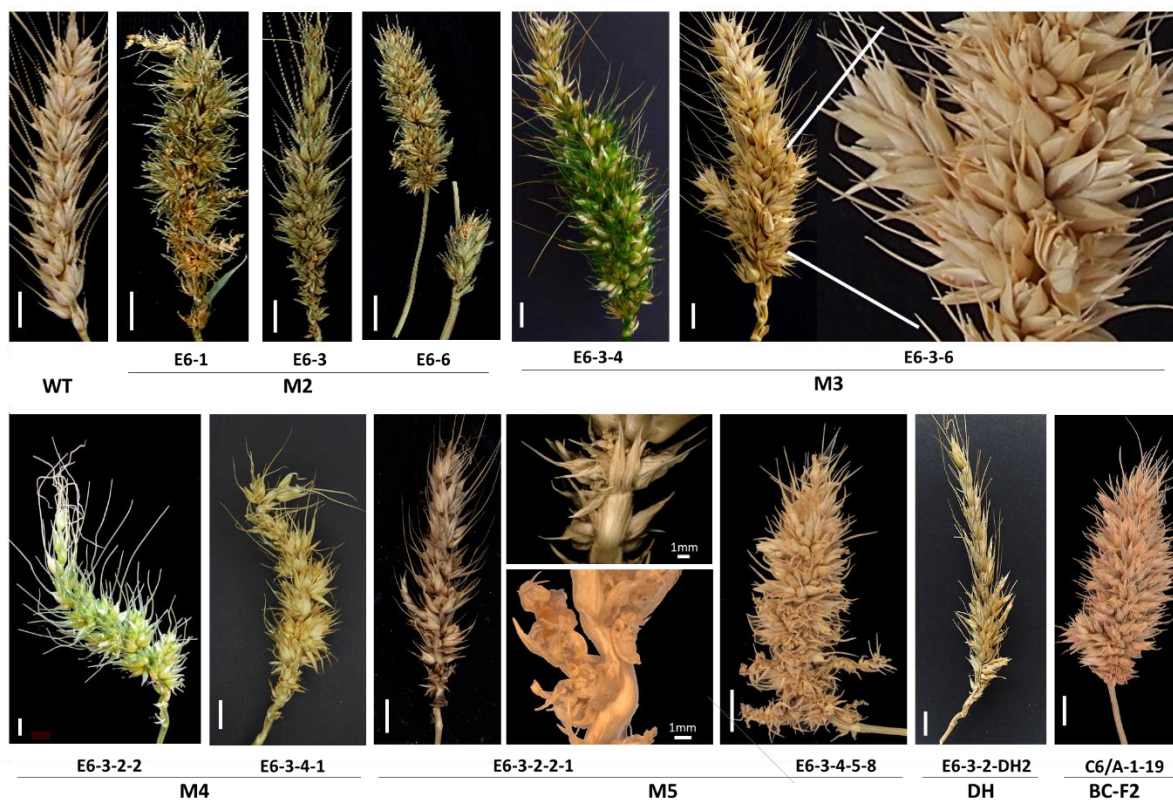


Abbildung 12 – Veränderte Ährenstruktur der E6-Nachkommen; weiße Balken entsprechen 1 cm bzw. wo angegeben 1 mm

4.2.1.3. Weitere Pflanzen mit verändertem Ährenphänotyp

Neben den Einzelpflanzen 52 und 6 sowie deren Nachkommen zeigten auch Nachkommen anderer Primärmutanten verschiedene phänotypische Veränderungen in ihren Ähren (Abbildung 13). So wiesen verschiedene DH-Pflanzen überzählige Ährchen auf (111-4-7-DH13), andere sogar komplette Verzweigungen der Ähre (97x113-4-3-DH8 und 111-4-7-DH3). Eine besonders deutliche Verzweigung besaß eine Ähre der Pflanze 111-4-7-DH3, obwohl nur die A-Kopie von *Branched head* mutiert war. Die verzweigte Ähre hatte jedoch kein entwickeltes Korn^(*). Der Phänotyp der DH-Pflanzen sollte jedoch mit Zurückhaltung interpretiert werden, da diese per in-vitro Regeneration entstanden sind und somit

Stress-ausgelöste epigenetische Veränderungen aufweisen können. Anders sieht es bei den Kreuzungsnachkommen 97x113-4-3-3 und 97x113-4-3-6-10 aus. Diese zeigten deutliche Verzweigungen, eine Überproduktion von Ährchen und bildeten keine Körner. In der Pflanze 97x113-4-3-3 konnten in der Genotypisierung^(*) nur Mutationen im B- und im D-Genom nachgewiesen werden, jedoch ist die T-DNA^(*) noch vorhanden und möglicherweise wurde im Verlauf der weiteren Individualentwicklung auch das A-Genom mutiert, in Folge dessen die Ährenentwicklung schwer gestört war. Die Pflanze 97x113-4-3-6-10 besaß überzählige Ährchen, jedoch wurden keine funktionellen Blüten gebildet und somit keine Körner. Die BD-Mutante 113-3-1-2-2 zeigte ebenfalls überzählige Ährchen. Eines dieser überzähligen Ährchen bildete 5 Körner.



Abbildung 13 – Veränderte Ährenstruktur weiterer Nachkommen primärmutierter WCH1-Pflanzen, welche durch Selbstung, Kreuzungen und Produktion doppelhaploider Pflanzen entstanden sind; weiße Balken repräsentieren 1 cm

4.2.1.4. Ährenphänotypen nach Mutationsart

Die Form der Ähre ist abhängig von den Mutationen, die in *Branched head* induziert wurden (Abbildung 14). So zeigen die Einzelgenommutanten in den meisten Fällen Wildtyp-Ähren, wobei die D-KOs der DH-Pflanzenfamilie E111-4-8-DH1 zum Teil überzählige Ährchen zeigen. Die in den *Bh*-Subgenomen^(*) A und B bzw. A und D mutierten Pflanzen wiesen überwiegend ebenfalls den Wildtyp-Phänotyp auf, wobei auch vereinzelte Ähren mit überzähligen Ährchen zu finden waren.

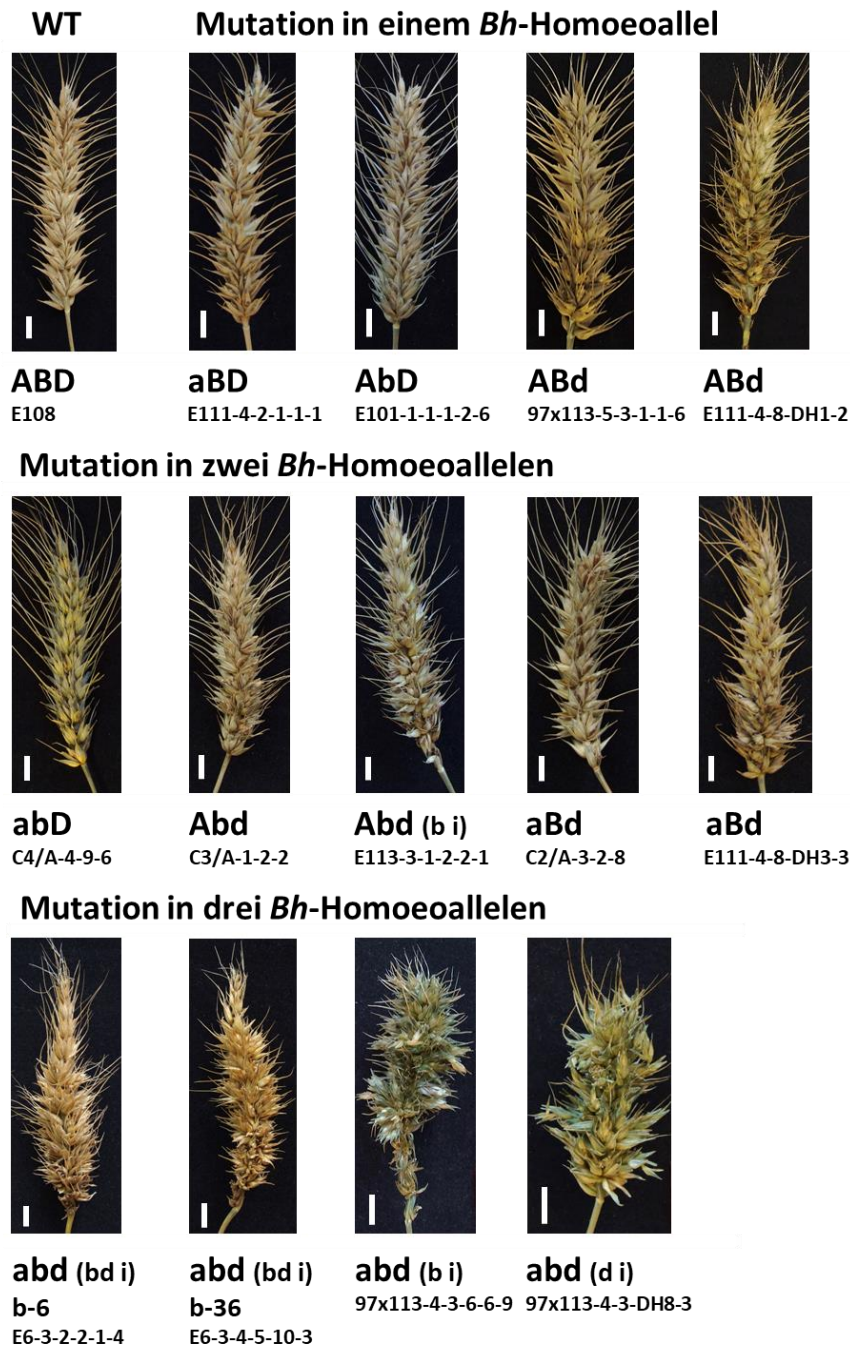


Abbildung 14 – Ährenphänotypen der Allelkombinationen von *Branched head* (*Bh*); A/B/D: *Bh*-Homoeoallele; a/b/d: mutierte *bh*-Allele; i: Mutationen ohne Leserahmenverschiebung in den vorangestellten *Bh*-Homoeoallelen; weiße Balken repräsentieren 1 cm

Deutlicher wird dieser Phänotyp in den BD-Mutanten, wobei hier die Variante *Abd (b i)* mit Erhalt des Leserahmens im B-Genom insbesondere mehr sekundäre Ährchen ausbildet. Besonders drastisch waren die Veränderungen bei Pflanzen mit drei mutierten Homoeoallelen, welche wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben deutlich mehr sekundäre Ährchen entwickelten und auch verzweigten Ähren aufwiesen (Abbildung 14). Bei diesen Ähren entstand am basalen Nodium der Rachis anstelle des Ährchens eine neue Rachis-ähnliche Struktur, welche wiederum an ihren Nodien Ährchen ausbildete (Abbildung 14; Abbildung 15). Dementsprechend bestand in diesen Pflanzen ein Potential für mehr Kornansatzstellen, jedoch bewirkte der Funktionsverlust von mehreren *Branched head*-Allelen einen hohen Grad an Infertilität. Alle Ähren, die bedingt durch die Allelkombinationen überzählige Ährchen ausbildeten, zeigten kürzere bis kaum noch vorhandene Grannen.

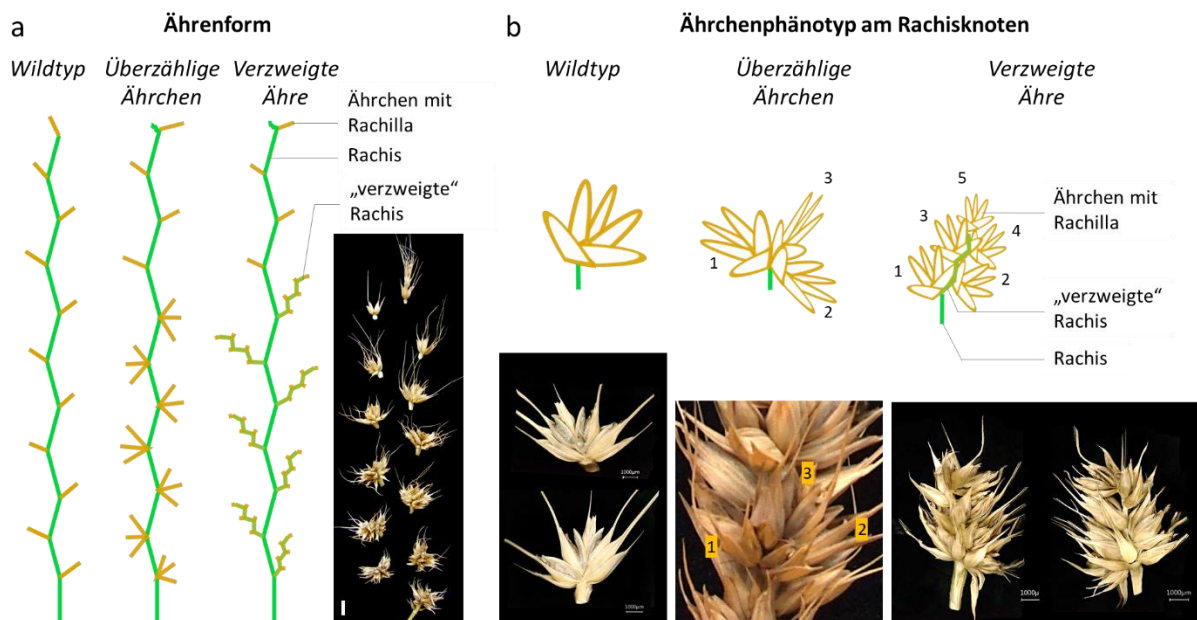


Abbildung 15 – Schematische Darstellung der verschiedenen Formen der Ähren (a) und Rachisknoten mit Ährchen (b) bei Pflanzen mit modifiziertem *Branched head*-Gen; (a) Schemata der Wildtypähren (links), Ähren mit überzähligen Ährchen (Mitte links) und verzweigten Ähren (Mitte rechts) sowie zerteilte Ähre der Pflanze E6-3-2-2-1-4; (b) Schematische und mikroskopische Darstellung eines Wildtypährchens (links), eines Rachis-Nodiums mit überzähligen Ährchen wie in Pflanze C6/A-1-20-11 (Mitte) und ein Rachis-Nodium einer verzweigten Ähre mit Aufnahme von Pflanze E6-3-4-5-10-3; Maßstabsbalken repräsentieren 1 cm (a) bzw. 1 mm (b)

4.2.2. Analyse des Phänotyps unter besonderer Berücksichtigung ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M5-/ F4-/ BC-F2-Generation

In der Phänotypischen Analyse der M5-/ F4-/ BC-F2-Generation wurden 2 bis 10 Nachkommen pro Mutterpflanze verwendet (Tabelle 28) und verschiedene Parameter der Pflanzen- und Ährenarchitektur sowie der Korneigenschaften untersucht.

Bestimmt wurden die Anzahl der Sprosse, die Anzahl und Länge der Ähren und der Anteil steriler Ähren, die Kornzahl pro Ähre sowie die Kornzahl pro 1 cm Ähre, die Länge, Breite und Fläche der Körner und das Tausendkorngewicht (Tabelle 28; Abbildung A3).

Tabelle 28 – Signifikante Unterschiede in der Phänotypisierung der M5-/ F4-/ BC-F2-Generation; i: Mutation mit Erhalt des Leserahmens, het: heterozygote Mutation; Pfeile repräsentieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte (Pfeil nach oben) bzw. verringerte (Pfeil nach unten) Werte

Mutation	Pflanzenfamilie	Anzahl der Pflanzen	Sprosszahl	Ährenzahl	Anteil steriler Ähren	Ährenlänge [cm]	Kornzahl pro Ähre	Kornzahl pro 1cm Ähre	Kornlänge	Kornbreite	Kornfläche	Tausendkorngewicht
aBD	E111-4-2-1	5				↓		↑	↓	↓	↓	↓
AbD	E101-1-1-1	4				↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓
AbD (b i)	97x113-3-1-2	3	↑	↑		↓	↓	↓	↑		↑	
ABd	97x113-5-3-1	5		↑				↑	↓	↑		
AaBDd	C2	2					↑	↑	↓	↓	↓	
Abd	C3	2		↑		↓	↓		↓	↑	↑	
Abd (b i)	E113-1-2	2				↑				↑	↑	
AaBbD	C4	2		↑		↓		↑	↓	↑		
abd (bd i) b-6	E6-3-2-2	10	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓		↓	↓
abd (bd i) b-36	E6-3-4-5	10	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓			↓
abd (b i)	97x113-4-3-6	4	↑	↑	↑	↓						
WT ABD	E108	5										

Die Einzel-KO-Mutanten zeigten konsequent eine erhöhte Kornzahl bezogen auf 1 cm Ähre, wobei die Körner kürzer waren. Die A- und B-KO-Pflanzen hatten insgesamt kleinere und leichtere Körner und die Ähren waren kleiner, das Tausendkorngewicht war bis zu 1/3 geringer als beim Wildtyp. Im Vergleich zur B-KO-Pflanze hatten die mit Erhalt des Leserahmens mutierten B-Mutanten größere Körner und weniger Körner pro 1 cm Ähre. Auch war die Anzahl der Sprosse von 6 auf 10 und der Ähren von 5 auf 10 erhöht.

Da die Pflanzen mit zwei mutierten Homoeoallelen zum Teil noch heterozygot waren (AaBDd und AaBbD) und nur eine geringe Zahl an Vertretern dieser Kombination zur Verfügung standen, sollten die Signifikanzen mit Zurückhaltung interpretiert werden. Der Funktionsverlust der A- und der D-Kopie von *Branched head* (AaBDd) zeigt aber bereits im heterozygotem Zustand mehr, jedoch kleinere Körner pro Ähre. Bei Verlust der B- und der D-Kopie (*Abd*) kam es zur gesteigerten Bildung von Ähren, die jedoch kleiner waren und weniger Körner pro Ähre bildeten, die wiederum kürzer und breiter als beim Wildtyp waren. Wenn jedoch die B-Kopie teilweise noch funktionell war (*Abd (b i)*), waren die Ähren länger als beim Wildtyp. Wenn die Funktion des A- und B-Alleles in heterozygoten Pflanzen teilweise verloren ging (AaBbD) wurden ebenfalls mehr, aber kürzere Ähren gebildet, die mehr Körner pro 1 cm Ähre aufwiesen. Die Körner waren kürzer und breiter.

Pflanzen mit drei mutierten Homoeoallelen zeigten übereinstimmend, dass die Spross- und Ährenzahl erhöht war und deutlich mehr sterile Ähren gebildet wurden. Die Vertreter der Familie 97x113-4-3-6 (*abd (b i)*) bildeten keine Körner, was maßgeblich durch die KO-Mutation im D-Genom bedingt war. Dieses Merkmal ist kohärent mit der vollständigen Störung der Kornbildung bei kompletten Verlust der Funktion von *Branched head*, der in den DH-Pflanzen DH4, DH5 und DH10 der Ursprungspflanze 97x113-4-3 (siehe 4.1.11.) sowie in der Ursprungspflanze E52 vorlag. Die Nachkommen der primären Pflanze 6 zeigten insgesamt deutlich weniger Körner pro Ähre und die Körner waren kürzer. Das Tausendkorngewicht war von 30 g im Wildtyp auf bis zu 20 g in den E6-Nachkommen verringert.

4.2.3. Analyse des Phänotyps unter besonderer Berücksichtigung ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M6-/ F5-/ BC-F3-Generationen und der DH-Nachkommen

Da die vorhergehende Phänotypisierung der M5-/F4-/BC-F3-Generation noch heterozygote Pflanzen umfasste, erfolgte eine weitere Untersuchung des Phänotyps in den Generationen M6, F5 und BC-F3 sowie anhand der DH-Linien. Untersucht wurden Parameter der Pflanzenarchitektur (Pflanzenhöhe und Sprosszahl), der Biomasse (Spross-Trockenmasse), der Bildung & Architektur von Ähren (Ährenzahl, Anzahl steriler Ähren, Ährenlänge und Ährchen pro Ähre), der Kornausbildung (Anzahl der Körner pro Ährchen, Ähre und 1 cm Ähre) und der Form und Masse der Körner (Länge, Breite Fläche und Tausendkorngewicht). Für die Auswertung erfolgte eine Zusammenfassung der Pflanzenfamilien und Einzelpflanzen, die ähnliche Mutationsvarianten besaßen, also entweder eine KO-Mutation oder eine Mutation ohne Leserahmenverschiebung in einem der Homoeoallele von *Branched head* (Tabelle 29, Abbildung 16).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Funktionsverlust von nur einem *Bh*-Homoeoallel bereits einen negativen Einfluss auf die Zahl der Körner pro Ähre und Ährchen hat, die Körner jedoch größer sind. Dieses Phänomen zeigt sich für alle drei Homoeoallele von *Branched head*. Bei der B-Kopie ist dieser

Effekt auch in den Pflanzen mit Mutation mit Erhalt des Leserahmens zu beobachten (*AbD (b i)*). Pflanzen mit KO-Mutationen in den Kombinationen *abD* und *aBd*, als auch deren Variationen mit Erhalt des *Bh*-Leserahmens im B-Genom (*abD (b i)*) oder D-Genom (*aBd (d i)*) zeigen ähnliche Tendenzen wie Einzelgenom-Mutanten. Ein deutlich stärkerer Effekt zeigt sich für die *BD*-Mutanten. Bei Funktionsverlust der *bh*-B- und D-Kopie (*Abd*) war zusätzlich die Biomasse des Sprosses verringert und ein höherer Grad an Sterilität von Ähren zu beobachten. Im Falle der Mutation mit Erhalt des Leserahmens der B-Kopie (*Abd (b i)*) wurden mehr Ährchen pro Ähre gebildet und die Pflanzen waren durchschnittlich 10 cm höher.

Die Kombinationen *abD (b i)* und *aBd (d i)* zeigten keine signifikante Veränderung bezüglich der Anzahl der Körner pro Ähre, jedoch vergrößerte Körner mit einem erhöhten Tausendkorngewicht. Jedoch lagen für die Analyse der Allelkombination *aBd (d i)* nur zwei Pflanzen vor.

Tabelle 29 – Signifikante Unterschiede in der Phänotypisierung der M6-/ F5-/ BC-F3-Generation sowie der DH-Linien; *i* – Mutation ohne Leserahmenverschiebung; * Einzelpflanzen einer Population; die Pfeile repräsentieren signifikant erhöhte (Pfeil nach oben) bzw. verringerte (Pfeil nach unten) Werte

Mutation	Pflanzenfamilien/ Einzelpflanzen*	Anzahl der Pflanzen	Pflanzenhöhe	Sprosszahl	Spross-Trockenmasse	Ährenzahl	Anzahl steriler Ähren	Ährenlänge	Ährchen pro Ähre	Körner pro Ähre	Körner pro Ährchen	Körner pro 1 cm Ähre	Kornertrag pro Ähre	Kornertrag pro Pflanze	Kornlänge	Kornbreite	Kornfläche	Tausendkorngewicht
<i>aBD</i>	E111-4-2-1-1; C6/A-1-17*; C6/A-1-20*	10						↓	↓	↓			↓	↓	↑	↑	↑	
<i>AbD</i>	E101-1-1-1-2	5						↓	↓	↓			↓			↑	↑	
<i>AbD (b i)</i>	97x113-3-1-2-3; C6/A-1-15*	10							↓	↓	↓		↓		↑	↑	↑	↑
<i>ABd</i>	97x113-5-3-1-1; E111-4-8-DH1	12							↓	↓	↓		↓			↑	↑	↑
<i>abD</i>	C4/A-4-9	5						↓	↓	↓			↓		↑	↑	↑	↑
<i>abD (b i)</i>	C6/A-1-15	5													↑	↑	↑	↑
<i>aBd</i>	C2/A-3-2-8*; E111-4-8-DH3	7							↓	↓	↓		↓		↑	↑	↑	↑
<i>aBd (d i)</i>	C6/A-1-17	2													↑	↑	↑	↑
<i>Abd</i>	C3/A-1-2	6			↓		↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↑	↑	↑
<i>Abd (b i)</i>	E113-3-1-2-2	6	↑					↑	↓	↓	↓				↑	↑	↑	↑
<i>abd (b i)</i>	97x113-4-3-6-6-9*	1	↓		↓		↑	↑										
<i>abd (d i)</i>	97x113-4-3-DH8	5		↑			↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	
<i>abd (bd i) b-6</i>	E6-3-2-2-1	4		↑		↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>abd (bd i) b-36</i>	E6-3-4-5-10	5			↓		↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
WT ABD	E108	6																

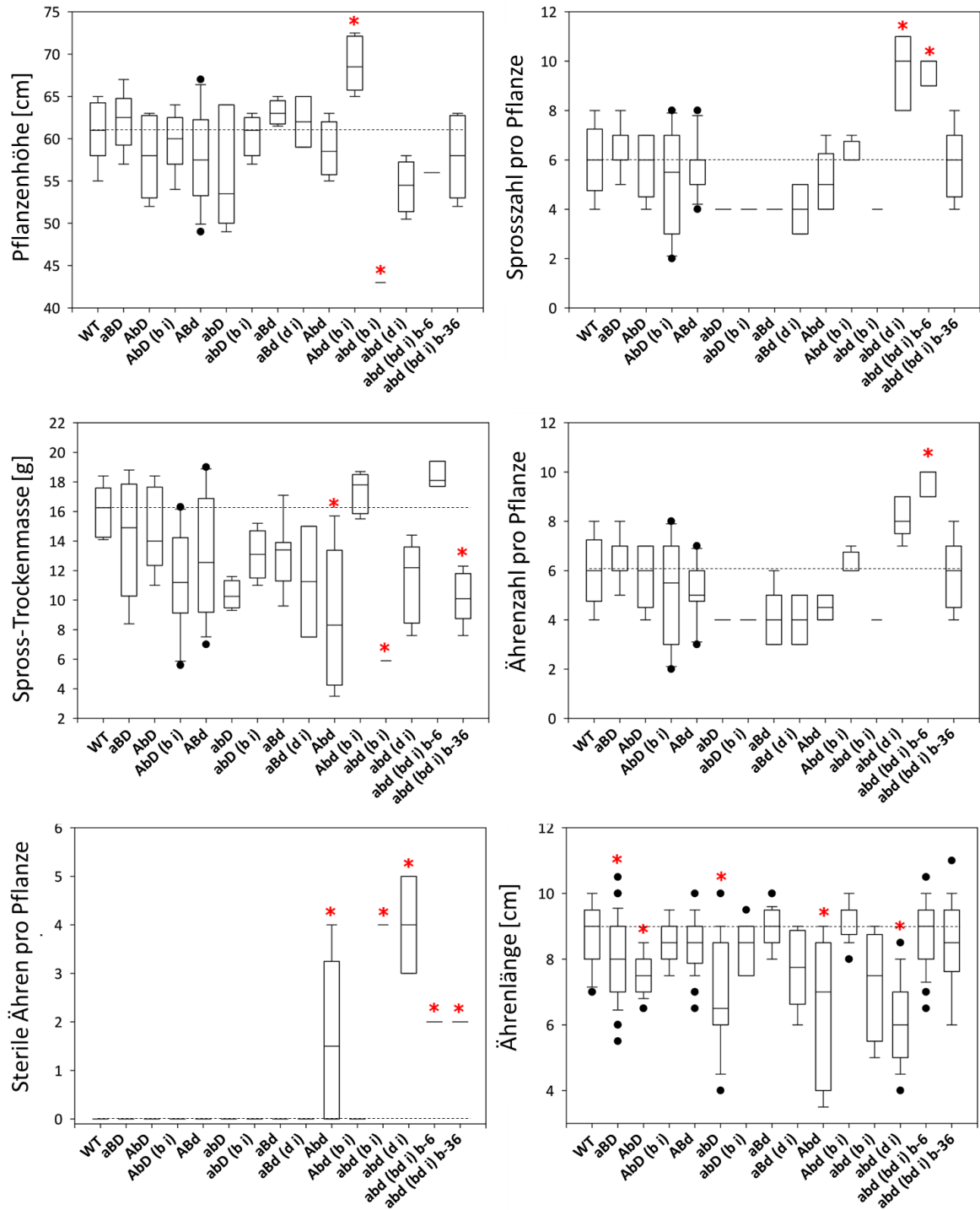
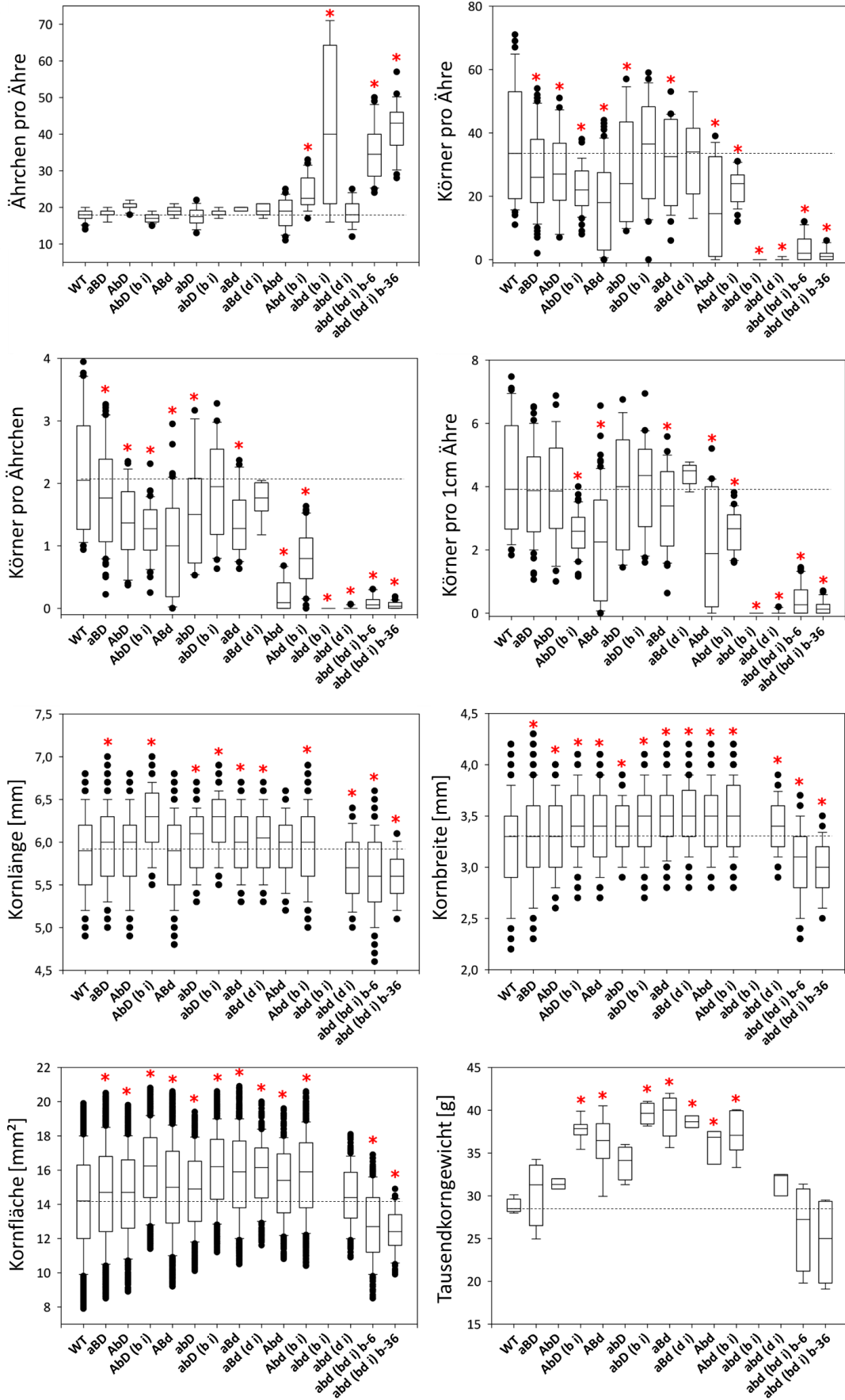


Abbildung 16 – Untersuchung Pflanzenarchitektur-bezogener und ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M6-, F5- und BC-F3-Generation und der DH-Linien; A/B/D: Branched head (*Bh*) Homoeoallele; a/b/d: mutierte *bh*-Allele; i: Mutationen ohne Leserahmenverschiebung in den vorangestellten *Bh*-Homoeoallelen; WT: E108; aBD: E111-4-2, C6/A-1-17 und C6/A-1-20; AbD: E101; Abd (b i): 97x113-3 und C6/A-1-15; ABd: 97x113-5 und E111-4-8-DH1; abD: C4/A-4-9-4; abD (b i): C6/A-1-15; aBd: C2/A-3-2-8 und E111-4-8-DH3; aBd (d i): C6/A-1-17; Abd: C3/A-1-2-1; Abd (b i): E113; abd (b i): 97x113-4; abd (d i): 97x113-4-3-DH8; abd (bd i) b-6: E6-3-2; abd (bd i) b-36: E6-3-4; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp; gestrichelte Linie repräsentiert Wildtyp-Median

Fortsetzung Abbildung 16



Deutlich größer waren die Veränderungen der pflanzenarchitektonischen und ertragsrelevanten Eigenschaften in den Weizenpflanzen mit drei mutierten *Bh*-Homoeoallelen, in denen jeweils ein KO der A-Kopie vorlag und entweder die B-Kopie (D: KO-mutiert), die D-Kopie (B: KO-mutiert) oder B und D eine Mutation ohne Leserahmenverschiebung mit einer möglichen verbleibenden Proteinfunktion vorhanden waren. Die Kombination *abd (b i)* zeigte dabei den größten Einfluss auf die Pflanzenarchitektur: die Pflanzen waren kleiner und hatten weniger Biomasse, die Ährchen waren so stark verändert, dass keine Blüten und Körner ausgebildet wurden. Der Verlust der Funktion in den Homoeoallelen *bh-A* und *bh-D* konnte nicht durch das ohne Leserahmenverschiebung mutierte B-Allel kompensiert werden. Die Pflanzen der Kombination *abd (d i)* bildeten signifikant mehr Sprosse, allerdings auch mehr sterile und kürzere Ähren. Die Körner dieser Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp kürzer aber breiter.

Die in allen drei Homoeoallelen mutierten Pflanzen mit erhaltenem Leserahmen im B- und im D-Genom (*abd (bd i)*) und den unterschiedlichen Deletionen im B-Allel (6 bp oder 36 bp) wiesen hingegen weniger und kleinere Körner auf. Es wurden im Vergleich zum Wildtyp etwa doppelt so viele Ährchen pro Ähre ausgebildet, wobei diese Veränderung auf der zusätzlichen Herausbildung sekundärer Ährchen pro Rachis-Nodium beruht, wobei die Anzahl der Spindelstufen sogar verringert war (Abbildung 15a). Unterschiede konnten außerdem bezüglich der Pflanzenarchitektur beobachtet werden: Pflanzen mit 6 bp-Deletion im B-Allel bildeten mehr Sprosse und Ähren, die 36 bp-Deletion führte jedoch zur verringerten Biomasseproduktion.

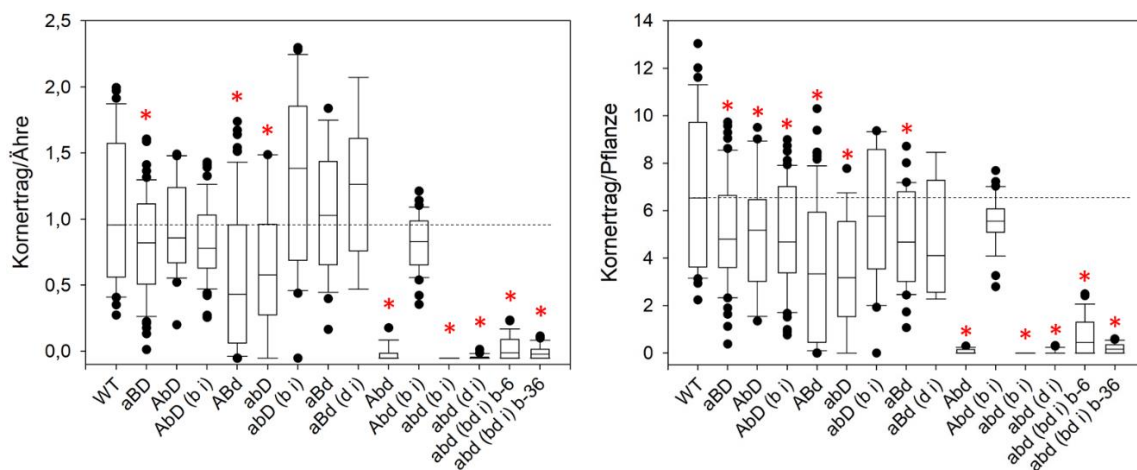


Abbildung 17 – Berechnung des Korntrages pro Ähre und Pflanze von Vertretern der M6-, F5- und BC-F3-Generation und der DH-Linien; A/B/D: Branched head (*Bh*) Homoeoallele; a/b/d: mutierte *bh*-Allele; i: Mutationen ohne Leserahmenverschiebung in den vorangestellten *Bh*-Homoeoallelen; WT: E108; aBD: E111-4-2, C6/A-1-17 und C6/A-1-20; AbD: E101; Abd (b i): 97x113-3 und C6/A-1-15; ABd: 97x113-5 und E111-4-8-DH1; abd: C4/A-4-9-4; abd (b i): C6/A-1-15; aBd: C2/A-3-2-8 und E111-4-8-DH3; aBd (d i): C6/A-1-17; Abd: C3/A-1-2-1; Abd (b i): E113; abd (b i): 97x113-4; abd (d i): 97x113-4-3-DH8; abd (bd i) b-6: E6-3-2; abd (bd i) b-36: E6-3-4; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp; gestrichelte Linie repräsentiert Wildtyp-Median

Alle Allelkombinationen wurden auf ihren Kornertrag untersucht (Abbildung 17). Dabei wurde es ersichtlich, dass der Kornertrag pro Pflanze in den meisten Kombinationen verringert war und auch der Kornertrag pro Ähre war für die meisten Pflanzen niedriger. Lediglich die Kombinationen mit B-Mutation (*AbD*; *AbD (b i)*) sowie die zweifach mutierten Kombinationen *abD (b i)*, *aBd*, *aBd (d i)* und *Abd (b i)* erreichten einen Kornertrag/Ähre wie der WT bzw. tendenziell sogar einen höheren Ertrag (*abD (b i)*; *aBd (d i)*).

4.2.4. Phänotypische Konsequenzen bei Funktionsverlust der A- bzw. B-Subgenomkopie von *Branched head*

Die Untersuchung des Wurzelwachstums in *bh-A*- und *bh-B*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erfolgte in speziellen Rhizotöpfen (Abbildung A11a) auf einer automatischen Phänotypisierungsanlage. Als Wildtyp wurden Vertreter der regenerierten Pflanzenfamilie 108 verwendet, als *bh-A*-KO dienten Vertreter der Familie E111-4-2-1 und als *bh-B*-KO Vertreter der Pflanzenfamilie E101-1-1-1. Das Wachstum erfolgte bei 25 °C bis zur Bildung der primären Ähren. Die Wurzeln wurden über 44 Tage an 16 unterschiedlichen Messpunkten (3, 6, 10, 14, 15, 17, 20, 22, 24, 27, 29, 31, 34, 37, 42 und 44 Tage nach Aussaat (Days after sowing - DAS; Abbildung A11d)) mittels Nahinfrarotlicht dokumentiert. Die dokumentierten Wurzelenaufnahmen wurden durch Verwendung des Bildanalyseprogrammes *saRIA* ausgewertet (Narisetti et al., 2019, Abbildung A11b). Bestimmt wurden für die Wurzeln die Biomasse über die Oberfläche und das Gesamtvolumen, die Wurzellänge und die Zahl der Wurzelverzweigungen über Verzweigungs- und Endpunkte.

Parallel wurde das Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile mittels Aufnahmen im sichtbaren Licht mittels vier seitlicher Aufnahmen dokumentiert und die Auswertung wurde mittels des Programmes *IAP* (Klukas et al., 2014) durchgeführt (Abbildung A11c). Es erfolgte eine zusätzliche Messung 8 DAS. Die Sprossphänotypisierung umfasst die Pflanzenhöhe und die Gesamtoberfläche der oberirdischen Pflanzenteile. Außerdem erfolgte eine Messung der Frisch- und Trockenmasse nach Abschluss der automatischen Phänotypisierung.

4.2.4.1. Analyse von Wurzelparametern

Insgesamt zeigte die Messung der verschiedenen Wurzelparameter trotz Eliminierung der Ausreißerwerte vor allem bei den *bh-B*-KO-Pflanzen eine hohe Streuung der Replikate, dennoch konnten einige Signifikanzen und Tendenzen ermittelt werden (Tabelle 30; Abbildung 18).

So wiesen die *bh-A*-KO-Pflanzen bezüglich der Zahl der Verzweigungspunkte eine erhöhte Tendenz ab 42 DAS auf, während die *bh-B*-KO-Pflanzen tendenziell weniger Verzweigungen zwischen 22 und 31 DAS hatten. Die Zahl der Wurzelendpunkte bestätigte diese Tendenzen und war bei den *bh-A*-KO-Pflanzen 44 Tage nach Aussaat signifikant erhöht, d.h. von 554 Endpunkten im Wildtyp auf 897

Endpunkte. Die Wurzelbiomasse zeigte bezüglich des Oberflächenparameters eine Tendenz zur Erhöhung bei den A-KOs (ab 42 DAS) und war bei den B-KOs zwischen 24 und 29 DAS verringert. Die geringere Biomasse bestätigte sich auch in tendenziell verringertem Wurzelvolumen zwischen 27 und 29 DAS bei den B-KOs. Die Wurzellänge war 44 DAS signifikant bei den A-KOs mit 889 mm Länge gegenüber den Wildtyppflanzen mit 514 mm erhöht. Auch hier wiesen die B-KOs eine geringere Länge zwischen 20 und 31 DAS auf. Im Verhältnis der Wurzellänge zum Wurzelvolumen zeigten sich 34 DAS signifikant verringerte Werte für B-KOs, was insgesamt die Beobachtung bestätigt, dass der Verlust der Funktion des B-Genoms die Wurzelentwicklung negativ beeinflusst, wohingegen der Verlust der A-Funktion die Zahl der Verzweigungen und die Wurzellänge begünstigt.

Tabelle 30 – Tendenzen und signifikante Unterschiede bei der Wurzelentwicklung der bh-A- und bh-B-KO-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp; Tendenzen: graue, diagonale Pfeile; Signifikanzen: schwarze Pfeile; DAS – Tage nach Aussaat (Days after sowing)

DAS	Verzweigungen		Endpunkte		Länge in mm		Volumen in mm ³		Oberfläche in mm ²		Länge/Volumen	
	bh-A	bh-B	bh-A	bh-B	bh-A	bh-B	bh-A	bh-B	bh-A	bh-B	bh-A	bh-B
3												
6												
10												
14												
15												
17												
20				↘		↘						
22		↘		↘		↘						↘
24		↘		↘		↘				↘		↘
27		↘		↘		↘		↘		↘		
29		↘		↘		↘		↘		↘		
31		↘		↘		↘				↘		↘
34												↓
37											↗	↘
42	↗		↗		↗				↗			
44	↗		↑		↑				↗		↗	

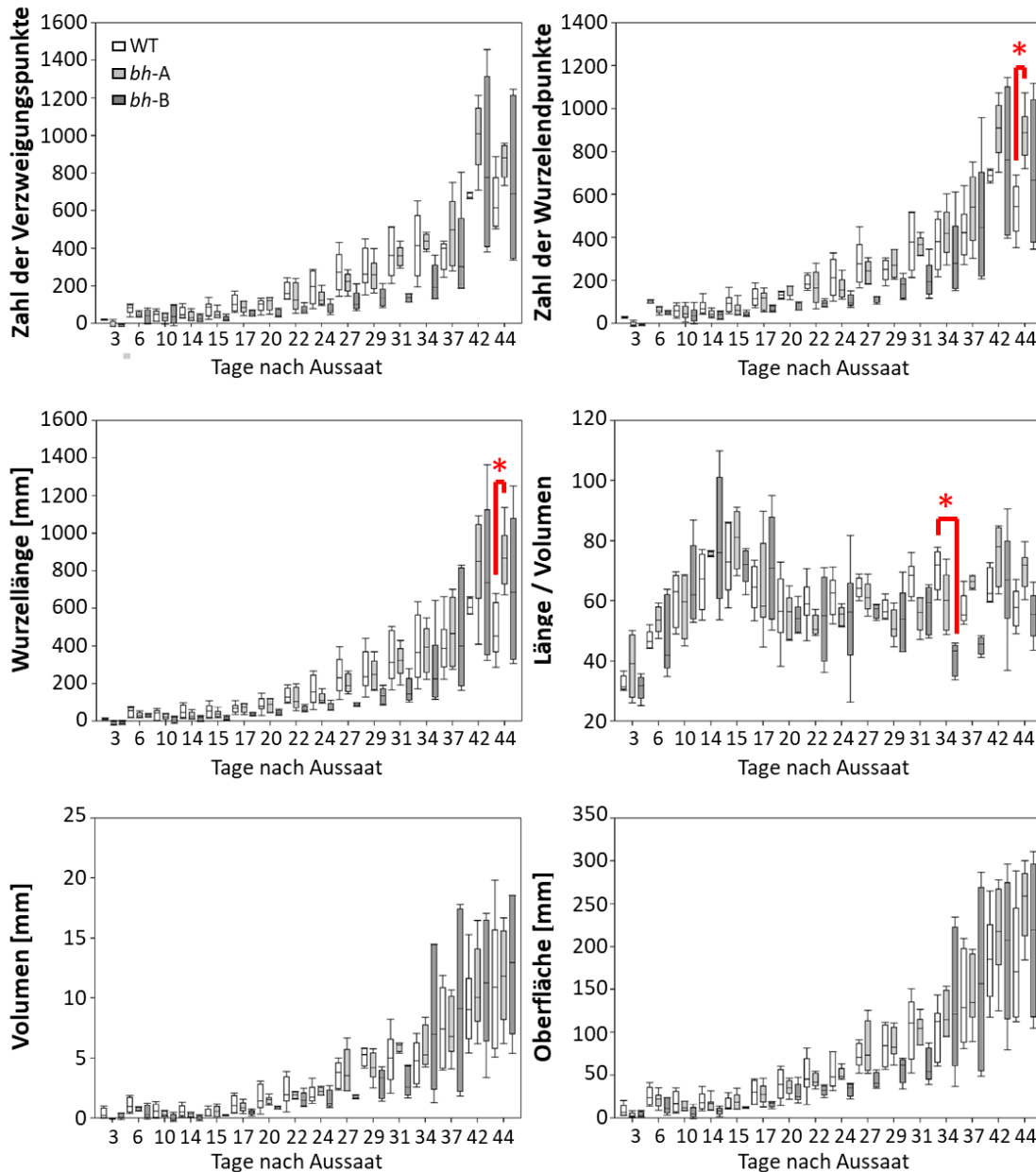


Abbildung 18 – Wurzelphänotypisierung; Bestimmung der Zahl der Verzweigungs- und Wurzelendpunkte (erste Reihe), der Wurzellänge und des Verhältnisses von Länge zu Volumen (zweite Reihe) und die Biomasseparameter Wurzelvolumen und Wurzeloberfläche (dritte Reihe); WT weiß, *bh-A*-KO-Pflanzen hellgrau, *bh-B*-KO-Pflanzen dunkelgrau dargestellt; rote Balken und Asteriske repräsentieren Signifikanzen

4.2.4.2. Analyse von Sprossparametern

Im Zuge der Wurzelphänotypisierung erfolgte an 17 Messtagen eine Dokumentation des Sprossmaterials. Die KO-Pflanzen für *bh-A* und *bh-B* zeigten sich in ihrer Entwicklung gegenüber dem WT verzögert. So war die Pflanzenhöhe für beide KO-Mutanten signifikant verringert, wobei der Effekt in den *bh-B*-KO-Pflanzen stärker war. Die ermittelte Oberfläche des Sprossmaterials war im sehr frühen Stadien ebenfalls in beiden KO-Varianten verringert, wobei ab dem 15. Tag nach Aussaat vor allem die Werte der *bh-B*-KO-Pflanzen signifikant verringert waren (Tabelle 31, Abbildung 19).

Tabelle 31 – Signifikante Unterschiede bei der Sprossentwicklung der *bh-A*- und *bh-B*-KO-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp; DAS – Tage nach Aussaat (Days after sowing)

DAS	Bh-Allel	3	6	8	10	14	15	17	20	22	24	27	29	31	34	37	42	44
Pflanzenhöhe [px]	<i>bh-A</i>		↓		↓	↓		↓			↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓
	<i>bh-B</i>		↓	↓	↓		↓	↓			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Oberfläche [px ²]	<i>bh-A</i>			↓	↓	↓		↓					↓					
	<i>bh-B</i>			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

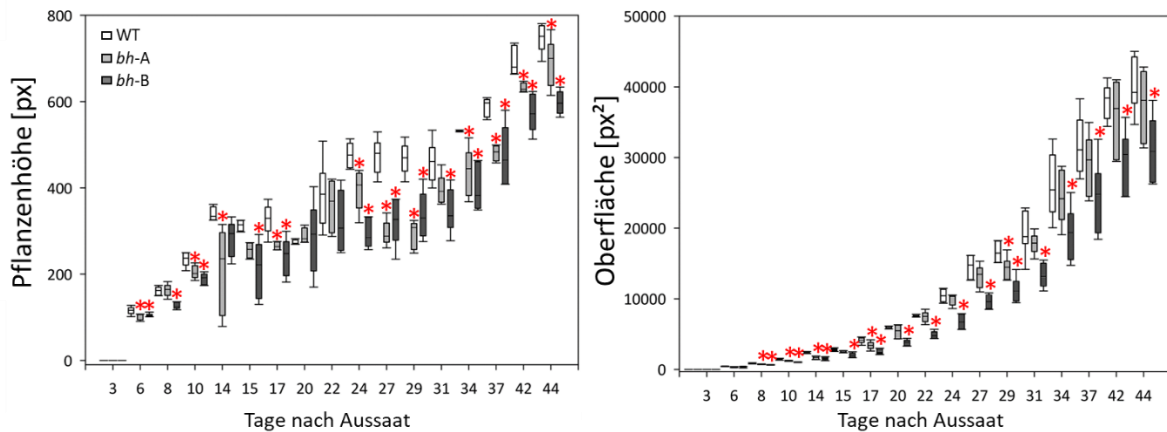


Abbildung 19 – Sprossphänotypisierung; Messung der Pflanzenhöhe in pixel (px, links) und der Oberfläche der oberirdischen Pflanzenteile in px² (rechts); Wildtyp weiß, *bh-A*-KO-Pflanzen hellgrau, *bh-B*-KO-Pflanzen dunkelgrau dargestellt; rote Asteriske repräsentieren signifikante Veränderungen gegenüber dem WT

Die Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts ergab eine erhöhte Sprossbiomasse in den *bh-A*-KO-Pflanzen, welche auch bezüglich des Trockengewichtes mit 3,9 g gegenüber dem WT (2,9 g) und den B-KO-Pflanzen (2,7 g) signifikant höher war (Abbildung 20). Daraus lässt sich schließen, dass Verlust der Funktion der A-Kopie von *Branched head* zu einer stärkeren Sprossausbildung führt.

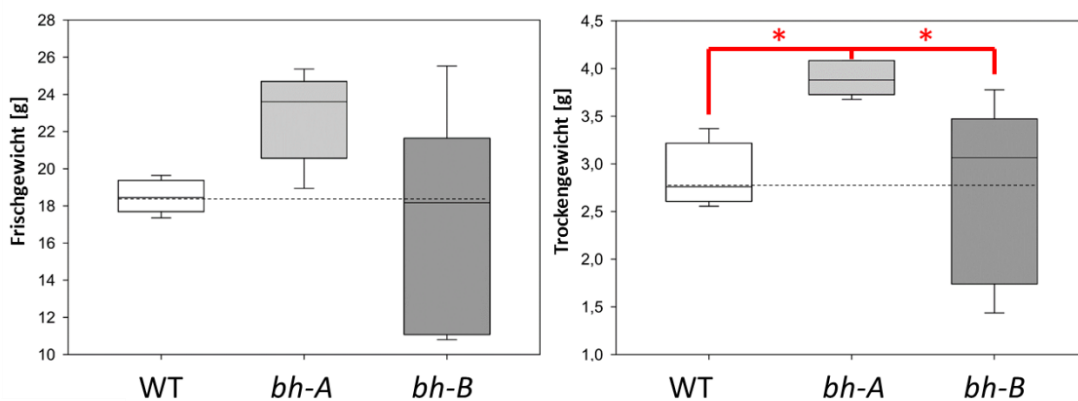


Abbildung 20 – Bestimmung der Spross-Biomasse; Messung des Frischgewichtes (links) und des Trockengewichtes (rechts); WT weiß, A-KO-Pflanzen hellgrau, B-KO-Pflanzen dunkelgrau dargestellt; rote Balken und Asteriske repräsentieren Signifikanzen; gestrichelte Linie repräsentiert Wildtyp-Median

4.3. Erstellung und Charakterisierung von Gerstenpflanzen mit einem Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors *Squamosa-promotor binding protein-like 14*

4.3.1. Ermittlung des Kandidatengens in Gerste

Das *Sp14*-Gen ist durch die chromosomal nicht zugeordnete Gen-ID HORVU0Hr1G020810 im durch Mascher et al. (2017) veröffentlichten 2016er Referenzgenom für Gerste annotiert (HvSPL14-v1, Abbildung 21). Die Sequenz dieser Gen-ID ist jedoch unvollständig, da das erste Exon komplett fehlt und nur Exon 2 mit 134 bp und das 680 bp große Exon 3 vorhanden sind. Eine Analyse von 4000 bp stromaufwärts der Gensequenz mittels der Entschlüsselungssoftware für Gene *FGENESH* (Solovyev et al., 2006; <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>) ergab ein zusätzliches erstes Exon von 281 bp Länge gefolgt von einem großen Intron, welches 3140 bp umfasst (HvSPL14-v1-Ex1, Abbildung 21). Die funktionelle SBP-Domäne befand sich nach Untersuchung der gesamten genomischen Sequenz mittels *Conserved Domain Database* von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) teils im ersten, teils im zweiten Exon. Jedoch weckte die fehlende Annotation des ersten Exons Zweifel an dessen Richtigkeit, weshalb für die funktionelle Untersuchung von *Sp14* mittels gezielter Mutagenese ausschließlich das zweite Exon verwendet wurde.

Im 2019er Gerstenreferenzgenom (Monat et al., 2019) wurde *Sp14* mit der Gen-ID HORVU.MOREX.r2.7HG0564420 neu annotiert und nun dem Chromosom 7H zugeordnet, was die Ergebnisse von Shahinnia und Kollegen bestätigt (Shahinnia et al., 2012). Es umfasst nun 3 Exons, wobei die letzten beiden mit der oben genannten ID HORVU0HR1G020810 übereinstimmen (HvSPL14-v2, Abbildung 21, Abbildung A13). Das erste Exon sowie das erste Intron setzen sich in der neueren Version des Gerstengenoms anders zusammen und sind nun dem *Sp14*-Orthologen^(*) in Weizen ähnlicher.

Zur Absicherung, ob HORVU0HR1G020810 das Ortholog zum im Reis beschriebenen *Sp14* (Jiao et al., 2010; Miura et al., 2010) ist, erfolgte eine phylogenetische Untersuchung unter Nutzung der Aminosäuresequenzen verschiedener Gersten-SPL-Vertreter (Tripathi et al., 2018) sowie einzelner SPL-Proteine aus Arabidopsis, Mais, Sorghum und Reis (Abbildung 21). Die phylogenetische Analyse bestätigte, dass HORVU0HR1G020810 das *Sp14*-Ortholog in Gerste repräsentiert, wie es bereits durch Shahinnia et al. (2012) und Alqudah et al. (2016) beschrieben worden war. Die Sequenz des Referenzgenoms von 2019 stimmt im Bereich von Exon 2 und Exon 3 mit der Referenzsequenz der für die Transformation^(*) verwendeten Sommergerste Golden Promise überein und wird hier ebenfalls auf Chromosom 7H zugeordnet (Horvu_GOLDEN_7H01G260800.1; Schreiber et al., 2020).

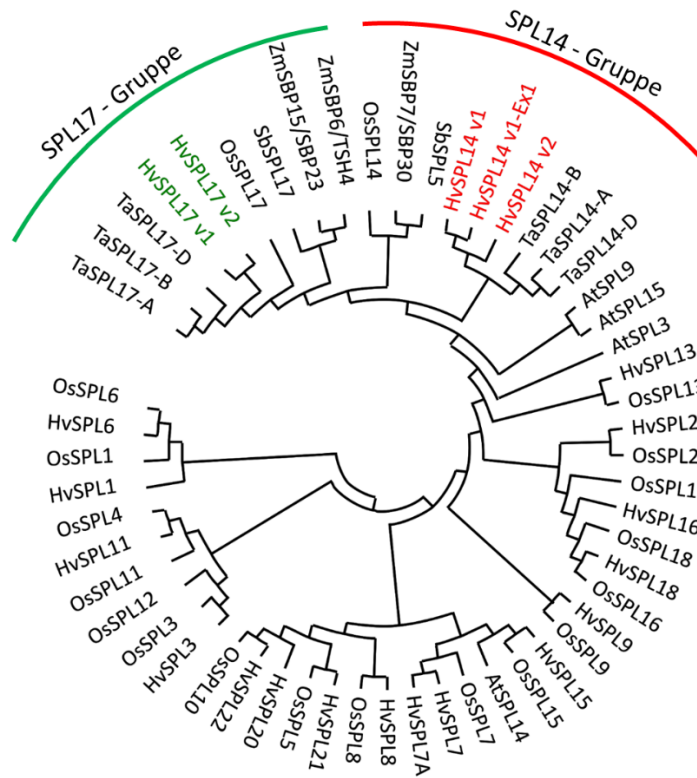


Abbildung 21 – Phänologische Analyse von SPL-Proteinen aus Gerste (Hv), Reis (Os), Arabidopsis (At), Weizen (Ta), Mais (Zm) und Sorghumhirse (Sb); für Gerste wurden die Referenzsequenz v1-Sequenzen (Mascher et al., 2017) verwendet sowie für SPL14 und SPL17 die v2-Referenzsequenzen (Monat et al., 2019); HvSPL14-v1 in der annotierten Version und v1-Ex1 mit *FGENESH* vorhergesagten 1. Exon und 1. Intron; HvSPL14 und SPL14-Gruppe rot markiert, HvSPL17 und die SPL17-Gruppe grün markiert; die Analyse erfolgte mit *MEGA X* (Kumar et al., 2018)

4.3.2. *In silico*-Identifizierung und Validierung von Gerste *Sp14*-spezifischen Zielmotiven RNA-vermittelter Cas9 im 2. Exon

Insgesamt wurden im zweiten Exon neun Zielmotive^(*) (ZM) gefunden werden, die auf die Lage im Exon bzw. der funktionellen SBP-Domäne, die theoretischen Aktivitätswerte, assoziierte *OFF-Target*-Werte und die möglichen Sekundärstrukturen untersucht wurden (Tabelle 32).

Tabelle 32 – Ausgewählte Zielmotive (ZM) im 2. Exon von HvSPL14, ^a: Position der Zielmotive im 2. Exon mit Hinweis auf Lage in SBP-Domäne

Zielmotiv	Sequenz inklusive PAM	DESKGEN-ON-Target (*)Aktivität	DESKGEN-OFF-Target (*)Aktivität	WU-CRISPR-Aktivität	Position im Exon 2 ^a [bp]	DNA-Strang
ZM2-1	TGGCGGGCCACAACGAGCGCCGG	57	47	98	54 (SBP)	+
ZM2-2	TAGCGTGATGCCAGAGGGCCGGG	47	48	65	89	-
ZM2-3	GCCCTCTGGCATCACGCTACGGG	49	49	80	93	+
ZM2-4	CGGGCCACAACGAGCGCCGGAGG	55	48	96	56 (SBP)	+
ZM2-5	CGTGATGCCAGAGGGCCGGGAGG	66	48	98	86	-
ZM2-6	TGTGGCCCGCCAGACGCCTGCCG	61	49	98	43 (SBP)	-
ZM2-7	GCCCGTAGCGTGATGCCAGAGGG	61	50	93	94	-
ZM2-8	CAGCTGCCCTGAATTCGATCAAGG	61	49	71	8 (SBP)	+
ZM2-9	AAGGAAAACGCAGCTGCCGCAGG	51	48	96	27 (SBP)	+

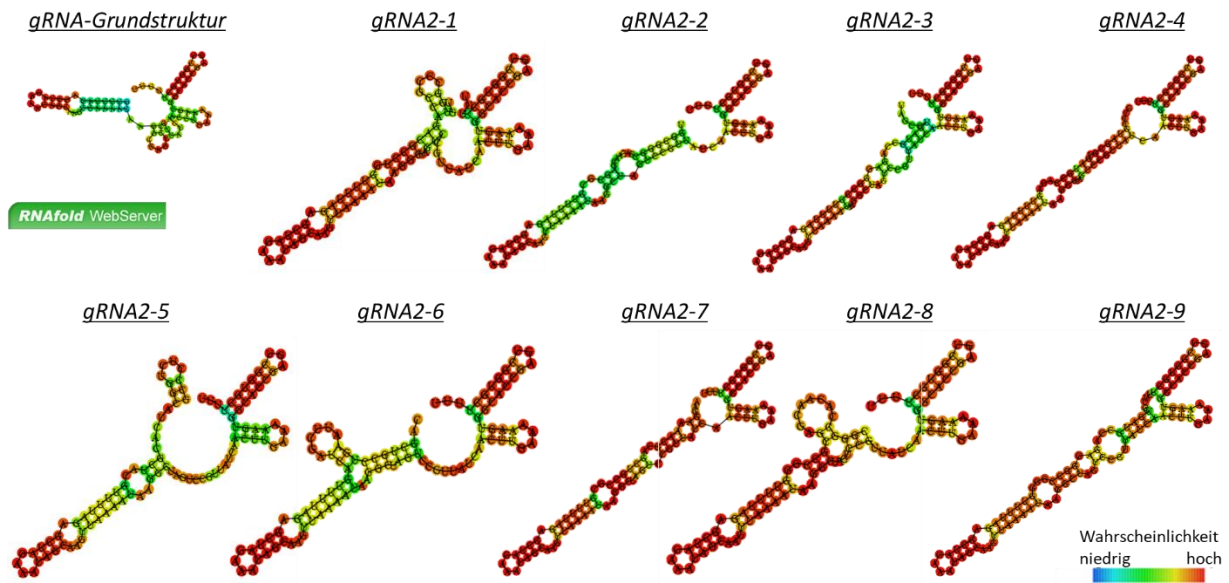


Abbildung 22 – Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (*gRNA scaffold*) sowie der *Spl14*-gRNAs 2-1 bis 2-9 (RNAfold Webserver: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>); blau-grün: geringe / gelb-rot: hohe Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung

Die beiden Zielmotive 2-1 und 2-4 überzeugten dabei mit ihren vorhergesagten Aktivitäten, der Sekundärstruktur der entsprechenden gRNAs (Abbildung 22) und vor allem durch ihre Lage in der SBP-Domäne (Abbildung A13). Beide Zielmotive überlappen mit einer Verschiebung von nur 3 bp zueinander und sind spezifisch für *Spl14*, jedoch gibt es ähnliche Zielmotive im paralogen^(*) Gen *Spl17*, welche 2-3 Basenunterschiede aufweisen (Tabelle 33).

Tabelle 33 – Ausgewählte *Spl14*-Zielmotive im Paralog *Spl17*; rot: Basenunterschiede in *Spl17*

<i>Spl</i> -Gen	Sequenz des Zielmotivs 2-1	Sequenz des Zielmotivs 2-4
<i>Spl14</i>	TGGCGGGCCACAACGAGCGCCGG	CGGGCCACAACGAGCGCCGGAGG
<i>Spl17</i>	TCGCGGGTCACAA T GAGCGCCGG	CGGG T CACAA T GAGCGCCGGAGG

4.3.3. Validierung der *Spl14*-spezifischen gRNA/*cas9*-Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Gerstenblättern

Zur Validierung der gRNA/Cas9-Aktivitäten wurden die Zielmotiv-spezifischen Teile der gRNA mittels Bsal-Schnittstellen in den generischen^(*) Vektor^(*) pSH121 eingefügt (Gerasimova et al., 2018; 2020; GenBank-ID: MW145140.1). In beiden Fällen wurde als Transkriptionsstart^(*) im Kontext des *OsU3*-Promotors^(*) am 5'-Ende ein nicht mit der Zielsequenz komplementäres A-Nukleotid eingefügt. Die Validierung erfolgte wie in 3.10. und von Budhagatapalli et al. (2016) beschrieben. Die gRNA/*cas9*-Konstrukte pCH6 (gRNA2-1) und pCH9 (gRNA2-4) wurden mit den zugehörigen Zielvektoren pCH19 bzw. pCH22 (Tabelle 4) gemischt und ballistisch^(*) in die Epidermis von Gerstenblättern übertragen. Es wurden zwei Experimente mit je zwei bis vier Platten pro gRNA durchgeführt (Tabelle 34).

Tabelle 34 – Berechnung des Anteils transformierter Gerstenepidermiszellen mit im *Spl14*-Exon2-Zielmotiven mutiertem Zielvektor (YFP-Signal) gegenüber transformierten Zellen ohne YFP-Restitution (*mCherry*-Signal)

gRNA	Experiment	Platte	Zellen mit mCherry	Zellen mit YFP	gRNA-Aktivität als Häufigkeit YFP-fluoreszierender Zellen von der Gesamtzahl der transformierten Zellen
gRNA2-1	1	1	62	32	55 %
		2	28	15	
	2	1	28	14	
		2	85	49	
		3	24	13	
		4	45	27	
			Gesamt	272	
gRNA2-4	1	1	70	36	55 %
		2	38	22	
	2	1	21	13	
		2	67	36	
			Gesamt	196	

Für beide gRNAs lag der Anteil transformierter Zellen mit zu YFP-führenden Mutationen in den Zielvektoren bei 55 %. Beide gRNAs wurden für die stabile Transformation in Gerste (siehe 4.3.4.) verwendet.

4.3.4. Stabile Gerstentransformation durch Agrobakterien-vermittelten Transfer der binären gRNA/*cas9*-Konstrukte in unreife Embryonen

Für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer war es notwendig, die Expressionseinheiten von gRNA und *cas9* in Agrobakterien zu überführen. Hierfür wurden diese Elemente in den Binärvektor p*6i*-d35S-TE9 integriert (Abbildung A4f). Die entstandenen Vektoren haben die Bezeichnung pCH30 für gRNA2-1 und pCH31 für gRNA2-4 (Tabelle 4).

Die Gerstentransformation wurde wie in 3.11.4. beschrieben nach Marthe et al., 2015 durchgeführt und die jeweilige T-DNA^(*) der beiden gRNA/*cas9*-Konstrukte in unabhängigen Experimenten in unreife Embryonen der Gerstensorte Golden Promise transformiert (Tabelle 35; Tabellen A28, A29). Während der Untersuchung auf Mutationen gab es technische Probleme bei der PCR und der anschließenden Sequenzierung, wodurch die Auswertung der Sequenzdateien einiger Regenerate nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde nur ein Teil der regenerierten Pflanzen ausgewertet.

Tabelle 35 – Transfer *Spl14*-spezifischer gRNA/*cas9*-Binärkonstrukte in Gerstenembryos

Plasmide (*)	gRNA	Embryonen	Regenerate	Pflanzen mit T-DNA	Regenerate mit auswertbaren Sequenzen
pCH30	gRNA2-1	400	46	45	28
pCH31	gRNA2-4	280	44	41	24

4.3.5. Analyse der Primärmutanten (M1) mit Mutationen im Zielmotiv 2-1

Alle ausgewerteten Pflanzen zeigten die Anwesenheit der gRNA2-1- und *cas9*-DNA. Beide durchgeführte Transformationsexperimente ergaben Mutationen im Zielmotiv 2-1 von *Sp14* in 14 von 28 auswertbaren Regeneraten (Tabelle A28). Zur genaueren Spezifizierung wurden die PCR-Amplifikate von 6 mutierten Regeneraten subkloniert^(*) und jeweils 8 Klone sequenziert, von denen 4-8 schlussendlich auswertbar waren. Die Untersuchung der Klone zeigte homozygote^(*) oder heterozygot^(*)/chimäre^(*) Mutationen, welche Deletionen^(*) (12 bp, 8 bp, 1 bp), Insertionen^(*) (1 bp) oder kombinierte Deletionen mit Insertionen (InDel-Mutationen) umfassen (Tabelle 36).

Tabelle 36 – Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten von *Sp14* im Zielmotiv 2-1 und mittels PCR detektierte T-DNA in den ausgewählten Regeneraten

Pflanzen-ID	Mutationen	T-DNA
E2	1/4 +1 bp (T) 1/4 -13/+8 bp	gRNA2-1, <i>cas9</i>
E3	1/4 +1 bp (T)	gRNA2-1, <i>cas9</i>
E4	1/7 -12 bp 1/7 -8 bp 1/7 +1 bp (T)	gRNA2-1, <i>cas9</i>
E5	4/7 +1 bp (A) 3/7 -1 bp	gRNA2-1, <i>cas9</i>
E11	7/7 +1 bp (4xA; 2xT; 1xC)	gRNA2-1, <i>cas9</i>
AE3	6/8 +1 bp (C)	gRNA2-1, <i>cas9</i>

Die mutierten Pflanzen zeigten eine höhere Pflanzenhöhe als der Wildtyp. Es erfolgte keine Analyse der Nachkommen zugunsten der Auswertung der Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 mutierten Pflanzen.

4.3.6. Analyse der Primärmutanten (M1) mit Mutationen im Zielmotiv 2-4

Die Analyse der Regenerate des Transformationsexperimentes mit dem gRNA2-4/Cas9-Konstrukt zeigte Mutationen in 23 von 24 auswertbaren Pflanzen, von denen 13 bereits ein klares Chromatogramm mit einer Insertion im Zielmotiv 2-4 zeigten und somit als homozygot mutiert gelten können. Zehn weitere Pflanzen besaßen 2 mutierte Allele (biallelisch) oder waren heterozygot/chimär mutiert. In 22 von 24 Pflanzen wurde gRNA2-4- und/oder *cas9*-DNA nachgewiesen. Eine Pflanze mit A-Insertion (E25) zeigte keine T-DNA und in einer Pflanze (E18) konnten weder T-DNA noch Mutationen nachgewiesen werden (Tabelle A29). Diese Pflanze diente in nachfolgenden Generationen als Wildtyp. Eine Subklonierung^(*) des PCR-Amplifikates mit anschließender Sequenzierung von 8 Klonen bestätigte für sechs ausgewählte Pflanzen, dass sie homozygot oder biallelisch im Zielmotiv 2-4 mutiert waren, wobei nur 1 bp-Insertionen auftraten (Tabelle 37).

Tabelle 37 – Anzahl der Klone mit mutierten PCR-Amplifikaten von *Spl14* im Zielmotiv 2-4 und mittels PCR detektierte T-DNA in den ausgewählten Regeneraten

Pflanzen-ID	Mutationen	T-DNA
E11	7/7 +1 bp (T)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
E12	6/6 +1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
E20	8/8 +1 bp (5xT; 3xA)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
E22	5/5 +1 bp (4xG; 1xT)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
E26	6/6 +1 bp (4xA; 2xG)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
E43	5/5 +1 bp (3xT; 2xG)	gRNA2-4, <i>cas9</i>

Die mutierten Pflanzen wiesen im Vergleich zum Wildtyp ein größeres Längenwachstum auf und einige Pflanzen bildeten verkürzte Ähren. Zum Teil kam es zu Verzweigungen am Ährengrund, die jedoch auch sortenspezifisch für Golden Promise vorkommen.

Die Pflanzen E11, E12 und E20 wurden für weitere Arbeiten ausgewählt.

4.3.7. Analyse der Nachkommen aus geselbsteten Mutanten mit gRNA2-4

4.3.7.1. Genotypische und phänotypische Untersuchung der M2-Generation

Für die Untersuchung der Nachkommenschaft wurden jeweils 10 Körner der in 4.3.6. genannten Mutterpflanzen ausgelegt und 4 bis 9 Tochterpflanzen genotypisch^(*) (Tabellen A30, A31, A32) und phänotypisch^(*) (Abbildung 23, 24, Tabelle 39) untersucht. In 7 von 9 Pflanzen wurde die Anwesenheit der T-DNA mittels PCR nachgewiesen, wobei in vier Pflanzen die gRNA nicht mehr nachweisbar war und in einer Pflanze wurde nur das *hpt*-Fragment amplifiziert. Die fünf Nachkommen von E11 zeigten einheitlich eine T-Insertion und zwei von fünf wiesen keine T-DNA mehr auf (Tabelle A30). Die vier gekeimten E12-Nachkommen wiesen eine A-Insertion auf und eine Pflanze war ebenfalls T-DNA-frei (Tabelle A31). Die neun Nachkommen der biallelisch-mutierten E20-Pflanze zeigten in fünf Fällen eine T bzw. A-Insertion, in zwei Fällen eine T-Insertion, eine Pflanze hatte eine C-Insertion und 1 Pflanze war biallelisch mit einer T- bzw. C-Insertion (Tabelle A32). Die 1 bp-Insertion führt in allen Fällen zur Verschiebung des Leserahmens und zu einem verkürzten Protein (Tabelle 38).

Die phänotypische Untersuchung dieser Pflanzen zeigte zunächst eine deutlich verlängerte Generationszeit von 8-9 Monaten für die mutierten Linien gegenüber dem Wildtyp, der nur 5-6 Monate bis zur Ernte unter Gewächshausbedingungen benötigte. Die mutierten Pflanzen wiesen im Vergleich zum Wildtyp ein größeres Längenwachstum (Abbildung 23a), mehr und kürzere Internodien^(*), mehr Sprosse, einen höheren Anteil unproduktiver Sprosse sowie weniger und kürzere Ähren auf (Tabelle 39; Abbildung 23b; Abbildung 24). Mehrere Einzelpflanzen bildeten keine Ähren aus, zeigten aber ein besonders starkes Längenwachstum. Alle mutierten Pflanzen hatten eine fortgeschrittene Grannenentwicklung in den normalerweise sterilen lateralen Ährchen, welche jedoch z.T. auch Körner entwickelten (Abbildung 23c).

Tabelle 38 – Mutierte *spl14*-Allele auf DNA- und Proteinebene; grün: *Spl14*-Zielmotiv 2-4 (PAM unterstrichen); rot: Mutation bzw. Aminosäuretausch; gelb hinterlegt: SBP-Domäne; grau: veränderte Aminosäuresequenz; grüne Senkrechtstriche zeigen durch Cas9-Endonuklease induzierte Strangbrüche in der DNA

Mutation Sequenzen

WT	TCTGGCGGGCCACAACGAGCG C CGGAGGAAGCC
+1 bp (T)	TCTGGCGGGCCACAACGAGCG C TCGGAGGAAGCC
+1 bp (A)	TCTGGCGGGCCACAACGAGCG C ACGGAGGAAGCC
WT	MEIGSGGCGGGSGGGGAGDDPQRHGLKFGKKIYFEDATGGGGGGGGGNASSSKPPAGGGRKGGKAAAAGGTSGS APPRCQVEGCDVDLSGVKQYYSRHKVCCMHSKAPHVVVAGLEQRFCCQCSRFBQLPEFDQGKRSCRRLAGHNE RRRKPPGGLASRYGRLAASFEEPRFRSYLLDFSYPRVPSSVRDAWPGARPGYRMPGEIQWQGNLDRPHTGA ATGYHGPQPHHAYSGHGGGFPGEIPPGGCLAGVAADSSCALSLSTQPWDNTPHGASHHHHRSAAAMSAAGFN GNPPVGVSPSIMASNYPMPGSPWSASRGHEGGRNAPHQQLPHDVPLHEVHHHPAGSSQHGHFSGELELALQGNR PAPGPRGDHGGGAFDHPGSSSNWSL*
+1 bp (T)	MEIGSGGCGGGSGGGGAGDDPQRHGLKFGKKIYFEDATGGGGGGGGGNASSSKPPAGGGRKGGKAAAAGGTSGS APPRCQVEGCDVDLSGVKQYYSRHKVCCMHSKAPHVVVAGLEQRFCCQCSRFBQLPEFDQGKRSCRRLAGHNE RSEEAASRPSGITLRATRRIW*
+1 bp (A)	MEIGSGGCGGGSGGGGAGDDPQRHGLKFGKKIYFEDATGGGGGGGGGNASSSKPPAGGGRKGGKAAAAGGTSGS APPRCQVEGCDVDLSGVKQYYSRHKVCCMHSKAPHVVVAGLEQRFCCQCSRFBQLPEFDQGKRSCRRLAGHNE RTEEAASRPSGITLRATRRIW*

Tabelle 39 – Signifikante Unterschiede der im Zielmotiv 2-4 mutierten *spl14*-Selbstungsnachkommen der Primärmutanten E11, E12 und E20

Parameter	<i>spl14</i>
Pflanzenhöhe	↑
Sprosszahl gesamt	↑
Produktive Sprosse	↓
Unproduktive Sprosse	↑
Internodienzahl	↑
Internodienlänge	↓
Ährenanzahl	↓
Ährenlänge	↓

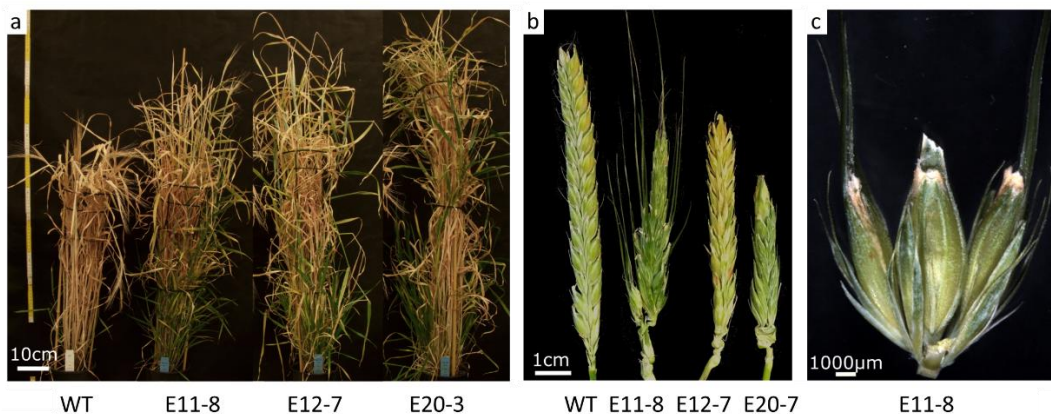


Abbildung 23 – Phänotypisierung der Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 von *Spl14* mutierten Pflanzen in der M2-Generation; (a) Pflanzenhöhe von Nachkommen der Pflanzen 11, 12 und 20 im Vergleich zum WT; (b) Ährchentriplett der Pflanze 11-8 mit Körnern in den seitlichen Ährchen; (c) Ährenlänge und Ährenform von Nachkommen der Pflanzen 11, 12 und 20 im Vergleich mit dem WT

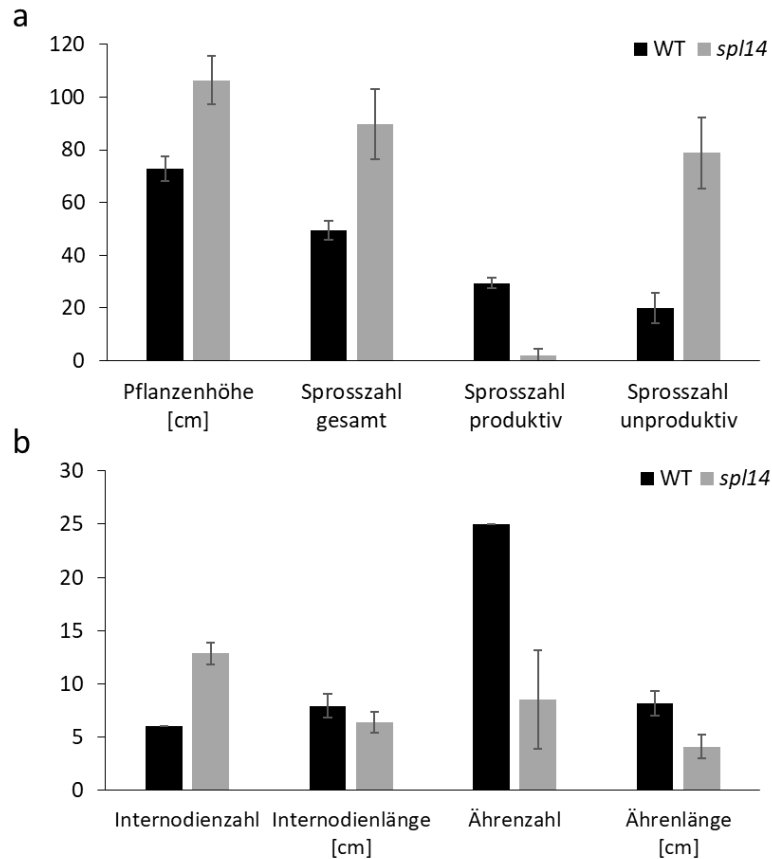


Abbildung 24 – Bestimmung von Pflanzenarchitektur-bezogenen und ertragsrelevanten Parametern der M2-Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 mutierten Pflanzen E11, E12 und E20 (*sp14*) im Vergleich mit Wildtyppflanzen (WT); (a) Pflanzenhöhe, Sprosszahl gesamt, produktiv und unproduktiv; (b) Zahl und Länge der Internodien, Zahl und Länge der Ähren; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

Zur Absicherung des durch Mutation von *Sp14* verursachten Phänotyps erfolgte eine Untersuchung des Paraloges *Sp17*, wobei das Zielmotiv 2-4 in diesem Gen an zwei Positionen von gRNA2-4 abweichende Basen aufweist (Tabelle 33; siehe 4.3.2.; Abbildung A10). In keiner der Pflanzen konnte eine Mutation in *Sp17* entdeckt werden.

Da der Ährenphänotyp Ähnlichkeiten mit dem *vrs4*-Phänotyp (Koppolu et al., 2013) aufweist erfolgte auch eine Untersuchung auf Sequenzveränderungen in *Vrs4* (Abbildung A10), wobei in keiner der Pflanzen eine Veränderung in diesem Gen zu finden war.

4.3.7.2. Phänotypische Untersuchung der M3-Generation

Die Phänotypisierung von Nachkommen der Pflanzen E11-8, E12-7 und E20-7 erfolgte im Vergleich zum Wildtyp-Segreganten E18, in dem weder Mutationen noch die T-DNA nachweisbar waren (siehe 4.3.6.2.). Insgesamt wurden zwei Versuchsgruppen getestet. Die Versuchsgruppe 1 umfasste Nachkommen der Pflanzen E11-8, E12-7 und E20-7 unter Stressbedingungen, da die Anzucht in 9 cm Töpfen erfolgte und die Pflanzen einen Stressphänotyp mit vorzeitiger Bildung von Ähren

entwickelten. Das Wachstum der Versuchsgruppe 2 erfolgte in Standard-Töpfen (18 cm), jedoch wurde auf die Analyse der Nachkommen der Pflanze E20-7 verzichtet. Untersucht wurden die Pflanzenhöhe, die Anzahl und Länge der Internodien, die Anzahl der Sprosse mit dem Anteil produktiver und unproduktiver Sprosse, die Anzahl und Länge der Ähren sowie die Kornzahl pro Ähre und, um die Ährenlänge mit einzubeziehen, auch die Kornzahl pro 1 cm Ähre (Tabelle 40).

Tabelle 40 – Phänotypisierung von M3-Nachkommen der Primärmutanten E11, E12 und E20 im Vergleich zum WT E18 in den beiden Versuchsgruppen 1 (gestresst) und 2 (ungestresst)

Parameter	Versuchsgruppe 1				Versuchsgruppe 2		
	E18 (WT)	E11-8	E12-7	E20-7	E18 (WT)	E11-8	E12-7
Anzahl Pflanzen	9	10	11	9	6	6	6
Pflanzenhöhe (cm)	57,3	83,3	84,8	80,6	68,3	94,4	93,9
Internodienlänge (cm)	7,5	6,5	6,2	7,6	9	5	6
Internodienzahl	5	10	9	8	5	13	11
Sprosszahl gesamt	25	32	31	33	61	112	86
Anteil produktiver Sprosse	95,9 %	69,3 %	76,2 %	75,2 %	45,9 %	24 %	44 %
Anteil unproduktiver Sprosse	4,1 %	30,7 %	23,8 %	24,8 %	54,1 %	76 %	56 %
Ährenanzahl	24	21	23	23	19	20	38
Ährenlänge	6,2	5,4	5,5	4,9	8,2	4,1	5,0
Kornzahl pro Ähre	15	13	13	11	14	7	10
Kornzahl pro 1 cm Ähre	1,6	2,5	1,8	2,3	1,7	1,6	2,0

In beiden Versuchsgruppen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der SPL14-Funktion zu einem erhöhten Längenwachstum führt. Es gab deutlich mehr Internodien, die individuell bis zu 3 cm kürzer waren als im Wildtyp. Ein weiteres besonderes Merkmal war der drastische Anstieg der Anzahl der Sprosse, wobei der Anteil produktiver Sprosse verringert und der Anteil unproduktiver Sprosse erhöht war. Die Anzahl ausgebildeter Ähren blieb nahezu gleich bzw. war erhöht, die Ähren waren jedoch bis zu 50 % kürzer (Abbildung 26a). Insgesamt wurden auch weniger Körner pro Ähre gebildet, wobei die Kornzahl pro 1 cm Ähre unverändert bis etwas erhöht war (Abbildung 25).

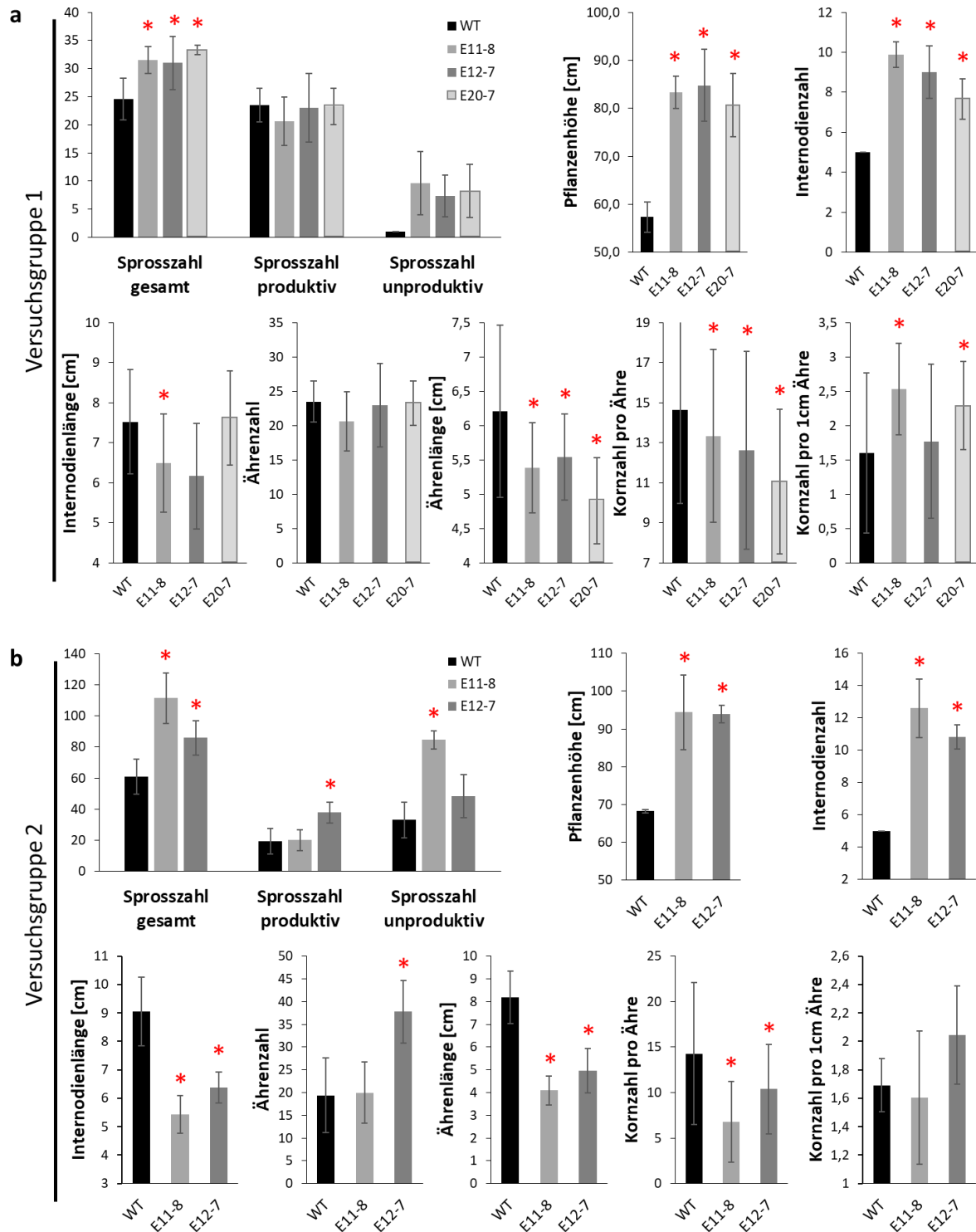


Abbildung 25 – Bestimmung von Pflanzenarchitektur-bezogenen und ertragsrelevanten Parametern der M3-Nachkommen der im SPL14-Zielmotiv 2-4 mutierten E11, E12 und E20 (*sp14*) im Vergleich mit Wildtyppflanzen (WT) der Versuchsgruppen 1 (a) und 2 (b); (a,b) obere Reihe von links nach rechts: Sprosszahl (gesamt, produktiv, unproduktiv), Pflanzenhöhe, Zahl der Internodien; untere Reihe von links nach rechts: Länge der Internodien, Zahl und Länge der Ähren, Kornzahl pro Ähre, Kornzahl pro 1 cm Ähre; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

Die Sprosse zeigten teilweise deutliche Deformierungen und bei der Pflanze E12-7-29 entstanden im mittleren Bereich des Sprosses Nebenähren (Abbildung 26b). Sämtliche herausgeschobene Ähren der mutierten Linien besaßen einen gefalteten Ährenstiel unterhalb der Ähre.

In der Versuchsgruppe 2 konnte in den mutierten Linien beobachtet werden, dass die sonst sterilen lateralen Ährchen in allen Fällen weiterentwickelt waren und teils Körner und Grannen bildeten (Pflanze E11-8-45, Abbildung 26c, d, e). Die lateralen Ährchen waren insgesamt länger, breiter und hatten eine größere Fläche als der Wildtyp (Abbildung 27b, c).

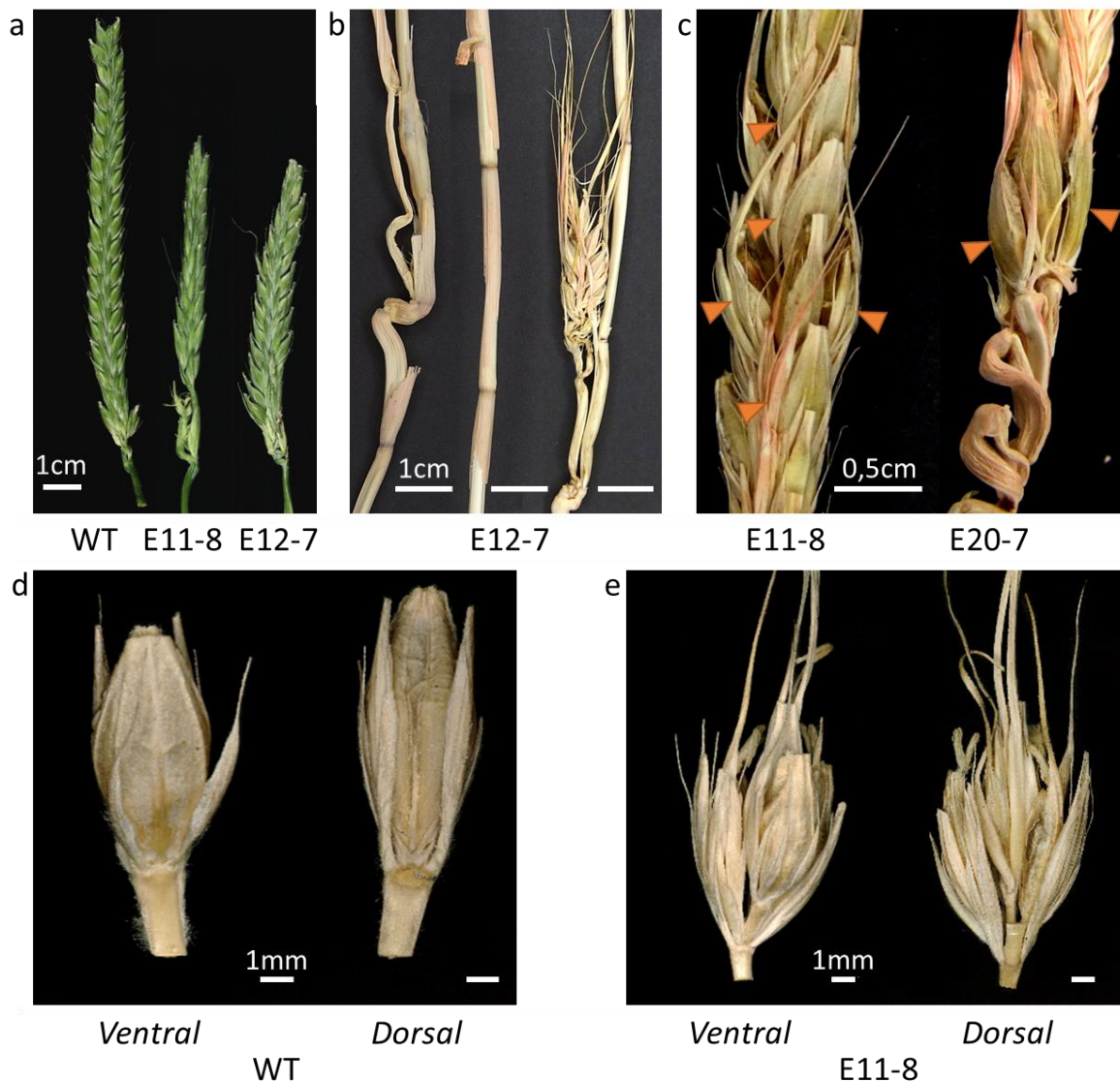


Abbildung 26 – Phänotypisierung der Nachkommen der im Zielmotiv 2-4 von *Sp14* mutierten Pflanzen in der M3-Generation; (a) Ähren der WT-Pflanze E18 und der Nachkommen der mutierten Pflanzen E11-8 und E12-7; (b) Veränderte Sprossarchitektur in E12-Nachkommen mit verkürzten Internodien sowie geknickten Spross mit zusätzlicher Ähre; (c) Vergrößerte und entwickelte seitliche Ährchen (orange Dreiecke) in Nachkommen von E11-8 und E20-7; (d) Ährchentriplett einer Wildtyppflanze in ventraler^(*) und dorsaler^(*) Ansicht; (e) Ährchentriplett mit seitlichen Körnern von Nachkommen der Pflanze E11-8 in ventraler und dorsaler Ansicht; weiße Linie entspricht den angegebenen Längensmaßen

Pflanzen mit 1 bp-Insertionen im Zielmotiv 2-4 zeigten eine deutlich erhöhte Zahl an Internodien und somit auch an Blättern. Der Grund lag in der veränderten Ährenentwicklung des frühen Stadiums *Double Ridge*. So wiesen die Pflanzen eine verlängerte vegetative^(*) Phase und eine längere Phase der Bildung der Blattprimordien, der *Leaf Ridges* auf, welche im Meristem^(*) deutlich dominant erschienen. Auch die Blattprimordien waren vergrößert (Abbildung 27a).

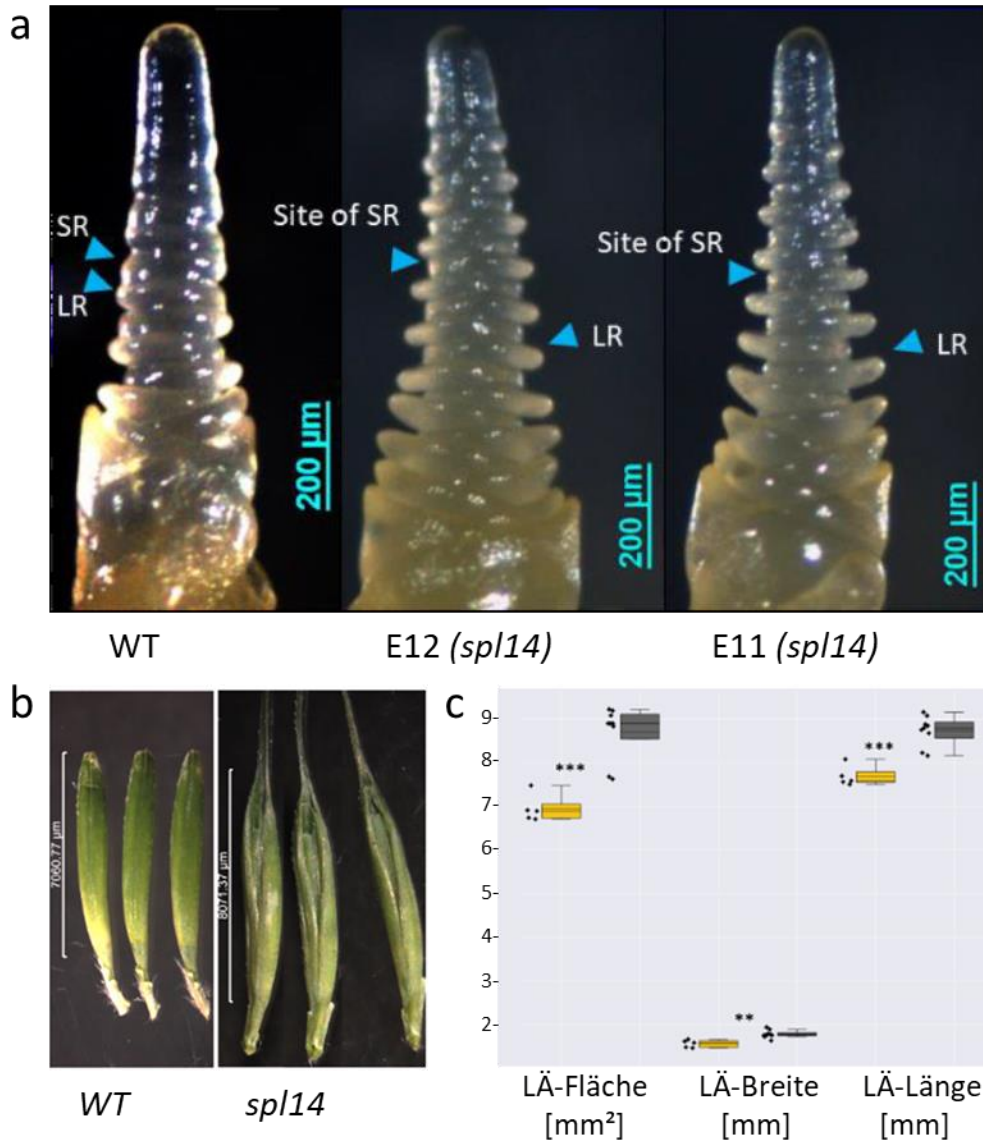


Abbildung 27 – Veränderungen des Sprossmeristems und der seitlichen Ährchen; (a) Sprossmeristem im *Double Ridge*-Stadium von WT und *spl14* KO Pflanzen, LR: *Leaf Ridge*, SR: *Spikelet Ridge*; (b) Laterale Ährchen von WT und *spl14*-KOs; (c) Fläche, Breite und Länge der lateralen Ährchen (LÄ), WT (gelb): n=5, *spl14*-KO (grau): n=9, P-Wert: *** = <0,001, **=<0,01 (zweiseitiger Student's t-Test), Grafiken modifiziert von Thiel et al., 2021

4.3.8. Vergleichende Expressionsanalyse verschiedener Ährenarchitekturgene in *spl14*-Mutanten

Für die Expressionsanalyse wurden Meristeme im Stadium primordialer Grannen (*Awn Primordia Stage*) gesammelt und es wurde RNA isoliert, cDNA^(*) hergestellt und eine Transkriptionsanalyse^(*) mittels qRT-PCR durchgeführt. Das Ziel war, den Einfluss der reduzierten SPL14-Proteinherstellung auf die Expression der verschiedenen Ährenzeitigkeitsgene *Six-rowed spike 1* (*Vrs1*; Komatsuda et al., 2007), *Vrs2* (Youssef et al., 2017), *Vrs3* (Bull et al., 2017), *Vrs4 / Ramosa2* (*Ra2*; Koppolu et al., 2013) und *Vrs5 / Intermedium-C* (*Int-C*; Ramsay et al., 2011) zu untersuchen. Zur Normalisierung wurde das Gerstengen *Actin1* verwendet. Insgesamt wurden 3 biologische Replikate verwendet und in jeweils 3 technischen Replikaten untersucht, wobei aufgrund der Streuung der C_T-Werte die Auswertung anhand von zwei biologischen Replikaten erfolgte. Die *Spl14*-Primer^(*) zeigten eine erhöhte PCR-Effizienz von 147 % im Vergleich zu den *Actin*-Primern, dennoch konnte eine eindeutige Verringerung der *Spl14*-Expression in *spl14*-KOs bestimmt werden.

Das entscheidende Gen für den Unterschied der zwei- oder sechszeiligen Gerste, *Vrs1*, war in den *spl14*-Pflanzen verringert, während *Vrs2* in den Meristemen der E12-Nachkommen erhöht war. Die Expression von *Vrs3* und *Vrs4* war recht niedrig, aber gegenüber dem WT nicht eindeutig verändert. In Meristemen der E11-Nachkommen konnte eine tendenziell niedrigere *Vrs4*-Expression beobachtet werden. *Vrs5* war insgesamt auf einem sehr niedrigen Expressionsniveau, jedoch war auch dieses Gen in den mutierten Pflanzen tendenziell abreguliert (Abbildung 28, Tabelle A33).

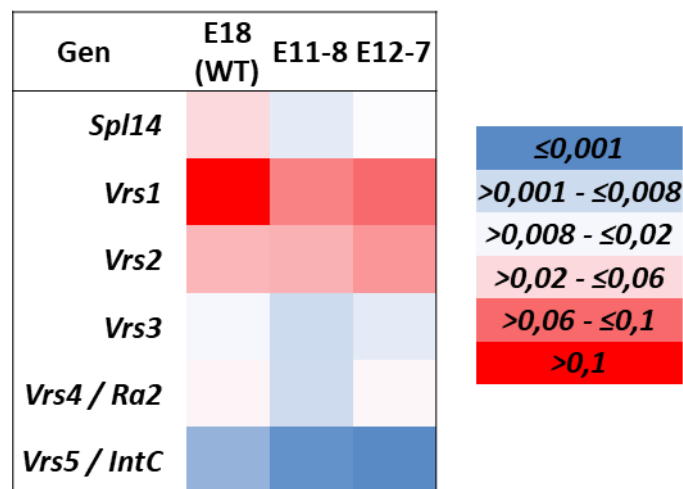


Abbildung 28 – Relative Expression der Ährenarchitekturgene *Spl14*, *Vrs1*, *Vrs2*, *Vrs3*, *Vrs4/Ra2* und *Vrs5/IntC* in Wildtyppflanze E18 und Nachkommen der *spl14*-KO-Pflanzen E11-8 und E12-7; die relativen Expressionswerte zeigen den $2^{-(\Delta CT)}$ Wert aus 2 biologischen Replikaten mit je 3 technischen Replikaten bezogen auf Gerste *Actin1*, der Hintergrund zeigt niedrige Expressionswerte in blau, mittlere Werte in weiß und hohe Werte in rot an

4.4. Gezielte Mutagenese der Expressions-regulierenden *miR156*-Bindestelle in den Transkriptionsfaktor-genen *Squamosa-promotor binding protein-like 14* und *17* der Gerste

4.4.1. Beschreibung der *miR156*-Bindestelle in *Spl14* und *Spl17*

Die beiden *SPL*-Paraloge^(*) *Spl14* und *Spl17* zeigen im 3. Exon eine vollständig übereinstimmende Region von 53 bp. In dieser konservierten Region befindet sich auch die *miR156*-Bindestelle. Acht weitere Gersten-*SPL*-Gene haben eine *miR156*-Bindestelle (Tabelle 41), jedoch sind die 5'-gelegenen flankierenden Sequenzen unterschiedlich und folgende Unterschiede zu beobachten: Während *Spl14*, *Spl16*, *Spl17*, *Spl18* und *Spl23* eine vollständige *miR156*-Bindestelle aufweisen, ist in *Spl7/7A* und *Spl11* das erste Nukleotid verändert und bei *Spl3* und *Spl13* weichen sogar die ersten beiden Nukleotide von der kanonischen Sequenz ab, zudem liegt in *Spl13* ein weiterer Basenaustausch in der *miR156*-Bindestelle vor.

Ziel des hier verfolgten Ansatzes ist es, bei *Spl14* eine Modifikation innerhalb der *miR156*-Bindestelle einzuführen, die die Anbindung der *miR156* behindert und somit zu einer Deregelierung der Expression von *Spl14* führt.

Tabelle 41 – Übersicht über die Gen-IDs und die *miR156*-Bindestellen der Gerste-*SPL*-Gene; fett dargestellt ist die *miR156*-Bindestelle, rot markiert sind Abweichungen

Gen	Gen-ID 2016	Gen-ID 2019	<i>miR156</i> -Bindestelle
<i>miR156</i>			ACACGAGUGAGAGAAGACAGU
<i>Spl3</i>	HORVU6Hr1G019700.2	HORVU.MOREX.r2.6HG0462880.1	ttcag ca TGCTCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl7</i>	HORVU2Hr1G097580.1	HORVU.MOREX.r2.2HG0157010.1	cggct g TGCTCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl7A</i>	HORVU2Hr1G097610.1		
<i>Spl11</i>	HORVU6Hr1G031450.6	HORVU.MOREX.r2.6HG0473260.1	ttcag c TGCTCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl13</i>	HORVU2Hr1G048280.2	HORVU.MOREX.r2.2HG0117740.1	ggctg ca TGCT C CTCTCTTCTGTCA
<i>Spl14</i>	HORVU0Hr1G020810.1	HORVU.MOREX.r2.7HG0564420.1	ccagc T GTGCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl16</i>	HORVU5Hr1G076380.9	HORVU.MOREX.r2.5HG0409580.1	ccgac T GTGCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl17</i>	HORVU5Hr1G073440.13	HORVU.MOREX.r2.5HG0406890.1	ccagc T GTGCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl18</i>	HORVU0Hr1G039170.6	HORVU.MOREX.r2.7HG0567820.1	cggac T GTGCTCTCTCTTCTGTCA
<i>Spl23</i>	HORVU3Hr1G094730.2	HORVU.MOREX.r2.3HG0259540.1	acaac T GTGCTCTCTCTTCTGTCA

4.4.2. *In silico*-Analyse der Zielregion und Auswahl von Zielmotiven für gRNA/Cas9

4.4.2.1. Auswahlkriterium für Zielmotiv

Da durch das vorgegebene Ziel, die Modifizierung der *miR156*-Bindestelle, die Zielregion^(*) festgelegt war, stand nur eine eingeschränkte Auswahl an Zielmotiven^(*) zur Verfügung. Insgesamt waren vier mögliche Zielmotive im unmittelbaren Sequenzkontext vorhanden, von denen jedoch nur das Zielmotiv 3-2 einen möglichen Doppelstrangbruch innerhalb des *miR156*-Motivs ermöglicht (Tabelle 42, Abbildung 29). Die anderen drei Zielmotive eignen sich nur eingeschränkt, da sie einerseits eine größere Deletion^(*) bis ins *miR156*-Bindemotiv benötigen und dies andererseits zum Verlust mehrerer

Aminosäuren führt, der ein höheres Risiko des Funktionsverlustes des jeweiligen Zielgens birgt. Da die adressierte Zielregion in *Spl14* und *Spl17* übereinstimmt, sind alle vier Zielmotive in beiden Genen gleichermaßen vorhanden (Abbildung A13).

Tabelle 42 – Zielmotive (ZM) in der *miR156*-Zielregion von *Spl14* und *Spl17*, gelb: überlappender Teil der Zielmotive mit *miR156*-Bindestelle, grün: Schnittbereich von *Cas9*

Zielmotiv	Sequenz inklusive PAM	DESKGEN-ON-Target (*)Aktivität	DESKGEN-OFF-Target (*)Aktivität	WU-CRISPR-Aktivität
ZM3-1	GAGAGCACAGCTGGAGTCGGCGG	51	33	100
ZM3-2	CAGAAGAGAGAGAGCACAGCTGG	46	28	98
ZM3-3	TCTTCTGTCAACTCAGCATGGG	60	30	63
ZM3-4	AGAGAGAGCACAGCTGGAGTCGG	53	33	98

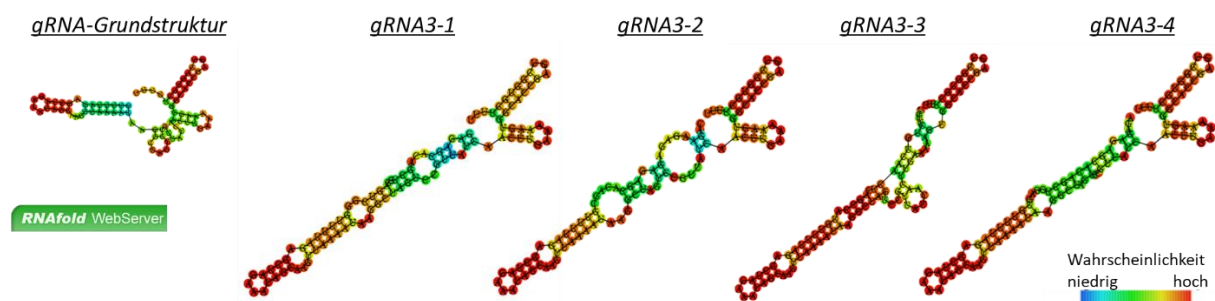


Abbildung 29 – Sekundärstruktur des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (*gRNA scaffold*) sowie der gRNAs 3-1 bis 3-4 (RNAfold Webserver: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>); blau-grün: geringe / gelb-rot: hohe Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung

4.4.2.2. Promotorabhängige Varianten des zielspezifischen Bereichs der gRNA3-2

Die ausgewählte gRNA3-2 ist in ihren vorhergesagten Aktivitätswerten und der Sekundärstruktur nicht optimal und hat an Position 1 ein C, welches nicht kompatibel mit dem zur Expression genutzten *OsU3*-Promotor(*) ist. Zur Expression unter dem *OsU3*-Promotor wurde gezeigt, dass die gRNA ein A oder G an Position 1 aufweisen sollte (Gao et al., 2014). Um die bestmögliche Konstellation für das gRNA3-2-Zielmotiv zu erhalten, wurden drei verschiedene Varianten verwendet (Tabelle 43). Es wurden zwei 21 bp lange gRNAs mit einem am 5'-Ende hinzugefügten A (gRNA3-2A) oder G (gRNA3-2G) erstellt, wobei in der A-Variante keine Fehlpaarung zum Genom entstanden ist, während in der G-Variante eine Fehlpaarung vorliegt. Als dritte Variante wurde eine 19 bp-gRNA-Variante erstellt, in dem das C an Position 1 des Zielmotives 3-2 bei der Expressionseinheit der gRNA weggelassen wurde und das an Position 2 stehende A als neues Start-Nukleotid der gRNA verwendet wurde (gRNA3-2o1).

Tabelle 43 – Varianten der *Spl14/17* spezifischen gRNA3-2; fett dargestellt sind die Start-Nukleotide

gRNA-Variante	Sequenz inklusive PAM	Eigenschaft
gRNA3-2A	A CAGAAGAGAGAGAGCACAGCTGG	21 bp, keine Fehlpaarung
gRNA3-2G	G CAGAAGAGAGAGAGCACAGCTGG	21 bp, Fehlpaarung von Start-G
gRNA3-2o1	A GAAGAGAGAGAGCACAGCTGG	19 bp

4.4.3. Validierung der *Spl14/17*-spezifischen gRNA/*cas9*-Konstrukte mittels transienter Co-Expression mit einem Zielvektor in der Epidermis von Gerstenblättern

Zur Validierung der gRNA-Aktivitäten wurden die Zielspezifischen 5'-Enden der gRNAs (siehe 4.4.2.2.) mittels BsaI-Schnittstellen in den generischen^(*) Vektor^(*) pSH121 eingefügt (Gerasimova et al., 2018; 2020; GenBank-ID: MW145140.1). Die Validierung erfolgte wie in 3.10. beschrieben nach Budhagatapalli et al. (2016). Für alle drei getesteten gRNA/*cas9*-Konstrukte (pCH12 für gRNA3-2A, pCH13 für gRNA3-2G und pCH14 für gRNA3-2o1) wurde der Zielvektor pCH25 verwendet (Tabelle 4) und es wurden zwei Experimente mit 1-2 Platten pro gRNA durchgeführt (Tabelle 44).

Tabelle 44 – Berechnung des Anteils von Gerstenepidermiszellen mit im *Spl14*-Exon3-Zielmotiv mutiertem Zielvektor (YFP-Restitution) bezogen auf alle transformierten Zellen (mCherry-Signal)

gRNA	Experiment	Platte	Zellen mit mCherry	Zellen mit YFP	gRNA-Aktivität als Häufigkeit YFP-fluoreszierender Zellen von der Gesamtzahl der transformierten Zellen
gRNA3-2A	1	1	62	28	50 %
		2	12	8	
	2	1	45	24	
		<i>Gesamt</i>	<i>119</i>	<i>60</i>	
gRNA3-2G	1	1	35	15	52 %
		2	31	12	
	2	1	68	38	
		2	33	22	
	<i>Gesamt</i>	<i>167</i>	<i>87</i>		
gRNA3-2o1	1	1	24	8	37 %
		2	24	5	
	2	1	38	18	
		2	69	27	
	<i>Gesamt</i>	<i>155</i>	<i>58</i>		

Die beiden 21 bp langen gRNA-Varianten zeigten dabei eine deutlich höhere Rate an YFP-positiven Zellen als die 19 bp-Variante der gRNA3-2. Alle drei gRNA-Varianten wurden für die stabile Transformation verwendet.

4.4.4. Stabile Gerstentransformation durch Agrobakterien-vermittelten Transfer der binären *Spl14/17*-spezifischen gRNA/*cas9*-Konstrukte in unreife Embryonen

Die gRNA/*cas9*-Expressions-kassetten wurden in den Binärvektor p6i-d35S-TE9 (Abbildung A8d) eingeführt, wobei entsprechend der gRNA3-2-Variante das Plasmid^(*) pCH32 für gRNA3-2A, pCH33 für gRNA3-2G und pCH34 für gRNA3-2o1 erstellt wurde (Tabelle 4, Abbildung A4f). Die Gerstentransformation^(*) erfolgte wie in 3.11.4. beschrieben nach Marthe et al., 2015, wobei die jeweilige T-DNA^(*) der drei gRNA/*cas9*-Konstrukte in unabhängigen Experimenten in unreife Embryonen der Gerstensorte Golden Promise transformiert wurde (Tabelle 45).

Tabelle 45 – Transfer *Spl14/17*-spezifischer gRNA/cas9-Binärkonstrukte in Gerstenembryos

Plasmid ^(*)	gRNA	Embryonen	Regenerate
pCH32	gRNA3-2A	360	27
pCH33	gRNA3-2G	360	34
pCH34	gRNA3-2o1	360	31

4.4.5. Vergleich der Mutationseffizienz der gRNA3-2-Varianten

Fast alle regenerierten Pflanzen zeigten die Anwesenheit der T-DNA, jedoch war die Mutationseffizienz in allen Fällen recht niedrig. Die höchste Effizienz konnte für die Variante gRNA3-2G ermittelt werden, während für die Varianten gRNA3-2A und 3-2o1 deutlich weniger mutierte Pflanzen gefunden wurden (Tabelle 46).

Tabelle 46 – Vergleich der Mutationseffizienz der *Spl14/17*-spezifischen gRNA3-2-Varianten

gRNA	Pflanzen mit T-DNA	Mutierte Pflanzen	Mutationseffizienz
gRNA3-2A	27	3	11,1 %
gRNA3-2G	34	6	17,6 %
gRNA3-2o1	29	3	10,3 %

Die Fehlpaarung an Position 1 in der Variante gRNA3-2G scheint keinen negativen Einfluss auf die Bindefähigkeit der gRNA an das Zielmotiv zu haben. Die 19 bp-Variante gRNA3-2o1 zeigte, wie auch im transienten^(*) Aktivitätstest (siehe 4.4.3.), die geringste Effizienz.

4.4.6. Analyse primär-mutierter Pflanzen im Zielmotiv 3-2

In allen Regeneraten der Transformationsexperimente der gRNA3-2A- und gRNA3-2G-Variante sowie in 29 von 31 regenerierten Pflanzen der gRNA3-2o1-Variante wurden über PCR-Amplifikation die gRNA- und *cas9*-DNA nachgewiesen (Tabellen A34, A35, A36).

Die gRNA-Variante 3-2A erbrachte dabei zwei Pflanzen (E1 und E7) mit Mutationen im Zielmotiv 3-2 bei *Spl14* und eine Pflanze (E12) mit Mutationen bei *Spl17* (Tabelle A34). Die Experimente mit der gRNA-Variante 3-2G ergaben 6 Pflanzen mit spezifischen Mutationen im Zielmotiv 3-2 in *Spl14* bzw. *Spl17*, wobei 2 Pflanzen (E1 und E23) Mutationen bei beiden *SPL*-Genen zeigten, eine Pflanze (E11) nur bei *Spl14* und 3 Pflanzen (E4, AE3 und AE4) bei *Spl17* (Tabelle A35). Die gRNA-Variante 3-2o1 ergab 3 Pflanzen mit spezifischen Mutationen in *Spl17* (E02, E07 und E13) (Tabelle A36). Die PCR-Produkte aller 12 mutierten Pflanzen wurden subkloniert^(*) und 8 Klone mittels Sequenzierung analysiert (Tabelle 47).

Tabelle 47 – Subklonierung der PCR-Amplifikate der im Zielmotiv 3-2 bei *Spl14* und *Spl17* mutierten Pflanzen der gRNA3-2-Varianten und mittels PCR nachgewiesene T-DNA, *-Mutation ohne Leserahmenverschiebung

gRNA	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
gRNA3-2A	E1	7/8 +1 bp (A)	WT	gRNA3-2A, <i>cas9</i>
	E7	3/7 Δ 2 bp	WT	gRNA3-2A, <i>cas9</i>
	E12	WT	2/5 +1 bp (C)	gRNA3-2A, <i>cas9</i>
gRNA3-2G	E1	4/4 +1 bp (A)	2/6 +1 bp (T) 1/6 +1 bp (A)	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	E4	WT	2/4 +1 bp (A)	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	E11	2/4 Δ 1 bp	WT	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	E23	5/8 +1 bp (A) 3/8 Δ 19 bp	2/7 +1 bp (A)	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	AE3	WT	1/6 Δ 30 bp*	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	AE4	WT	2/5 +1 bp (T)	gRNA3-2G, <i>cas9</i>
	gRNA3-2o1	E2	WT	3/7 +1 bp (A)
E7		WT	2/7 +1 bp (T)	gRNA3-2o1, <i>cas9</i>
E14		WT	4/7 +1 bp (T)	gRNA3-2o1, <i>cas9</i>

Die Pflanze AE3 der gRNA3-2G-Variante zeigte eine 30 bp-Deletion im Zielmotiv 3-2 bei *Spl17*, welche jedoch nur in einem von sechs Klonen nachgewiesen wurde. Die in den anderen Pflanzen nachgewiesenen Mutationen führten alle zur Leserahmenverschiebung von *Spl14* bzw. *Spl17*. Es erfolgte keine weitere Analyse der im verbleibenden Leserahmen mutierten Pflanze AE3 der gRNA-Variante 3-2G, da diese Mutation in *Spl17* mit geringer Wahrscheinlichkeit vorlag und das Hauptinteresse der Studie auf *Spl14* lag.

4.4.7. Genotypische Analyse der M2-Generation

Für die Analyse der Nachkommen wurden alle mutierten Primärregenerate der gRNA-Varianten 3-2A (Tabellen A37, A38, A39) und 3-2o1 (Tabellen A42, A43, A44) und die beiden putativen *spl14/spl17*-Doppelmutanten E1 und E23 der gRNA-Variante 3-2G (Tabellen A40, A41) weitergeführt. Die Genotypisierung^(*) der Nachkommen ergab alles in allem nur Mutationen, die zur Leserahmenverschiebung von *SPL14* bzw. *SPL17* führen. Diese umfassen 1-2 bp Deletionen^(*) oder Insertionen^(*). In einigen Nachkommen aller drei gRNA3-2-Varianten wurde keine T-DNA mittels PCR nachgewiesen.

Alle Mutationen führten zur Veränderung der *miR156*-Bindestelle. Jedoch muss konstatiert werden, dass keine der analysierten Pflanzen eine Mutation ohne Leserahmenverschiebung besitzt. Somit konnte das Ziel, Pflanzen mit veränderter *miR156*-Bindestelle bei Beibehaltung des Leserahmens von *Spl14* und *Spl17* nicht erreicht werden. Die weiteren Analysen beschäftigen sich daher mit dem Einfluss des Funktionsverlustes von *Spl14* und/oder *Spl17*.

4.4.8. Phänotypische Analyse der M2-Generation

Aufgrund der Tatsache, dass keine Pflanzen mit Mutationen der miR156-Bindestelle ohne Leserahmenverschiebung gefunden wurden, erfolgte die phänotypische^(*) Analyse der noch nicht genetisch fixierten M2-Pflanzen im Hinblick auf die unterschiedlichen Einflüsse des Funktionsverlustes der beiden Transkriptionsfaktorgene^(*) *Spl14* und *Spl17*. Hierfür wurden diese in *spl14*-, *spl17*- und *spl14/spl17*-Mutanten zusammengefasst. Bestimmt wurden die Höhe der Pflanzen, die Anzahl und Länge der Internodien^(*), die Zahl und Länge der Ähren, die Körner pro Ähre und die in Abhängigkeit der Ährenlänge die Kornzahl pro 1 cm Ähre (Tabelle 48; Abbildung 31).

Tabelle 48 – Phänotypisierung der M2-Selbstungsnachkommen aller *gRNA3-2*-Varianten; kursiv: Standardabweichung

Parameter	WT	<i>spl14</i>	<i>spl17</i>	<i>spl14/spl17</i>
Anzahl Pflanzen	2	13	5	6
Pflanzenhöhe (cm)	69,5 ± 5,0	94 ± 15,8	80,2 ± 19,9	118 ± 8,3
Anzahl Internodien	4 ± 0	10 ± 3,2	6 ± 1,5	24,5 ± 1,3
Internodienlänge (cm)	9,0 ± 2,5	6,3 ± 1,8	8,6 ± 1,9	4,2 ± 1,2
Ährenzahl	31,5 ± 3,5	17 ± 9,9	36 ± 10,1	0 ± 0
Ährenlänge (cm)	8,7 ± 1,6	6,1 ± 1,9	6,8 ± 1,2	
Zahl verzweigter Ähren	4 ± 0	2,3 ± 2,2	5,6 ± 3,2	
Körner pro Pflanze	546 ± 146	263 ± 33	374 ± 50	
Körner pro Ähre	20 ± 7	12 ± 7	11 ± 6	
Kornzahl pro 1 cm Ähre	4,13 ± 0,27	3,75 ± 0,45	3,7 ± 0,34	

Die *spl14*-Pflanzen zeigten generell einen größeren Längenwuchs, welcher durch eine größere Zahl an Internodien hervorgerufen wurde, die jedoch gegenüber dem WT etwas verkürzt waren (Abbildung 30). Es wurden weniger Ähren gebildet, die verkürzt waren und dadurch auch weniger Körner pro Ähre besaßen. Jedoch war die Anzahl der Körner pro 1 cm Ähre nicht signifikant verändert.

Die *spl17*-Pflanzen waren etwas länger als die Golden Promise-Wildtypen, da im Durchschnitt ein Internodium mehr vorhanden war. Die Länge der Internodien und die Zahl der Ähren entsprachen Wildtyppflanzen, jedoch waren die Ähren kürzer (Abbildung 30) und hatten weniger Körner pro Ähre. Zudem zeigten die mutierten Pflanzen tendenziell mehr Verzweigungen im basalen Bereich der Ähre, als der Wildtyp Golden Promise, welcher grundsätzlich bereits zu Verzweigungen neigt.

Die *spl14/spl17*-Doppelmutanten zeigten einen deutlichen Längenzuwachs und hatten sechseinhalb Mal mehr Internodien als die Wildtypen, wobei dieses deutlich kürzer waren. Sowohl die homozygoten^(*), als auch die heterozygoten^(*) Doppelmutanten bildeten keine Ähren. Die erhöhte Zahl der Internodien, das stärkere Längenwachstum und die fehlende Ausbildung der Ähren zeigten, dass der Übergang vom vegetativen^(*) zum generativen^(*) Wachstum gestört ist.

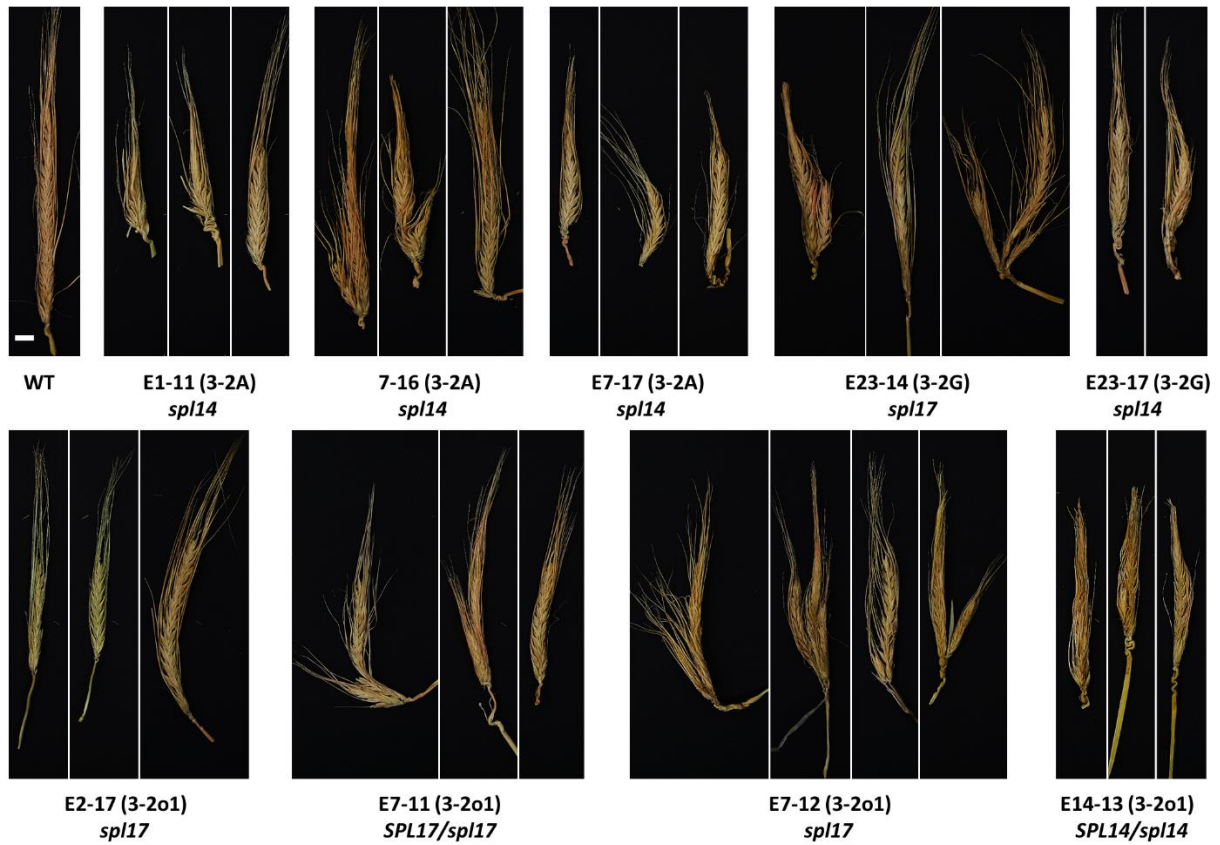


Abbildung 30 – Ährenphänotyp der homo- und heterozygoten M2-Nachkommen der in *Spl14* oder *Spl17* durch gRNA3-2 und Cas9 mutierten regenerierten Pflanzen; *spl14*-Mutationen in den Pflanzen 1-11, 7-16, 7-17 (gRNA3-2A), 23-17 (gRNA3-2G) und 14-13 (gRNA3-2o1); *spl17*-Mutationen in den Pflanzen 23-14 (gRNA3-2A), 2-17, 7-11 und 7-12 (gRNA3-2o1); weiße Linie repräsentiert 1 cm

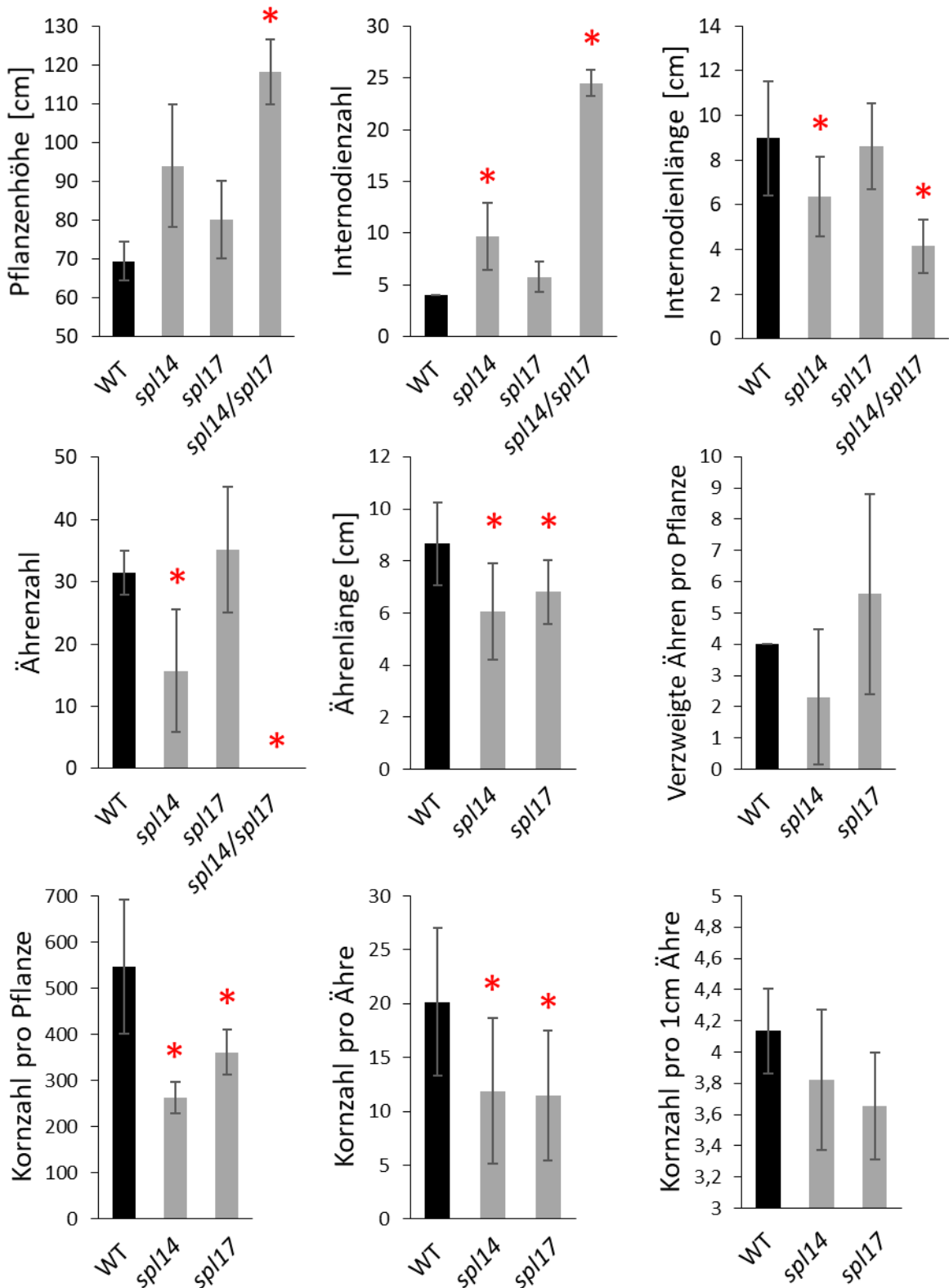


Abbildung 31 – Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in *Spl14* und/oder *Spl17* mutierten M2-Nachkommen; Ergebnisse der Linien nach mutiertem Gen zusammengefasst (WT: n=2, *spl14*: n=13, *spl17*: n=5, *spl14/spl17*: n=6); obere Reihe von links nach rechts: Pflanzenhöhe, Zahl und Länge der Internodien; mittlere Reihe von links nach rechts: Zahl und Länge der Ähren, Zahl verzweigter Ähren pro Pflanze; untere Reihe von links nach rechts: Kornzahl pro Pflanze, pro Ähre und pro 1 cm Ähre; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

4.4.9. Genotypische Analyse der M3-Generation

Aufgrund des rein vegetativen Wachstums der *spl14/spl17*-Doppelmutanten wurden bei den weiteren Analysen ausschließlich Nachkommen von einzelmutierten Pflanzen berücksichtigt. Sowohl für *Spl14*, als auch für *Spl17* wurden homozygot-mutierte Pflanzen gefunden (Tabellen A37, A38, A39, A41, A42, A43).

Tabelle 49 – Mutierte *spl14*- und *spl17*-Allele auf DNA- und Proteinebene; grün: Zielmotiv 3-2; rot: Mutationen; gelb hinterlegt: miR156-Bindestelle; grün hinterlegt: homologe Sequenzwiederholung welche Δ2 bzw. Δ28 bp-Mutation verursacht, WT-Sequenz als Vergleich hinzugefügt; grau: veränderte Aminosäuresequenz; grüne Senkrechtstriche zeigen durch Cas9-Endonuklease induzierte Strangbrüche in der DNA; Unterstreichung im Protein stellt übereinstimmende Zielregion in *SPL14* und *SPL17* dar

Gen	Mutation	Sequenzen
DNA-Sequenzen		
<i>Spl14</i>	WT	CCGCCGACTCCAGCT G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	+1 bp (A)	CCGCCGACTCCAGCTA G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	Δ2 bp	CCGCCGACTCCAGC - - TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
		CCGCCGACTCCAGC TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA (WT)
	Δ1 bp	CCGCCGACTCCAGCT - - TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
<i>Spl17</i>	WT	CCGCCGACTCCAGCT G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	+1 bp (A)	CCGCCGACTCCAGCTA G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	+1 bp (C)	CCGCCGACTCCAGCTC G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	+1 bp (T)	CCGCCGACTCCAGCTT G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACTCAGCCA
	Δ28 bp	CCGCCGACTC CAG - - - - CCA
		CCGCCGACTC CAGCT G TGCTCTCTCTCTTCTGTCAACT CCA (WT)
Protein-Sequenzen		
<i>Spl14</i>	WT	MEIGSGGCGGGSGGGGAGDDPQRHGLKFGKKIYFEDATGGGGGGGGGNASSSKP PAGGGRKPKAAAAGGTSAPSPPRCQVEGCDVDLSGVKQYYSRHKVCCMHSKAPHV VVAGLEQRFCQQCSRFBHQLPEFDQGKRSCRRLAGHNERRRKPFPGLASRYGRL AASFEEPRFRSYLLDFSYPVPSVSRDAWPGARPGYRMPGEIQWQGNLDRPHT GAATGYHGPQPHHAYSGHGGGFPGPEIPPGGCLAGVAADSS <u>CALSLLS</u> TQPWDNT PHGASHHHHRSAAMSAAGFNGNPPVGVSPS IMASNYPMPGSPWSASRGHEGGR NAPHQQLPHDVPLHEVHHPAGSSQHGHFSGELELALQGNRPAPGPRGDHGGGAFD HPGSSSNWSL*
	+1 bp (A)	...AGVAADSS*
	Δ2 bp	...AGVAADSSCSLSSVNSAMGQHTPWCQPPPSSVGGHVRRGLQWQPTCGSVTLHH GE*
	Δ1 bp	...AGVAADSSLLSLFCQLSHGTTTHPMVPATTIIGRRPCPPRRASMTLWECPPS WRV'TTCRRRGAPGVPPGAMKVGTRHTSSCHMTSRSTRCTTQQALASMVTSQANS SSPCKGTGRRLGRAAITAAARSTTPAARPTGPCRQGFQLRHPKSAQRSMDLPAVQ FYLLVTSISMGRKGSEVAGDWFLPYA*
<i>Spl17</i>	WT	METGSSGGGRGPGDDVHGLHFVKKIYFEQDVAGGSGSSSSASGGRRGRGPAVGG GGGGGGGGGGGGGASTPAAGGSASQSQQPRCQVEGCGVDLSGGKTYICRHKV CSMHSKAPLVVAGIEQRFCQQCSRFBHQLPEFDQGKRSCRRLAGHNERRRKPFP GPMSTRYGRLAASFNEDPGRFRSFLDFSYPAPAGVRDPWPAVQPGDHRMPGTT HWQQGQSHHEQHHAHRSVAGYGDHAYNGQGSSSGGGGAPMIPAGFELPSDECM <u>AGVAADSS CALSLLS</u> TQPWDSSAHSSSHIRSPAMSTASAFQGSPVAPSVMASNYM AAASSGSWGSPRGARSMQQQHHHHHMQHDTVMNEVHPSSVHHGQFGELELALQQ GRATPNPPHAEHGAFSHSSNAMNWSL*
	+1 bp (A)	...AGVAADSS*
	+1 bp (C)	...AGVAADSSCSLSSVNSAMG*
	+1 bp (T)	...AGVAADSSLCSLSSVNSAMG*
	Δ28 bp	...AGVAADSSHGIVVPTAPATSGPRQCRRPAPSRAARWRPPSWPATTWRRRAAAAP GVAPGAPGACSSSTTTITCSMTR*

In den *spl14*-Pflanzen bewirken alle homozygot-vorliegenden Mutationen eine Leserahmenverschiebung und dadurch bedingt zu unterschiedlich langen SPL14-Proteinen: Die A-Insertion führt zu einem Stopp-Codon am Beginn der *miR156*-Bindestelle, wodurch 135 Aminosäuren fehlen, die durch eine Mikrohomologie^(*) entstandene 2 bp-Deletion erzeugt ein um 86 Aminosäuren verkürztes Protein, die 1 bp-Deletion bewirkt ein um 48 Aminosäuren längeres SPL14-Protein, wobei die Aminosäuresequenz verändert ist (Tabelle 49).

Die *spl17*-Pflanzen zeigen ebenfalls homozygot-vorliegende Mutationen, die eine Leserahmenverschiebung hervorrufen und zu verkürzten SPL17-Proteinen führen: eine A-Insertion induziert ein Stop-Codon am Beginn der *miR156*-Bindestelle und verkürzt das Protein um 129 Aminosäuren, eine T- oder C-Insertion führt zur Verkürzung um 117 Aminosäuren, eine offensichtlich durch eine Mikrohomologie entstandene 28 bp-Deletion führt zum Verlust der *miR156*-Bindestelle und einer Verkürzung von SPL17 um 60 Aminosäuren (Tabelle 49).

In allen Fällen kommt es zur Veränderung der *miR156*-Bindestelle, jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch zu starkem bis totalem Funktionsverlust des Proteins, obgleich die SBP-Domäne grundsätzlich erhalten geblieben ist (Tabelle 49).

4.4.10. Phänotypische Analyse der M3-Generation

Die Phänotypisierung der *spl14*- und *spl17*-Mutanten umfasste folgende Parameter: die Pflanzenhöhe, die Zahl und Länge der Internodien, die Anzahl der Sprosse und der Anteil unproduktiver Sprosse, die Zahl und Länge der Ähren, die Kornzahl pro Ähre und die Kornzahl pro 1 cm Ähre, die Länge, Breite und Fläche der Körner sowie das Tausendkorngewicht (Tabelle 50; Abbildung 32).

Tabelle 50 – Phänotypisierung der M3-Selbstungsnachkommen aller *gRNA3-2*-Varianten; kursiv: Standardabweichung

Parameter	WT	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>
Anzahl Pflanzen	2	13	11
Pflanzenhöhe in cm	77,5 ± 3,5	108,8 ± 8,2	82,8 ± 6,4
Internodienzahl	7 ± 1	11 ± 1	6 ± 0
Internodienlänge in cm	10,2 ± 1,7	8,6 ± 1,3	10,3 ± 1,8
Sprosszahl	30 ± 3,5	63 ± 15,9	46 ± 9,4
Anteil unproduktiver Sprosse in %	12,5 ± 17,7	69,4 ± 15,6	46,7 ± 12,2
Ährenzahl	26 ± 2	23 ± 1	22 ± 3
Ährenlänge in cm	8,5 ± 0,6	6,3 ± 1,1	7,7 ± 1,2
Kornzahl pro Ähre	21,3 ± 5,8	15,1 ± 5,0	13,2 ± 5,9
Kornzahl pro 1 cm Ähre	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,7	1,6 ± 0,9
Kornlänge in mm	7,5 ± 0,4	8,2 ± 0,4	8,0 ± 0,5
Kornbreite in mm	3,7 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Kornfläche in mm ²	19,1 ± 1,8	21,4 ± 1,7	18,9 ± 1,9
Tausendkorngewicht in g	37,5 ± 2,6	39,2 ± 3,2	29,6 ± 3,4

Die *sp14*-Pflanzen waren deutlich höher gewachsen und zeigten eine größere Zahl an verkürzten Internodien. Es wurden deutlich mehr Sprosse gebildet, wobei 67 % von ihnen keine Ähren ausbildeten. Die Anzahl und Länge der Ähren war verringert und es wurden weniger Körner pro Ähre gebildet. Das Verhältnis von Kornzahl zu Ährenlänge (Kornzahl pro 1 cm Ähre) war vergleichbar mit den Wildtypen. Die Körner waren länger als im Wildtyp, aber das Tausendkorngewicht zeigte keinen bemerkenswerten Unterschied an.

Die *sp17*-Pflanzen waren bezogen auf ihr Längenwachstum und ihre Internodienarchitektur ähnlich wie die Wildtyppflanzen, es wurden jedoch mehr Sprosse gebildet, von denen 42 % keine Ähren ausbildeten. Die Zahl der Ähren war unverändert, jedoch waren die Ähren verkürzt und somit weniger Körner pro Ähre und auch weniger Körner pro 1 cm Ähre vorhanden. Die Körner selbst waren länger, jedoch auch leichter, wie das geringere Tausendkorngewicht zeigt.

Der Einfluss auf die Pflanzenarchitektur ist in *sp14*-Mutanten deutlich größer als in *sp17*-Mutanten.

Ergebnisse

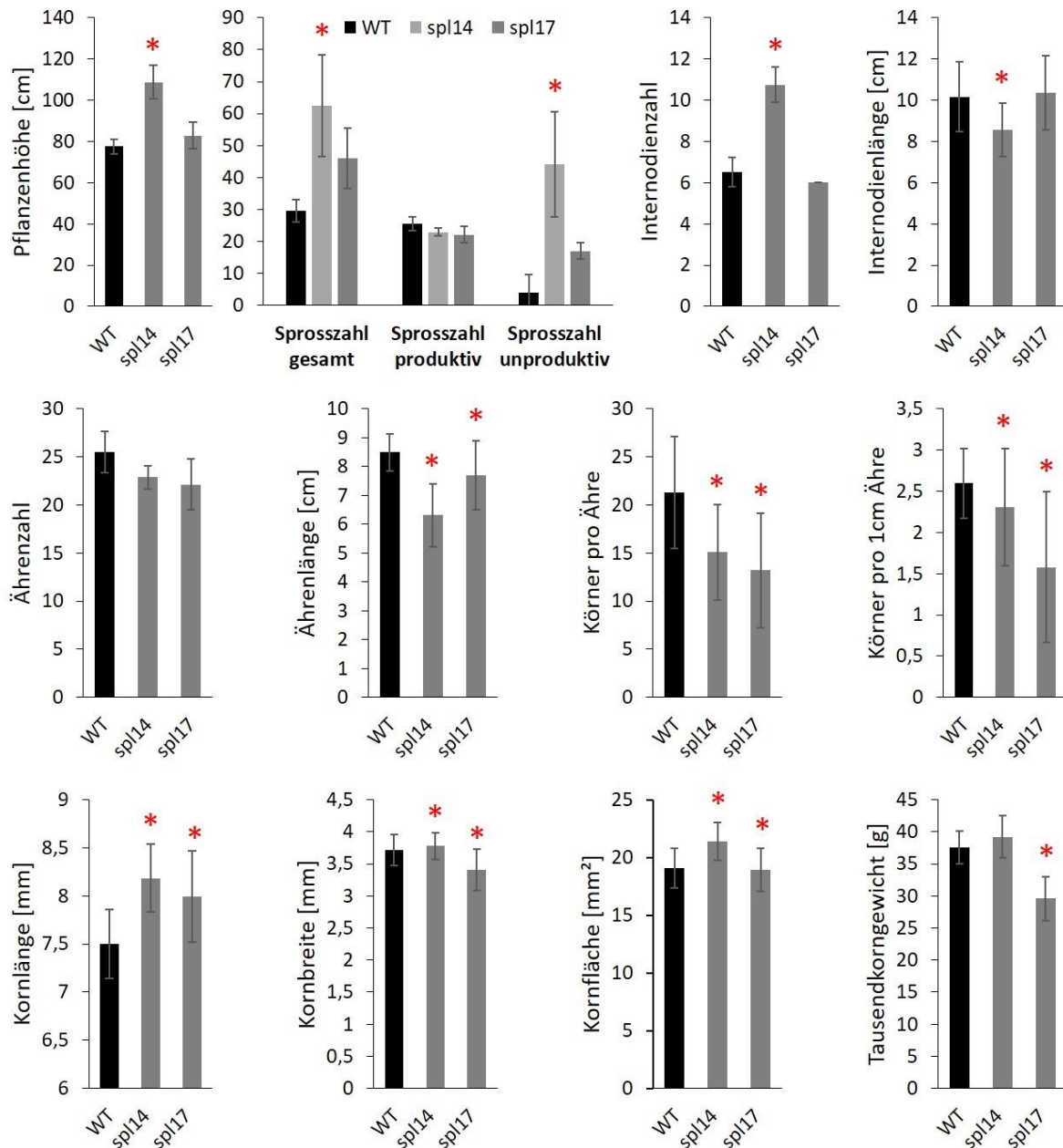


Abbildung 32 – Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in *Spl14* oder *Spl17* mutierten M3-Nachkommen; Ergebnisse der Linien nach mutiertem Gen zusammengefasst (WT: n=2, spl14: n=13, spl17: n=11); obere Reihe von links nach rechts: Pflanzenhöhe, Sprosszahl gesamt, produktiv und unproduktiv, Zahl und Länge der Internodien; mittlere Reihe von links nach rechts: Zahl und Länge der Ähren, Kornzahl pro Ähre und pro 1 cm Ähre; untere Reihe von links nach rechts: Länge, Breite und Fläche der Körner, Tausendkorngewicht; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung; rote Asterisken repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

4.4.10.1. *Spl14*-Mutationen

Die genauere Analyse der einzelnen Mutationsarten (T-Insertion, 2 bp-Deletion, 1 bp-Deletion) der *spl14*-Pflanzen zeigte, dass die verschiedenen Allele unterschiedliche Phänotypen verursachten (Tabelle 51; Abbildung 33). Alle Mutationen verändern die Pflanzenarchitektur, jedoch ist der Einfluss der 2 bp-Deletion (mit vergleichsweise kurzem *nonsense* C-Terminus) im Durchschnitt am geringsten, der der 1 bp-Deletion (mit langem *nonsense* C-Terminus) am Höchsten. Das Längenwachstum der Pflanzen ist in allen Mutanten von 77,5 cm im Wildtyp auf bis zu 128 cm in der Pflanze mit 1 bp-Deletion erhöht.

Tabelle 51 – Phänotypisierung der *spl14*-Mutanten der M3-Selbstungsnachkommen; kursiv: Standardabweichung

Parameter	WT	+1 bp (A)	Δ2 bp	Δ1 bp
Anzahl Pflanzen	2	5	7	1
Pflanzenhöhe in cm	77,5 ± 3,5	113,1 ± 6,2	103,3 ± 1,0	128,0 ± 0
Internodienzahl	7 ± 1	11 ± 1	11 ± 0	15 ± 0
Internodienlänge in cm	10,2 ± 1,7	8,5 ± 1,2	9,0 ± 0,5	6,3 ± 0,5
Sprosszahl	30 ± 3,5	60 ± 13,5	57 ± 13,9	84 ± 0
Anteil unproduktiver Sprosse in %	12,5 ± 17,7	83,2 ± 0,5	59,1 ± 11,7	71,4 ± 0
Ährenzahl	26 ± 2	12 ± 1	23 ± 1	24 ± 0
Ährenlänge in cm	8,5 ± 0,7	5,0 ± 0,6	6,7 ± 0,6	6,7 ± 0,9
Kornzahl pro Ähre	21,3 ± 5,8	10,2 ± 5,5	17,1 ± 3,7	10,7 ± 5,1
Kornzahl pro 1 cm Ähre	2,6 ± 0,4	1,5 ± 0,9	2,5 ± 0,6	1,9 ± 0,8
Kornlänge in mm	7,5 ± 0,4	7,9 ± 0,4	8,2 ± 0,3	8,4 ± 0,3
Kornbreite in mm	3,7 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,2
Kornfläche in mm ²	19,1 ± 1,7	19,8 ± 1,8	21,5 ± 1,5	21,9 ± 1,7
TKW in g	37,5 ± 2,6	36,0 ± 1,0	41,4 ± 2,2	36,6 ± 0

Die Pflanze mit 1 bp-Deletion zeigen die höchste Zahl an Internodien, wobei diese deutlich kürzer sind, sowie eine fast dreifach erhöhte Zahl an Sprossen, von denen mehr als 70 % keine Ähren ausbildeten. Die Ähren der 1 bp-Deletionspflanze waren etwas verkürzt und zeigten eine verringerte Kornzahl pro Ähre. Die Körner waren etwas länger, jedoch war das Tausendkorngewicht nicht verändert.

Die Pflanzen mit A-Insertion und 2 bp-Deletion zeigten ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Internodien, die jedoch nur etwas kürzer als Wildtypähren waren. Die Sprosszahl war gegenüber dem Wildtyp verdoppelt und die Ährenbildung unterschiedlich stark verringert. Die A-Insertion führte zu einer deutlich verringerten Anzahl von Ähren. Die Pflanzen mit 2 bp-Deletion bildeten ähnlich viele Ähren wie die Wildtypen. Die Kornzahl pro Ähre war in den Insertionspflanzen deutlich verringert, da die Ähren stärker verkürzt sind als in den 2 bp-Deletionsmutante. Bezogen auf 1 cm Ähre war jedoch kaum ein Unterschied zum Wildtyp gegeben. Die Körner der Pflanzen mit A-Insertion und 2 bp-Deletion waren etwas länger und die Deletion führte zur deutlichen Erhöhung des Tausendkorngewichtes.

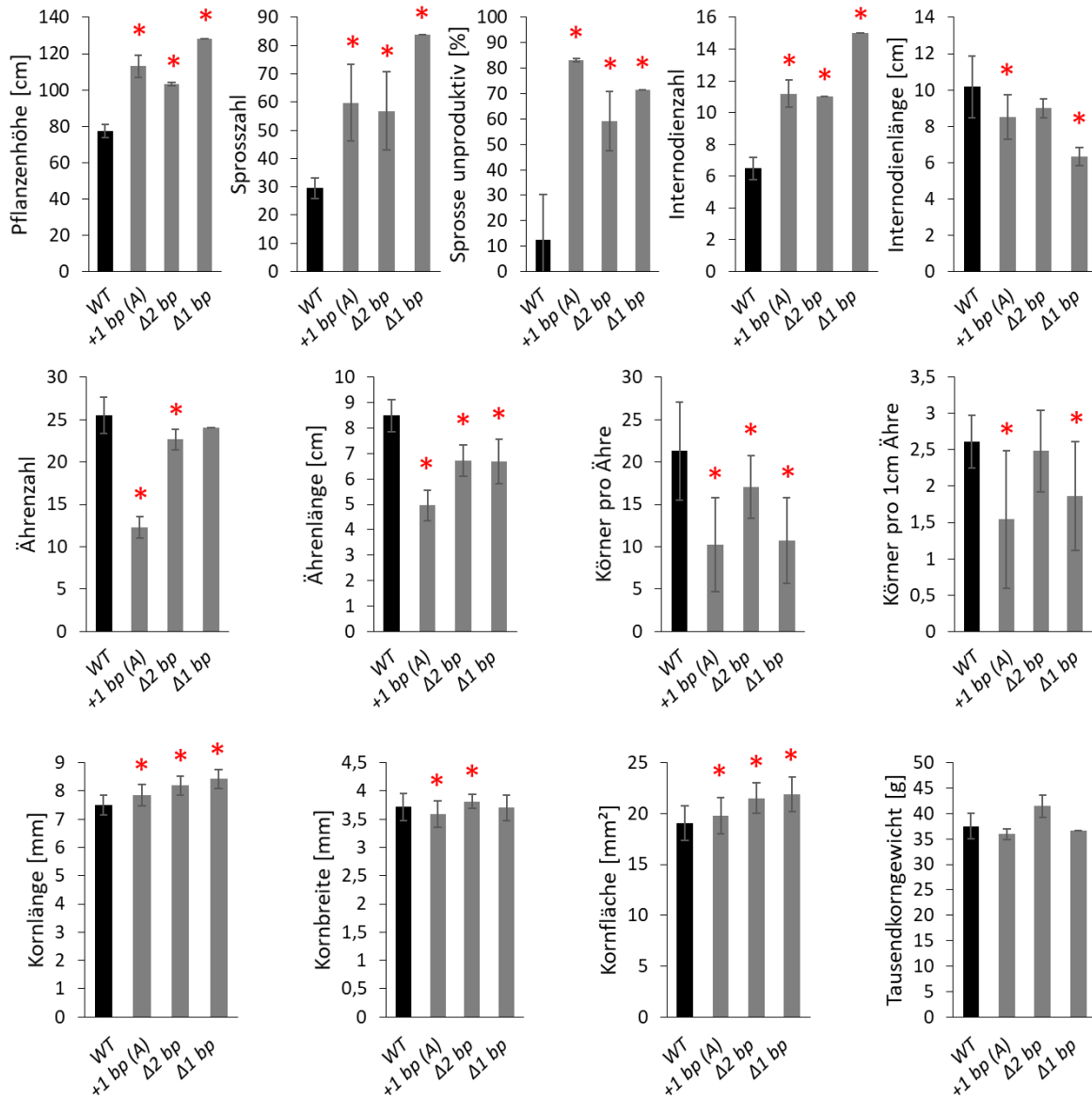


Abbildung 33 – Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in *Spl14* verschiedenen mutierten M3-Nachkommen; Ergebnisse nach mutiertem Allel zusammengefasst (WT: n=2, +1 bp (A): n=5, Δ2 bp: n=7, Δ1 bp: n=1); obere Reihe von links nach rechts: Pflanzenhöhe, Sprosszahl und Anteil unproduktiver Sprosse, Zahl und Länge der Internodien; mittlere Reihe von links nach rechts: Zahl und Länge der Ähren, Kornzahl pro Ähre und pro 1 cm Ähre; untere Reihe von links nach rechts: Länge, Breite und Fläche der Körner, Tausendkorngewicht; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

4.4.10.2. *Spl17*-Mutationen

Für die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Mutationsarten für *Spl17* (A-, C-, T-Insertion, 28 bp-Deletion) konnten für die Deletion und die C- bzw. T-Insertion nur Einzelpflanzen verwendet werden (Tabelle 52; Abbildung 34).

Tabelle 52 – Phänotypisierung der *spl17*-Mutanten der M3-Selbstungsnachkommen; kursiv: Standardabweichung

Parameter	WT	+1 bp (A)	+1 bp (C)	+1 bp (T)	Δ 28 bp
Anzahl Pflanzen	2	8	1	1	1
Pflanzenhöhe in cm	77,5 ± 3,5	83 ± 7,6	83 ± 0	84 ± 0	80 ± 0
Internodienzahl	7 ± 1	6 ± 0	5 ± 0	6 ± 0	7 ± 0
Internodienlänge in cm	10,2 ± 1,7	10,6 ± 2,3	11,1 ± 1,3	12,7 ± 2,3	10,1 ± 0,7
Sprosszahl	30 ± 3,5	42 ± 4,9	34 ± 0	52 ± 0	77 ± 0
Anteil unproduktiver Sprosse in %	12,5 ± 17,7	40,8 ± 6,8	44,1 ± 0	34,6 ± 0	58,4 ± 0
Ährenzahl	26 ± 2	21 ± 1	19 ± 0	34 ± 0	32 ± 0
Ährenlänge in cm	8,5 ± 0,6	8,0 ± 1,2	7,5 ± 0,6	7,1 ± 0,9	7,8 ± 0,6
Kornzahl pro Ähre	21,3 ± 5,8	13,6 ± 6,0	16,1 ± 4,0	13,3 ± 4,0	7,0 ± 3,6
Kornzahl pro 1 cm Ähre	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,8	2,2 ± 0,8	1,6 ± 0,9	0,6 ± 0,6
Kornlänge in mm	7,5 ± 0,4	8,0 ± 0,5	7,8 ± 0,3	7,9 ± 0,5	8,0 ± 0,5
Kornbreite in mm	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3
Kornfläche in mm ²	19,1 ± 1,7	19,3 ± 1,8	18,3 ± 1,5	17,8 ± 1,5	17,9 ± 1,6
TKW in g	37,5 ± 2,6	30,5 ± 3,2	31,4 ± 0	25,4 ± 0	26,0 ± 0

Alle Mutationsarten führen zu einem leicht erhöhten Längenwachstum. Die Internodien sind ähnlich wie im Wildtyp, jedoch etwas verlängert. Die Sprosszahl variiert in den verschiedenen Mutanten vom WT-Niveau (C-Insertion) bis zur zweieinhalbfachen Anzahl (28 bp-Deletion). Die Ähren sind in allen *spl17*-Mutanten leicht verkürzt und haben deutlich weniger Körner pro Ähre, wobei der Effekt der 28 bp-Deletion am Stärksten ist. Die Körner sind länger und dünner und das Tausendkorngewicht ist zum Teil deutlich verringert (T-Insertion und 28 bp-Deletion).

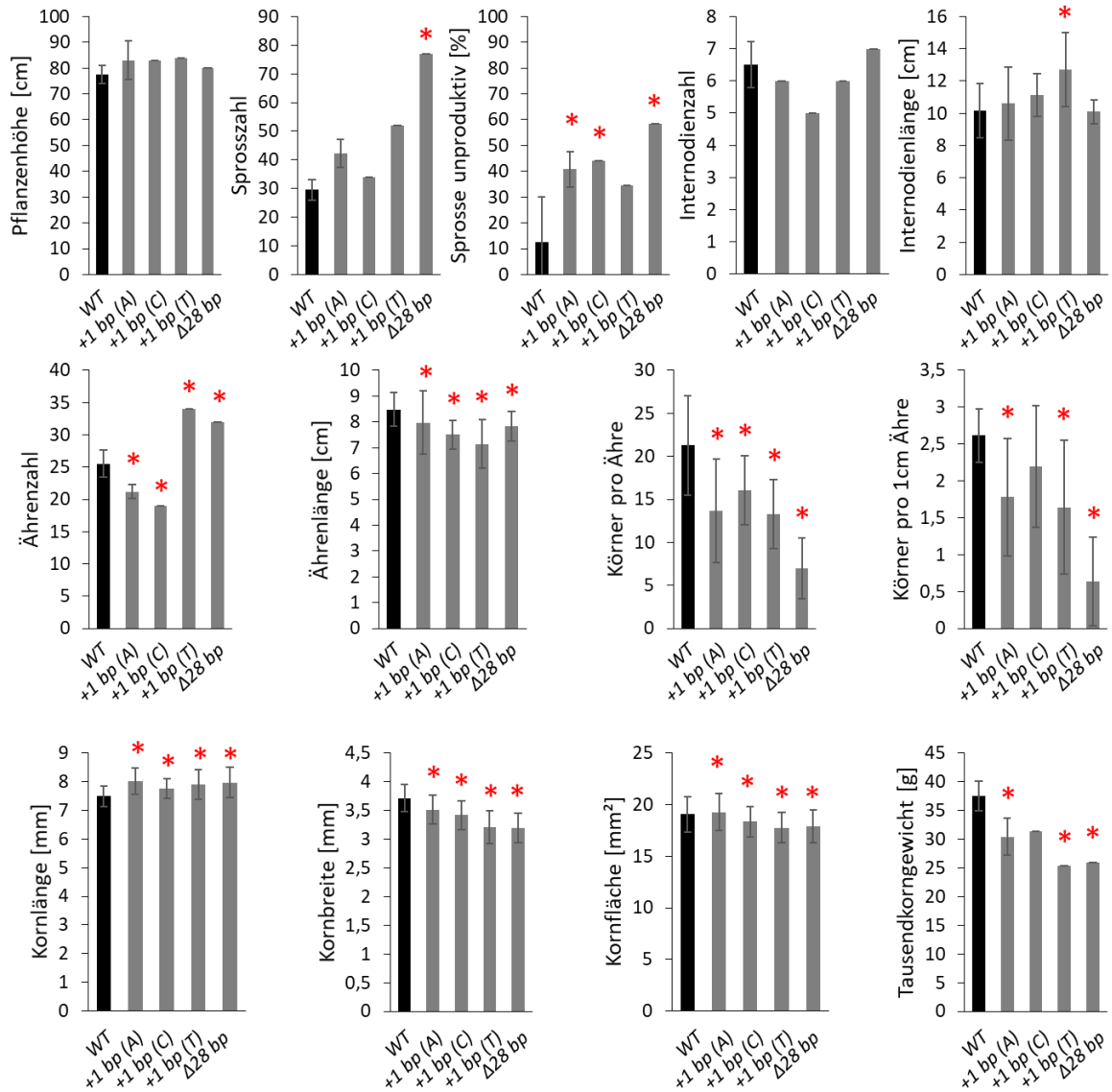


Abbildung 34 – Bestimmung von pflanzenarchitekturbezogenen und ertragsrelevanten Parametern von in *Spl17* verschiedenen mutierten M3-Nachkommen; Ergebnisse nach mutiertem Allel zusammengefasst (WT: n=2, +1 bp (A): n=8, +1 bp (C): n=1, +1 bp (T): n=1, Δ28 bp: n=1); obere Reihe von links nach rechts: Pflanzenhöhe, Sprosszahl und Anteil unproduktiver Sprosse, Zahl und Länge der Internodien; mittlere Reihe von links nach rechts: Zahl und Länge der Ähren, Kornzahl pro Ähre und pro 1 cm Ähre; untere Reihe von links nach rechts: Länge, Breite und Fläche der Körner, Tausendkorngewicht; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp

4.4.11. Gezielte Veränderung der *miR156*-Bindestelle durch Baseneditierung

4.4.11.1. Cytidin-Deaminase APOBEC1 in Gerstenpflanzen

Um eine Veränderung der *miRNA156*-Bindestelle gezielter ohne Veränderung des translationalen Leserahmens zu erzeugen wurde die Cytidin-Deaminase^(*) APOBEC1 mit einer Nickase^(*)-Variante von Cas9 (nCAs9) mit D10A-Mutation kombiniert (pSH183, Abbildung A4g, A7d) und die in 4.4.2.1. erwähnten gRNAs 3-1 und 3-3 verwendet, um Cytidin-zu-Thymin-Baseneditierungen in der *miR156*-Zielregion zu induzieren (Abbildung 35). Für beide gRNAs wurden einzelne Vektorkonstrukte erstellt.



Abbildung 35 – Cytidin-Deaminase-Experiment – Schematische Darstellung der möglichen Basenaustauschpositionen (rote Dreiecke) der Zielmotive 3-1 und 3-3 (grün) in der *miR156*-Bindestelle (roter Hintergrund) in *Spl14* und *Spl17*

Die Transformation der beiden Binärkonstrukte pCH41 (gRNA3-1) und pCH42 (gRNA3-3) erfolgte wie in 3.11.4. beschrieben unabhängig voneinander mittels Agrobakterien in unreife Gerstenembryonen und eine Vielzahl von Regeneraten mit integrierter T-DNA wurden hergestellt. Jedoch konnte in keiner dieser Pflanzen ein Basenaustausch detektiert werden (Tabelle 53, Tabelle A45).

Tabelle 53 – Stabile Gerstentransformation mit *Spl14/17*-spezifischen gRNA/nCas9/Cytidin-Deaminase-Binärkonstrukten

Plasmid	gRNA	Embryonen	Regenerate	Pflanzen mit T-DNA	Pflanzen mit Basenaustausch in <i>Spl14</i> oder <i>Spl17</i>
pCH41	gRNA3-1	360	51	50	0
pCH42	gRNA3-3	360	60	59	0

4.4.11.2. Adenosin-Deaminase ecTadA in Gerstenprotoplasten

Eine weitere Variante der Baseneditierung ist die Umwandlung der Nukleinbase Adenin in Guanin mittels der tRNA Adenosin-Deaminase^(*) TadA aus *Escherichia coli* (ecTadA; Li et al., 2018a). Zur Modifikation der *miR156* wurde ein Vektorkonstrukt erstellt, bei dem ecTadA mit einer Nickase-Variante von Cas9 (nCas9) mit D10A-Mutation kombiniert wurde (Abbildungen A4h, A8c, A9). Für dieses Experiment wurde die gRNA3-2o1 unter Kontrolle des *TaU6*-Promotors verwendet, wobei als Transkriptionsstart ein zusätzliches G an das 5'-Ende angefügt wurde.



Abbildung 36 – Adenosin-Deaminase-Experiment – Schematische Darstellung der möglichen Basenaustauschpositionen (rote Dreiecke) im Zielmotiv 3-2 (grün) in der *miR156*-Bindestelle (roter Hintergrund) in *Spl14* und *Spl17*

Dieses Konstrukt wurde in Protoplasten^(*) der Gerstensorte Golden Promise in drei technischen Replikaten transfektiert (siehe 3.11.1.) und anschließend die Zielregionen von *SPL14* und *SPL17* über *Amplikon Deep Sequencing* auf Baseneditierungen untersucht. Dabei konnten weder in der Zielregion von *Spl14* noch in *Spl17* modifizierte *Reads* im Zielmotiv 3-2 (Abbildung 36) gefunden werden.

5. Diskussion

5.1. Methodische Aspekte

5.1.1. Auswahl optimaler Zielmotive für die gezielte Mutagenese von Getreide

Am Anfang jeder Studie mit RNA-vermittelten Endonukleasen^(*) steht die Auswahl möglicher Zielmotive^(*). Diese sollten einerseits abhängig von der zu verwendenden Endonuklease ausgewählt werden und andererseits dem Ziel des Experimentes entsprechen. Eine Veränderung im Promotorbereich könnte genutzt werden, um die Expression des Kandidatengens zu beeinflussen. Dies wurde unter anderem für die Entwicklung einer Resistenz gegen den Verursacher des Zitrusfruchtkrebses durch eine Veränderung des *CsLOB1*-Promotors verwendet (Peng et al., 2017) oder um die Expression des Phytase-Gens in Gerste (*PapHy_a*) in Abhängig der Anwesenheit verschiedener cis-regulatorischer Elemente zu untersuchen (Holme et al., 2017). Der Bereich der kodierenden Sequenz bietet sich dagegen an, um die Genfunktion komplett auszuschalten, wie bereits in mehreren Studien gezeigt worden ist (Lawrenson et al., 2015, Holme et al., 2017, Gerasimova et al., 2020).

Zur Auswahl der Zielmotive wurden verschiedene Online-Tools entwickelt, jedoch zumeist auf Grundlage menschlicher oder tierischer Zellen (Doench et al., 2016; Wong et al., 2015; Haeussler et al., 2016; Stemmer et al., 2015; Park et al., 2015; Moreno-Mateos et al., 2015; Hiranniramol et al., 2020), eher selten direkt für Pflanzen (Liu et al., 2017b; Brazelton et al., 2016; Beier et al., 2020). Naim und Kollegen konnten zeigen, dass die vorhandenen gRNA-Aktivitäts-Vorhersage-Tools *CRISPRko* (Doench et al., 2016), *WU-CRISPR* (Wong et al., 2015), *CRISPOR* (Haeussler et al., 2016; Doench et al., 2016; Moreno-Mateos et al., 2015), *Benchling* (Doench et al., 2016), *CCtop* (Stemmer et al., 2015), *sgRNA scorer 2.0* (Chari et al., 2017), *CRISPR-P* (Liu et al., 2017b) und *Cas-Designer* (Park et al., 2015) keine signifikante Korrelation zwischen den vorhergesagten und beobachteten Effizienzen der gRNAs gegenüber der direkten Editierung aufwiesen. Hierfür wurden verschiedene Motive in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Musa acuminata* und *Oryza sativa* untersucht (Naim et al., 2020). Das Vorhersagetool *krispr* der *Kmasker plants* Plattform von Beier und Kollegen (Beier et al., 2020) wurde ebenso wie *CRISPR-P* (Liu et al., 2017b) alleine auf Grundlage pflanzlicher Zielmotive und gRNA-Aktivitäten erstellt, jedoch ist die Datengrundlage für die Entwicklung der Algorithmen deutlich kleiner als bei Algorithmen menschlicher oder tierischer Zielmotive. Das *krispr*-Tool zeigte dabei eine größere Übereinstimmung der berechneten Effizienzen mit den in Pflanzen ermittelten Mutationsfrequenzen als *CRISPR-P* und *WU-CRISPR* (Beier et al., 2020). Für die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Zielmotive wurden die Algorithmen von Doench et al., 2014 und 2016 (*DESKGEN*, jetzt *Benchling*) sowie von Wong et al., 2015 (*WU-CRISPR*) verwendet und mögliche Kandidaten kritisch auf ihre Sekundärstruktur mittels des RNA-Strukturvorhersagetools *RNAfold*

(Gruber et al., 2008) unter Verwendung des *Andronescu*-Modells (Andronescu et al., 2007) untersucht. Die vorhergesagten Aktivitätswerte von *DESKGEN* und *WU-CRISPR* entsprachen vereinzelt in etwa der Anzahl der Mutanten pro Regenerate, es erfolgte jedoch in keinem Fall eine richtige Vorhersage der Effizienz (Abbildung 37b).

In den vergangenen 10 Jahren wurden verschiedene Kenntnisse über die Einflüsse der Besetzung von Positionen des Zielmotives mit den vier Nukleobasen der DNA auf die Effizienz der gezielten Mutagenese erlangt (Abbildung 37a). So beschrieben Doench und Kollegen einen negativen Einfluss von Cytosin und Thymin an Position 1 in 5'-Richtung vor dem so genannten PAM auf die gRNA-Effizienz bei Verwendung einer Cas9-Endonuklease. Ist diese Position mit einem Guanin besetzt, so erhöht sich die Effizienz der gRNA. Unbedingt sollte in den 4 Positionen vor dem PAM ein TT und auf der Position nach dem PAM ein Guanin vermieden werden (Doench et al., 2014). Das Problem mit TT kann jedoch durch eine modifizierte Version des Zielmotiv-unspezifischen 3'-Teils der gRNA (*gRNA scaffold*) umgangen werden (Graf et al., 2019). Xu und Kollegen setzten sich sehr stark mit der gesamten Zusammensetzung des Zielmotivs auseinander indem sie viele gRNAs bezüglich ihrerer Mutagenese-Effizienz im verwendeten experimentellen System gruppierten und hohe Effizienzen mit der Besetzung der einzelnen Positionen assoziierten. Dabei kam heraus, dass Guanin vor allem in den ersten beiden Positionen vor dem PAM gelegen sein sollte. Auch an weiteren Positionen waren einige Nukleotide mit hohen Effizienzen assoziiert, z.B. ein Cytosin an der Position 3 vor dem PAM und der ersten Position nach dem PAM. Dagegen korrelierte ein Thymin in den 4 Positionen vor dem PAM oder an der N-Position des NGG-PAMs mit geringer Effizienz. Gut funktionierende Zielmotive hatten in dieser Studie in den Positionen 5-12 vor dem PAM bevorzugt ein Adenin sowie in den Positionen 14-17 vor dem PAM ein Guanin (Xu et al., 2015). Hiranniramol und Kollegen zeigten zudem, dass ein Cytosin an Position 4 vor dem PAM sowie ein Guanin an der N-Position des PAMs in effizienten gRNAs vermehrt vorkamen (Hiranniramol et al., 2020). Der GC-Gehalt der gRNA sollte zwischen 30 und 80 % sein (Hiranniramol et al., 2020), jedoch in der so genannten *Seed*-Region, also den 6 Positionen vor dem PAM, über 50 % liegen (Ren et al., 2014). Die drei Positionen vor dem PAM sollten nicht mit CTT besetzt sein, da dies sonst an die Positionen 51-53 des Zielmotiv-unspezifischen Teils der gRNA anbinden und durch eine verlängerte Struktur des Stem-Loops die Sekundärstruktur der gRNA negativ beeinflussen würden (Wong et al., 2015). Ebenso sollte ein GCC in diesem Bereich vermieden werden (Graf et al., 2019). Eine Aufeinanderfolge von 4 oder mehr Thymin-Nukleotiden kann zur Termination der Transkription^(*) führen (Arimbasseri & Maraia, 2015), wobei der Zielmotiv-unspezifische Teil der gRNA ein 4T-Motiv am 5'-Ende enthält.

Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte eine nähere Analyse der in dieser Arbeit ausgewählten Zielmotive auf potenziell positive und negative Einflüsse verschiedener Nukleotide (Abbildung 37b).

Für die *Spl14/17*-Ziel motive in Gerste sind dabei Zusammenhänge zwischen Mutationsrate und der Anwesenheit von bestimmten Nukleotiden ersichtlich. So war *Spl* ZM2-4 unter Berücksichtigung der o.g. Kriterien von vornherein so ausgewählt worden, dass es keine Nukleotide mit vorhersagbar negativem Einfluss und in der *Seed*-Region mit CCGG an den Positionen 4 bis 1 vor dem PAM eine theoretisch optimale Zusammensetzung aufwies. Außerdem zeigte die *Seed*-Region einen GC-Gehalt von 100%. Tatsächlich wurden 96 % aller Regenerate in diesem Ziel motiv mutiert. Im Vergleich dazu haben *Spl* ZM2-1 und *Spl* ZM3-2 jeweils ein Cytosin in der Position vor dem PAM sowie ZM 3-2 ein Thymin an der N-Position des PAMs, welche gehäuft in weniger effizienten gRNAs vorkommen (Xu et al., 2015). Beide Ziel motive wurden mit deutlich geringerer Effizienz mutiert als ZM2-4. Damit gehen die in dieser Doktorarbeit analysierten Mutagenese-Effizienzen in großen Teilen mit den in der Literatur beschriebenen Kriterien der Nukleotid-Zusammensetzung der Ziel motive, vor allem in der *Seed*-Region, einher. Für den Beweis einer Kausalität ist es jedoch nötig, eine Vielzahl von Experimenten mit verschiedenen gRNAs durchzuführen. Dennoch sollten die o.g. Kriterien zukünftig bei der Auswahl von Ziel motiven berücksichtigt werden. Hervorzuheben ist jedoch, dass die meisten Daten von Zellkulturen tierischer (Maus) oder humaner Zellen gewonnen wurden und die direkte Übertragung aller Kriterien auf pflanzliche Systeme noch nicht erfolgt ist.

a

Position	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	N	G	G	+1	Referenz	Experimentelles System	Hinweise	
Positiver Einfluss	G	G																								Ma et al., 2014, Shan et al., 2014	u.a. Protoplasten (Weizen)	für U6-Promotoren G oder GG
			G	G	G	G																				Xu et al., 2015	Zellkultur (Mensch)	Vorhandensein von Guanin
							A	A	A	A	A	A	A	A												Xu et al., 2015	Zellkultur (Mensch)	Vorhandensein von Adenin
																	C									Hiranniramol et al., 2020	Zellkultur (Mensch)	
																										Xu et al., 2015	Zellkultur (Mensch)	
																										Xu et al., 2015	Zellkultur (Mensch)	
																										Doench et al., 2014, Xu et al., 2015	Zellkultur (Maus, Mensch)	
																										Hiranniramol et al., 2020	Zellkultur (Mensch)	
																										Doench et al., 2014, Xu et al., 2015	Zellkultur (Maus, Mensch)	
																										Ren et al., 2014	Drosophila Embryos	<i>Seed</i> -Region, GC ≥ 50 %
Negativer Einfluss																										Doench et al., 2014, Xu et al., 2015	Zellkultur (Maus, Mensch)	
																										Doench et al., 2014, Xu et al., 2015	Zellkultur (Maus, Mensch)	
																										Graf et al., 2019	Zellkultur (Maus)	TT-Motiv 4bp vor PAM
																										Graf et al., 2019	Zellkultur (Maus)	
																										Wong et al., 2015	Zellkultur (Maus, Mensch)	
																										Xu et al., 2015	Zellkultur (Mensch)	
																										Doench et al., 2014	Zellkultur (Maus, Mensch)	

b

Ziel motiv	Nukleotide an Positionen 1-20, NGG und +1																								Desk-gen	WU-CRISPR	Mutanten pro Anzahl der Regenerate	GC-Gehalt der seed-Region	Hinweise	
Bh ZM4	G	C	G	A	C	C	C	G	A	C	C	A	C	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	G	C	62	100	5 % (6 von 126)	50 %	Weizen mit geringerer Effizienz
Bh ZM5	G	G	G	C	G	G	G	T	A	G	T	T	G	T	T	G	T	A	G	G	C	G	G	C	64	96	3 % (4 von 126)	50 %	Weizen mit geringerer Effizienz	
Spl ZM2-1	T	G	G	C	G	G	G	C	C	A	C	A	A	C	G	A	G	C	G	C	C	G	A	G	A	57	98	50 % (14 von 28)	83 %	
Spl ZM2-4	C	G	G	G	C	C	A	C	A	A	C	G	A	G	C	G	C	C	G	G	A	G	A	G	A	55	96	96 % (23 von 24)	100 %	
Spl ZM3-1	G	A	G	A	G	C	A	C	A	G	C	T	G	G	A	G	T	C	G	C	G	C	G	C	G	51	100	0 % (0 von 51)	67 %	Baseneditierung
Spl ZM3-2	C	A	G	A	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	C	A	C	A	G	C	T	G	G	A	G	46	98	13 % (12 von 90)	67 %	
Spl ZM3-3	T	C	T	T	C	T	G	T	C	A	A	C	T	C	A	G	C	C	A	T	G	G	A	G	60	63	0 % (0 von 60)	50 %	Baseneditierung	

Abbildung 37 – Kriterien für gRNA-Design; (a) Nukleotide mit positivem oder negativem Einfluss auf gRNA-Effizienz an den Positionen 1-20 vor der PAM, NGG sowie 1 Position nach der PAM; (b) Anwendung der Kriterien auf verwendete gRNAs mit vorhergesagten Aktivitätswerten von DESKGEN und WU-CRISPR sowie der ermittelten Anzahl von Mutanten pro Regeneraten und dem GC-Gehalt der *Seed*-Region, gelb: Positionen im Ziel motiv, grün: Nukleotide mit positivem Einfluss auf gRNA-Effizienz, rot: Nukleotide mit negativem Einfluss auf gRNA-Effizienz

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung der Effizienz ist die simultane Adressierung von nah beieinanderliegenden Ziel motiven, vor allem, wenn ein Motiv eine suboptimale Sequenz aufweist. Joberty und Kollegen (2020) beschrieben, dass sich Ribonukleoproteinkomplexe von zwei gRNAs, welche 40-300 bp voneinander entfernt agieren, gegenseitig während der Induktion von

Doppelstrangbrüchen unterstützen, höchstwahrscheinlich durch die Helicase-Aktivität von Cas9. Ein effizienter gRNA/Cas9-Komplex könnte dafür sorgen, dass ein suboptimaler zweiter gRNA/Cas9-Komplex verbesserte Bedingungen für die Prozessierung des Zielmotivs vorfindet (Joberty et al., 2020). Durch dieses Prinzip sollten Mutationen mit höherer Wahrscheinlichkeit erreicht werden. Liu und Kollegen (2019c) zeigten für beide in ihrer Studie verwendeten gRNAs eine deutlich erhöhte Effizienz und die Entstehung großer Deletionen^(*) zwischen den Schnittstellen. Chen und Kollegen (2017) nutzten flankierende Ziel motive, an welche ein inaktiviertes SpdCas9-Enzym anband, um den DNA-Doppelstrang lokal aufzuweiten und die Bindung weniger effizienter Cas9-Varianten von *Francisella novicida* (FnCas9) und *Campylobacter jejuni* (CjCas9) zu ermöglichen (Chen et al., 2017). Die in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Experimente im Weizen zeigten, dass Mutationen im Zielmotiv 4 bei alleiniger Anwesenheit des Transgens für gRNA4 erzeugt wurden, jedoch nicht im Zielmotiv 5, wenn ausschließlich das gRNA5-Transgen nachweisbar war. In Pflanzen, die die Expressionseinheiten beider gRNAs trugen, wurden Mutationen in beiden Zielmotiven 4 und 5 gefunden. Damit konnten die Erkenntnisse von Joberty und Kollegen anhand eines anderen biologischen Systems bestätigt werden.

5.1.2. Auswahl geeigneter Promotoren für gRNAs und *cas9*

Für die Transkription der gRNAs wurden bereits mehrere Promotorsysteme verwendet, jedoch in Gerste und Weizen bisher fast ausschließlich die Promotoren der *U3*- und *U6*-Gene aus Weizen, Reis und Gerste. Shan und Kollegen (2013) veröffentlichten erstmals auf Protoplastenebene^(*) im Weizen *MLO*-Gen durch Cas9 induzierte Mutationen und verwendeten dabei einen Weizen *U6*-Promotor (*TaU6*). Dieser *TaU6*-Promotor wurde in zahlreichen Studien später verwendet, sowohl in Weizen (z.B. Singh et al., 2018; Okada et al., 2019; Cui et al., 2019) als auch in Gerste (z.B. Gasparis et al., 2018; Yang et al., 2020; Lee et al., 2021). Zhang und Kollegen (2019a) führten zusätzlich in Weizenprotoplasten eine Analyse von 4 verschiedenen *TaU6*-Promotoren durch, welche als *TaU6.1*, *TaU6.2*, *TaU6.3* und *TaU6.5* bezeichnet wurden. Das Prinzip des Experimentes bestand aus einer Restitution von GFP, welches durch die Einfügung einer Base nicht mehr im Leserahmen war. Durch eine gezielte Mutagenese wurde der Leserahmen wiederhergestellt und das GFP-Signal gemessen. Dabei zeigten sich die höchsten Mutagenese-Effizienzen mit den Promotor-Varianten *TaU6.1* und vor allem *TaU6.3* wobei letzterer eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber den anderen Varianten aufwies. In dieser Doktorarbeit wurde die Variante *TaU6.1* von Shan und Kollegen (2013) erfolgreich in Weizen verwendet um mit gRNA/*cas9*-Konstrukten Mutationen in *Branched head* (*Bh*) zu induzieren.

Als Hauptalternative zum *TaU6*-Promotor wurde, vor allem in Gerste, der Reis *U3*-Promotor (*OsU3*) verwendet (z.B. Lawrenson et al., 2015; Li et al., 2019; Gerasimova et al., 2020;). Camerlengo und Kollegen (2019) nutzten diesen Promotor zur Mutation der Weizengene *Cm3* und *Cm6*. Auch für die in

dieser Doktorarbeit beschriebenen Modifikationen von *Squamosa-promotor binding protein-like 14* und *17 (Spl14/17)* in Gerste wurde der *OsU3*-Promotor von Shan und Kollegen (2013) erfolgreich angewandt (Thiel et al., 2021).

Neben diesen Hauptpromotoren wurden auch weitere *U*-Promotoren für die Cas9-vermittelte Mutagenese in Weizen und Gerste verwendet. Der *OsU6*-Promotor wurde durch Abe und Kollegen (2019) in Weizen angewandt, während Kapusi und Kollegen (2017) sowie Kim und Kollegen (2020) ihn in Gerste nutzten. Auch für einen *TaU3*-Promotor gab es Verwendung in Weizen (Wang et al., 2018a; Howells et al., 2018). Kumar und Kollegen (2018) konnten außerdem unter Verwendung des Gersten *U3*-Promotors (*HvU3*) Mutationen in *Morc1* induzieren, wobei die Expression der gRNA unter dem *HvU3*-Promotor höher war als mit *OsU3*.

Li und Kollegen (2020b) führten in Protoplasten vergleichende Experimente mit *TaU3*, *TaU6*, *OsU3* und *OsU6*-Promotoren in Weizen durch und kamen zu dem Schluss, dass der verwendete *TaU3*-Promotor am besten für die Mutagenese in Weizen geeignet war (Effizienz 9,1-11,3%) als die anderen Promotoren (Effizienz 0-4,6%). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Liu und Kollegen (2020) in Weizen, welche die Effizienz der Promotoren *TaU3*, *TaU6* und *OsU6a* nach Agrobakterien-vermittelter Transformation^(*) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei Verwendung eines *TaU3*-Promotors eine Mutation in 61 % der regenerierten Pflanzen entstand, was im Vergleich zu *TaU6* mit 36 % und *OsU6a* mit 22 % mutierten Regeneraten deutlich erhöht ist. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden in der jeweiligen Spezies jeweils entweder der *TaU6*-Promotor (Weizen) oder der *OsU3*-Promotor (Gerste) eingesetzt, wobei die Mutagenese-Effizienzen stark schwanken. In Weizen waren 0 bis 5,6 % der Regenerate mutiert, während in Gerste zwischen 10 und 96 % der analysierten, regenerierten Pflanzen Mutationen aufwiesen. Ein direkter Vergleich ist jedoch aufgrund der verschiedenen Zielmotive nicht möglich.

In mehreren Studien kam alternativ oder zusätzlich zu den *U*-Promotoren ein tRNA-Prozessierungssystem zum Einsatz um mehrere gRNAs in einer Expressionseinheit zu exprimieren (Gasparis et al., 2018; Wang et al., 2018a; Raffan et al., 2021). Raffan und Kollegen (2021) nutzten dabei das von Xie und Kollegen (2015) entwickelte System der tRNA-Prozessierung.

Upadhyay und Kollegen (2013), welche zu den ersten Wissenschaftlern gehören, die Cas9-induzierte Mutationen in Weizen generiert haben, verwendeten für ihre Arbeiten den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus. Dieser wurde ebenfalls von Gao und Zhao (2014) für die Expression von gRNAs verwendet, jedoch im Zusammenhang mit einem sogenannten *Hammerhead (HH)-Hepatitis Delta Virus (HDV) Dual Ribozyme Model*, wobei sich selbst schneidende Ribozym-Sequenzen die gRNA flankieren und diese schließlich ohne Überhänge oder andere mRNA-Prozessierungen gebildet wird.

Dieses Prinzip wurde erfolgreich für die Mutagenese des *Arabidopsis*-Gens *ABP1* verwendet (Gao et al., 2016). Ein weiteres Expressionssystem für gRNAs unter einem Polymerase^(*) II-Promotor stellt das zunächst in humanen Zellen entwickelte, aus Bakterien ursprünglich stammende CRISPR Typ III Ribonuklease Csy4-System dar (Tsai et al., 2014). Dieses wurde erstmals erfolgreich in Protoplasten von Weizen und Gerste unter Kontrolle des *UBIQUITIN 1*-Promotors der Rutenhirse *Panicum virgatum* bzw. eines Promotors des *Cestrum yellow leaf curling virus* (CmYLCV) angewandt (Cermák et al., 2017). Es zeigte sich, dass gRNAs am Ende der Csy4-Expressionseinheit weniger aktiv waren als diejenigen die sich davor befanden. Dies führte dazu, dass in einigen Fällen keine Verbesserung gegenüber gRNAs bestand, die unter einem individuellen U6-Promotor exprimiert wurden. Generell kann jedoch ein positiver Einfluss auf die Expression einzelner gRNAs beobachtet werden. Das Csy4-System wurde danach u.a. in Tomaten (Li et al., 2018b), Raps (Wang et al., 2021) und Orange (Huang et al., 2020) eingesetzt. Die Verwendung multipler Ziel motive in einem Ansatz stellt eine Spezialanwendung dar, welche in der Resistenzforschung bedeutsam ist, weniger jedoch für die funktionelle Analyse einzelner Gene.

Für die Expression der Cas9-Endonuklease wurde in den meisten Studien bei Weizen und Gerste, so auch in dieser Doktorarbeit, der *POLYUBIQUITIN 1 (UBI1)*-Promotor aus Mais zusammen mit der 5'-UTR inklusive dem 1. Intron des gleichen Gens verwendet. Die Integration des ersten Introns erhöht die Expression der nachfolgenden Gene (Vain et al., 1996). Hensel und Kollegen (2011) beschrieben ebenfalls, dass die Kombination der *UBI1*- und *ACTIN 1 (ACT1)*-Promotoren von Mais und Reis generell mit dem 1. Intron der 5'-UTR verwendet werden um eine starke Genexpression zu erhalten. Der *ACT1*-Promotor aus Reis wurde ebenfalls für die *cas9*-Expression genutzt und führte zu einer erfolgreichen Modifikation des *Pds*-Gens im Weizen und der Gerste (Howells et al., 2018). Upadhyay und Kollegen (2013) verwendeten für ihre Arbeiten in Weizenzell suspensionen den *35S*-Promotor, um *cas9* zu exprimieren. Vor kurzem wurde auch der *UBI1*-Promotor aus Reis zur Transkription von *cas9* bei Gerste verwendet (Lee et al., 2021).

5.1.3. Vergleichende Betrachtung von Validierungsmethoden

Die Auswahl guter Ziel motive ist die Grundlage dafür, Fehlversuche bei der stabilen Transformation und Regeneration von Weizen und Gerste zu vermeiden. Daher bietet es sich an, sich nicht nur auf die *in silico*^(*) ermittelten Aktivitätswerte zu verlassen, sondern die Aktivität selbst zu untersuchen. Hierfür wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Verfahren entwickelt. Einige dieser Validierungsmethoden fanden auch in dieser vorgelegten Doktorarbeit Anwendung.

In Gerste und Tabak wurde von Budhagatapalli und Kollegen (2016) ein Testsystem entwickelt, welches eine semi-quantitative Aussage darüber erlaubt, wie hoch die Aktivität einer gRNA ist. In diesem

System werden der gRNA/cas9-Vektor^(*) und ein Zielvektor, welcher neben dem Zielmotiv ein aus dem Leserahmen verschobenes *YFP*-Reporter-gen enthält, über ballistischen^(*) Transfer in die Epidermiszellen von Gerstenblättern eingebracht. Cas9 und die gRNA induzieren zusammen im Zielmotiv des Zielvektors Mutationen, von denen einige zur Wiederherstellung des Leserahmens und damit zur Restitution des *YFP*-Reportergens führen, sodass dessen Signal detektiert werden kann. Dabei liegen beide Komponenten in einer sehr hohen Anzahl an Kopien vor, weshalb es zeitweilig zu einer sehr hohen Expression von *cas9* und gRNA kommt. Wie bereits beschrieben, führen nicht alle Mutationen zu einem detektierbaren Signal, weshalb dieser Test keine vollständige Aussage gibt, wie hoch die Aktivität einer gRNA ist, jedoch bekommt man einen grundsätzlichen Eindruck, ob das ausgewählte Zielmotiv verwendet werden kann. Dieses Testsystem wurde bereits in verschiedenen Studien bei Gerste (Holubová et al., 2018; Gerasimova et al., 2020; Thiel et al., 2021), Weizen (Budhagatapalli et al., 2020) und Triticale (Michalski et al., 2021) angewandt.

Deutlich genauer sind die Erkenntnisse, die über Protoplastenvorversuche gewonnen werden können. Die Transfektion^(*) von Protoplasten mit einem gRNA/cas9-Konstrukt führt zu einer vorübergehend sehr hohen Expression und Akkumulation von gRNA und Cas9, deren Komplex unabhängige Mutationen in jedem einzelnen transfizierten Protoplasten induzieren kann. Diese Mutationen können qualitativ und semi-quantitativ über einen Restriktionsverdau^(*) des PCR-Amplifikates nachgewiesen werden (PCR/RE) oder quantitativ über dessen Tiefensequenzierung. Dies ergibt einerseits Aufschluss darüber, mit welcher Effizienz der Komplex aus Cas9 und einer bestimmten gRNA arbeiten kann, und andererseits, welche Mutationsmuster erwartet werden können. So wurden bereits kurz nach der Einführung der Cas9-Technologie für Getreidepflanzen erste Studien veröffentlicht, in denen Mutationen in Weizenprotoplasten nachweisbar waren (Shan et al., 2013; 2014). Diese Arbeiten dienen in erster Linie für den generellen Beleg dafür, dass Cas9-basierte Mutagenese in Getreiden möglich ist. Diese Methode der Protoplastentransformation wurde zunehmend in verschiedenen Gerstensorten angewendet, um die Aktivität der gRNAs zu testen, so in Golden Promise (Gerasimova et al., 2020), Aley (Gerasimova et al., 2018) und Igri (Hoffie et al., 2021). Auch in Triticale (Michalski et al., 2021) und anderen Arten wurden Protoplasten für die Voruntersuchung von gRNAs verwendet. Auch die Aktivität der zur Baseneditierung verwendeten Cytidin-Deaminasen^(*) APOBEC1 (Zong et al., 2017) und APOBEC3A (Zong et al., 2018) sowie der Adenosin-Deaminase^(*) ecTadA (Li et al. 2018) wurde in Weizenprotoplasten nachgewiesen. Liang und Kollegen (2017) nutzten Protoplastentests erfolgreich zur Testung von gRNA/Cas9-Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen im Vergleich zu Plasmiden.

Die Erstellung von *in vitro*^(*) hergestellten gRNA/Cas9-Ribonukleoprotein-Komplexen ermöglicht eine weitere Form der Untersuchung der Aktivität beider Komponenten. LeBlanc und Kollegen (2018)

nutzten RNPs zur Untersuchung der Aktivität von SpCas9 bei verschiedenen Temperaturen, indem sie die RNPs für eine festgelegte Zeit mit einer linearen DNA mischten, die das Zielmotiv enthielt. Auch für die Testung modifizierter Cas9-Varianten kam dieses Testsystem zum Einsatz (Nishimasu et al., 2018).

Eine neue Möglichkeit zur Untersuchung der gRNA-Aktivität stellt die Nanotechnologie dar. So könnten gRNAs an Nanopartikel gebunden werden und in *cas9*-transgene Pflanzen eingeführt werden, um die Aktivität der gRNAs zu bestimmen (Demirer et al., 2021). Da diese Technik noch sehr neu ist bleibt abzuwarten, ob und in welchem Maße sie von Wissenschaft und Industrie angenommen wird.

In dieser vorgelegten Doktorarbeit wurden sowohl die Protoplastenmethode als auch der gRNA-Aktivitätstest in Blattepidermiszellen angewendet. Letzterer lieferte den Beleg, dass die jeweils für das Zielgen ausgewählten gRNAs im Weizen und der Gerste grundsätzlich aktiv sind, jedoch wichen die damit ermittelten Aktivitätswerte deutlich von den Mutationseffizienzen der stabilen Transformationen ab. So ergab die ballistische Transformation von Blattepidermis im Weizen für beide verwendeten *Bh*-gRNAs Aktivitäten von 37 % bzw. 38 %, wobei Mutationen auf Pflanzenebene im Zielmotiv 5 deutlich seltener beobachtet wurden als im Zielmotiv 4. Bei Gerste waren die Aktivitäten in den Epidermiszellen der Blätter zum Teil deutlich geringer (*Spl14*-gRNA 2-4) oder höher (*Spl14/17*-gRNA 3-2-Varianten) als in den stabilen Transformationsexperimenten. Die Testung der *Bh*-gRNAs in Weizenprotoplasten ergab hingegen im Vergleich mit den nachfolgenden stabilen Transformationen quantitativ aussagekräftigere Effizienzen. So war die Aktivität der *Bh*-gRNA 4 in allen drei *Bh*-Homoeoallelen^(*) deutlich höher als die der *Bh*-gRNA 5, wobei sich Letztere in den Protoplasten als besonders niedrig darstellte. Auch wurden 5 von 16 in Pflanzen nachgewiesenen Mutationsmuster vorher auch in Protoplasten nachgewiesen, wobei 4 davon über alle nachfolgenden Generationen weitervererbt wurden (*Bh*-A-Kopie: $\Delta 1$ bp, $\Delta 20$ bp; *Bh*-B-Kopie: +1 bp; *Bh*-D-Kopie: $\Delta 15$ bp).

5.1.4. Mutagenese von Gerste und Weizen ohne Integration der T-DNA

Die Kallusbildung und anschließende Regeneration von Pflanzen nach einer stabilen Transformation erfolgt in der Regel unter Selektionsdruck, wobei das Vorhandensein eines durch die T-DNA^(*) übertragenen Selektionsmarkergens gewährleisten kann, dass sich transformierte Zellen und daraus entstandene Gewebe und Regenerate prioritär entwickeln. Dies erfolgte auch bei den in dieser Arbeit durch Agrobakterien vermittelten stabilen Transformationen in Gerste. Mittels Segregation der Nachkommen konnten teils T-DNA-freie Mutanten gewonnen werden. Für Agrobakterien-vermittelten Transformationen finden sich in der Literatur bereits Studien, bei denen die Selektion verkürzt oder komplett unterlassen worden ist. Chen und Kollegen (2018) führten im vergleichsweise leicht transformierbaren Tabak nach Transformation von 415 Explantaten eine Regeneration ohne Selektionsdruck durch und wiesen dabei bezogen auf die Anzahl aller regenerierter Sprosse in 2,6 %

aller Regenerate Mutationen im *PDS*-Gen nach (bezogen auf die Anzahl der Explantate sind es 47,5 %). Von den mutierten Sprossen wurden 29 zufällig ausgewählt und auf die Anwesenheit von T-DNA untersucht. In 17,2 % der ausgewählten Pflanzen erfolgte keine T-DNA-Integration. Wenn man dies auf die Gesamtzahl aller 197 Mutanten hochrechnet und auf die Anzahl der eingesetzten Explantate bezieht, zeigen sich rechnerisch in 8,2 % aller Regenerate T-DNA-freie Mutationen. Diese Berechnung ist jedoch theoretisch und nicht direkt experimentell durch die Autoren (Chen et al., 2018) belegt. Trotzdem zeigt die Berechnung, dass in Tabak, unabhängig zur Integration ins Genom^(*), mit einem recht hohen Anteil eine Transkription der T-DNA-Expressionseinheiten stattfindet und zu Mutationen in den regenerierten Pflanzen führt. Durch Selektionsdruck würden wiederum diese T-DNA-freien Mutanten absterben. Veillet und Kollegen (2019) verfolgten einen anderen Ansatz, indem sie Zielmutative des Herbizid-Resistenzgens *ACETOLACTATE SYNTHASE 1 (ALS1)* in Tomate und Kartoffel auswählten und nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation zunächst nur für 2 Wochen eine Selektion auf Transgenität durchführten und anschließend mittels Chlorsulfuron nur Pflanzen selektierten, deren *ALS1*-Gen durch den Baseneditor CDA1 auf gewünschter Weise mutiert war. Das war in diesem Fall möglich, da einige Punktmutationen in *ALS1* zur Resistenz gegen ALS-Inhibitoren wie Chlorsulfuron führen. Dies Prinzip ist jedoch nur möglich, wenn die zu erzielenden Mutationen einen Selektionsvorteil bewirken, was leider üblicher Weise nicht der Fall ist.

Der ballistische^(*) Gentransfer selbst bietet eine potentiell effizientere Möglichkeit, T-DNA-freie Mutanten zu erhalten. Zhang et al. (2016) führten nach dem Beschuss unreifer Weizenembryonen mit einem gRNA/*cas9*-Konstrukt eine selektionsfreie Regeneration durch und konnten je nach Zielgen einen Anteil von 43,8 bis 86,8 % der Primärmutanten ohne T-DNA-Insertion nachweisen. Bei Beschuss von unreifen Embryonen mit *in vitro*^(*)-Transkripten von Cas9 und einer gRNA für das *Gw2*-Gen und anschließender selektionsfreier Regeneration wurden Mutationen mit einer Effizienz (Anzahl mutierte Pflanzen/Anzahl beschossener Embryonen) von 1,1 % gefunden werden, was ca. einem Drittel der Mutationseffizienz bei Beschuss mit entsprechender Plasmid-DNA mit oder ohne Selektionsdruck entspricht (Zhang et al., 2016). Liang und Kollegen (2018) zeigten in ähnlichen Experimenten in Weizen, dass die Nutzung von *in vitro*-Transkripten von *cas9* und gRNAs sowie von RNPs zu einem Anteil von 1,8 % mutierter Regenerate führte. Alternativ dazu beschossen Hamada und Kollegen (2018) das freigelegte Sprossmeristem^(*) reifer Weizenembryonen mit einem gRNA/*cas9*-Konstrukt und ließen die Embryonen danach keimen. Von 210 so entstandenen Pflanzen erwiesen sich 5,2 % als im Zielmotiv mutiert und alle mutierten Nachkommen zeigten keine Anwesenheit integrierter Plasmid-DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ballistische Gentransfer in Weizen anhand von 4 Versuchen durchgeführt, wobei in zwei Experimenten ein Einzelnes und in den beiden anderen Transformationen beide für die Mutagenese von *Branched head* erstellten gRNA/*cas9*-Konstrukte verwendet wurden.

Für die Einzeltransformationen wurden 795 (Experiment WCH2) bzw. 705 (Experiment WCH3) Embryonen eingesetzt, in den resultierenden Regeneraten jedoch keine Mutationen detektiert. Bezogen auf die Zahl der eingesetzten Embryonen wurde T-DNA mit einem Anteil von 0,3 % bzw. 0,1 % nachgewiesen, was für eine erfolgreiche gezielte Mutagenese wahrscheinlich eine zu geringe Transformationseffizienz darstellt. Die Co-Transformation beider verwendeten gRNA/*cas9*-Konstrukte ohne Selektionsdruck (Experiment WCH4) führte ebenfalls zu keinen mutierten Pflanzen, resultierte jedoch, bezogen auf die eingesetzten 276 Embryonen, mit einem Anteil von 9,4 % in detektierbaren T-DNA-Insertionen. Erfolgreicher stellte sich die Co-Transformation mit Selektionsdruck (Experiment WCH1) dar, wobei es bezogen auf die eingesetzten 1200 Embryonen in einem Anteil von 1,2 % zur T-DNA-Insertion kam und Mutationen mit einer Effizienz von 0,6 % nachweisbar waren. Der Anteil T-DNA-freier Mutationen lag bei 0,3 % bezogen auf die eingesetzten Embryonen. Eine T-DNA-freie Primärmutante (WCH1 E101) gab das mutierte Allel auch an die nachfolgenden Generationen weiter. Diese Werte sind deutlich geringer als bisher beschrieben (Zhang et al., 2016; Liang et al., 2018) und zeigen einen deutlichen Optimierungsbedarf für den ballistischen Gentransfer. Jedoch stellen auch die zuvor veröffentlichten Effizienzen nur Momentaufnahmen dar und in dieser Arbeit wurde auch nur ein Gen modifiziert, weshalb keine generelle Aussage zur Spanne erzielbarer Effizienzen der ballistischen Transformation getroffen werden kann. Was jedoch beachtet werden sollte ist die Qualität des Donormaterials. In den durchgeführten Transformationsexperimenten WCH2, WCH3 und WCH4 wurde Mehltau-belasteter Weizen verwendet, welcher behandelt werden musste. Diese Behandlungen waren in der Vergangenheit oft mit deutlich verringerten Transformationseffizienzen assoziiert. Insgesamt konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass bei Weizen T-DNA-freie, Zielsequenz-spezifische Mutationen generiert werden können.

5.1.5. Frequenz und Bedeutung Homologie-basierter DNA-Endverknüpfung

Mit steigendem Interesse wird im Kontext der Genom-Editierung das Prinzip der Mikrohomologie-basierten DNA-Reparatur (*microhomology-mediated end-joining*, MMEJ) beachtet. In Abhängigkeit von der Zielregion^(*) kann ein erheblicher Anteil der induzierten Mutationen durch Mikrohomologien hervorgerufen werden. So wurde durch Bae und Kollegen (2014) in humanen Zellen gezeigt, dass 2-8 bp große Sequenzwiederholungen beidseitig des Doppelstrangbruchs diesen Reparaturmechanismus auf dominierende Weise auslösen. Für das Prinzip, wie solche Sequenzwiederholungen zur Komplementarität zwischen den gegenübererliegenden DNA-Strängen führen sei an dieser Stelle nochmals auf Abbildung 4 verwiesen. Wenn die Sequenzwiederholungen einen hohen GC-Gehalt haben und bis zu etwa 3 Nukleotide vom Doppelstrangbruch entfernt liegen, führte dies zu einem sehr robusten MMEJ (Kent et al., 2015). Dies wurde wiederum von Tan und Kollegen (2020) bestätigt, in deren Studie näher am Doppelstrangbruch lokalisierte Sequenzwiederholungen zu deutlich höherer

Mutationseffizienz führten als bei weiterer Entfernung. Die Länge der Mikrohomologien spielte in unmittelbarer Nähe des DNA-Bruches kaum eine Rolle (Tan et al., 2020). Ein positiver Einfluss eines höheren GC-Gehaltes der Mikrohomologien wurde durch Vu und Kollegen (2021) bestätigt, wobei andererseits ein geringer GC-Gehalt das MMEJ sogar beeinträchtigen könnte (Daley & Wilson, 2005). Im Gegensatz dazu beschrieben Sui et al. (2021) im gramnegativen Stäbchenbakterium *Zymomonas mobilis* eine geringere MMEJ-Effizienz bei hohen GC-Gehalten.

Die in dieser vorgelegten Arbeit analysierten Mikrohomologien umfassen eine Länge von 2 bis 5 Basenpaaren und hatten einen GC-Gehalt zwischen 50 und 100 %. In den meisten Fällen lag eine der beiden Sequenzwiederholungen innerhalb einer Distanz von 5 bis 7 Basenpaaren vom Doppelstrangbruch. Damit stimmen die hier erzielten Ergebnisse mit den Erkenntnissen von Bae et al. (2014), Kent et al. (2015) und Vu et al. (2021) überein.

MMEJ kann auch außerhalb der Pflanzenbiotechnologie beobachtet werden. So scheint die von Dobrovolskaya und Kollegen (2015) beschriebene 14 bp-Deletion in der A-Kopie des *Branched head/Wheat frizzy panicle (Bh/Wfzp)*-Gens in einer Vielzahl von Weizenakzessionen mit überzähligen Ährchen^(*) auf eine DNA-Reparatur mittels MMEJ zurückzugehen (Abbildung 38).

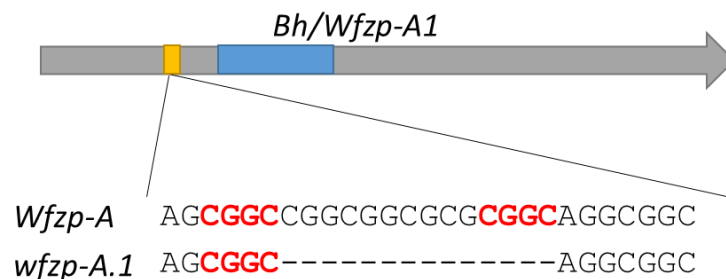


Abbildung 38 – Darstellung der Mikrohomologie in *Wfzp-A* (rot), welche die 14 bp-Deletion im *wfzp-A.1*-Allel (Dobrovolskaya et al., 2015; Li et al., 2021b) induziert hat

Beying und Kollegen (2020) zeigten in *ku70*-Mutanten in *Arabidopsis*, in denen der reguläre NHEJ-Reparaturweg ausgeschaltet ist, eine bis zu 5x höhere Translokationsfrequenz mit Deletionen und Insertionen, die offensichtlich auf Mikrohomologien beruhen. Es konnte bewiesen werden, dass MMEJ in Wildtyp-Pflanzen in einer ähnlichen Frequenz wie NHEJ auftrat, während in *ku70*-Mutanten die Frequenz von MMEJ deutlich erhöht war (Beying et al., 2020). Eine Studie mit der Grünen Borstenhirse *Setaria viridis* zeigte in 52,2 % aller Fälle von Cas9-vermittelten Mutationen in Kombination mit der Trex2-Exonuklease eine DNA-Reparatur mittels Mikrohomologien (Weiss et al., 2020). Garcia-Medel und Kollegen (2019) wiesen zudem nach, dass Pflanzenorganellen vorwiegend MMEJ zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen verwendeten.

5.1.6. Vererbung von Mutationen und Fixierung mutierter Allele

Die Nutzung der Cas9-Technologie zur Induktion von Mutationen in Gerste und Weizen wurde seit 2013 in zahlreichen Veröffentlichungen erfolgreich gezeigt (Tabelle 1; Tabelle 2). Jedoch besteht ein Unterschied, ob gezielt Kandidatengene ausgewählt wurden, um agronomische Parameter zu optimieren oder ob die Auswahl als Reporter- oder Beispielgen erfolgte, um Technologie weiter zu entwickeln. So wurden in einigen Fällen Experimente lediglich in Protoplasten durchgeführt, um innerhalb kurzer Zeit Erkenntnisse über die Effizienzen neuer Techniken und Cas-Varianten zu erhalten oder um die Cas9-Technologie in noch nicht transformierbaren Sorten anwenden zu können (Shan et al., 2013; Cermák et al., 2017; Zhang et al., 2018; Gerasimova et al., 2018; Cui et al., 2019). Aus Sicht der Methodenentwicklung sind diese Studien wichtig, jedoch sind die Bedingungen bei stabil-transformierten Pflanzen hinsichtlich der Zellteilung und der Repression der Transkription von gRNA und *cas9*, dem sog. *Silencing*, komplexer. Weitere, vor allem methodisch geprägte Studien, beschrieben lediglich Mutationen in der T0-Generation (Shan et al., 2013; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2016; Cermák et al., 2017; Zhang et al., 2018; Debernardi et al., 2020). Dabei bleibt es offen, ob die generierten Mutationen auch an nachfolgende Generationen vererbt werden können.

Wenn Nachkommen nach einer stabilen Transformation untersucht wurden, dann erfolgte dies in der Gerste in der Regel bis maximal in die T2-Generation, da hier vorhandene Mutationen in der Regel homozygot^(*) vorlagen und Phänotypen^(*) ausgewertet werden konnten (Tabelle 1). Im Weizen mussten Pflanzen aufgrund des tetra- oder hexaploiden Genoms bis in die T4-Generation fortgeführt werden, um homozygote Mutationen in allen Subgenomen^(*) zu erhalten und eindeutige, genspezifische Phänotypen zu erkennen (Tabelle 2). In einzelnen Fällen waren jedoch bereits in den regenerierten Pflanzen der T0-Generation klare phänotypische Veränderungen sichtbar (Howells et al., 2018; Gerasimova et al., 2020; Debernardi et al., 2020), wobei eine phänotypische Auswertung von aus der Zellkultur regenerierten Pflanzen ohnehin nicht empfohlen wird (Hensel et al., 2017).

Um neue Allele von *Branched head* zu erstellen, wurden in der vorgelegten Arbeit zahlreiche Technologien angewandt, um genetisch fixierte Mutationen in den Nachkommen zu erhalten. Neben der Selbstung über mehrere Generationen erfolgten auch Kreuzungen und die Anwendung von Haploidentechnologie. Die Kreuzungen wurden direkt zwischen den primären Regeneraten sowie zwischen deren Nachkommen untereinander und dem Wildtyp (Bobwhite) durchgeführt. Die Anwendung von Haploidentechnologie durch Antherenkultur und die darauffolgende Regeneration doppelhaploider^(*) Pflanzen wurde bei zuvor geselbsteten und gekreuzten Pflanzen ausgeführt. Bei den Selbstungen waren 1 bis 4 weitere Generationen nötig, um in allen Subgenomen homozygot mutierte und genetisch fixierte Mutationen zu erhalten. Bei den Kreuzungspflanzen waren jeweils 2

bis 3 Generationen dafür nötig. Die drei aus der Antherenkultur gewonnenen T-DNA-freien Pflanzen waren dagegen direkt genetisch fixiert (Tabelle 26, siehe 4.1.10.; Abbildung 39).

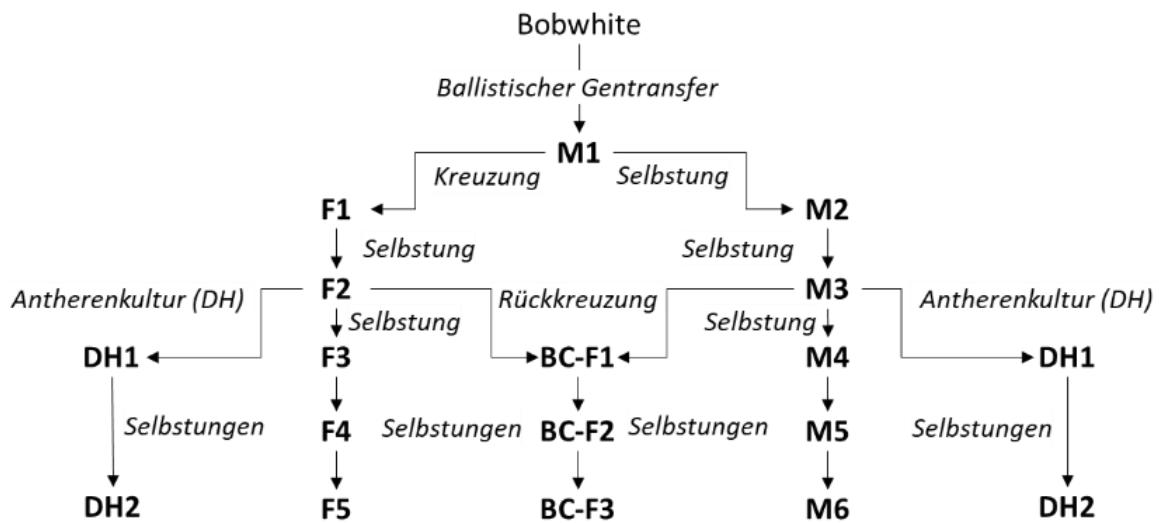


Abbildung 39 – Schematische Darstellung der angewendeten Techniken und analysierten Generationen bei der Herstellung neuer Allele von *Branched head*; M1: nach ballistischem DNA-Transfer regenerierte primärmutierte Pflanzen; M2-M6: Nachkommen von M1 mit durchgängig durch Selbstung vererbten Mutationen; F1: Kreuzungsprodukte der M1-Pflanzen; F2-F5: Selbstungsnachkommen der F1-Pflanzen; BC-F1: Produkte der M3/F2/Bobwhite-Rückkreuzungen; BC-F2/F3: Selbstungsnachkommen der BC-F1-Pflanzen; DH1: durch Haploidentechnologie generierte doppelhaploide Regenerate von ursprünglichen M3/F2-Pflanzen; DH2: Selbstungsnachkommen von DH1-Pflanzen

Dies lässt den Schluss zu, dass die Anwendung von Haploidentechnologie die Generierung homozygoter Pflanzen beschleunigen kann, wenn die T-DNA entweder nicht mehr vorhanden ist oder alle Zielmutative mutiert sind. Sollten jedoch neben der T-DNA auch Wildtyp-Allele nach der Genomverdopplung vorhanden sein, so kann eine erneute Induktion von Doppelstrangbrüchen und chimären^(*) Mutationen erfolgen (siehe 4.1.9.). Der Vorteil der Haploidentechnologie zur genetischen Fixierung von Cas9-induzierten Mutanten wurde bereits mehrfach genutzt. So wurden z.B. Kreuzungen von Weizen und gRNA/cas9-transgenem Mais durchgeführt, die im Weizengenom erfolgreich Mutationen erzeugten. Nach der Eliminierung des Mais-Genoms entstanden mutierte haploide Pflanzen, welche nach der Verdopplung des Chromosomensatzes homozygote Mutationen aufwiesen (Kelliher et al., 2019; Budhagatapalli et al., 2020). Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Mikrosporenkulturen für die Transformation, wie es bereits durch Hoffie und Kollegen (2021) für die Wintergerste Igri beschrieben wurde. Dieser Ansatz führt zu doppelhaploiden Regeneraten und somit direkt zu homozygot-mutierten Primärtransformanten, allerdings liegt auch die integrierte T-DNA homozygot vor und muss über Rückkreuzungen mit dem Wildtyp und nachfolgender Segregation entfernt werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Kombination von Technologien zur Erstellung neuer Weizenallele wurde in bisher publizierten Studien nicht angewandt, bietet sich allerdings zukünftig zur schnellen Erstellung einer Vielzahl neuer und spezifisch-mutierter Allele an. Dies stellt einen Fortschritt gegenüber der ungerichtet induzierten Mutagenese mittels chemischer oder radioaktiver Behandlung dar. Diese hat jedoch weiterhin ihre Berechtigung, wenn es um Veränderungen in Genen geht, deren Funktion im Kontext bestimmter Eigenschaften unbekannt ist. Die gezielte Mutagenese hat dagegen einen unbestreitbaren Vorteil, wenn eine bereits bekannte oder vermutete Beziehung von Gen und Eigenschaft Grundlage des Ansatzes ist.

5.2. Veränderung der Pflanzenarchitektur von Gerste und Weizen durch gezielte Mutagenese von Transkriptionsfaktoren

5.2.1. Veränderung der Architektur und Steigerung des Ertragspotenzials von Getreide

Die wichtigste Zielstellung der praktischen Pflanzenzüchtung ist die Optimierung von Ertragskomponenten. Hierbei ist zu beachten, dass die Anzahl der Körner^(*) und das Korngewicht miteinander in Verbindung stehen und eine Erhöhung der Kornzahl alleine Einfluss auf das Korngewicht hat (Hawkesford et al., 2013). Die beiden in der vorliegenden Arbeit modifizierten Transkriptionsfaktoren BRANCHED HEAD/ WHEAT FRIZZY PANICLE (BH/WFZP) in Weizen und SQUAMOSA-PROMOTOR BINDING PROTEIN-LIKE 14 (SPL14) sowie das Paralog^(*) SPL17 in Gerste spielen eine wichtige Rolle für die Identität der jeweiligen Ährchenmeristeme^(*) und stehen somit in direktem Zusammenhang zum Kornertrag dieser Getreidearten (Sakuma & Schnurbusch, 2020; Thiel et al., 2021). In einigen beschriebenen Fällen die das *Bh/Wfzp*-Gen betreffen, führte die Erhöhung der Anzahl der Körner im Gegenzug zu einer Verringerung der Korngröße bzw. des Tausendkorngewichtes (Poursarebani et al., 2015; Du et al., 2021). Andererseits gab es aber auch Ergebnisse in Durum-Weizen, welche zeigten, dass das Vorhandensein des *bh^f-A1*-Allels (Poursarebani et al., 2015) im Elite-Durum-Weizen Floradur eine erhöhte Anzahl der Körner pro Ähre bei gleichzeitigem Erhalt des Tausendkorngewichtes bewirkt (Wolde et al., 2019a). Die Erhöhung der Expression von *SPL14* führte in Reis ebenfalls zur Erhöhung der Kornzahl pro Rispe und Pflanze (Miura et al., 2010), wobei das Tausendkorngewicht auch erhöht war (Jiao et al., 2010). Diese Erkenntnisse geben BH/WFZP und SPL14 eine hervorgehobene Stellung unter den ertragsrelevanten Genen.

Allerdings sollten neben der Kornzahl und dem Korngewicht auch weitere Parameter und Beobachtungen in das Gesamturteil einfließen, ob wir mittels der Cas9-Technologie den Ertrag unserer Getreide steigern können. Die Verwendung von Cas9 und spezifischer gRNAs ermöglicht eine sehr zielgenaue Veränderung im Pflanzengenom, welche durch herkömmliche Mutagenesemethoden wie EMS-Behandlung oder Bestrahlung nur durch langwierige Prozesse der Rückkreuzung erreicht werden kann, wobei auch hier nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, dass Veränderungen auch an unerwünschter Stelle entstehen. Auch bei gezielten Veränderungen im Bereich der Pathogenresistenzen^(*) macht es Sinn, ertragsrelevante Parameter zu untersuchen, um mögliche pleiotrope Effekte der Resistenzgene auszuschließen. Dies wurde unter anderem durch Hoffie und Kollegen (2021) bei der Untersuchung ihrer gezielt induzierten Virusresistenzen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher neben den Kornparametern auch allgemeine Parameter der Pflanzenarchitektur untersucht (u.a. Pflanzenhöhe, Zahl und Länge der Internodien). Ein Fokus lag auch auf der Biomasse (u.a. Trockenmasse des Sprossmaterials), da auch das nach der Ernte übrigbleibende Stroh eine Verwendung in verschiedenen Industrieprozessen hat (Björnsson & Prade, 2021). Jedoch

lag aufgrund der Hintergrundinformationen zu BH/WFZP und SPL14 ein besonderes Augenmerk auf Veränderungen der Ährenarchitektur (u.a. Länge und Anzahl der Ähren, Anzahl der Ährchen, Verzweigungen) und speziell bei BH auch auf der Wurzelentwicklung.

5.2.2. Einfluss von BRANCHED HEAD/ WHEAT FRIZZY PANICLE auf die Architektur von Weizen

5.2.2.1. Vergleichende Betrachtung der Effekte von Mutationen in *Bh/Wfzpz*-Allelen, die zum Funktionsverlust oder zu einem gleichbleibenden Leserahmen führen

Von den in der vorliegenden Arbeit mittels Cas9-Technologie induzierten und genetisch fixierten 14 Mutationsvarianten führten 8 zu einem Funktionsverlust der jeweiligen Subgenom-Kopie von *Branched head (Bh)/ Wheat Frizzy panicle (Wfzpz)*, davon 2 Varianten der A-Kopie und jeweils 3 der B- und D-Kopie. Die 6 verbliebenen Mutationen erfolgten bei verbleibendem Leserahmen, davon 4 im B- und 2 im D-Genom. Bei Letzteren besteht somit die Möglichkeit, dass die Funktion von BH, wenn auch eingeschränkt, weiterhin vorhanden ist. Schlussendlich wurden Pflanzen gewonnen, in denen jeweils eine Subgenom-Kopie von *Bh* keine Funktion mehr aufwies (siehe 4.1.10., Kombinationen *aBD*, *AbD*, *ABd*) sowie Pflanzen, welche eine Mutation mit verbleibendem Leserahmen der B-Kopie trugen (siehe 4.1.10., Kombination *AbD (b i)*). In allen Fällen wurden weniger Körner in den Ähren und Ährchen gebildet. Überzählige Ährchen wurden nur vereinzelt in Pflanzen gefunden, die eine $\Delta 18/+7$ bp-Mutation in der *bh*-D-Kopie aufwiesen.

Dobrovolskaya und Kollegen (2015) zeigten, dass eine Mutation mit Funktionsverlust des A-Genoms (*wfzpz-A.1*-Allel) alleine keine überzähligen Ährchen hervorrief, während ein vorzeitiges Stopp-Codon in der *bh*-D-Kopie (*wfzpz-D.2*-Allel) einen schwachen Phänotyp der überzähligen Ährchen verursachte. Poursarebani und Kollegen (2015) wiesen in allen untersuchten tetraploiden Wunderweizen lediglich eine Punktmutation mit Basenaustausch im A-Genom nach, welche zu einem Aminosäuretausch (L96P) führt. Der dadurch hervorgerufene Phänotyp der verzweigten Ähren steht somit im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Daten in hexaploidem Weizen, wo selbst der Funktionsverlust kaum zu diesem Phänotyp führte. Dies erklärt sich durch Hinweise von Wolde und Kollegen (2019b), die beschrieben, dass die Ährenverzweigung im tetraploiden Wunderweizen durch eine Doppelmutation des *Bh*-Gens und des *Q*-Gens hervorgerufen wird. Möglicherweise stellt dieser Fakt den Grund dar, warum die in der vorgelegten Arbeit neu-generierten *Knockout*-Allele nur vereinzelt zu Verzweigungen in den Ähren führten.

5.2.2.2. Folgen der Kombination modifizierter *Bh/Wfzpz*-Homoeoallele in Weizen

Die neu geschaffenen Allele^(*) von *Bh*, welche zum Funktionsverlust führten oder bei gleichbleibendem Leserahmen mutiert sind, bilden eine Reihe von verschiedenen Kombinationen aus zwei oder drei

veränderten *Bh*-Homoeoallelen. Es wurden einerseits Pflanzen gewonnen, die genetisch fixierte Funktionsverlust-Mutationen in zwei *Bh*-Homoeoallelen (siehe 4.1.10., Kombinationen *abD*; *aBd*; *Abd*) tragen und andererseits Varianten, in denen nur eine *BH*-Kopie komplett ohne Funktion ist und eine weitere, die bei verbleibendem Leserahmen mutiert ist (siehe 4.1.10., Kombinationen *abD* (*b i*); *aBd* (*d i*); *Abd* (*b i*)). Diese Pflanzen bildeten teilweise überzählige Ährchen. Dobrovolskaya und Kollegen (2015) untersuchten ebenfalls in zwei *Bh/Wfzp*-Homoeoallelen mutierte Pflanzen, in denen das A-Allel von *Bh/Wfzp* keine Funktion mehr aufwies und die D-Kopie entweder vollständig entfernt war oder eine Punktmutation trug. Auch diese Pflanzen bildeten überzählige Ährchen. Der Funktionsverlust von zwei *Bh*-Homoeoallelen führte in allen erstellten Allelkombinationen zur geringeren Ausbildung von Körnern in den Ähren und Ährchen, während das Vorhandensein einer Mutation mit verbleibendem Leserahmen diesen negativen Effekt teilweise aufhob (Kombinationen *abD* (*b i*) und *aBd* (*d i*)). Des Weiteren zeigten die Ähren mit überzähligen Ährchen allesamt verkürzte Grannen gegenüber den Wildtyp-Pflanzen. Dieser Phänotyp wurde bereits von Du und Kollegen (2021) für *WFZP-A/D*-Doppelmutanten beschrieben und somit bestätigt.

Zusätzlich entstanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Pflanzen, welche Mutationen in allen drei Homoeoallelen trugen. Dabei zeigte der vollständige Funktionsverlust aller drei *Bh*-Homoeoallele einen drastischen Einfluss auf die Ähren- und Kornentwicklung, da keine regulären Blütchen mehr gebildet wurden. Mehrere über Haploidentechnologie generierte DH-Pflanzen (DH4 und DH5) aus der Ursprungslinie 97x113-4-3 zeigten diese Kombination und bildeten verzweigte Ähren ohne Kornansätze. In allen *Bh*-Homoeoallelen mutierte Pflanzen, welche in der B-Kopie lediglich eine Mutation mit verbleibendem Leserahmen zeigten ($\Delta 24$ bp; Pflanze 97x113-4-3-6-6-9), waren ebenfalls nicht in der Lage, Körner auszubilden. Dahingegen waren Vertreter mit einer im verbleibendem Leserahmen mutierten *Bh*-D-Kopie ($\Delta 8/+2$ bp; Pflanze 97x113-4-3-DH8) anscheinend in der Lage, ein funktionsfähiges *BH*-Protein bilden zu können, was in der Folge zur Entwicklung von Körnern führte. Das in den letzteren Pflanzen akkumulierte *BH*-Protein des D-Homoeoalleles zeigt keine Veränderung in den DNA-Bindemotiven der AP2-Domäne. In der vorliegenden Literatur erfolgte bislang keine Untersuchung von Pflanzen mit Mutationen in allen drei *Bh*-Homoeoallelen, weshalb kein direkter Vergleich möglich ist. Jedoch bestätigen die hier erzielten Ergebnisse die von Dobrovolskaya et al. (2015) beschriebene untergeordnete Rolle der *Bh*-B-Kopie und die dominante Funktion des D-Allels von *Bh*, welche sich phänotypisch sowohl in den Mehrfachmutanten als auch in den Einzelmutanten zeigt. Der Promotor^(*) der B-Kopie von *Bh* enthält zwei invers wiederholte transposable Elemente, deren Anwesenheit die Expression verringert. Diese transposablen Elemente wurden in einer Vielzahl von tetraploiden und hexaploiden Weizenakzessionen gefunden, jedoch nicht in diploiden Weizen der S-Genom tragenden Arten *Aegilops longissima*, *Ae. sharonensis* und *Ae. speltoides* (Du et al., 2021). Aus dem S-Genom von *Ae. speltoides* entstand das im polyploidem Weizen vorhandene B-Genom

(Ruban & Badaeva, 2018). Somit liegt der Schluss nahe, dass die Einschränkung der Expression der *Bh*-B-Kopie nach der Hybridisierung zu tetraploiden Weizen erfolgte und die Aufgabe mehr auf das Allel im A-Subgenom übertragen wurde. Du und Kollegen (2021) zeigten ebenfalls, dass die Deletion eines oder beider transposabler Elemente zur Reaktivierung der *Bh*-B-Expression führt. Ein Vergleich zwischen den Kombinationen *aBd* und *abd (b i)*, deren Unterschied in der Funktionalität des B-Allels liegt, ergab, dass der Verlust der Funktion der A- und D-Varianten allein durch eine intakte B-Kopie ausgeglichen wurde, wenn auch mit dem entsprechenden Phänotyp der überzähligen Ährchen. Eine zusätzliche Mutation im B-Allel, wenn auch bei verbleibendem Leserahmen, führte jedoch zu einer noch geringeren Abundanz von BH-B-Protein und somit zur gestörten Entwicklung der Blütchen, wodurch keine Körner gebildet werden konnten. Li und Kollegen (2021b) bestätigten in ihren Arbeiten die Dominanz der A- und D-Kopien von BH und spekulierten über den negativen Einfluss einer möglichen Dreifachmutation auf die Blütchenentwicklung, da BH/WFZP neben der Unterdrückung von sekundären Ährchen auch den Übergang vom Ährchenmeristem zum Blütchenmeristem fördert. Diese Vermutung wird durch die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Erkenntnisse bekräftigt, da der vollständige Funktionsverlust von BH dazu führte, dass keine fertilen Blütchen und somit keine Körner gebildet werden konnten. Jedoch führt eine nur geringe Abundanz des BH/WFZP-Proteins zur Bildung sekundärer, überzähliger Ährchen.

5.2.2.3. BH/WFZP kontrolliert Spross- und Ährenarchitektur

Die Hauptveränderung der im *Bh/Wfzp*-Gen mutierten Pflanzen liegt in der Ährenarchitektur. Die Bildung von überzähligen Ährchen und z.T. auch von verzweigten Ähren wurde sowohl in der vorliegenden Arbeit (Abbildung 40), als auch in weiteren Studien an tetra- und hexaploiden Weizenpflanzen mit mutierten *Bh/FZP*-Allelen gefunden (Dobrovolskaya et al., 2015; 2017; Poursarebani et al., 2015; Zhang et al., 2017c; Wolde et al., 2021, Du et al., 2021). Zhang und Kollegen (2017c) beschrieben 3 verschiedene Ährenphänotypen im Zusammenhang mit *Bh*, welche entweder zur Vierzeiligkeit (*Four Row Spikelet*, FRS), zu kurz-verzweigten Ährchen (*Short-Ramified Spikelet*, SRS) oder lang-verzweigten Ährchen (*Long-Ramified Spikelet*, LRS) führten, wobei Pflanzen mit den unterschiedlichen Ausprägungen des Ährenphänotyps im *Bh*-Gen und in nachfolgenden Faktoren keine Unterschiede zueinander aufwiesen. Allen gemeinsam war die charakteristische, bereits von Poursarebani et al. (2015) beschriebene, T287C-Punktmutation im *Bh*-A-Allel, die zum L96P-Aminosäureaustausch führt (Zhang et al., 2017c) und das *bh^t-A1*-Allel definiert (Wolde et al., 2019a). Wolde und Kollegen (2021) haben belegt, dass in tetraploiden Weizen sowohl Mutationen in der A-Kopie (*bh^t-A1*-Allel) als auch der B-Kopie (*bh^t-B1*-Allel) gemeinsam für den Verzweigungsphänotyp verantwortlich sind.

Neben dem Ährenphänotyp zeigten die in dieser Arbeit generierten Allelkombinationen von *Bh* weitere Veränderungen in der Pflanzenarchitektur, wobei die in allen drei Homoeoallelen mutierten Pflanzen erwartungsgemäß stärkere Effekte aufwiesen. Es wurden Veränderungen der Pflanzenhöhe in den Kombinationen *Abd (b i)* und *abd (b i)* beobachtet, während die Sprossanzahl in den vollständig mutierten Kombinationen *abd (d i)* und *abd (bd i) b-6* erhöht war (Tabelle 29). Zhang und Kollegen (2017c) berichteten zudem, dass Weizen mit überzähligen Ährchen so gut wie keine veränderten Pflanzenhöhen aufwies. Die Biomasse des gesamten Sprossmaterials war in Pflanzen mit den Allelkombinationen *Abd*, *abd (b i)* und *abd (bd i) -36* reduziert (Tabelle 29). Das Vorhandensein der in dieser Arbeit generierten 1 bp Deletion in der *bh*-A-Kopie führte unter erhöhten Temperaturen (26 °C am Tag) zu deutlich mehr Biomassebildung im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 20) als unter Standardbedingungen mit 18 °C am Tag (Abbildung 16).

5.2.2.4. BH/WFZP unterdrückt die Bildung sekundärer Ährchen und kontrolliert mit weiteren Faktoren die Ährenarchitektur

Die Regulation von *FZP* wurde vor allem in Reis beschrieben. Bekannt ist hier, dass die Expression von *FZP* durch die Faktoren BRASSINAZOLE-RESISTENT1 (BZR1) und verschiedene Auxin-Antwort-Regulatoren (Auxin response factors; ARFs) beeinflusst wird (Bai et al., 2017; Huang et al., 2018). Außerdem wurde festgestellt, dass die mRNA von *FZP* im 3'-untranslatierten Bereich (untranslated region; UTR) eine Region mit einer Anreicherung von CU-Sequenzwiederholungen aufweist (Chen et al., 2022). Diese CU-Region wurde als bedeutsam für die Regulation der Kornzahl und der Ausbildung sekundärer Rispenverzweigungen beschrieben, da hier die beiden Faktoren POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEINS 1 und 2 (PTB1/2) binden und dadurch die Translation von *FZP* reprimieren. Dieser Mechanismus wird zur Feinjustierung der Produktion von *FZP* genutzt und damit die Bildung sekundärer Verzweigungen kontrolliert (Chen et al., 2022). In Weizen wurde bisher keine Publikation veröffentlicht, die Ähnliches für *Bh/Wfzp* beschreibt. Jedoch ist davon auszugehen, dass ähnliche Mechanismen auch für die Ausbildung der Ährenstruktur vorhanden sind.

Mehrere Studien beschäftigten sich im Weizen jedoch mit der spezifischen Bedeutung von BH/WFZP für die Bildung sekundärer Ährchen. So wurde das von Poursarebani und Kollegen (2015) beschriebene *bh^t-A1*-Allel unter anderem in Eliteweizen integriert, was nicht wie vorher im Wunderweizen beschrieben zur Verzweigung der Ähre, sondern lediglich zur Bildung sekundärer Ährchen führte (Wolde et al., 2019a). Dies lässt den Schluss zu, dass weitere Gene Einfluss auf den Ährenphänotyp nehmen. Klindworth und Kollegen (1990a) beschrieben bereits den Einfluss verschiedener Gene auf die Bildung überzähliger Ährchen, wobei sie von einem Hauptgen im Zusammenspiel mit mehreren modifizierenden Genen ausgingen. Dieses Hauptgen würde, wie die A-Kopie von *Bh*, auf Chromosom 2A liegen und die modifizierenden Gene wären mit diesem nicht direkt gekoppelt (Klindworth et al.,

1990b). Das *Q-Gen* (Wolde et al., 2019b) und *Sham ramification 2 (Shr-2)* (Dobrovolskaya et al., 2017) wurden in diesem Zusammenhang diskutiert. Des Weiteren wurde einem Genabschnitt auf dem Chromosomenarm 1AS ein schwacher Effekt auf den Ährenphänotyp zugeordnet, der als *bh^t-A2* bezeichnet wird (Wolde et al., 2021). Li und Kollegen (2021b) zeigten, dass BH/WFZP die Expression von *Vrn1-A* und *Hox4-A* fördert und dadurch die Bildung sekundärer Ährchen verhindert sowie die Entwicklung der Blütenmeristeme initiiert. Zusätzlich verringert WFZP die Bildung primärer Ährchenmeristeme im Blütenstandsmeristem und spielt eine Rolle in der Anzahl der Ährchen durch Regulation von *Taw1*, *Rcn1* sowie verschiedenen *HOX*- und *MADS*-Genen (Li et al., 2021b). Du und Kollegen (2021) zeigten außerdem die Bindung von WFZP an den Promotor von Weizen *Barren stalk 1 (Ba1)*, welches in Mais als Initiator der lateralen Ährenmeristeme beschrieben ist. Der von Poursarebani und Kollegen (2015) beschriebene L96P-Aminosäuretausch führte dazu, dass die Bindung an den *Ba1*-Promotor nicht mehr möglich war (Du et al., 2021). Dies spricht dafür, dass die Aminosäure L96 für die DNA-Bindeaktivität von BH/WFZP eine besondere Rolle spielt, wobei sie nicht direkt mit den DNA-Bindemotiven an GCC-Boxen in Verbindung steht (Abbildung 8).

5.2.2.5. BH/WFZP verantwortlich für Fertilität und Anzahl der Körner

Eine wichtige Bedeutung von BH/WFZP zeigt sich, hervorgerufen durch die überzähligen Ährchen und verzweigten Ähren, im gesteigerten Potential von Kornansatzstellen. Poursarebani und Kollegen (2015) beschrieben in Wunderweizen, der einen L96P-Aminosäure-Austausch in der A-Kopie von BH enthält, eine Steigerung von ca. 445 auf 700 Körnern pro 10 Ähren, was ungefähr 57 % mehr Körnern entspricht. Du und Kollegen (2021) konnten in ihren durch Cas9 induzierten *wfzp-A/D*-Mutanten eine Steigerung der Kornzahl zwischen 30 und 100 % beobachten, allerdings mit deutlichen Schwankungen zwischen den untersuchten Pflanzen. Li und Kollegen (2021b) untersuchten die lokale Weizensorte YM44 und fanden heraus, dass der Phänotyp der überzähligen Ährchen durch eine 14 bp-Deletion im *Wfzp-A*-Allel und eine Methylierung im Promotor des *Wfzp-D*-Allels hervorgerufen wird. Im Vergleich mit einer weiteren Sorte, die normale Ähren bildet, hatte YM44 eine Steigerung von nahezu 100 % in der Anzahl der Körner (Li et al., 2021b).

Entgegen dieser Beispiele zeigten die mittels Cas9 induzierten Mutanten der vorgelegten Arbeit in den meisten Fällen weniger Körner pro Ähre. Lediglich die Kombinationen *abD (b i)* und *aBd (d i)* mit jeweils einer KO- und einer Mutation bei vorliegenden Leserahmen zeigten eine geringe Tendenz zu einer erhöhten Kornzahl (Abbildung 16). Einhergehend damit war ein besonders in Pflanzen mit drei mutierten *Bh*-Homoeoallelen auftretender, hoher Grad an Infertilität. Es zeigte sich, dass die Spelzen^(*) verändert waren und die Blütenorgane in vielen Fällen nicht oder nur verkümmert ausgebildet wurden. Aus Reis ist bekannt, dass FZP einen direkten Einfluss auf die Ausbildung der Deckspelze (Lemma) nimmt und ein Funktionsverlust dessen Entwicklung hemmt (Ren et al., 2018b). Auch bei den

Mutanten der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Bildung der Spelzen und auch der Blütenorgane in einigen Fällen eingeschränkt war (Abbildungen 10 und 11). Es besteht daher die Möglichkeit, dass eine veränderte Entwicklung der Spelzen dazu führt, dass die jungen Blütenorgane ungeschützt vorliegen. Dies führt wiederum zu mehr Infertilität und somit weniger Körnern pro Ähre. Eine detaillierte Analyse der Ährenentwicklung der im *Bh*-Gen mutierten Pflanzen könnte diese offenen Fragen beantworten.

5.2.2.6. BH/WFZP beeinflusst die Entwicklung der Korngröße und des Tausendkorngewichtes

Die gebildeten Körner von Pflanzen mit einem oder zwei mutierten *Bh*-Homoeoallelen waren größer und zeigten in den meisten Kombinationen ein größeres Tausendkorngewicht. Diese Ergebnisse stehen konträr zu einer Studie von Du und Kollegen (2021), in welcher jeweils ein durch Cas9 induzierter Funktionsverlust des D-Allels bzw. der A- und D-Allele von *Bh/Wfzp* zu kleineren Körnern mit einem geringeren Tausendkorngewicht führte. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutationen mit Leserahmenverschiebung innerhalb der AP2-Domäne von BH führen jede für sich zum vollständigen Verlust der Funktion von BH als Transkriptionsfaktor. Im Vergleich dazu führten Du und Kollegen (2021) ihre gezielte Mutagenese jenseits der AP2-Domäne durch (Abbildung A12). Somit können mögliche phänotypische Unterschiede durch die Restfunktionalität der veränderten BH/WFZP-Proteine hervorgerufen werden. Pflanzen mit dem *bh^t-A1*-Allel in tetraploidem Weizen bildeten mehr Körner und Ährchen pro Ähre aus, wobei die Anzahl der Körner pro Ährchen verringert war (Poursarebani et al., 2015; Zhang et al., 2017c; Wolde et al., 2021). Die gebildeten Körner waren kleiner und bildeten ein geringeres Tausendkorngewicht (Poursarebani et al., 2015; Zhang et al., 2017c). Kleinere Körner wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich in Pflanzen mit drei mutierten *Bh*-Homoeoallelen, mit Ausnahme der Kombination *abd (d i)*, beobachtet (Tabelle 29). Li und Kollegen (2021b) beschrieben eine herausragende Rolle von WFZP auf die Kontrolle der Korngröße. WFZP reguliert die Größe der Körner durch Kontrolle der Kornbreite, während Reis FZP die Kornlänge kontrolliert (Bai et al., 2017; Li et al., 2021b). Körner von *wfzp-a/d*-Pflanzen zeigten eine verringerte Zellzahl im äußeren Integument, wodurch die Kornbreite beeinflusst wird (Li et al., 2021b). Die Korngröße ist von vielen Faktoren abhängig, zum Beispiel sind in der Gerste unter anderem der Zuckertransporter SUT1 (Weschke et al., 2000), die Zellwand-Invertase CWINV1 (Weschke et al., 2003) sowie Endosperm-transferzellspezifische Elemente des Zweikomponenten-Signalsystems um die Histidinkinase HK1 (Hertig et al., 2020) für die Entwicklung und Füllung der Körner mit verantwortlich. Im Weizen wurden mittels Cas9-Technologie die Homoeoallele von *Grain width and weight 2 (Gw2)* mutiert, wodurch die Körner größer und schwerer wurden (Wang et al., 2018b). In *wfzp-a/d*-Pflanzen wurde gezeigt, dass die Expression von GW5, einem negativen Regulator der Korngröße, verringert war und der positive Regulator GW8 eine erhöhte Transkriptmenge zeigte (Li et al., 2021b). Somit deutet sich ein Einfluss von BH/WFZP als

Transkriptionsfaktor in der Regulation der Korngröße an, der zukünftig genauer untersucht werden sollte.

Interessanterweise zeigten die Kombinationen *abD (b i)* und *aBd (d i)*, welche jeweils kein funktionelles BH-A-Protein und ein in der AP2-Domäne mit verbleibendem Leserahmen modifiziertes BH-B- bzw. BH-D-Protein bilden, größere und schwerere Körner (Abbildung 40). Dabei wurden keine weiteren signifikanten Veränderungen im Pflanzenwuchs oder der Ährenentwicklung festgestellt, jedoch zeigen diese Pflanzen eine Tendenz zu weniger Ähren. Wie in 5.2.2.5. bereits beschrieben ist eine geringe Tendenz für eine gesteigerte Kornzahl pro Ähre zu sehen. Diese Pflanzen wiesen aufgrund des gesteigerten Tausendkorngewichtes einen tendenziell höheren Kornertrag pro Ähre auf, wobei dieser zum Wildtyp nicht signifikant verschieden war. Dennoch könnten diese beiden Kombinationen für die Weizenzüchtung interessant sein.

Eine weitere Untersuchung der generierten Pflanzen mit verschiedenen *Bh*-Allelkombinationen unter feldähnlichen Bedingungen dürfte die Aussagekraft bezüglich des Ertrages aller generierten Allelkombinationen weiter festigen.

5.2.2.7. BH/WFZP kontrolliert die Verzweigung von Wurzeln

In der bekannten Literatur wurden bisher kaum Erkenntnisse gefunden, die den Einfluss von BRANCHED HEAD auf die Wurzelarchitektur beschreiben. Dobrovolskaya und Kollegen (2017) konnten so gut wie keine Expression der *Bh*-Homoeoallele in Wurzeln nachweisen. Dem entgegen stehen weitere Expressionsstudien, die eine erhöhte Expression von *Bh* in den Wurzeln, speziell in den Wurzelspitzenmeristemen zeigen (Ramirez-Gonzalez et al., 2018). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Phänotypisierung des Wurzelwachstums von Pflanzen, welche kein funktionelles BH-A- bzw. BH-B-Protein bilden können, ergab, dass BH ebenfalls Einfluss auf das Wurzelwachstum, speziell die Ausprägung von Wurzelverzweigungen, nimmt (Abbildung 40). In Zukunft sollten daher auch der Einfluss des BH-D-Proteins und die Effekte der Kombination verschiedener *Bh*-Allele auf das Wurzelwachstum vergleichend untersucht werden.

<i>Bh/Wfzp</i>			Ährenform	Fertilität & Kornbildung	Kornanzahl & Korngröße	Wurzelerzweigungen
A-Allel	B-Allel	D-Allel				
A	/ B	/ D				
A	/ B	/ d				
A	/ b	/ d				
a	/ B	/ d				
a	/ b*	/ d*				
a	/ b	/ d*				
a	/ b*	/ d				
a	/ b	/ d				
a	/ b*	/ D				
a	/ B	/ d*				
a	/ B	/ D				

Abbildung 40 – Schematische Darstellung der Allelkombinationen von *Branched head (Bh)* und deren Phänotypen für die Ähren, Körner und Wurzelerzweigung; A/B/D – Wildtyp-Allele; a/b/d (grau) – Mutation mit Funktionsverlust des Allels; b*/d* (grün) – Mutation bei verbleibenden Leserahmen des Allels, wobei die Funktion eingeschränkt sein kann

5.2.3. Einfluss der Transkriptionsfaktoren SPL14 und SPL17 für den Übergang zur generativen Entwicklung und die Ährenarchitektur in Gerste

5.2.3.1. Allgemeiner Einfluss von Mikro-RNAs und SPL-Vertretern für die Auslösung generativer Entwicklung und die Architektur von Pflanzen

Der über Mikro-RNAs und SPL-Faktoren induzierte Signalweg für den Übergang von der vegetativen^(*) zur generativen Entwicklung^(*) wurde vor allem bei *Arabidopsis* beschrieben (Wang et al., 2009) und repräsentiert einen Teil des komplexen Netzwerkes zur Beeinflussung der in der Gerste und im Weizen vorhandenen Vernalisationsgene *Vrn-1*, *Vrn-2*, *Vrn-3/Ft1* und *Vrn-D4* dar (Yan et al., 2003, 2004, 2006; Kippes et al., 2014; Kiseleva & Salina, 2018). Eine zentrale Komponente ist dabei zunächst die Mikro-RNA *miR156*, deren Überexpression in Mais, Reis, Tomate, Pappel und Tabak den Übergang von der jugendlichen zur erwachsenen Pflanze verzögert (Manuela & Xu, 2020). Yang und Kollegen (2011) stellten fest, dass der vegetativ-zu-generative Übergang durch abgegebene Signale der Blattprimordien^(*) initiiert wird, wodurch die Expression von *AtmiR156* gehemmt ist. Die Induktion erfolgt über Effekte des Pflanzenhormons Abscisinsäure (*Abcisic Acid*, ABA), welche bei zunehmender Alterung der Blätter die Anreicherung von *AtmiR159* fördern (Guo et al., 2021). Diese Mikro-RNA kontrolliert die Expression von *AtMYB33*, welches einerseits direkt an die Promotoren von *AtMIR156A/C* sowie *AtSPL9* bindet (Manuela & Xu, 2020) und andererseits auch über *AtABI5* die Expression der *AtmiR156* und von *AtSPL9* kontrolliert (Guo et al., 2017; 2021). Guo und Kollegen (2021) zeigten, dass *myb33/abi5*-Pflanzen eine erhöhte *AtSPL9*- und eine verringerte *AtmiR156*-Expression hatten. Die *SPL*-Gene selbst fördern die Expression der Mikro-RNA *AtmiR172*, welche *AP2*-Domänen-Gene wie *APETALA 2 (AtAP2)*, *TARGET OF EAT 1,2,3 (AtTOE1,2,3)*, *SCHLAFMUTZE (AtSMZ)* und *SCHNARCHZAPFEN (AtSNZ)* hemmt (Wang & Wang, 2015; Wu et al., 2009). Dadurch wird der Blühinitiator *FLOWERING LOCUS T (AtFT)*, welcher ortholog^(*) zu *VRN3/FT1* in Gerste und Weizen ist, gebildet und ins Sprossspitzenmeristem transportiert. Hier beginnt eine weitere Rückkopplung, da *AtFT* nachfolgend die Expression von *APETALA 1 (AtAP1)*, *FRUITFUL (AtFUL)*, *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (AtSOC1)* und *LEAFY (AtLFY)* fördert. Dadurch werden erneut verschiedene *SPL*-Gene aktiviert, unter anderem *AtSPL3* und *AtSPL9*. *AtSPL9* ist ortholog zu Gerste *Spl14* (Abbildung 21). Diese fördern wiederum die Expression von *AtAP1*, *AtFUL*, *AtSOC1* und *AtLFY* und sind dadurch an der Initiierung der generativen Phase beteiligt (Wang & Wang, 2015; Yamaguchi et al., 2019; Manuela & Xu, 2020). Ein Funktionsverlust von *AtmiR156* und *AtmiR157* führt zur Hochregulation von *AtSPL3*, *9* und *15* (He et al., 2018).

In mehrjährigen Pflanzen, die eine erhöhte *miR156*-Expression zeigen, wurde eine verzögerte Blütenbildung und mehr Produktion von Blattmaterial beschrieben (Preston et al., 2016). Bei Bäumen wurde das Verhältnis von *miR156* zu *miR172* untersucht und festgestellt, dass sich das Expressionsverhältnis gegensätzlich während der fortschreitenden Alterung junger Blätter entwickelt,

miR156 sinkend, *miR172* ansteigend (Wang et al., 2011). Dies bestätigt den in *Arabidopsis* beschriebenen altersgesteuerten Signalweg via *miR156-SPL-miR172*. In der Gerste wurde mit *miR171* ein weiterer Regulator der *miR156*-Expression beschrieben, der im Vergleich zu *miR159* allerdings die Transkription von *miR156* fördert (Curaba et al., 2013).

Im Reis wurde gezeigt, dass die Expressionslevel verschiedener *SPL*-Gene Einfluss auf die Pflanzen- und besonders die Rispenarchitektur hatten. So führte eine reduzierte Expression von *SPL13*, *14* und *17* zur Bildung von mehr Sprossen mit weniger Rispenverzweigungen und weniger Körnern während ein mittleres Expressionsniveau der gleichen Gene die Sprosszahl verringerte und die Verzweigung der Rispe induzierte (Wang & Zhang, 2017). Dies wurde bereits auch spezifisch für *SPL14/IPA1* gezeigt (Jiao et al., 2010). Eine sehr hohe Expression von *SPL7*, *13*, *14*, *16* und *17*, welche allesamt durch die Mikro-RNAs *miR156*, *157* und *529* reguliert werden, führte hingegen zu einer stark reduzierten Sprosszahl und weniger Rispenverzweigungen (Wang & Zhang, 2017).

Die von Wang und Zhang (2017) beschriebenen Phänotypen bei einer durch RNAi reduzierten Expression von *SPL14* und *17* in Reis stimmen zum Teil mit den in der vorliegenden Arbeit in Gerste erzielten Ergebnissen überein, da ein Funktionsverlust von Gerste *SPL14* ebenfalls zur erhöhten Sprossanzahl führte und kürzere Ähren mit weniger Spindelstufen und Körnern verursachte. In Gerstenpflanzen mit einem funktionslosen *SPL17* konnten keine Veränderungen in der Architektur beobachtet werden, jedoch waren auch hier die Ähren kürzer und hatten weniger und kleinere Körner. Die beobachteten drastischen Veränderungen bezüglich fehlender generativer Entwicklung bei Leserahmenverschiebung in *spl14* und *spl17* zusammen waren jedoch in Reis nicht beschrieben worden. Dies führt zur Annahme, dass die Funktionen der Gene in Reis und Gerste unterschiedlich sind.

5.2.3.2. Limitation der Zielsequenz-spezifischen Mutagenese der *miR156*-Bindestelle von *Spl14/17*

Ursprünglich war es geplant, die Akkumulation von *SPL14* durch eine gezielte Veränderung der *miR156*-Bindestelle zu erhöhen und damit eine Veränderung der Ähren- und Pflanzenarchitektur nach dem Vorbild von Jiao und Kollegen (2010) zu erreichen. Diese beschrieben im Reis phänotypische Änderungen in Folge einer Punktmutation in der *miR156*-Bindestelle, welche zur Verzweigung der Rispe und stabileren Halmen führten. Die durchgeführten Experimente, die sowohl mittels konventioneller Cas9 als auch mit nCas9 gekoppelt mit Baseneditoren durchgeführt wurden, ergaben in der *miR156*-Bindestelle weder Einzelbasenaustausche noch andere Mutationen ohne Verschiebung des Leserahmens. Die konventionelle Mutagenese durch Cas9 sowie die Basen-Editierung mit einer Adenosin-Deaminase^(*) erfolgten am *SPL*-Zielmotiv 3-2. Dieses Motiv war das Einzige, dessen gRNA zusammen mit Cas9 einerseits einen Doppelstrangbruch innerhalb der *miR156*-Bindestelle induziert

und andererseits mehrere A-Nukleotide für die Baseneditierung enthält. Dieses Zielmotiv 3-2 zeigt jedoch suboptimale Nukleotidbesetzungen in der *Seed*-Region und im *PAM* (Abbildung 37). Passend zu dieser Ausgangslage konnten nur in wenigen Regeneraten Mutationen gefunden werden, die zudem allesamt zu Leserahmenverschiebungen führten. Das Ziel, die Bindefähigkeit der Mikro-RNA durch Mutationen bei verbleibenden Leserahmen zu behindern ohne die sonstige Funktionalität von SPL14 und/oder SPL17 zu beeinflussen wurde über diesen Ansatz nicht erreicht. Allerdings konnten die dabei entstandenen *Knockout*-Pflanzen für die funktionelle Charakterisierung dieser beiden SPL-Transkriptionsfaktoren verwendet werden.

Auch die durchgeführten Ansätze mit Baseneditoren führten nicht zu Mutationen in den miRNA-Bindestellen. Die primär-transgenen Gerstenpflanzen, die gRNA und *ncas9* mit translational fusionierter Cytidin-Deaminase^(*) *APOBEC1* erhielten (Zong et al., 2017), zeigten keine Basenaustausche in den Zielmotiven 3-1 und 3-3. Im Nachhinein wurde von Zong und Kollegen (2018) beschrieben, dass APOBEC1 wenig Aktivität zeigt und durch APOBEC3A ersetzt werden sollte. Dessen bessere Aktivität wurde in Weizenprotoplasten und stabil transformierten T0-Regeneraten gezeigt (Zong et al., 2018). Des Weiteren zeigte auch die verwendete Adenosin-Deaminase ecTadA keine Basenaustausche in Gerstenprotoplasten, was einerseits durch die geringe Effizienz der gRNA 3-2 und andererseits durch das verwendete Heterodimer der Wildtyp-Form ecTadA in Kombination mit der modifizierten Form ecTadA* entsprechend Li und Kollegen (2018a) bedingt sein könnte. Dahingehend wurde erst kürzlich beschrieben, dass die alleinige Verwendung von ecTadA* im Reis zu deutlich höheren Effizienzen führt als das Heterodimer mit ecTadA (Hua et al., 2020). Allerdings sind Effizienzvergleiche mit Reis generell nur eingeschränkt möglich, da dafür eine wesentlich höhere Temperatur für die Protoplasten und die Pflanzenkultur verwendet wird als bei Gerste oder Weizen. Bisher konnten ausschließlich Li und Kollegen (2018a) erfolgreiche Basen-Editierungen mit ecTadA in Weizenprotoplasten und stabil transformierten Pflanzen zeigen, allerdings ohne Informationen über die Vererbbarkeit der Veränderungen vorzulegen.

5.2.3.3. SPL14 bedeutsam für Initiierung der generativen Entwicklung und Repression lateraler Ährchen

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden verschiedene Mutationen im 2. und 3. Exon von *Spl14* generiert, die in den meisten Fällen einen Funktionsverlust oder eine mögliche Verringerung der Funktion durch eine Verschiebung des Leserahmens verursachen. Die im zweiten Exon induzierten Insertionen liegen in der SBP-Domäne und führen zu einem verkürzten Protein. Dahingegen erbrachte die Mutagenese im 3. Exon von *Spl14* sowohl eine 1 bp-Insertion als auch zwei verschiedene Deletionen mit intakter funktioneller SBP-Domäne. Die A-Insertion ergab ein neues Stopp-Codon, wodurch die Translation des Proteins am Beginn der *miR156*-Bindestelle zum Ende kommt. Die beiden

Deletionen führen jeweils zu einem verkürzten oder verlängerten Protein mit *nonsense*-Aminosäuresequenz von der Mutationsstelle bis zum C-Terminus.

Die verschiedenen Mutationspositionen und -muster führten vergleichend zum Wildtyp nur zu geringfügigen phänotypischen Unterschieden. Lediglich die Anzahl der Ähren und der Körner pro 1 cm Ähre ergaben Unterschiede zwischen den im Exon 2 und im Exon 3 induzierten Mutationen. Während die im Zielmotiv 2-4 mutierten Pflanzen zum Teil mehr Ähren bildeten (E12-Nachkommen) und die Kornzahl pro 1cm Ähre nicht beeinflusst war, wurde bei Pflanzen mit der im Zielmotiv 3-2 generierten 1 bp Insertion bzw. Deletion deutlich weniger Körner pro Ähre bzw. 1 cm Ähre gebildet und es entstanden weniger Ähren. Insgesamt führte die 1 bp-Deletion im 3. Exon zu den stärksten Veränderungen der Pflanzenarchitektur wohingegen die Mutationen im 2. Exon und die 1 bp-Insertion im 3. Exon jeweils vor allem den Ährenphänotyp beeinflussten. Die Körner der im 3. Exon mutierten Pflanzen waren etwas größer, allerdings ohne Einfluss auf das Tausendkorngewicht.

Zusammenfassend zeigte sich in allen Mutanten mit dem verspäteten Übergang in die generative Phase ein drastischer Effekt, wobei die Generationszeit um 2-3 Monate verlängert wurde. Dabei stieg der Anteil nichtfertiler Halme, die mehr und kürzere Internodien und mehr Blätter bildeten. Ähnliche Beobachtungen beschrieben Schwarz und Kollegen (2008) für *sp19*- bzw. *sp15*-Mutanten in *Arabidopsis*, welche mehr junge Rosettenblätter bildeten und so einen gestörten Übergang zur Alterung zeigten. *SPL9* und *SPL15* stellen in *Arabidopsis* die orthologen Gene zu Gerste *Spl14* und *Spl17* dar. Die Analyse der Meristeme von im *Spl14*-Exon 2 mutierten Gerstenpflanzen bestätigte den verzögerten Übergang in die generative Phase durch die gestörte Entwicklung des primordialen Ährchen-bildenden Teils (*Spikelet Ridge*) im *Double Ridge*-Entwicklungsstadium des Sprossspitzenmeristems.

Besonders die im *Spl14*-Zielmotiv 2-4 mutierten Pflanzen zeigten den Effekt, dass die sonst infertilen lateralen Ährchen weiterentwickelt waren und z.T. auch Körner ausbildeten. Bestätigend wurde der Einfluss von *SPL14* auf die Expression der Zeiligkeitse Gene *Vrs1 bis 5* nachgewiesen, wobei vor allem die Expression von *Vrs1*, das für die Infertilität der lateralen Ährchen in zweizeiligen Gersten hauptverantwortlich ist (Komatsuda et al., 2007), negativ durch den Verlust von *sp14* beeinflusst wurde (Abbildung 41).

5.2.3.4. *SPL17* unterstützt den Übergang zur generativen Entwicklung

Durch die übereinstimmende *miR156*-Binderegion im 3. Exon kam es neben *Spl14* auch zu Mutation in *Spl17*. Diese umfassen verschiedene 1 bp-Insertionen sowie eine 28 bp Deletion und führten allesamt zu einer *nonsense*-Aminosäuresequenz und damit zum Funktionsverlust. Für die Interpretation der

Ergebnisse ist es wichtig, dass für drei der vier Mutationen (außer A-Insertion) nur eine Pflanze zur Verfügung stand und somit teilweise nur Einzelwerte für die Analyse genutzt werden konnten.

Im Gegensatz zu den *sp14*-Mutanten gab es teilweise unterschiedliche Tendenzen in den untersuchten Parametern. Bei der Anzahl der Sprosse hatten nur Pflanzen, die die 28 bp Deletion in der Zielregion aufwiesen, einen signifikant erhöhten Wert. Die Internodienzahl und die Internodienlänge waren mehr oder weniger vergleichbar mit dem Wildtyp, wobei die Pflanze mit der C-Insertion ein Internodium weniger bildete und die Pflanze mit der T-Insertion längere Internodien aufwies. Somit ist SPL17 im Gegensatz zu SPL14 kein Hauptfaktor für den Übergang zum generativen Wachstum. Die Ährenarchitektur ist grundsätzlich in allen M2-Pflanzen verändert, allerdings abhängig zur Mutation in *SPL17*. Es zeigten sich sehr unterschiedliche Ährenlängen zwischen der A- und C-Insertion einerseits (↓) und der T-Insertion und der 28 bp-Deletion andererseits (↑). Gründe dafür können u.a. unerkannte off-target-Mutationen oder mögliche epigenetische Effekte aus der Kallusregeneration sein, die zu einem geringeren Teil an die nachfolgende Generation übertragen werden können.

Für die Kornparameter lassen sich eindeutige Tendenzen beobachten. Die verschiedenen mutierten Pflanzen bildeten längere und schmalere Körner, welche eine reduzierte Kornfläche zeigten und ein deutlich geringeres Tausendkorngewicht hatten. Da es keine weiteren Informationen in der Literatur zu Gersten *SPL17* gibt, ergeben diese Daten erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors.

5.2.3.5. *sp14/sp17*-Doppelmutanten verbleiben in vegetativer Phase

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Pflanzen generiert, die kein funktionelles SPL14- und SPL17-Protein mehr bilden konnten. Diese Doppelmutanten waren doppelt so hoch wie der Wildtyp (zum Vergleich: *sp14*: 1,5x), bildeten fünfmal so viele Internodien wie der Wildtyp (*sp14*: 2x) und die Internodienlänge war um die Hälfte reduziert (*sp14*: um ein Viertel kürzer). Außerdem konnten die Doppelmutanten keine Ähren ausbilden, sondern waren auf vegetatives Wachstum beschränkt.

Was in diesem Zusammenhang diskutiert werden muss ist die Frage, ab wann die generative Entwicklung einsetzt. Laut Kirby und Appleyard (1987) liegt das so genannte *Double Ridge*-Stadium, welches sowohl die vegetativen Blattprimordien als auch die generativen Ährchenprimordien in sich trägt, vor, wenn zwischen vier und neun Blätter aus dem Hauptspross gebildet wurden. Zwischen dem späten *Double Ridge*-Stadium und dem Abschluss der Ausbildung aller Primordien beginnt laut Kirby (2002) die Streckung des Weizenhalmes durch Längenwachstum der letzten vier bis sieben Internodien zunächst mit dem untersten Internodium. Es schließen sich nacheinander die darüber liegenden Internodien an. Mit der Anthese ist diese Entwicklung abgeschlossen (Kirby, 2002).

Ausgehend davon findet während der generativen Entwicklung das nun ausgelöste vegetative Längenwachstum des Halmes statt. Sowohl die *spl14*-Einzelmutanten als auch die *spl14/spl17*-Doppelmutanten zeigen die Streckung des Halmes, obwohl die weitere Entwicklung der Ährenprimordien verzögert bzw. vollständig gestört ist. Allerdings führt die verzögerte oder fehlende Aktivierung der Ährchenvorläufer zur Ausbildung von mehr Nodien und somit mehr Blättern. Man kann davon ausgehen, dass der grundsätzliche Übergang in die generative Phase in den Mutanten erfolgt, die Ausbildung der Blütenorgane jedoch, v.a. in Doppelmutanten, nicht initiiert wird. Eine genauere Analyse der Ährenmeristementwicklung in den *spl14/spl17*-Doppelmutanten würde diese offenen Punkte aufklären.

Somit waren die Einflüsse der Doppelmutation von *spl14* und *spl17* auf die Pflanzenentwicklung noch stärker als bei den *spl14*-Mutanten. Dies legt den Schluss nahe, dass SPL14 und SPL17 einerseits eine gewisse funktionelle Redundanz aufweisen, andererseits eine gemeinsame essentielle Rolle in der generativen Entwicklung spielen und der Verlust beider Faktoren die Blütenentwicklung hemmt. In *Arabidopsis* wurde anhand von *spl9/spl15*-Doppelmutanten gezeigt, dass diese beiden Orthologe von Gerste *Sp14* und *Sp17* im Vergleich zum Wildtyp eine doppelte Anzahl juveniler^(*) Blätter bildeten und eine verzögerte Blütenbildung aufwiesen (Schwarz et al., 2008). Die genaue Einordnung beider Transkriptionsfaktoren in den Ablauf der generativen Entwicklung muss noch tiefergehend untersucht werden, jedoch lässt sich von den in der vorliegenden Arbeit erbrachten Daten ableiten, dass SPL14 als ein Hauptfaktor während der generativen Entwicklung wirkt und SPL17 als Verstärker und Co-Faktor dient (Abbildung 41).

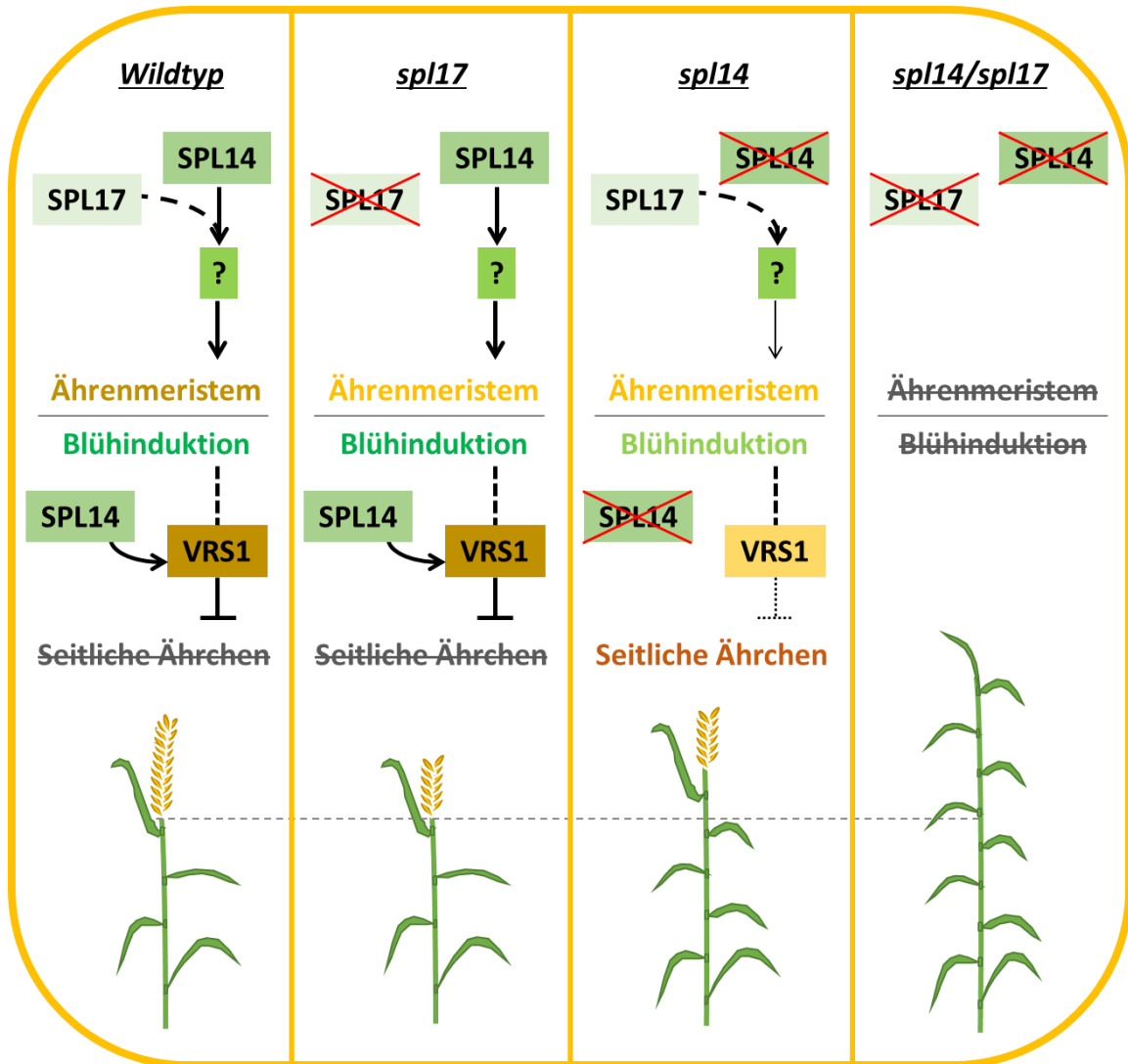


Abbildung 41 – Modell des Einflusses von SPL14 und SPL17 und dem individuellen oder gemeinsamen Funktionsverlust beider Faktoren auf die Induktion der generativen Entwicklung und der Ausbildung von seitlichen Ährchen; dicke Pfeile zeigen direkten Einfluss, gestrichelte Pfeile einen untergeordneten Einfluss auf nachfolgende Gene, Organe oder Entwicklungsschritte; gestrichelte Linie zeigt Standardhöhe für Wildtyppflanzen im Vergleich mit den Mutanten; Farbcodes zeigen, ob Funktion aktiv (dunkler Hintergrund/Text), eingeschränkt (heller Hintergrund/Text) oder inaktiviert (grauer Text und/oder durchgestrichen) ist

Literaturverzeichnis

- Abe, F., E. Haque, H. Hisano, T. Tanaka, Y. Kamiya, M. Mikami, K. Kawaura, M. Endo, K. Onishi, T. Hayashi und K. Sato. **2019**. 'Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat', *Cell Rep*, 28: 1362-69 e4.
- Alqudah, A. M., R. Koppolu, G. M. Wolde, A. Graner und T. Schnurbusch. **2016**. 'The Genetic Architecture of Barley Plant Stature', *Front Genet*, 7: 117.
- Álvaro, F., J. Isidro, D. Villegas, L. F. García del Moral und C. Royo. **2008**. 'Breeding Effects on Grain Filling, Biomass Partitioning, and Remobilization in Mediterranean Durum Wheat', *Agronomy Journal*, 100: 361-70.
- Amagai, Y., P. Martinek, N. Watanabe und T. Kuboyama. **2013**. 'Microsatellite mapping of genes for branched spike and soft glumes in *Triticum monococcum* L', *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61: 465-71.
- Aman, R., Z. Ali, H. Butt, A. Mahas, F. Aljedaani, M. Z. Khan, S. Ding und M. Mahfouz. **2018a**. 'RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants', *Genome Biol*, 19: 1.
- Aman, R., A. Mahas, H. Butt, F. Aljedaani und M. Mahfouz. **2018b**. 'Engineering RNA Virus Interference via the CRISPR/Cas13 Machinery in *Arabidopsis*', *Viruses*, 10.
- Andronescu, M., A. Condon, H. H. Hoos, D. H. Mathews und K. P. Murphy. **2007**. 'Efficient parameter estimation for RNA secondary structure prediction', *Bioinformatics*, 23: i19-28.
- Arazi, T., M. Talmor-Neiman, R. Stav, M. Riese, P. Huijser und D. C. Baulcombe. **2005**. 'Cloning and characterization of micro-RNAs from moss', *The Plant Journal*, 43: 837-48.
- Arimbasseri, A. G. und R. J. Maraia. **2015**. 'Mechanism of Transcription Termination by RNA Polymerase III Utilizes a Non-template Strand Sequence-Specific Signal Element', *Mol Cell*, 58: 1124-32.
- Bae, S., J. Kweon, H. S. Kim und J. S. Kim. **2014**. 'Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites', *Nat Methods*, 11: 705-6.
- Bahrman, N., M. Zivy und H. Thiellement. **1988**. 'Genetic relationships in the Sitopsis section of *Triticum* and the origin of the B genome of polyploid wheats', *Heredity*, 61: 473-80.
- Bai, X., Y. Huang, D. Mao, M. Wen, L. Zhang und Y. Xing. **2016**. 'Regulatory role of FZP in the determination of panicle branching and spikelet formation in rice', *Sci Rep*, 6: 19022.
- Bai, X., Y. Huang, Y. Hu, H. Liu, B. Zhang, C. Smaczniak, G. Hu, Z. Han und Y. Xing. **2017**. 'Duplication of an upstream silencer of FZP increases grain yield in rice', *Nat Plants*, 3: 885-93.
- Baulcombe, D. C., I. Crute, B. Davies, J. Dunwell, M. Gale, J. Jones, J. Pretty, W. Sutherland und C. Toulmin. **2009**. Reaping the benefits: science and the sustainable intensification of global agriculture. (The Royal Society).
- Becraft, P. W., D. K. Bongard-Pierce, A. W. Sylvester, R. Sc. Poethig und M. Freeling. **1990**. 'The *liguleless-1* gene acts tissue specifically in maize leaf development', *Developmental Biology*, 141: 220-32.
- Beier, S., C. Ulpinis, M. Schwalbe, T. Munch, R. HOFFIE, I. Koeppel, C. Hertig, N. Budhagatapalli, S. Hiekel, K. M. Pathi, G. Hensel, M. Grosse, S. Chamas, S. Gerasimova, J. Kumlenn, U. Scholz und T. Schmutzer. **2020**. 'Kmasker plants - a tool for assessing complex sequence space in plant species', *Plant J*, 102: 631-42.
- Benito, C., C. Zaragoza, F. J. Gallego, A. de la Pena und A. M. Figueiras. **1991**. 'A map of rye chromosome 2R using isozyme and morphological markers', *Theor Appl Genet*, 82: 112-16.
- Beying, N., C. Schmidt, M. Pacher, A. Houben und H. Puchta. **2020**. 'CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in *Arabidopsis*', *Nat Plants*, 6: 638-45.
- Birkenbihl, R. P., G. Jach, H. Saedler und P. Huijser. **2005**. 'Functional Dissection of the Plant-specific SBP-Domain: Overlap of the DNA-binding and Nuclear Localization Domains', *Journal of Molecular Biology*, 352: 585-96.
- Björnsson, L. und T. Prade. **2021**. 'Sustainable Cereal Straw Management: Use as Feedstock for Emerging Biobased Industries or Cropland Soil Incorporation?', *Waste and Biomass Valorization*, 12: 5649-63.
- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt und U. Bonas. **2009**. 'Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors', *Science*, 326: 1509-12.
- Boden, S. A., C. Cavanagh, B. R. Cullis, K. Ramm, J. Greenwood, E. Jean Finnegan, B. Trevaskis und S. M. Swain. **2015**. 'Ppd-1 is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat', *Nat Plants*, 1: 14016.
- Bonas, U., R. E. Stall und B. Staskawicz. **1989**. 'Genetic and Structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*', *Molecular and General Genetics*, 218: 127-36.
- Bonnett, O. T. **1967**. *Inflorescences of Maize, Wheat, Rye, Barley, and Oats: Their Initiation and Development* (University of Illinois, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, Bulletin 721).
- Borrill, P., R. Ramirez-Gonzalez und C. Uauy. **2016**. 'expVIP: a Customizable RNA-seq Data Analysis and Visualization Platform', *Plant Physiol*, 170: 2172-86.
- Boulton, S. J. und S. P. Jackson. **1996**. 'Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance', *Nucleic Acids Res*, 24: 4639-48.
- Brauer, E. K., M. Balcerzak, H. Rocheleau, W. Leung, J. Schernthaner, R. Subramaniam und T. Ouellet. **2020**. 'Genome Editing of a Deoxynivalenol-Induced Transcription Factor Confers Resistance to *Fusarium graminearum* in Wheat', *Mol Plant Microbe Interact*, 33: 553-60.
- Brazelton, V. A., S. Zarecor, D. A. Wright, Y. Wang, J. Liu, K. Chen, B. Yang und C. J. Lawrence-Dill. **2015**. 'A quick guide to CRISPR sgRNA design tools', *GM Crops & Food*, 6: 266-76.
- Brenchley, R., M. Spannagl, M. Pfeifer, G. L. Barker, R. D'Amore, A. M. Allen, N. McKenzie, M. Kramer, A. Kerhornou, D. Bolser, S. Kay, et al. **2012**. 'Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing', *Nature*, 491: 705-10.
- Brinkman, E. K., T. Chen, M. Amendola und B. van Steensel. **2014**. 'Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition', *Nucleic Acids Res*, 42: e168.
- Budhagatapalli, N., T. Rutten, M. Gurushidze, J. Kumlenn und G. Hensel. **2015**. 'Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley', *G3 (Bethesda)*, 5: 1857-63.

- Budhagatapalli, N., S. Schedel, M. Gurushidze, S. Pencs, S. Hiekel, T. Rutten, S. Kusch, R. Morbitzer, T. Lahaye, R. Panstruga, J. Kumlehn und G. Hensel. **2016**. 'A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants', *Plant Methods*, 12: 18.
- Budhagatapalli, N., T. Halbach, S. Hiekel, H. Buchner, A. E. Muller und J. Kumlehn. **2020**. 'Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer', *Plant Biotechnol J*, 18: 2376-78.
- Bull, H., M. C. Casao, M. Zwirek, A. J. Flavell, W. T. B. Thomas, W. Guo, R. Zhang, P. Rapazote-Flores, S. Kyriakidis, J. Russell, A. Druka, S. M. McKim und R. Waugh. **2017**. 'Barley SIX-ROWED SPIKE3 encodes a putative Jumonji C-type H3K9me2/me3 demethylase that represses lateral spikelet fertility', *Nat Commun*, 8: 936.
- Caldecott, K. W., C. K. McKeown, J. D. Tucker, S. Ljungquist und L. H. Thompson. **1994**. 'An Interaction between the Mammalian DNA Repair Protein XRCC1 and DNA Ligase III', *Molecular and Cellular Biology*, 14: 68-76.
- Camerlengo, F., A. Frittelli, C. Sparks, A. Doherty, D. Martignago, C. Larré, R. Lupi, F. Sestili und S. Masci. **2020**. 'CRISPR-Cas9 Multiplex Editing of the α -Amylase/Trypsin Inhibitor Genes to Reduce Allergen Proteins in Durum Wheat', *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4.
- Cao, R., L. Guo, M. Ma, W. Zhang, X. Liu und H. Zhao. **2019**. 'Identification and Functional Characterization of Squamosa Promoter Binding Protein-Like Gene TaSPL16 in Wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Front Plant Sci*, 10: 212.
- Cardon, G. H., S. Höhmann, K. Nettessheim, H. Saedler und P. Huijser. **1997**. 'Functional analysis of the Arabidopsis thaliana SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition', *The Plant Journal*, 12: 367-77.
- Cermak, T., S. J. Curtin, J. Gil-Humanes, R. Cegan, T. J. Y. Kono, E. Konecna, J. J. Belanto, C. G. Starker, J. W. Mathre, R. L. Greenstein und D. F. Voytas. **2017**. 'A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants', *Plant Cell*, 29: 1196-217.
- Chang, J.-Z., F.-X. Yan, L.-Y. Qiao, J. Zheng, F.-Y. Zhang und Q.-S. Liu. **2016**. 'Genome-wide identification and expression analysis of SBP-box gene family in Sorghum bicolor L', *Yi Chuan = Hereditas*, 38: 569-80.
- Charbonnel, C., M. E. Gallego und C. I. White. **2010**. 'Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in Arabidopsis plants', *The Plant Journal*, 64: 280-90.
- Chari, Raj, Nan Cher Yeo, Alejandro Chavez und George M. Church. **2017**. 'sgRNA Scorer 2.0: A Species-Independent Model To Predict CRISPR/Cas9 Activity', *ACS synthetic biology*, 6: 902-04.
- Chen, X., Z. Zhang, D. Liu, K. Zhang, A. Li und L. Mao. **2010**. 'SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development', *J Integr Plant Biol*, 52: 946-51.
- Chen, F., X. Ding, Y. Feng, T. Seebeck, Y. Jiang und G. D. Davis. **2017**. 'Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting', *Nat Commun*, 8: 14958.
- Chen, L., W. Li, L. Katin-Grazzini, J. Ding, X. Gu, Y. Li, T. Gu, R. Wang, X. Lin, Z. Deng, R. J. McAvoy, F. G. Gmitter, Jr., Z. Deng, Y. Zhao und Y. Li. **2018**. 'A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants', *Hortic Res*, 5: 13.
- Chen, Q., F. Tian, T. Cheng, J. Jiang, G. Zhu, Z. Gao, H. Lin, J. Hu, Q. Qian, X. Fang und F. Chen. **2022**. 'Translational repression of FZP mediated by CU-rich element/OsPTB interactions modulates panicle development in rice', *The Plant J*, 110: 1319-31.
- Cho, S. W., S. Kim, Y. Kim, J. Kweon, H. S. Kim, S. Bae und J. S. Kim. **2014**. 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases', *Genome Res*, 24: 132-41.
- Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove und D. F. Voytas. **2010**. 'Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases', *Genetics*, 186: 757-61.
- Chuck, G., M. Muszynski, E. Kellogg, S. Hake und R. J. Schmidt. **2002**. 'The Control of Spikelet Meristem Identity by the branched silkless1 Gene in Maize', *Science*, 298: 1238-41.
- Chuck, G. S., P. J. Brown, R. Meeley und S. Hake. **2014**. 'Maize SBP-box transcription factors unbranched2 and unbranched3 affect yield traits by regulating the rate of lateral primordia initiation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 18775-80.
- Colmsee, C., S. Beier, A. Himmelbach, T. Schmutzer, N. Stein, U. Scholz und M. Mascher. **2015**. 'BARLEX - the Barley Draft Genome Explorer', *Mol Plant*, 8: 964-6.
- Concordet, J. P. und M. Haeussler. **2018**. 'CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens', *Nucleic Acids Res*, 46: W242-W45.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini und F. Zhang. **2013**. 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339: 819-23.
- Cui, X., M. Balcerzak, J. Schernthaner, V. Babic, R. Datla, E. K. Brauer, N. Labbe, R. Subramaniam und T. Ouellet. **2019**. 'An optimised CRISPR/Cas9 protocol to create targeted mutations in homoeologous genes and an efficient genotyping protocol to identify edited events in wheat', *Plant Methods*, 15: 119.
- Curaba, J., M. Talbot, Z. Li und C. Helliwell. **2013**. 'Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley', *BMC Plant Biol*, 13.
- Daley, J. M. und T. E. Wilson. **2005**. 'Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length', *Mol Cell Biol*, 25: 896-906.
- De Vries, J. N. und J. Sybenga. **1984**. 'Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set', *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 92: 117-39.
- Debernardi, J. M., H. Lin, G. Chuck, J. D. Faris und J. Dubcovsky. **2017**. 'microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability', *Development*, 144: 1966-75.
- Debernardi, J. M., D. M. Tricoli, M. F. Ercoli, S. Hayta, P. Ronald, J. F. Palatnik und J. Dubcovsky. **2020**. 'A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants', *Nat Biotechnol*, 38: 1274-79.
- Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark und P. E. Hartman. **1966**. 'A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics', *Genetics*, 54: 61-76.
- Demirer, G. S., T. N. Silva, C. T. Jackson, J. B. Thomas, W. Ehrhardt D, S. Y. Rhee, J. C. Mortimer und M. P. Landry. **2021**. 'Nanotechnology to advance CRISPR-Cas genetic engineering of plants', *Nat Nanotechnol*, 16: 243-50.
- Derbyshire, P. und M. E. Byrne. **2013**. 'MORE SPIKELETS1 is required for spikelet fate in the inflorescence of Brachypodium', *Plant Physiol*, 161: 1291-302.
- Dixon, L. E., J. R. Greenwood, S. Bencivenga, P. Zhang, J. Cockram, G. Mellers, K. Ramm, C. Cavanagh, S. M. Swain und S. A. Boden. **2018**. 'TEOSINTE BRANCHED1 Regulates Inflorescence Architecture and Development in Bread Wheat (*Triticum aestivum*)', *Plant Cell*, 30: 563-81.

- Dobrovolskaya, O., P. Martinek, MS Röder und A Börner. **2008**. "Microsatellite mapping of a mutant gene (mrs) for multirow spike in wheat (*T. aestivum*)." In *Conf Proc Breeding*, 133-36.
- Dobrovolskaya, O., P. Martinek, A. V. Voylokov, V. Korzun, M. S. Roder und A. Borner. **2009**. 'Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*)', *Theor Appl Genet*, 119: 867-74.
- Dobrovolskaya, O., C. Pont, R. Sibout, P. Martinek, E. Badaeva, F. Murat, A. Chosson, N. Watanabe, E. Prat, N. Gautier, V. Gautier, C. Poncet, Y. L. Orlov, A. A. Krasnikov, H. Berges, E. Salina, L. Laikova und J. Salse. **2015**. 'FRIZZY PANICLE drives supernumerary spikelets in bread wheat', *Plant Physiol*, 167: 189-99.
- Dobrovolskaya, O. B., Y. Amagai, K. I. Popova, A. E. Dresvyannikova, P. Martinek, A. A. Krasnikov und N. Watanabe. **2017**. 'Genes WHEAT FRIZZY PANICLE and SHAM RAMIFICATION 2 independently regulate differentiation of floral meristems in wheat', *BMC Plant Biol*, 17: 252.
- Doench, J. G., E. Hartenian, D. B. Graham, Z. Tothova, M. Hegde, I. Smith, M. Sullender, B. L. Ebert, R. J. Xavier und D. E. Root. **2014**. 'Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation', *Nat Biotechnol*, 32: 1262-7.
- Doench, J. G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E. W. Vaimberg, K. F. Donovan, I. Smith, Z. Tothova, C. Wilen, R. Orchard, H. W. Virgin, J. Listgarten und D. E. Root. **2016**. 'Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9', *Nat Biotechnol*, 34: 184-91.
- Doudna, J. A. und E. Charpentier. **2014**. 'Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346: 1258096.
- Doyon, Y., J. M. McCammon, J. C. Miller, F. Faraji, C. Ngo, G. E. Katibah, R. Amora, T. D. Hocking, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov und S. L. Amacher. **2008**. 'Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases', *Nat Biotechnol*, 26: 702-8.
- Du, D., D. Zhang, J. Yuan, M. Feng, Z. Li, Z. Wang, Z. Zhang, X. Li, W. Ke, R. Li, Z. Chen, L. Chai, Z. Hu, W. Guo, J. Xing, Z. Su, H. Peng, M. Xin, Y. Yao, Q. Sun, J. Liu und Z. Ni. **2021**. 'FRIZZY PANICLE defines a regulatory hub for simultaneously controlling spikelet formation and awn elongation in bread wheat', *New Phytol*, 231: 814-33.
- Duan, E., Y. Wang, X. Li, Q. Lin, T. Zhang, Y. Wang, C. Zhou, H. Zhang, L. Jiang, J. Wang, C. Lei, X. Zhang, X. Guo, H. Wang und J. Wan. **2019**. 'OsSH11 Regulates Plant Architecture Through Modulating the Transcriptional Activity of IPA1 in Rice', *Plant Cell*, 31: 1026-42.
- Dvořák, J., P. di Terlizzi, H.-B. Zhang und P. Resta. **1993**. 'The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species', *Genome*, 36: 21-31.
- Eriksson, M., J. L. Moseley, S. Tottey, J. A. Del Campo, J. Quinn, Y. Kim und S. Merchant. **2004**. 'Genetic dissection of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes', *Genetics*, 168: 795-807.
- FAOSTAT Statistical. **2019**. 'Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]'. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/>.
- Fell, V. L. und C. Schild-Poulter. **2015**. 'The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond', *Mutat Res Rev Mutat Res*, 763: 15-29.
- Feng, N., G. Song, J. Guan, K. Chen, M. Jia, D. Huang, J. Wu, L. Zhang, X. Kong, S. Geng, J. Liu, A. Li und L. Mao. **2017**. 'Transcriptome Profiling of Wheat Inflorescence Development from Spikelet Initiation to Floral Patterning Identified Stage-Specific Regulatory Genes', *Plant Physiol*, 174: 1779-94.
- Ferrante, A., J. Cartelle, R. Savin und G. A. Slafer. **2017**. 'Yield determination, interplay between major components and yield stability in a traditional and a contemporary wheat across a wide range of environments', *Field Crops Research*, 203: 114-27.
- Fornara, F. und G. Coupland. **2009**. 'Plant phase transitions make a SPLash', *Cell*, 138: 625-7.
- Forster, B.P., R.P. Ellis, W.T.B. Thomas, A.C. Newton, R. Tuberosa, D. This, R.A. El-Enein, M.H. Bahri und M. Ben Salem. **2000**. 'The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley', *J Exp Bot*, 51: 19-27.
- Forster, B. P., J. D. Franckowiak, U. Lundqvist, J. Lyon, I. Pitkethly und W. T. Thomas. **2007**. 'The barley phytomer', *Ann Bot*, 100: 725-33.
- Franckowiak, J.D. und U. Lundqvist. **2010**. 'Rules for Nomenclature and Gene Symbolization in Barley', *Barley Genetics Newsletter*, 40: 178-82.
- Freisleben, R. und A. Lein. **1942**. 'Über die Auffindung einer mehltreueren Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen Linie von Sommergerste', *Die Naturwissenschaften*, 30: 608.
- Friend, D. J. C. **1965**. 'Ear length and spikelet number of wheat grown at different temperatures and light intensities', *Canadian Journal of Botany*, 43: 345-53.
- Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio und J. K. Joung. **2014**. 'Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs', *Nat Biotechnol*, 32: 279-84.
- Gandikota, M., R. P. Birkenbihl, S. Hohmann, G. H. Cardon, H. Saedler und P. Huijser. **2007**. 'The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings', *The Plant Journal*, 49: 683-93.
- Gao, H., J. Smith, M. Yang, S. Jones, V. Djukanovic, M. G. Nicholson, A. West, D. Bidney, S. C. Falco, D. Jantz und L. A. Lyznik. **2010**. 'Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease', *The Plant Journal*, 61: 176-87.
- Gao, Y. und Y. Zhao. **2014**. 'Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing', *J Integr Plant Biol*, 56: 343-9.
- Gao, Y., Y. Zhang, D. Zhang, X. Dai, M. Estelle und Y. Zhao. **2015**. 'Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2275-80.
- Garcia-Medel, P. L., N. Baruch-Torres, A. Peralta-Castro, C. H. Trasvina-Arenas, A. Torres-Larios und L. G. Brieba. **2019**. 'Plant organellar DNA polymerases repair double-stranded breaks by microhomology-mediated end-joining', *Nucleic Acids Res*, 47: 3028-44.
- Gasparis, S., M. Kala, M. Przyborowski, L. A. Lyznik, W. Orczyk und A. Nadolska-Orczyk. **2018**. 'A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.)', *Plant Methods*, 14: 111.
- Gasparis, S., M. Przyborowski, M. Kala und A. Nadolska-Orczyk. **2019**. 'Knockout of the HvCKX1 or HvCKX3 Gene in Barley (*Hordeum vulgare* L.) by RNA-Guided Cas9 Nuclease Affects the Regulation of Cytokinin Metabolism and Root Morphology', *Cells*, 8.
- Gaudelli, N. M., A. C. Komor, H. A. Rees, M. S. Packer, A. H. Badran, D. I. Bryson und D. R. Liu. **2017**. 'Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage', *Nature*, 551: 464-71.
- Gerasimova, S. V., A. M. Korotkova, C. Hertig, S. Hiekel, R. HOFFIE, N. Budhagatapalli, I. Otto, G. Hensel, V. K. Shumny, A. V. Kochetov, J. Kumlehn und E. K. Khlestkina. **2018**. 'Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease', *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 22: 1033-39.

- Gerasimova, S. V., C. Hertig, A. M. Korotkova, E. V. Kolosovskaya, I. Otto, S. Hiekel, A. V. Kochetov, E. K. Khlestkina und J. Kumlehn. **2020**. 'Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene', *BMC Plant Biol*, 20: 255.
- Gil-Humanes, J., Y. Wang, Z. Liang, Q. Shan, C. V. Ozuna, S. Sanchez-Leon, N. J. Baltes, C. Starker, F. Barro, C. Gao und D. F. Voytas. **2017**. 'High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9', *The Plant Journal*, 89: 1251-62.
- Gou, J. Y., F. F. Felippes, C. J. Liu, D. Weigel und J. W. Wang. **2011**. 'Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor', *Plant Cell*, 23: 1512-22.
- Gou, J., C. Fu, S. Liu, C. Tang, S. Debnath, A. Flanagan, Y. Ge, Y. Tang, Q. Jiang, P. R. Larson, J. Wen und Z. Y. Wang. **2017**. 'The miR156-SPL4 module predominantly regulates aerial axillary bud formation and controls shoot architecture', *New Phytol*, 216: 829-40.
- Graf, R., X. Li, V. T. Chu und K. Rajewsky. **2019**. 'sgRNA Sequence Motifs Blocking Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing', *Cell Rep*, 26: 1098-103 e3.
- Greenwood, J. R., E. J. Finnegan, N. Watanabe, B. Trevaskis und S. M. Swain. **2017**. 'New alleles of the wheat domestication gene Q reveal multiple roles in growth and reproductive development', *Development*, 144: 1959-65.
- Gruber, A. R., R. Lorenz, S. H. Bernhart, R. Neubock und I. L. Hofacker. **2008**. 'The Vienna RNA websuite', *Nucleic Acids Res*, 36: W70-4.
- Guo, Z. und T. Schnurbusch. **2015**. 'Variation of floret fertility in hexaploid wheat revealed by tiller removal', *J Exp Bot*, 66: 5945-58.
- Guo, Z., D. Chen, A. M. Alqudah, M. S. Roder, M. W. Ganai und T. Schnurbusch. **2017**. 'Genome-wide association analyses of 54 traits identified multiple loci for the determination of floret fertility in wheat', *New Phytol*, 214: 257-70.
- Guo, C., Y. Jiang, M. Shi, X. Wu und G. Wu. **2021**. 'ABI5 acts downstream of miR159 to delay vegetative phase change in Arabidopsis', *New Phytol*, 231: 339-50.
- Gupta, A. **2020**. 'Functional Analysis of Squamosa-Promoter Binding Protein Like 13 in Controlling Flowering Time, Plant Architecture, Grain Size, and Grain Number in Wheat', *Electronic Theses and Dissertations*, South Dakota State University.
- Gustafsson, A. und J. Mac Key. **1948**. 'The genetical effects of mustard gas substances and neutrons', *Hereditas*, 34: 371-86.
- Haeussler, M., K. Schonig, H. Eckert, A. Eschstruth, J. Mianne, J. B. Renaud, S. Schneider-Maunoury, A. Shkumatava, L. Teboul, J. Kent, J. S. Joly und J. P. Concordet. **2016**. 'Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR', *Genome Biol*, 17: 148.
- Hamada, H., Y. Liu, Y. Nagira, R. Miki, N. Taoka und R. Imai. **2018**. 'Biolicist-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat', *Sci Rep*, 8: 14422.
- Hawkesford, M. J., J.-L. Arous, R. Park, D. Calderini, D. Miralles, T. Shen, J. Zhang und M. A. J. Parry. **2013**. 'Prospects of doubling global wheat yields', *Food and Energy Security*, 2: 34-48.
- He, J., M. Xu, M. R. Willmann, K. McCormick, T. Hu, L. Yang, C. G. Starker, D. F. Voytas, B. C. Meyers und R. S. Poethig. **2018**. 'Threshold-dependent repression of SPL gene expression by miR156/miR157 controls vegetative phase change in Arabidopsis thaliana', *PLoS Genet*, 14: e1007337.
- He, T., C. B. Hill, T. T. Angessa, X. Q. Zhang, K. Chen, D. Moody, P. Telfer, S. Westcott und C. Li. **2019**. 'Gene-set association and epistatic analyses reveal complex gene interaction networks affecting flowering time in a worldwide barley collection', *J Exp Bot*, 70: 5603-16.
- Hensel, G., A. Himmelsbach, W. Chen, D. K. Douchkov und J. Kumlehn. **2011**. 'Transgene expression systems in the Triticeae cereals', *J Plant Physiol*, 168: 30-44.
- Hensel, G., C. Marthe und J. Kumlehn. **2017**. 'Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat Using Immature Embryos.' in Prem L. Bhalla und Mohan B. Singh (eds.), *Wheat Biotechnology: Methods and Protocols* (Springer New York: New York, NY).
- Hertig, C., M. Melzer, T. Rutten, S. Erbe, G. Hensel, J. Kumlehn, W. Weschke, H. Weber und J. Thiel. **2020**. 'Barley HISTIDINE KINASE 1 (HvHK1) coordinates transfer cell specification in the young endosperm', *The Plant Journal*, 103:1869-1884.
- Hiranniramol, K., Y. Chen, W. Liu und X. Wang. **2020**. 'Generalizable sgRNA design for improved CRISPR/Cas9 editing efficiency', *Bioinformatics*, 36: 2684-89.
- Hisano, H., R. E. HOFFIE, F. Abe, H. Munemori, T. Matsuura, M. Endo, M. Mikami, S. Nakamura, J. Kumlehn und K. Sato. **2022**. 'Regulation of germination by targeted mutagenesis of grain dormancy genes in barley', *Plant Biotechnol J*, 20: 37-46.
- Hoffie, R. E., I. Otto, D. Perovic, N. Budhagatapalli, A. Habekuss, F. Ordon und J. Kumlehn. **2021**. 'Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley', *Front Genome Ed*, 3: 784233.
- Hoffie, I., D. Daghma, M. Mirzakhmedov, S. Chamas, A. Egorova, I. Fontana, R. Hoffie, M. Ehrhardt, C. Marthe, H. Büchner, S. Hiekel und J. Kumlehn. **2023**. 'CasCADE: A modular and versatile vector system for Cas endonuclease-mediated genome modifications validated in mono- and dicotyledonous plants', *in preparation*
- Holme, I. B., T. Wendt, J. Gil-Humanes, L. C. Deleuran, C. G. Starker, D. F. Voytas und H. Brinch-Pedersen. **2017**. 'Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPhy_a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs', *Plant Mol Biol*, 95: 111-21.
- Holubova, K., G. Hensel, P. Vojta, P. Tarkowski, V. Bergougnoux und P. Galuszka. **2018**. 'Modification of Barley Plant Productivity Through Regulation of Cytokinin Content by Reverse-Genetics Approaches', *Front Plant Sci*, 9: 1676.
- Howells, R. M., M. Craze, S. Bowden und E. J. Wallington. **2018**. 'Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9', *BMC Plant Biol*, 18: 215.
- Hua, K., X. Tao, F. Yuan, D. Wang und J. K. Zhu. **2018**. 'Precise A.T to G.C Base Editing in the Rice Genome', *Mol Plant*, 11: 627-30.
- Hua, K., X. Tao, W. Liang, Z. Zhang, R. Gou und J. K. Zhu. **2020**. 'Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice', *Plant Biotechnol J*, 18: 770-78.
- Huang, X., Q. Qian, Z. Liu, H. Sun, S. He, D. Luo, G. Xia, C. Chu, J. Li und X. Fu. **2009**. 'Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice', *Nat Genet*, 41: 494-7.
- Huang, Y., S. Zhao, Y. Fu, H. Sun, X. Ma, L. Tan, F. Liu, X. Sun, H. Sun, P. Gu, D. Xie, C. Sun und Z. Zhu. **2018**. 'Variation in the regulatory region of FZP causes increases in secondary inflorescence branching and grain yield in rice domestication', *The Plant Journal*, 96: 716-33.
- Huang, X., Y. Wang, J. Xu und N. Wang. **2020**. 'Development of multiplex genome editing toolkit for citrus with high efficacy in biallelic and homozygous mutations', *Plant Mol Biol*, 104: 297-307.
- Huang, X., J. Hilscher, E. Stoger, P. Christou und C. Zhu. **2021**. 'Modification of cereal plant architecture by genome editing to improve yields', *Plant Cell Rep*, 40: 953-78.
- Huijser, P., J. Klein, W. E. Lönnig, H. Meijer, H. Saedler und H. Sommer. **1992**. 'Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene squamosa in *Antirrhinum majus*', *The EMBO Journal*, 11: 1239-49.

- IBSC International Barley Genome Sequencing, Consortium, K. F. Mayer, R. Waugh, J. W. Brown, A. Schulman, P. Langridge, M. Platzer, G. B. Fincher, G. J. Muehlbauer, K. Sato, T. J. Close, R. P. Wise und N. Stein. **2012**. 'A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome', *Nature*, 491: 711-6.
- Ismagul, A., G. Iskakova, J.C. Harris und S. Eliby. **2014**. 'Biostic Transformation of Wheat with Centropheoxine as a Synthetic Auxin.' in D. Fleury and R. Whitford (eds.), *Crop Breeding. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Humana Press: New York, NY).
- IWGSC International Wheat Genome Sequencing, Consortium, R. Appels, K. Eversole, C. Feuillet, B. Keller, J. Rogers, N. Stein, et al.. **2018**. 'Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome', *Science*, 361.
- Jeong, D. H., S. Park, J. Zhai, S. G. Gurazada, E. De Paoli, B. C. Meyers und P. J. Green. **2011**. 'Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage', *Plant Cell*, 23: 4185-207.
- Jia, Q., A. den Dulk-Ras, H. Shen, P. J. Hooykaas und S. de Pater. **2013**. 'Poly(ADP-ribose) polymerases are involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in Arabidopsis thaliana', *Plant Mol Biol*, 82: 339-51.
- Jia, H., V. Orbovic, J. B. Jones und N. Wang. **2016**. 'Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccDeltaphA4:dCsLOB1.3 infection', *Plant Biotechnol J*, 14: 1291-301.
- Jia, X. L., Y. K. Chen, X. Z. Xu, F. Shen, Q. B. Zheng, Z. Du, Y. Wang, T. Wu, X. F. Xu, Z. H. Han und X. Z. Zhang. **2017**. 'miR156 switches on vegetative phase change under the regulation of redox signals in apple seedlings', *Sci Rep*, 7: 14223.
- Jiao, Y., Y. Wang, D. Xue, J. Wang, M. Yan, G. Liu, G. Dong, D. Zeng, Z. Lu, X. Zhu, Q. Qian und J. Li. **2010**. 'Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice', *Nat Genet*, 42: 541-4.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna und E. Charpentier. **2012**. 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337: 816-21.
- Joberty, G., M. Falth-Savitski, M. Paulmann, M. Bosche, C. Doce, A. T. Cheng, G. Drewes und P. Grandi. **2020**. 'A Tandem Guide RNA-Based Strategy for Efficient CRISPR Gene Editing of Cell Populations with Low Heterogeneity of Edited Alleles', *CRISPR J*, 3: 123-34.
- Kapusi, E., M. Corcuera-Gomez, S. Melnik und E. Stoger. **2017**. 'Heritable Genomic Fragment Deletions and Small Indels in the Putative ENGase Gene Induced by CRISPR/Cas9 in Barley', *Front Plant Sci*, 8: 540.
- Kato, T. und A. Horibata. **2011**. 'A novel frameshift mutant allele, fzp-10, affecting the panicle architecture of rice', *Euphytica*, 184: 65-72.
- Kaya, H., M. Mikami, A. Endo, M. Endo und S. Toki. **2016**. 'Highly specific targeted mutagenesis in plants using Staphylococcus aureus Cas9', *Sci Rep*, 6: 26871.
- Kelliher, T., D. Starr, X. Su, G. Tang, Z. Chen, J. Carter, P. E. Wittich, S. Dong, J. Green, E. Burch, J. McCuiston, W. Gu, Y. Sun, T. Strebe, J. Roberts, N. J. Bate und Q. Que. **2019**. 'One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction', *Nature Biotechnology*, 37: 287-292.
- Kent, T., G. Chandramouly, S. M. McDevitt, A. Y. Ozdemir und R. T. Pomerantz. **2015**. 'Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase theta', *Nat Struct Mol Biol*, 22: 230-7.
- Kim, Y. G., J. Cha und S. Chandrasegaran. **1996**. 'Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1156-60.
- Kim, D., B. Alptekin und H. Budak. **2018**. 'CRISPR/Cas9 genome editing in wheat', *Funct Integr Genomics*, 18: 31-41.
- Kim, S. Y., T. Bengtsson, N. Olsson, V. Hot, L. H. Zhu und I. Ahman. **2020**. 'Mutations in Two Aphid-Regulated beta-1,3-Glucanase Genes by CRISPR/Cas9 Do Not Increase Barley Resistance to Rhopalosiphum padi L', *Front Plant Sci*, 11: 1043.
- Kippes, N., J. Zhu, A. Chen, L. Vanzetti, A. Lukaszewski, H. Nishida, K. Kato, J. Dvorak und J. Dubcovsky. **2014**. 'Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene VRN-D4 in hexaploid wheat', *Mol Genet Genomics*, 289: 47-62.
- Kippes, N., M. Guedira, L. Lin, M. A. Alvarez, G. L. Brown-Guedira und J. Dubcovsky. **2018**. 'Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of VRN-A1 first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat', *Mol Genet Genomics*, 293: 1231-43.
- Kirby, E. J. M. und M. Appleyard. **1987**. *Cereal Development Guide (NAC Cereal Unit: Stoneleigh, Kenilworth, UK)*.
- Kirby, E. J. M. **2002**. 'Botany of the wheat plant', in *FAO Plant Production and Protection Series BREAD WHEAT, Improvement and Production*, edited by B.C. Curtis, S. Rajaram und H. Gómez Macpherson, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <https://www.fao.org/3/Y4011e/y4011e00.htm>, Datum: 15.06.2022
- Kiseleva, A. A. und E. A. Salina. **2018**. 'Genetic Regulation of Common Wheat Heading Time', *Russian Journal of Genetics*, 54: 375-88.
- Klein, J., H. Saedler und P. Huijser. **1996**. 'A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the Antirrhinum majus floral meristem identity gene SQUAMOSA', *Molecular and General Genetics*, 250: 7-16.
- Klindworth, D. L., N. D. Williams und L. R. Joppa. **1990a**. 'Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross', *Genome*, 33: 509-14.
- Klindworth, D. L., N. D. Williams und L. R. Joppa. **1990b**. 'Chromosomal location of genes for supernumerary spikelet in tetraploid wheat', *Genome*, 33: 515-20.
- Klindworth, D. L., M. M. Klindworth und N. D. Williams. **1997**. 'Telosomic Mapping of Four Genetic Markers in Durum Wheat', *Journal of Heredity*, 88: 229-32.
- Klukas, C., D. Chen und J. M. Pape. **2014**. 'Integrated Analysis Platform: An Open-Source Information System for High-Throughput Plant Phenotyping', *Plant Physiol*, 165: 506-18.
- Koepfel, I., C. Hertig, R. Hoffie und J. Kumlehn. **2019**. 'Cas Endonuclease Technology-A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering', *Int J Mol Sci*, 20.
- Komatsu, M., A. Chujo, Y. Nagato, K. Shimamoto und J. Kyojuka. **2003**. 'FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets', *Development*, 130: 3841-50.
- Komatsuda, T., M. Pourkheirandish, Congfen He, P. Azhaguvel, H. Kanamori, D. Perovic, N. Stein, A. Graner, T. Wicker, A. Tagiri, U. Lundqvist, T. Fujimura, M. Matsuoka, T. Matsumoto und M. Yano. **2007**. 'Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 1424-29.
- Koppolu, R., N. Anwar, S. Sakuma, A. Tagiri, U. Lundqvist, M. Pourkheirandish, T. Rutten, C. Seiler, A. Himmelbach, R. Ariyadasa, H. M. Youssef, N. Stein, N. Sreenivasulu, T. Komatsuda und T. Schnurbusch. **2013**. 'Six-rowed spike4 (Vrs4) controls spikelet determinacy and row-type in barley', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 13198-203.

- Koppolu, R. und T. Schnurbusch. **2019**. 'Developmental pathways for shaping spike inflorescence architecture in barley and wheat', *J Integr Plant Biol*, 61: 278-95.
- Kouranova, E., K. Forbes, G. Zhao, J. Warren, A. Bartels, Y. Wu und X. Cui. **2016**. 'CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos', *Hum Gene Ther*, 27: 464-75.
- Kropat, J., S. Tottey, R. P. Birkenbihl, N. Depège, P. Huijser und S. Merchant. **2005**. 'A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 18730-35.
- Kumar, A., K. N. Yogendra, S. Karre, A. C. Kushalappa, Y. Dion und T. M. Choo. **2016**. 'WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets', *J Exp Bot*, 67: 4127-39.
- Kumar, N., M. Galli, J. Ordon, J. Stuttmann, K. H. Kogel und J. Imani. **2018**. 'Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system', *Plant Biotechnol J*, 16: 1892-903.
- Kumlehn, J., J. Pietralla, G. Hensel, M. Pacher und H. Puchta. **2018**. 'The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology', *J Integr Plant Biol*, 60: 1127-53.
- L'Obel, M. de. **1591**. "Icones stirpium seu plantarum tam exoticarum quam indigenarum, In gratiam rei herbariae studiosorum in duas partes digestae. Cum septem linguarum Indicibus, ad diuersarum nationum usum / [uti a Mathia Lobelio] ; [tomus primus]." In, 1-816. Antuerpiae: Antuerpiae : Ex officina Plantiniana. Apud Viduam et Ioannem Moretum.
- Lännpää, M., I. Jänönen, M. Hölttä-Vuori, M. Gardemeister, I. Poralı und T. Sapanen. **2004**. 'A new SBP-box gene BpSPL1 in silver birch (*Betula pendula*)', *Physiologia Plantarum*, 120: 491-500.
- Lassalle, F., T. Campillo, L. Vial, J. Baude, D. Costechareyre, D. Chapulliot, M. Shams, D. Abrouk, C. Lavire, C. Oger-Desfeux, F. Hommais, L. guéguen, V. Daubin, D. Muller und X. Nesme. **2011**. 'Genomic Species Are Ecological Species as Revealed by Comparative Genomics in *Agrobacterium tumefaciens*', *Genome Biol. Evol.*, 3: 762-81.
- Lawrenson, T., O. Shorinola, N. Stacey, C. Li, L. Ostergaard, N. Patron, C. Uauy und W. Harwood. **2015**. 'Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease', *Genome Biol*, 16: 258.
- Lazo, G. R., P. A. Stein und R. A. Ludwig. **1991**. 'A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*', *Biotechnology (N.Y.)*, 9: 963-67.
- LeBlanc, C., F. Zhang, J. Mendez, Y. Lozano, K. Chatpar, V. F. Irish und Y. Jacob. **2018**. 'Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress', *Plant J*, 93: 377-86.
- Lee, Jae Hoon, Hyo Jun Won, Phuong Hoang Nguyen Tran, Sun-mi Lee, Ho-Youn Kim und Je Hyeong Jung. **2021**. 'Improving lignocellulosic biofuel production by CRISPR/Cas9-mediated lignin modification in barley', *GCB Bioenergy*, 13: 742-52.
- Lei, Y., L. Lu, H. Y. Liu, S. Li, F. Xing und L. L. Chen. **2014**. 'CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants', *Mol Plant*, 7: 1494-96.
- Li, C. und S. Lu. **2014**. 'Molecular characterization of the SPL gene family in *Populus trichocarpa*', *BMC Plant Biol*, 14.
- Li, M., X. Li, Z. Zhou, P. Wu, M. Fang, X. Pan, Q. Lin, W. Luo, G. Wu und H. Li. **2016**. 'Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System', *Front Plant Sci*, 7: 377.
- Li, C., Y. Zong, Y. Wang, S. Jin, D. Zhang, Q. Song, R. Zhang und C. Gao. **2018a**. 'Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion', *Genome Biol*, 19: 59.
- Li, T., X. Yang, Y. Yu, X. Si, X. Zhai, H. Zhang, W. Dong, C. Gao und C. Xu. **2018b**. 'Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing', *Nature Biotechnology*, 36: 1160-1163.
- Li, M., G. Hensel, M. Mascher, M. Melzer, N. Budhagatapalli, T. Rutten, A. Himmelbach, S. Beier, V. Korzun, J. Kumlehn, T. Borner und N. Stein. **2019**. 'Leaf Variegation and Impaired Chloroplast Development Caused by a Truncated CCT Domain Gene in albobstrians Barley', *Plant Cell*, 31: 1430-45.
- Li, L., F. Shi, Y. Wang, X. Yu, J. Zhi, Y. Guan, H. Zhao, J. Chang, M. Chen, G. Yang, Y. Wang und G. He. **2020a**. 'TaSPL13 regulates inflorescence architecture and development in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Plant Sci*, 296: 110516.
- Li, J., Z. Wang, G. He, L. Ma und X. W. Deng. **2020b**. 'CRISPR/Cas9-mediated disruption of *TaNP1* genes results in complete male sterility in bread wheat', *J Genet Genomics*, 47: 263-72.
- Li, J., G. Jiao, Y. Sun, J. Chen, Y. Zhong, L. Yan, D. Jiang, Y. Ma und L. Xia. **2021a**. 'Modification of starch composition, structure and properties through editing of *TaSBEIIa* in both winter and spring wheat varieties by CRISPR/Cas9', *Plant Biotechnol J*, 19: 937-51.
- Li, Y., L. Li, M. Zhao, L. Guo, X. Guo, D. Zhao, A. Batool, B. Dong, H. Xu, S. Cui, A. Zhang, X. Fu, J. Li, R. Jing und X. Liu. **2021b**. 'Wheat *FRIZZY PANICLE* activates *VERNALIZATION1-A* and *HOMEBOX4-A* to regulate spike development in wheat', *Plant Biotechnol J*, 19: 1141-54.
- Li, M., G. Hensel, M. Melzer, A. Junker, H. Tschiersch, H. Ruwe, D. Arend, J. Kumlehn, T. Borner und N. Stein. **2021c**. 'Mutation of the ALBOBSTRIANS Ohnologous Gene *HvCMF3* Impairs Chloroplast Development and Thylakoid Architecture in Barley', *Front Plant Sci*, 12: 732608.
- Lian, L., H. Xu, H. Zhang, W. He, Q. Cai, Y. Lin, L. Wei, L. Pan, X. Xie, Y. Zheng, Y. Wei, Y. Zhu, H. Xie und J. Zhang. **2020**. 'Overexpression of *OsSPL14* results in transcriptome and physiology changes in indica rice 'MH86'', *Plant Growth Regulation*, 90: 265-78.
- Liang, G., H. Zhang, D. Lou und D. Yu. **2016**. 'Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing', *Sci Rep*, 6: 21451.
- Liang, Z., K. Chen, T. Li, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Zhao, J. Liu, H. Zhang, C. Liu, Y. Ran und C. Gao. **2017**. 'Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes', *Nat Commun*, 8: 14261.
- Liang, Z., K. Chen, Y. Yan, Y. Zhang und C. Gao. **2018**. 'Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes', *Plant Biotechnol J*, 16: 2053-62.
- Lin, Q., Z. Zhu, G. Liu, C. Sun, D. Lin, C. Xue, S. Li, D. Zhang, C. Gao, Y. Wang und J.-L. Qiu. **2021**. 'Genome editing in plants with *MAD7* nuclease', *J Gen Gen*, 48: 444-51.
- Lippmann, R., S. Friedel, H.-P. Mock und J. Kumlehn. **2015**. 'The low molecular weight fraction of compounds released from immature wheat pistils supports barley pollen embryogenesis', *Front. Plant Sci.*, 6: 498.
- Liu, Q., G. Shen, K. Peng, Z. Huang, J. Tong, M. H. Kabir, J. Wang, J. Zhang, G. Qin und L. Xiao. **2015**. 'The alteration in the architecture of a T-DNA insertion rice mutant *osmtd1* is caused by up-regulation of *MicroRNA156f*', *J Integr Plant Biol*, 57: 819-29.

- Liu, Q., N. P. Harberd und X. Fu. **2016**. 'SQUAMOSA Promoter Binding Protein-like Transcription Factors: Targets for Improving Cereal Grain Yield', *Mol Plant*, 9: 765-7.
- Liu, X., S. Wu, J. Xu, C. Sui und J. Wei. **2017a**. 'Application of CRISPR/Cas9 in plant biology', *Acta Pharm Sin B*, 7: 292-302.
- Liu, H., Y. Ding, Y. Zhou, W. Jin, K. Xie und L.-L. Chen. **2017b**. 'CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants', *Molecular Plant*, 10: 530-32.
- Liu, M., Z. Shi, X. Zhang, M. Wang, L. Zhang, K. Zheng, J. Liu, X. Hu, C. Di, Q. Qian, Z. He und D. L. Yang. **2019a**. 'Inducible overexpression of Ideal Plant Architecture1 improves both yield and disease resistance in rice', *Nat Plants*, 5: 389-400.
- Liu, K., J. Cao, K. Yu, X. Liu, Y. Gao, Q. Chen, W. Zhang, H. Peng, J. Du, M. Xin, Z. Hu, W. Guo, V. Rossi, Z. Ni, Q. Sun und Y. Yao. **2019b**. 'Wheat TaSPL8 Modulates Leaf Angle Through Auxin and Brassinosteroid Signaling', *Plant Physiol*, 181: 179-94.
- Liu, Y., Y. Gao, Y. Gao und Q. Zhang. **2019c**. 'Targeted deletion of floral development genes in Arabidopsis with CRISPR/Cas9 using the RNA endoribonuclease Csy4 processing system', *Hortic Res*, 6: 99.
- Liu, H., K. Wang, Z. Jia, Q. Gong, Z. Lin, L. Du, X. Pei und X. Ye. **2020**. 'Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of TaMTL using an optimized Agrobacterium-mediated CRISPR system', *J Exp Bot*, 71: 1337-49.
- Liu, Y., W. Luo, Q. Linghu, F. Abe, H. Hisano, K. Sato, Y. Kamiya, K. Kawaura, K. Onishi, M. Endo, S. Toki, H. Hamada, Y. Nagira, N. Taoka und R. Imai. **2021**. 'In planta Genome Editing in Commercial Wheat Varieties', *Front Plant Sci*, 12: 648841.
- Lorenz, R., S. H. Bernhart, C. Höner zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P. F. Stadler und I. L. Hofacker. **2011**. 'ViennaRNA Package 2.0', *Algorithms for Molecular Biology*, 6.
- Lowder, L. G., D. Zhang, N. J. Baltus, J. W. Paul, 3rd, X. Tang, X. Zheng, D. F. Voytas, T. F. Hsieh, Y. Zhang und Y. Qi. **2015**. 'A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation', *Plant Physiol*, 169: 971-85.
- Lu, Z., H. Yu, G. Xiong, J. Wang, Y. Jiao, G. Liu, Y. Jing, X. Meng, X. Hu, Q. Qian, X. Fu, Y. Wang und J. Li. **2013**. 'Genome-wide binding analysis of the transcription activator ideal plant architecture1 reveals a complex network regulating rice plant architecture', *Plant Cell*, 25: 3743-59.
- Lu, Y. und J. K. Zhu. **2017**. 'Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System', *Mol Plant*, 10: 523-25.
- Luo, L., W. Li, K. Miura, M. Ashikari und J. Kozuka. **2012**. 'Control of tiller growth of rice by OsSPL14 and Strigolactones, which work in two independent pathways', *Plant Cell Physiol*, 53: 1793-801.
- Ma, Y., L. Zhang und X. Huang. **2014**. 'Genome modification by CRISPR/Cas9', *FEBS J*, 281: 5186-93.
- Ma, X., Q. Zhang, Q. Zhu, W. Liu, Y. Chen, R. Qiu, B. Wang, Z. Yang, H. Li, Y. Lin, Y. Xie, R. Shen, S. Chen, Z. Wang, Y. Chen, J. Guo, L. Chen, X. Zhao, Z. Dong und Y. G. Liu. **2015**. 'A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants', *Mol Plant*, 8: 1274-84.
- Manning, K., M. Tor, M. Poole, Y. Hong, A. J. Thompson, G. J. King, J. J. Giovannoni und G. B. Seymour. **2006**. 'A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening', *Nat Genet*, 38: 948-52.
- Mansfeld, R. **1950**. 'Das morphologische System der Saatgerste, *Hordeum vulgare* L. s. l.', *Der Züchter*, 20: 8-24.
- Manuela, D. und M. Xu. **2020**. 'Juvenile Leaves or Adult Leaves: Determinants for Vegetative Phase Change in Flowering Plants', *Int J Mol Sci*, 21.
- Marthe, C., J. Kumlehn und G. Hensel. **2015**. 'Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using immature embryos', *Methods Mol Biol*, 1223: 71-83.
- Mascher, M., H. Gundlach, A. Himmelbach, S. Beier, S. O. Twardziok, T. Wicker, V. Radchuk, C. Dockter, P. E. Hedley, J. Russell, M. Bayer, L. et al. **2017**. 'A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome', *Nature*, 544: 427-33.
- Mascher, M., T. Wicker, J. Jenkins, C. Plott, T. Lux, C. S. Koh, J. Ens, H. Gundlach, L. B. Boston, Z. Tulpova, S. Holden, I. Hernandez-Pinzon, U. Scholz, K. F. X. Mayer, M. Spannagl, C. J. Pozniak, A. G. Sharpe, H. Simkova, M. J. Moscou, J. Grimwood, J. Schmutz und N. Stein. **2021**. 'Long-read sequence assembly: a technical evaluation in barley', *Plant Cell*.
- McIntosh, R.A., Y. Yamazaki, J. Dubcovsky, J. Rogers, C. Morris, R. Appels und X.C. Xia. **2013**. "Catalogue of Gene Symbols for Wheat." In 12th International Wheat Genetics Symposium. Yokohama, Japan.
- McMaster, G. S. **1997**. 'Phenology, development, and growth of the wheat (*Triticum aestivum* L.) shoot apex: a review', *Advances in agronomy*, 59: 63-118.
- Michalski, K., C. Hertig, D. R. Mankowski, J. Kumlehn, J. Zimny und A. M. Linkiewicz. **2021**. 'Functional Validation of cas9/guideRNA Constructs for Site-Directed Mutagenesis of *Triticale* ABA8'OH1 loci', *Int J Mol Sci*, 22.
- Milner, S. G., M. Jost, S. Taketa, E. R. Mazon, A. Himmelbach, M. Oppermann, S. Weise, H. Knupffer, M. Basterrechea, P. König, D. Schuler, et al.. **2019**. 'Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection', *Nat Genet*, 51: 319-26.
- Minakuchi, K., H. Kameoka, N. Yasuno, M. Umehara, L. Luo, K. Kobayashi, A. Hanada, K. Ueno, T. Asami, S. Yamaguchi und J. Kozuka. **2010**. 'FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice', *Plant Cell Physiol*, 51: 1127-35.
- Miura, K., M. Ikeda, A. Matsubara, X. J. Song, M. Ito, K. Asano, M. Matsuoka, H. Kitano und M. Ashikari. **2010**. 'OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice', *Nat Genet*, 42: 545-9.
- Monat, C., S. Padmarasu, T. Lux, T. Wicker, H. Gundlach, A. Himmelbach, J. Ens, C. Li, G. J. Muehlbauer, A. H. Schulman, R. Waugh, I. Braumann, C. Pozniak, U. Scholz, K. F. X. Mayer, M. Spannagl, N. Stein und M. Mascher. **2019**. 'TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of *Triticeae* genomes with open-source tools', *Genome Biology*, 20: 284
- Moreno, M. A., L. C. Harper, R. W. Krueger, S. L. Dellaporta und M. Freeling. **1997**. 'liguleless1 encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis', *Genes & Dev.*, 11: 616-28.
- Moreno-Mateos, M. A., C. E. Vejnar, J. D. Beaudoin, J. P. Fernandez, E. K. Mis, M. K. Khokha und A. J. Giraldez. **2015**. 'CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo', *Nat Methods*, 12: 982-8.
- Muller, H. J. **1927**. 'Artificial transmutation of the gene', *Science*, 66: 84-87.
- Naim, F., K. Shand, S. Hayashi, M. O'Brien, J. McGree, A. A. T. Johnson, B. Dugdale und P. M. Waterhouse. **2020**. 'Are the current gRNA ranking prediction algorithms useful for genome editing in plants?', *PLoS One*, 15: e0227994.
- Narisetti, N., M. Henke, C. Seiler, R. Shi, A. Junker, T. Altmann und E. Gladiiun. **2019**. 'Semi-automated Root Image Analysis (saRIA)', *Sci Rep*, 9: 19674.
- Nesbitt, M. und D. Samuel. **1995**. "From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats." In *Hulled wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 4. Proceedings of the First International Workshop on Hulled

- Wheats, edited by S. Padulosi, K. Hammer and J. Heller. Castelvécchio Pascoli, Tuscany, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Nishimasu, H., X. Shi, S. Ishiguro, L. Gao, S. Hirano, S. Okazaki, T. Noda, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, H. Mori, S. Oura, B. Holmes, M. Tanaka, M. Seki, H. Hirano, H. Aburatani, R. Ishitani, M. Ikawa, N. Yachie, F. Zhang und O. Nureki. **2018**. 'Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space', *Science*, 361: 1259-62.
- Okada, A., T. Arndell, N. Borisjuk, N. Sharma, N. S. Watson-Haigh, E. J. Tucker, U. Baumann, P. Langridge und R. Whitford. **2019**. 'CRISPR/Cas9-mediated knockout of Ms1 enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production', *Plant Biotechnol J*, 17: 1905-13.
- Osakabe, Y., T. Watanabe, S. S. Sugano, R. Ueta, R. Ishihara, K. Shinozaki und K. Osakabe. **2016**. 'Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants', *Sci Rep*, 6: 26685.
- Osman, K., J. D. Higgins, E. Sanchez-Moran, S. J. Armstrong und F. C. Franklin. **2011**. 'Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*', *New Phytol*, 190: 523-44.
- Otto, I., A. Müller und J. Kümlehn. **2015**. 'Barley (*Hordeum vulgare* L.) Transformation Using Embryogenic Pollen Cultures.', *Methods Mol Biol*, 1223: 85-99.
- Pacher, M. und H. Puchta. **2017**. 'From classical mutagenesis to nuclease-based breeding – directing natural DNA repair for a natural end-product', *The Plant Journal*, 90: 819-833.
- Pallotta, M. A., R. D. Graham, P. Langridge, D. H. B. Sparrow und S. J. Barker. **2000**. 'RFLP mapping of manganese efficiency in barley', *Theor Appl Genet*, 101: 1100-08.
- Park, J., S. Bae und J.-S. Kim. **2015**. 'Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites', *Bioinformatics*, 31: 4014-16.
- Pauwels, K., N. Podevin, D. Breyer, D. Carroll und P. Herman. **2014**. 'Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations', *New Biotechnology*, 31: 18-27.
- Pedelaçq, J. D., S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger und G. S. Waldo. **2006**. 'Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein', *Nat Biotechnol*, 24: 79-88.
- Peng, A., S. Chen, T. Lei, L. Xu, Y. He, L. Wu, L. Yao und X. Zou. **2017**. 'Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus', *Plant Biotechnol J*, 15: 1509-19.
- Plessis, A., A. Perrin, J. E. Haber und B. Dujon. **1992**. 'Sitespecific Recombination Determined by I-SceI, a Mitochondrial Group I Intron-Encoded Endonuclease Expressed in the Yeast Nucleus', *Genetics*, 130: 451-60.
- Poursarebani, N., T. Seidensticker, R. Koppolu, C. Trautewig, P. Gawronski, F. Bini, G. Govind, T. Rutten, S. Sakuma, A. Tagiri, G. M. Wolde, et al.. **2015**. 'The Genetic Basis of Composite Spike Form in Barley and 'Miracle-Wheat'', *Genetics*, 201: 155-65.
- Preston, J. C., S. A. Jorgensen, R. Orozco und L. C. Hileman. **2016**. 'Paralogous SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes differentially regulate leaf initiation and reproductive phase change in petunia', *Planta*, 243: 429-40.
- Puchta, H. **2005**. 'The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution', *J Exp Bot*, 56: 1-14.
- Puchta, H. und F. Fauser. **2014**. 'Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future', *The Plant Journal*, 78: 727-41.
- Raffan, S., C. Sparks, A. Huttly, L. Hyde, D. Martignago, A. Mead, S. J. Hanley, P. A. Wilkinson, G. Barker, K. J. Edwards, T. Y. Curtis, S. Usher, O. Kosik und N. G. Halford. **2021**. 'Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene TaASN2', *Plant Biotechnol J*.
- Ramirez-Gonzalez, R. H., P. Borrill, D. Lang, S. A. Harrington, J. Brinton, L. Venturini, M. Davey, J. Jacobs, F. van Ex, A. Pasha, Y. Khedikar, S. J. Robinson, et al.. **2018**. 'The transcriptional landscape of polyploid wheat', *Science*, 361.
- Ramsay, L., J. Comadran, A. Druka, D. F. Marshall, W. T. Thomas, M. Macaulay, K. MacKenzie, C. Simpson, J. Fuller, N. Bonar, P. M. Hayes, U. Lundqvist, J. D. Franckowiak, T. J. Close, G. J. Muehlbauer und R. Waugh. **2011**. 'INTERMEDIUM-C, a modifier of lateral spikelet fertility in barley, is an ortholog of the maize domestication gene TEOSINTE BRANCHED 1', *Nat Genet*, 43: 169-72.
- Rawson, H. M. **1971**. 'An upper limit for spikelet number per ear in wheat as controlled by photoperiod', *Australian Journal of Agricultural Research*, 22: 537-46.
- Rawson, H. M. und R. A. Richards. **1993**. 'Effects of high temperature and photoperiod on floral development in wheat isolines differing in vernalisation and photoperiod genes', *Field Crops Research*, 32: 181-92.
- Ray, D. K., N. D. Mueller, P. C. West und J. A. Foley. **2013**. 'Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050', *PLoS One*, 8: e66428.
- Ren, X., Z. Yang, J. Xu, J. Sun, D. Mao, Y. Hu, S. J. Yang, H. H. Qiao, X. Wang, Q. Hu, P. Deng, L. P. Liu, J. Y. Ji, J. B. Li und J. Q. Ni. **2014**. 'Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*', *Cell Rep*, 9: 1151-62.
- Ren, B., F. Yan, Y. Kuang, N. Li, D. Zhang, X. Zhou, H. Lin und H. Zhou. **2018a**. 'Improved Base Editor for Efficiently Inducing Genetic Variations in Rice with CRISPR/Cas9-Guided Hyperactive hAID Mutant', *Mol Plant*, 11: 623-26.
- Ren, D., J. Hu, Q. Xu, Y. Cui, Y. Zhang, T. Zhou, Y. Rao, D. Xue, D. Zeng, G. Zhang, Z. Gao, L. Zhu, L. Shen, G. Chen, L. Guo und Q. Qian. **2018b**. 'FZP determines grain size and sterile lemma fate in rice', *Journal of Experimental Botany*, 69: 4853-66.
- Reuter, J.S. und D.H. Mathews. **2010**. 'RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis', *BMC Bioinformatics*, 11.
- Rey, M. D., A. C. Martin, M. Smedley, S. Hayta, W. Harwood, P. Shaw und G. Moore. **2018**. 'Magnesium Increases Homoeologous Crossover Frequency During Meiosis in ZIP4 (Ph1 Gene) Mutant Wheat-Wild Relative Hybrids', *Front Plant Sci*, 9: 509.
- Roberts, R. J., M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. A. Bickle, J. Bitinaite, R. M. Blumenthal, SKh Degtyarev, D. T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, et al. **2003**. 'A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes', *Nucleic Acids Res*, 31: 1805-12.
- Ronald, P. **2011**. 'Plant genetics, sustainable agriculture and global food security', *Genetics*, 188: 11-20.
- Royo, C., F. Álvaro, V. Martos, A. Ramdani, J. Isidro, D. Villegas und L. F. García del Moral. **2006**. 'Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century', *Euphytica*, 155: 259-70.
- Ruban, A. S. und E. D. Badaeva. **2018**. 'Evolution of the S-Genomes in Triticum-Aegilops Alliance: Evidences From Chromosome Analysis', *Front Plant Sci*, 9: 1756.
- Rutledge, R. G. und C. Cote. **2003**. 'Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves', *Nucleic Acids Res*, 31: e93.

- Sakuma, S., G. Golan, Z. Guo, T. Ogawa, A. Tagiri, K. Sugimoto, N. Bernhardt, J. Brassac, M. Mascher, G. Hensel, S. Ohnishi, H. Jinno, Y. Yamashita, I. Ayalon, Z. Peleg, T. Schnurbusch und T. Komatsuda. **2019**. 'Unleashing floret fertility in wheat through the mutation of a homeobox gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 5182-87.
- Sakuma, S. und T. Schnurbusch. **2020**. 'Of floral fortune: tinkering with the grain yield potential of cereal crops', *New Phytol*, 225: 1873-82.
- Salomon, S. und H. Puchta. **1998**. 'Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells', *The EMBO Journal*, 17: 6086-95.
- Sanchez-Garcia, M., C. Royo, N. Aparicio, J. A. Martin-Sanchez und F. Alvaro. **2013**. 'Genetic improvement of bread wheat yield and associated traits in Spain during the 20th century', *J Agric Sci*, 151: 105-18.
- Sanchez-Leon, S., J. Gil-Humanes, C. V. Ozuna, M. J. Gimenez, C. Sousa, D. F. Voytas und F. Barro. **2018**. 'Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9', *Plant Biotechnol J*, 16: 902-10.
- Sapehin, A. A. **1930**. 'Röntgen-Mutationen beim Weizen (*Triticum vulgare*)', *Züchter*, 2:257-259.
- Schmittgen, T. D. und K. J. Livak. **2008**. 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nat Protoc*, 3: 1101-8.
- Schwarz, S., A. V. Grande, N. Bujdoso, H. Saedler und P. Huijser. **2008**. 'The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*', *Plant Mol Biol*, 67: 183-95.
- Serrago, R. A., I. Alzueta, R. Savin und G. A. Slafer. **2013**. 'Understanding grain yield responses to source-sink ratios during grain filling in wheat and barley under contrasting environments', *Field Crops Research*, 150: 42-51.
- Shahinnia, F., A. Druka, J. Franckowiak, M. Morgante, R. Waugh und N. Stein. **2012**. 'High resolution mapping of Dense spike-ar (*dsp.ar*) to the genetic centromere of barley chromosome 7H', *Theor Appl Genet*, 124: 373-84.
- Shan, Q., Y. Wang, J. Li, Y. Zhang, K. Chen, Z. Liang, K. Zhang, J. Liu, J. J. Xi, J. L. Qiu und C. Gao. **2013**. 'Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system', *Nat Biotechnol*, 31: 686-88.
- Shan, Q., Y. Wang, J. Li und C. Gao. **2014**. 'Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system', *Nat Protoc*, 9: 2395-410.
- Sharman, B. C. **1944**. 'Branched Heads in Wheat and Wheat Hybrids', *Nature*, 153: 497-98.
- Shikata, M., T. Koyama, N. Mitsuda und M. Ohme-Takagi. **2009**. '*Arabidopsis* SBP-box genes SPL10, SPL11 and SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase', *Plant Cell Physiol*, 50: 2133-45.
- Shimatani, Z., S. Kashojiya, M. Takayama, R. Terada, T. Arazoe, H. Ishii, H. Teramura, T. Yamamoto, H. Komatsu, K. Miura, H. Ezura, K. Nishida, T. Ariizumi und A. Kondo. **2017**. 'Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion', *Nat Biotechnol*, 35: 441-43.
- Shukla, V. K., Y. Doyon, J. C. Miller, R. C. DeKaveler, E. A. Moehle, S. E. Worden, J. C. Mitchell, N. L. Arnold, S. Gopalan, X. Meng, V. M. Choi, J. M. Rock, Y. Y. Wu, G. E. Katibah, G. Zhifang, D. McCaskill, M. A. Simpson, B. Blakeslee, S. A. Greenwalt, H. J. Butler, S. J. Hinkley, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory und F. D. Urnov. **2009**. 'Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases', *Nature*, 459: 437-41.
- Si, L., J. Chen, X. Huang, H. Gong, J. Luo, Q. Hou, T. Zhou, T. Lu, J. Zhu, Y. Shanguan, E. Chen, C. Gong, Q. Zhao, Y. Jing, Y. Zhao, Y. Li, L. Cui, D. Fan, Y. Lu, Q. Weng, Y. Wang, Q. Zhan, K. Liu, X. Wei, K. An, G. An und B. Han. **2016**. 'OsSPL13 controls grain size in cultivated rice', *Nat Genet*, 48: 447-56.
- Siebert, R. und H. Puchta. **2002**. 'Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome', *Plant Cell*, 14: 1121-31.
- Sigurbjornsson, B. und A. Micke. **1969**. 'Progress in Mutation Breeding', *Induced Mutations in Plants*. Vienna International Atomic Energy Agency: 673-98.
- Singh, M., M. Kumar, M. C. Albertsen, J. K. Young und A. M. Cigan. **2018**. 'Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Plant Mol Biol*, 97: 371-83.
- Smith, J., J. M. Berg und S. Chandrasegaran. **1999**. 'A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme', *Nucleic Acids Res*, 27: 674-81.
- Solovyev, V., P. Kosarev, I. Seledsov und D. Vorobyev. **2006**. 'Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters', *Genome Biol*, 7: S10.
- Song, X., Z. Lu, H. Yu, G. Shao, J. Xiong, X. Meng, Y. Jing, G. Liu, G. Xiong, J. Duan, X. F. Yao, C. M. Liu, H. Li, Y. Wang und J. Li. **2017**. 'IPA1 functions as a downstream transcription factor repressed by D53 in strigolactone signaling in rice', *Cell Res*, 27: 1128-41.
- Song, Ma, Yin, Yang, He, Zhu, Tong, Chen, Zhu, Liu und Gao. **2019**. 'Genome-Wide Characterization and Expression Profiling of Squamosa Promoter Binding Protein-like (SBP) Transcription Factors in Wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Agronomy*, 9.
- Sreenivasulu, N. und T. Schnurbusch. **2012**. 'A genetic playground for enhancing grain number in cereals', *Trends in Plant Science*, 17: 91-101.
- Stadler, L. J.. **1928**. 'Genetic effects of x-rays in maize', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 14:69-75.
- Stein, N., G. Herren und B. Keller. **2001**. 'A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*', *Plant Breeding*, 120: 354-56.
- Steinert, J., S. Schiml, F. Fauser und H. Puchta. **2015**. 'Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*', *The Plant Journal*, 84: 1295-305.
- Stemmer, M., T. Thumberger, M. Del Sol Keyer, J. Wittbrodt und J. L. Mateo. **2015**. 'CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool', *PLoS One*, 10: e0124633.
- Stone, J. M., X. Liang, E. R. Nekl und J. J. Stiers. **2005**. '*Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1', *The Plant Journal*, 41: 744-54.
- Stubbe, H. **1966**. *Genetik und Zytologie von Antirrhinum L. sect. Antirrhinum* (VEB Gustav Fischer Verlag: Jena).
- Su, Z., A. Bernardo, B. Tian, H. Chen, S. Wang, H. Ma, S. Cai, D. Liu, D. Zhang, T. Li, H. Trick, P. St Amand, J. Yu, Z. Zhang und G. Bai. **2019**. 'A deletion mutation in TaHRC confers Fhb1 resistance to Fusarium head blight in wheat', *Nat Genet*, 51: 1099-105.
- Sui, X., X. Wang, T. Liu, Q. Ye, B. Wu, G. Hu, S. Yang, M. He und N. Peng. **2021**. 'Endogenous CRISPR-assisted microhomology-mediated end joining enables rapid genome editing in *Zymomonas mobilis*', *Biotechnol Biofuels*, 14: 208.
- Takeda, T., Y. Suwa, M. Suzuki, H. Kitano, M. Ueguchi-Tanaka, M. Ashikari, M. Matsuoka und C. Ueguchi. **2003**. 'The OSTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice', *The Plant Journal*, 33: 513-20.

- Tan, J., Y. Zhao, B. Wang, Y. Hao, Y. Wang, Y. Li, W. Luo, W. Zong, G. Li, S. Chen, K. Ma, X. Xie, L. Chen, Y. G. Liu und Q. Zhu. **2020**. 'Efficient CRISPR/Cas9-based plant genomic fragment deletions by microhomology-mediated end joining', *Plant Biotechnol J*, 18: 2161-63.
- Tang, X., X. Zheng, Y. Qi, D. Zhang, Y. Cheng, A. Tang, D. F. Voytas und Y. Zhang. **2016**. 'A Single Transcript CRISPR-Cas9 System for Efficient Genome Editing in Plants', *Mol Plant*, 9: 1088-91.
- Tang, X., L. G. Lowder, T. Zhang, A. A. Malzahn, X. Zheng, D. F. Voytas, Z. Zhong, Y. Chen, Q. Ren, Q. Li, E. R. Kirkland, Y. Zhang und Y. Qi. **2017**. 'A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants', *Nat Plants*, 3: 17018.
- Thiel, J., R. Koppolu, C. Trautewig, C. Hertig, S. M. Kale, S. Erbe, M. Mascher, A. Himmelbach, T. Rutten, E. Esteban, A. Pasha, J. Kumlehn, N. J. Provart, S. Vanderauwera, C. Froberg und T. Schnurbusch. **2021**. 'Transcriptional landscapes of floral meristems in barley', *Science Advances*, 7: eabf0832.
- Thomas, S. G. **2017**. 'Novel Rht-1 dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins', *Journal of Experimental Botany*, 68: 354-58.
- Tripathi, R. K., R. Goel, S. Kumari und A. Dahuja. **2017**. 'Genomic organization, phylogenetic comparison, and expression profiles of the SPL family genes and their regulation in soybean', *Dev Genes Evol*, 227: 101-19.
- Tripathi, R. K., P. Bregitzer und J. Singh. **2018**. 'Genome-wide analysis of the SPL/miR156 module and its interaction with the AP2/miR172 unit in barley', *Sci Rep*, 8: 7085.
- Tsai, S. Q., N. Wyvekens, C. Khayter, J. A. Foden, V. Thapar, D. Reyon, M. J. Goodwin, M. J. Aryee und J. K. Joung. **2014**. 'Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing', *Nature biotechnology*, 32: 569-76.
- Tschermak, E. von. **1914**. 'Über die Vererbungsweise von Art- und Gattungebastarden innerhalb der Getreidegruppe', *Mitt. Landw. Lehrkanzel KK Hochschule Bodenkultur. Wien*, 2: 763-72.
- Unte, U. S., A. M. Sorensen, P. Pesaresi, M. Gandikota, D. Leister, H. Saedler und P. Huijser. **2003**. 'SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in Arabidopsis', *Plant Cell*, 15: 1009-19.
- Upadhyay, S. K., J. Kumar, A. Alok und R. Tuli. **2013**. 'RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat', *G3 (Bethesda)*, 3: 2233-8.
- Usami, T., G. Horiguchi, S. Yano und H. Tsukaya. **2009**. 'The more and smaller cells mutants of Arabidopsis thaliana identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty', *Development*, 136: 955-64.
- Vain, P., K.R. Finer, D.E. Engler, R.C. Pratt und J.J. Finer. **1996**. 'Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L.) and bluegrass (*Poa pratensis* L.)', *Plant Cell Rep*, 15: 489-94.
- Vancanneyt, G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer und M. Rocha-Sosa. **1990**. 'Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation', *Mol Gen Genet*, 220: 245-50.
- Veillet, F., L. Perrot, L. Chauvin, M. P. Kermarrec, A. Guyon-Debast, J. E. Chauvin, F. Nogue und M. Mazier. **2019**. 'Transgene-Free Genome Editing in Tomato and Potato Plants Using Agrobacterium-Mediated Delivery of a CRISPR/Cas9 Cytidine Base Editor', *Int J Mol Sci*, 20.
- Vilmorin-Andrieux, et al. **1880**. *Les Meilleurs Blés - Description et culture des Principales Variétés de Froments d'hiver et de printemps* (Vilmorin, H.: Paris).
- Voytas, D. F. **2013**. 'Plant genome engineering with sequence-specific nucleases', *Annu Rev Plant Biol*, 64: 327-50.
- Vu, G. T., H. X. Cao, K. Watanabe, G. Hensel, F. R. Blattner, J. Kumlehn und I. Schubert. **2014**. 'Repair of Site-Specific DNA Double-Strand Breaks in Barley Occurs via Diverse Pathways Primarily Involving the Sister Chromatid', *Plant Cell*, 26: 2156-67.
- Vu, T. V., D. T. H. Doan, J. Kim, Y. W. Sung, M. T. Tran, Y. J. Song, S. Das und J. Y. Kim. **2021**. 'CRISPR/Cas-based precision genome editing via microhomology-mediated end joining', *Plant Biotechnol J*, 19: 230-39.
- Wan, Y. und P. G. Lemaux. **1994**. 'Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants', *Plant physiology*, 104: 37-48.
- Wang, H., T. Nussbaum-Wagler, B. Li, Q. Zhao, Y. Vigouroux, M. Faller, K. Bomblies, L. Lukens und J. F. Doebley. **2005**. 'The origin of the naked grains of maize', *Nature*, 436: 714-9.
- Wang, J. W., R. Schwab, B. Czech, E. Mica und D. Weigel. **2008**. 'Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana', *Plant Cell*, 20: 1231-43.
- Wang, J. W., B. Czech und D. Weigel. **2009**. 'miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana', *Cell*, 138: 738-49.
- Wang, L., W. Xie, Y. Chen, W. Tang, J. Yang, R. Ye, L. Liu, Y. Lin, C. Xu, J. Xiao und Q. Zhang. **2010**. 'A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice', *The Plant Journal*, 61: 752-66.
- Wang, J. W., M. Y. Park, L. J. Wang, Y. Koo, X. Y. Chen, D. Weigel und R. S. Poethig. **2011**. 'miRNA control of vegetative phase change in trees', *PLoS Genet*, 7: e1002012.
- Wang, S., K. Wu, Q. Yuan, X. Liu, Z. Liu, X. Lin, R. Zeng, H. Zhu, G. Dong, Q. Qian, G. Zhang und X. Fu. **2012**. 'Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice', *Nat Genet*, 44: 950-4.
- Wang, Y., X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao und J. L. Qiu. **2014**. 'Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew', *Nat Biotechnol*, 32: 947-51.
- Wang, H. und H. Wang. **2015**. 'The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits', *Mol Plant*, 8: 677-88.
- Wang, B., S. Geng, D. Wang, N. Feng, D. Zhang, L. Wu, C. Hao, X. Zhang, A. Li und L. Mao. **2015a**. 'Characterization of Squamosa Promoter Binding Protein-LIKE genes in wheat', *Journal of Plant Biology*, 58: 220-29.
- Wang, L., S. Sun, J. Jin, D. Fu, X. Yang, X. Weng, C. Xu, X. Li, J. Xiao und Q. Zhang. **2015b**. 'Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 15504-9.
- Wang, L. und Q. Zhang. **2017**. 'Boosting Rice Yield by Fine-Tuning SPL Gene Expression', *Trends Plant Sci*, 22: 643-46.
- Wang, J., H. Yu, G. Xiong, Z. Lu, Y. Jiao, X. Meng, G. Liu, X. Chen, Y. Wang und J. Li. **2017a**. 'Tissue-Specific Ubiquitination by IPA1 INTERACTING PROTEIN1 Modulates IPA1 Protein Levels to Regulate Plant Architecture in Rice', *Plant Cell*, 29: 697-707.
- Wang, S., K. Wu, Q. Qian, Q. Liu, Q. Li, Y. Pan, Y. Ye, X. Liu, J. Wang, J. Zhang, S. Li, Y. Wu und X. Fu. **2017b**. 'Non-canonical regulation of SPL transcription factors by a human OTUB1-like deubiquitinase defines a new plant type rice associated with higher grain yield', *Cell Res*, 27: 1142-56.

- Wang, W., Q. Pan, F. He, A. Akhunova, S. Chao, H. Trick und E. Akhunov. **2018a**. 'Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat', *CRISPR J*, 1: 65-74.
- Wang, W., J. Simmonds, Q. Pan, D. Davidson, F. He, A. Battal, A. Akhunova, H. N. Trick, C. Uauy und E. Akhunov. **2018b**. 'Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of TaGW2 homoeologues to grain size and weight in wheat', *Theor Appl Genet*, 131: 2463-75.
- Wang, J., L. Zhou, H. Shi, M. Chern, H. Yu, H. Yi, M. He, J. Yin, X. Zhu, Y. Li, W. Li, J. Liu, J. Wang, X. Chen, H. Qing, Y. Wang, G. Liu, W. Wang, P. Li, X. Wu, L. Zhu, J.-M. Zhou, P. C. Ronald, S. Li, J. Li und X. Chen. **2018c**. 'A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice', *Science*, 361: 1026-28.
- Wang, S. S., C. L. Chung, K. Y. Chen und R. K. Chen. **2020**. 'A Novel Variation in the FRIZZLE PANICLE (FZP) Gene Promoter Improves Grain Number and Yield in Rice', *Genetics*, 215: 243-52.
- Wang, Z., L. Wan, Q. Xin, X. Zhang, Y. Song, P. Wang, D. Hong, Z. Fan und G. Yang. **2021**. 'Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing', *Journal of Experimental Botany*, 72: 4796-4808.
- Warburton, L., B. Skovmand und A. Mujeeb-Kazi. **2002**. 'The molecular genetic characterization of the 'Bobwhite' bread wheat family using AFLPs and the effect of the T1BL.1RS translocation', *Theor Appl Genet*, 104: 868-73.
- Waugh, A., P. Gendron, R. Altman, J. W. Brown, D. Case, D. Gautheret, S. C. Harvey, N. Leontis, J. Westbrook, E. Westhof, M. Zuker und F. Major. **2002**. 'RNAML: A standard syntax for exchanging RNA information', *RNA*, 8: 707-17.
- Weiss, T., C. Wang, X. Kang, H. Zhao, M. Elena Gamo, C. G. Starker, P. A. Crisp, P. Zhou, N. M. Springer, D. F. Voytas und F. Zhang. **2020**. 'Optimization of multiplexed CRISPR/Cas9 system for highly efficient genome editing in *Setaria viridis*', *Plant J*, 104: 828-38.
- Weschke, W., R. Panitz, N. Sauer, Q. Wang, B. Neubohn, H. Weber und U. Wobus. **2000**. 'Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation', *The Plant Journal*, 21: 455-467.
- Weschke, W., R. Panitz, S. Gubatz, Q. Wang, R. Radchuk, H. Weber und U. Wobus. **2003**. 'The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development', *The Plant Journal*, 33: 395-411
- West, C. E., W. M. Waterworth, Q. Jiang und C. M. Bray. **2000**. 'Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4', *The Plant Journal*, 24: 67-78.
- Whittall, A., M. Kaviani, R. Graf, G. Humphreys und A. Navabi. **2018**. 'Allelic variation of vernalization and photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes', *PLoS One*, 13: e0203068.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G. V. Wilson und N. J. Provart. **2007**. 'An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets', *PLoS One*, 2: e718.
- Wolde, G. M., M. Mascher und T. Schnurbusch. **2019a**. 'Genetic modification of spikelet arrangement in wheat increases grain number without significantly affecting grain weight', *Mol Genet Genomics*, 294: 457-68.
- Wolde, G. M., C. Trautewig, M. Mascher und T. Schnurbusch. **2019b**. 'Genetic insights into morphometric inflorescence traits of wheat', *Theor Appl Genet*, 132: 1661-76.
- Wolde, G. M. und T. Schnurbusch. **2019c**. 'Inferring vascular architecture of the wheat spikelet based on resource allocation in the branched head(t) (bh(t)-A1) near isogenic lines', *Funct Plant Biol*, 46: 1023-35.
- Wolde, G. M., M. Schreiber, C. Trautewig, A. Himmelbach, S. Sakuma, M. Mascher und T. Schnurbusch. **2021**. 'Genome-wide identification of loci modifying spike-branching in tetraploid wheat', *Theor Appl Genet*, 134: 1925-43.
- Wong, N., W. Liu und X. Wang. **2015**. 'WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system', *Genome Biol*, 16: 218.
- Wu, G. und R. S. Poethig. **2006**. 'Temporal Regulation of Shoot Development in Arabidopsis Thaliana By Mir156 and Its Target SPL3', *Development*, 133: 3539-47.
- Wu, G., M. Y. Park, S. R. Conway, J. W. Wang, D. Weigel und R. S. Poethig. **2009**. 'The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis', *Cell*, 138: 750-9.
- Xie, K., C. Wu und L. Xiong. **2006**. 'Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice', *Plant Physiol*, 142: 280-93.
- Xie, K. und Y. Yang. **2013**. 'RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system', *Mol Plant*, 6: 1975-83.
- Xie, K., B. Minkenberg und Y. Yang. **2015**. 'Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 3570-5.
- Xie, L., Y. Zhang, K. Wang, X. Luo, D. Xu, X. Tian, L. Li, X. Ye, X. Xia, W. Li, L. Yan und S. Cao. **2021**. 'TaVrt2, an SVP-like gene, cooperates with TaVrn1 to regulate vernalization-induced flowering in wheat', *New Phytol*, 231: 834-48.
- Xing, S., M. Salinas, S. Hohmann, R. Berndtgen und P. Huijser. **2010**. 'miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in Arabidopsis', *Plant Cell*, 22: 3935-50.
- Xing, H.-L., L. Dong, Z.-P. Wang, H.-Y. Zhang, C.-Y. Han, B. Liu, X.-C. Wang und Q.-J. Chen. **2014**. 'A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants', *BMC Plant Biol*, 14.
- Xu, H., T. Xiao, C. H. Chen, W. Li, C. A. Meyer, Q. Wu, D. Wu, L. Cong, F. Zhang, J. S. Liu, M. Brown und X. S. Liu. **2015**. 'Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design', *Genome Res*, 25: 1147-57.
- Yamaguchi, A., M. F. Wu, L. Yang, G. Wu, R. S. Poethig und D. Wagner. **2009**. 'The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1', *Dev Cell*, 17: 268-78.
- Yamasaki, K., T. Kigawa, M. Inoue, M. Tateno, T. Yamasaki, T. Yabuki, M. Aoki, E. Seki, T. Matsuda, E. Nunokawa, Y. Ishizuka, T. Terada, M. Shirouzu, T. Osanai, A. Tanaka, M. Seki, K. Shinozaki und S. Yokoyama. **2004**. 'A Novel Zinc-binding Motif Revealed by Solution Structures of DNA-binding Domains of Arabidopsis SBP-family Transcription Factors', *Journal of Molecular Biology*, 337: 49-63.
- Yan, L., A. Loukoianov, G. Tranquilli, M. Helguera, T. Fahima und J. Dubcovsky. **2003**. 'Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 6263-68.
- Yan, L., A. Loukoianov, A. Blechl, G. Tranquilli, W. Ramakrishna, P. SanMiguel, J.L. Bennetzen, V. Echenique und J. Dubcovsky. **2004**. 'The Wheat VRN2 Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization', *Science*, 303: 1640-44.
- Yan, L., D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli, M. Bonafede, A. Sanchez, M. Valarik, S. Yasuda und J. Dubcovsky. **2006**. 'The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19581-86.

- Yang, Z., X. Wang, S. Gu, Z. Hu, H. Xu und C. Xu. **2008**. 'Comparative study of SBP-box gene family in Arabidopsis and rice', *Gene*, 407: 1-11.
- Yang, L., S. R. Conway und R. S. Poethig. **2011**. 'Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156', *Development*, 138: 245-9.
- Yang, Q., X. Zhong, Q. Li, J. Lan, H. Tang, P. Qi, J. Ma, J. Wang, G. Chen, Z. Pu, W. Li, X. Lan, M. Deng, W. Harwood, Z. Li, Y. Wei, Y. Zheng und Q. Jiang. **2020**. 'Mutation of the D-hordein gene by RNA-guided Cas9 targeted editing reducing the grain size and changing grain compositions in barley', *Food Chemistry*, 311.
- Yi, G., J.-H. Choi, E.-G. Jeong, N.-S. Chon, K. K. Jena, Y.-C. Ku, D.-H. Kim, M.-Y. Eun, J.-S. Jeon und M.-H. Nam. **2005**. 'Morphological and molecular characterization of a new frizzy panicle mutant, "fzp-9(t)", in rice (*Oryza sativa* L.)', *Hereditas*, 142: 92-97.
- Youssef, H. M., K. Eggert, R. Koppolu, A. M. Alqudah, N. Poursarebani, A. Fazeli, S. Sakuma, A. Tagiri, T. Rutten, G. Govind, U. Lundqvist, A. Graner, T. Komatsuda, N. Sreenivasulu und T. Schnurbusch. **2017**. 'VRS2 regulates hormone-mediated inflorescence patterning in barley', *Nat Genet*, 49: 157-61.
- Youssefian, S., E. J. M. Kirby und M. D. Gale. **1992a**. 'Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leaves', *Field Crops Research*, 28: 179-90.
- Youssefian, S., E. J. M. Kirby und M. D. Gale. **1992b**. 'Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth', *Field Crops Research*, 28: 191-210.
- Yu, N., W. J. Cai, S. Wang, C. M. Shan, L. J. Wang und X. Y. Chen. **2010**. 'Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in Arabidopsis thaliana', *Plant Cell*, 22: 2322-35.
- Yu, S., V. C. Galvao, Y. C. Zhang, D. Horrer, T. Q. Zhang, Y. H. Hao, Y. Q. Feng, S. Wang, M. Schmid und J. W. Wang. **2012**. 'Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors', *Plant Cell*, 24: 3320-32.
- Yu, Z. X., L. J. Wang, B. Zhao, C. M. Shan, Y. H. Zhang, D. F. Chen und X. Y. Chen. **2015a**. 'Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in Arabidopsis and Patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors', *Mol Plant*, 8: 98-110.
- Yu, N., Q. W. Niu, K. H. Ng und N. H. Chua. **2015b**. 'The role of miR156/SPLs modules in Arabidopsis lateral root development', *The Plant Journal*, 83: 673-85.
- Zedler, J. H. **1743**. "Sicilianisches Korn und Weizen." In *Grosses vollständiges Universal Lexicon Aller Wissenschaften und Künste, Welche bißhero durch menschlichen Verstand und Witz erfunden und verbessert worden*, 918-23. Leipzig und Halle: Zedler, J. H.
- Zhan, X., F. Zhang, Z. Zhong, R. Chen, Y. Wang, L. Chang, R. Bock, B. Nie und J. Zhang. **2019**. 'Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting', *Plant Biotechnol J*, 17: 1814-22.
- Zhang, Y., S. Schwarz, H. Saedler und P. Huijser. **2007**. 'SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in Arabidopsis', *Plant Mol Biol*, 63: 429-39.
- Zhang, J. P., X. L. Li, A. Neises, W. Chen, L. P. Hu, G. Z. Ji, J. Y. Yu, J. Xu, W. P. Yuan, T. Cheng und X. B. Zhang. **2016a**. 'Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency', *Sci Rep*, 6: 28566.
- Zhang, Y., Z. Liang, Y. Zong, Y. Wang, J. Liu, K. Chen, J. L. Qiu und C. Gao. **2016b**. 'Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA', *Nat Commun*, 7: 12617.
- Zhang, L., H. Yu, B. Ma, G. Liu, J. Wang, J. Wang, R. Gao, J. Li, J. Liu, J. Xu, Y. Zhang, Q. Li, X. Huang, J. Xu, J. Li, Q. Qian, B. Han, Z. He und J. Li. **2017a**. 'A natural tandem array alleviates epigenetic repression of IPA1 and leads to superior yielding rice', *Nat Commun*, 8: 14789.
- Zhang, B., W. Xu, X. Liu, X. Mao, A. Li, J. Wang, X. Chang, X. Zhang und R. Jing. **2017b**. 'Functional Conservation and Divergence among Homoeologs of TaSPL20 and TaSPL21, Two SBP-Box Genes Governing Yield-Related Traits in Hexaploid Wheat', *Plant Phys*, 174: 1177-91.
- Zhang, R.-Q., F. Hou, J. Chen, S.-L. Chen, L.-P. Xing, Y.-G. Feng und A.-Z. Cao. **2017c**. 'Agronomic characterization and genetic analysis of the supernumerary spikelet in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.)', *Journal of Integrative Agriculture*, 16: 1304-11.
- Zhang, Y., Y. Bai, G. Wu, S. Zou, Y. Chen, C. Gao und D. Tang. **2017d**. 'Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat', *The Plant Journal*, 91: 714-24.
- Zhang, S., R. Zhang, G. Song, J. Gao, W. Li, X. Han, M. Chen, Y. Li und G. Li. **2018**. 'Targeted mutagenesis using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat', *BMC Plant Biol*, 18: 302.
- Zhang, Z., L. Hua, A. Gupta, D. Tricoli, K. J. Edwards, B. Yang und W. Li. **2019a**. 'Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing', *Plant Biotechnol J*, 17: 1623-35.
- Zhang, T., Y. Zhao, J. Ye, X. Cao, C. Xu, B. Chen, H. An, Y. Jiao, F. Zhang, X. Yang und G. Zhou. **2019b**. 'Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants', *Plant Biotechnol J*, 17: 1185-87.
- Zhong, Y., A. Blennow, O. Kofoed-Enevoldsen, D. Jiang und K. H. Hebelstrup. **2019**. 'Protein Targeting to Starch 1 is essential for starchy endosperm development in barley', *J Exp Bot*, 70: 485-96.
- Zhou, Y., S. Srinivasan, S. V. Mirnezami, A. Kusmec, Q. Fu, L. Attigala, M. G. Salas Fernandez, B. Ganapathysubramanian und P. S. Schnable. **2019**. 'Semiautomated Feature Extraction from RGB Images for Sorghum Panicle Architecture GWAS', *Plant Physiol*, 179: 24-37.
- Zhu, Q.-H., M. S. Hoque, Dennis E. S. und N. M. Upadhyaya. **2003**. 'Ds tagging of BRANCHED FLORETLESS 1 (BFL1) that mediates the transition from spikelet to floret meristem in rice (*Oryza sativa* L.)', *BMC Plant Biol*, 3.
- Zhu, C., L. Bortesi, C. Baysal, R. M. Twyman, R. Fischer, T. Capell, S. Schillberg und P. Christou. **2017**. 'Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops', *Trends Plant Sci*, 22: 38-52.
- Zhu, T., L. Wang, H. Rimbart, J. C. Rodriguez, K. R. Deal, R. De Oliveira, F. Choulet, G. Keeble-Gagnere, J. Tibbits, J. Rogers, K. Eversole, R. Appels, Y. Q. Gu, M. Mascher, J. Dvorak und M. C. Luo. **2021**. 'Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly', *Plant J*, 107: 303-14.
- Zong, Y., Y. Wang, C. Li, R. Zhang, K. Chen, Y. Ran, J. L. Qiu, D. Wang und C. Gao. **2017**. 'Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion', *Nat Biotechnol*, 35: 438-40.
- Zong, Y., Q. Song, C. Li, S. Jin, D. Zhang, Y. Wang, J. L. Qiu und C. Gao. **2018**. 'Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A', *Nat Biotechnol*.
- Zuker, M. **2003**. 'Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction', *Nucleic Acids Res*, 31: 3406-15.
- Zuker, M. und A. B. Jacobson. **1998**. 'Using reliability information to annotate RNA secondary structures', *RNA*, 4: 669-79.
- Zuo, Z. und J. Liu. **2016**. 'Cas9-catalyzed DNA Cleavage Generates Staggered Ends: Evidence from Molecular Dynamics Simulations', *Sci Rep*, 5: 37584.

Anhang

I) Ergänzende Tabellen

Tabelle A1 – Liste der verwendeten Oligonukleotide; unterstrichen sind Klonierungsüberhänge; rot: Unterschiede zwischen BH-Homoeoallelen

Primer ^(*) -ID	Sequenz	Referenz, Herkunft	
<u>Klonierungsprimer</u>			
CH48-35S-HindIII-F	<u>aagctcacgtgacggaattaagcttcgaattc</u> AA GCTGGAGCTCATGTTAC	Vorliegende Dissertation	
CH49-35S-NotI-R	c <u>ctt</u> gtaatccatctagagcggccgcAGTGCTCG AGAGAGATAG		
pSH149_Gib-F	gcgctacgcctgaacttaagGACAAGAAGTACTC GATCG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
pSH149_Gib-R	<u>ctgccgcccggagtcacgcgct</u> CCTTCTTCTTCTTCG CCTG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
pSH181_Gib-F	ACGCGTGACTCCGGCGGC	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
pSH181_Gib-R	CTTAAGTTCAGGCGTAGCG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
<u>Sequenzierprimer für Klonierung</u>			
IK70-F	GCTCACATGTTCTTTCTCTGCG	Hoffie et al., 2023	
IK71-R	CACCTGACGTCTAAGAAACC	Hoffie et al., 2023	
2x35S_F1	GACGTAAGGGATGACGCAC	Budhagatapalli et al., 2016	
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG	LGC Genomics, Berlin, Deutschland	
pSH91_S1	AGGCCATGAAACTGAAGG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
pSH91_S6	TAGCCCTGCCTTCATACG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
pSH91_S11	AGCAGAAGCAGCTGTTCG	PRB*, S. Hiekel, unveröffentlicht	
CH159-p6i-RB	GAGTTCGCCACAGACC	Vorliegende Dissertation	
CH160-p6i-E9	TGTCAAATCGTGGCCTCTAA		
<u>Oligonukleotide für zielsequenzspezifischen 5'-Abschnitt der gRNAs</u>			
Bh-gRNA4-F	<u>CTT</u> CGACCCGACCACCAAGGAG	Vorliegende Dissertation	
Bh-gRNA4-R	AA <u>ACC</u> TCCTTGGTGGTCGGGTCG		
Bh-gRNA5-F	<u>CTT</u> GGCGGGGTAGTTGTGTAGG		
Bh-gRNA5-R	AA <u>ACC</u> CTACAACAACCTACCCGCC		
Spl14-gRNA2-1-F	<u>TGG</u> CATGGCGGGCCACAACGAGCGC		
Spl14-gRNA2-1-R	AA <u>AC</u> GCGCTCGTTGTGGCCCGCCAT		
Spl14-gRNA2-4-F	<u>TGG</u> CACGGGCCACAACGAGCGCCGG	Thiel et al., 2021	
Spl14-gRNA2-4-R	AA <u>ACC</u> CGCGCTCGTTGTGGCCCGT	Thiel et al., 2021	
Spl14/17-gRNA3-2A-F	<u>TGG</u> CACAGAAGAGAGAGACACAGC	Vorliegende Dissertation	
Spl14/17-gRNA3-2A-R	AA <u>AC</u> GCTGTGCTCTCTCTTCTGT		
Spl14/17-gRNA3-2G-F	<u>TGG</u> CGCAGAAGAGAGAGACACAGC		
Spl14/17-gRNA3-2G-R	AA <u>AC</u> GCTGTGCTCTCTCTTCTGT		
Spl14/17-gRNA3-2o1-F	<u>TGG</u> CAGAAGAGAGAGACACAGC		
Spl14/17-gRNA3-2o1-R	AA <u>AC</u> GCTGTGCTCTCTCTTCT		
Spl14/17-gRNA3-1-F	<u>TGG</u> CGAGAGCACAGCTGGAGTCGG		
Spl14/17-gRNA3-1-R	AA <u>ACC</u> GACTCCAGCTGTGCTCTC		
Spl14/17-gRNA3-3-F	<u>TGG</u> CATCTTCTGTCAACTCAGCCAT		
Spl14/17-gRNA3-3-R	AA <u>AC</u> TGGCTGAGTTGACAGAAGAT		
Spl14/17-gRNA3-2-TaU6-F	<u>CTT</u> GAGAAGAGAGAGACACAGC		
Spl14/17-gRNA3-2-TaU6-R	AA <u>AC</u> GCTGTGCTCTCTCTTCT		
<u>Primer für Zielvektoren des ballistischen Aktivitätstests</u>			
Bh-Zielmotiv4-F	GATCGGACCCGACCACCAAGGAGCGGC		Vorliegende Dissertation
Bh-Zielmotiv4-R	AA <u>TT</u> GCCGCTCCTTGGTGGTCGGGTCGC		
Bh-Zielmotiv5-F	GATCGGGCGGGTAGTTGTGTAGGCGGC		
Bh-Zielmotiv5-R	AA <u>TT</u> GCCGCCTACAACAACCTACCCGCC		
Spl14-Zielmotiv2-1-F	GATC <u>TGG</u> CGGGCCACAACGAGCGCCGGC		
Spl14-Zielmotiv2-1-R	AA <u>TT</u> GCCAGCTGTGCTCTCTCTTCTG		
Spl14-Zielmotiv2-4-F	GATCGGGCCACAACGAGCGCCGGAGGC		
Spl14-Zielmotiv2-4-R	AA <u>TT</u> GCCTCCGGCGCTCGTTGTGGCCCG		
Spl14/17-Zielmotiv3-2-F	GATCCAGAAGAGAGAGACACAGCTGGC		
Spl14/17-Zielmotiv3-2-R	AA <u>TT</u> GCCGGCGCTCGTTGTGGCCGCCA		
<u>Weizen Bh-Untersuchung auf Mutationen</u>			
CH5-Bh-D-F	GCCTCACTTCACTTCAGTTC	Vorliegende Dissertation	

Primer ^(*) -ID	Sequenz	Referenz, Herkunft
CH6-Bh-D-R	CCACGTACTGTGACTGATCG	Vorliegende Dissertation
CH24-Bh-A-F	GGCGGGAGCAGTAGTATAG	
CH26-Bh-A-R	CCGCCACTTTAATTCCACAC	
CH29-Bh-B-F	AGTGCTCTCAGCCTCTCACTC	
CH31-Bh-B-R	TGCCGGTGCATTTGCTTCAG	
CH96-Bh-ABD-F	GAGCATTCGCTGCCGAAG	
CH97-Bh-ABD-R	TCAGGTACCCGGAGTTGTC	
<u>Gerste Spl14/Spl17-Untersuchung auf Mutationen</u>		
CH57-Spl14Ex2-F	GCGCTTCTGCTCATCTTGTC	Thiel et al., 2021
CH58-Spl14Ex2-R	AACCTGCCGGGTTCTTCTG	Thiel et al., 2021
CH60-Spl14Ex3-F	TGTTTCTCGCAGCCAATCC	Vorliegende Dissertation
CH63-Spl14Ex3-R	CTGATACTGGTGACCAGAAG	
CH64-Spl17Ex3-F	CTCGCAGTTTGAACGAAACG	
CH66-Spl17Ex3-R	TCCAGATCGGCAAAGTCTAC	
CH142-Spl17Ex2-F	GTCAATTCGCATTGGCTCTG	Thiel et al., 2021
CH143-Spl17Ex2-R	GGCAGAGTCAATACCGTTTC	Thiel et al., 2021
CH144-Vrs4-F	CCCTAATCTCCTCCTTCAAC	Thiel et al., 2021
CH145-Vrs4-R	TTTACTCAAACGGGCCACTC	Thiel et al., 2021
<u>Weizen Bh-Protoplastenuntersuchung durch Amplikon Deep Sequenzierung</u>		
CH161-Bhg4-NGS-AB-F	CGGTACGCGGCCGAGATACG	Vorliegende Dissertation
CH162-Bhg4-NGS-D-F	CGGTACGCGGCCGAGATACG	
CH163-Bhg4-NGS-ABD-R	TTCGACACGGCGCAGGAGG	
CH164-Bhg5-NGS-ABD-F	GCGCGTAGACGAAGTTGGTG	
CH165-Bhg5-NGS-A-R	TGCTGCTGCGCGTGGAACGG	
CH166-Bhg5-NGS-BD-R	TGCTGCTGCGCGTGGAACGG	
<u>Gerste Spl14/Spl17-Protoplastenuntersuchung durch Amplikon Deep Sequenzierung</u>		
CH155-Spl14Ex3-NGS-F	CCATGCATACAGCGGCCAC	Vorliegende Dissertation
CH156-Spl14Ex3-NGS-R	TAGTTACTCGCCATGATGGAGG	
CH157-Spl17Ex3-NGS-F	CACGCGTACAACGGCCAGG	
CH158-Spl17Ex3-NGS-R	TGACGGAGGGCGCCACCG	
<u>Gerste Spl14/Spl17-Expressionsanalyse mittels qPCR</u>		
CH169-Spl14-qPCR-F	TGGTCACTTCTCAGGCGAAC	Vorliegende Dissertation
CH170-Spl14-qPCR-R	GTGACCAGAAGGTAATAATGAACG	
CH171-Spl17-qPCR-F	GTTACCACGGGCAGTTC	
CH172-Spl17-qPCR-R	CCTCCCCGTCTGAAATC	
Vrs1-qPCR-F	CCGAGATAGCTGCTGCCGCC	Komatsuda et al., 2007
Vrs1-qPCR-R	TGCATCGCGGGCAATGGAGA	Komatsuda et al., 2007
Vrs2-qPCR-F	CTTAGCTTAATGAGGCCCCGT	Youssef et al., 2017
Vrs2-qPCR-R	TCAGATGCTCCCAAGAAGAGC	Youssef et al., 2017
Vrs3-qPCR-F	CACTTCTTTATGAGTGGACGAAA	Bull et al., 2017
Vrs3-qPCR-R	CAGAAGAGATTTACGCCAGA	Bull et al., 2017
Vrs4_Ra2-qPCR-F	ATTACCACCACCTCAGGATCA	Koppolu et al., 2013
Vrs4_Ra2-qPCR-R	GAGTAGGAGAGGTAATCCACA	Koppolu et al., 2013
Vrs5_IntC-qPCR-F	ACCATTCCTCCCCTCCATT	Ramsay et al., 2011
Vrs5_IntC-qPCR-R	GCACCGGCACCGGCACAGAGGTAG	Ramsay et al., 2011
HvActin-qPCR-F	AAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGG	Koppolu und Schnurbusch, 2019
HvActin-qPCR-R	TCGCAACTTAGAAGCACTTCCG	Koppolu und Schnurbusch, 2019
<u>Nachweis der T-DNA</u>		
TaU6-F1	GCCCCGTTATTCTGACAGTTC	PRB*, G. Hensel, unveröffentlicht
OsU3p-F1	CAGGGACCATAGCACAAAGAC	Gerasimova et al. 2020
Bie475	TTTAGCCCTGCCTTCATACG	Gerasimova et al. 2020
zCas9-R1	TTAATCATGTGGGCCAGAGC	Gerasimova et al. 2020
35S-F2-Catrin	CATGGTGGAGCAGCACTCTC	Gerasimova et al. 2020
Hyg-R5	GATTCCTTGCGGTCGGAATG	Gerasimova et al. 2020
IK273-p6i_35S_F	CACGATCGGCTCTAGATCGG	PRB*, I. Hoffie, unveröffentlicht
IK274-p6i_HYG_R	CGGGAGATGCAATAGGTCAG	PRB*, I. Hoffie, unveröffentlicht

* Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie des IPK Gatersleben, wo die vorliegende Studie durchgeführt wurde

Tabelle A2 – Klonierungsprogramme

Hybridisierung der gRNA-Oligonukleotide				Golden Gate Klonierung	
95 °C	5 min			37 °C	5 min
85 °C	5 sec			22 °C	10 min
85 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen	→10 Zyklen	
75 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen	37 °C	30 min
65 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen	75 °C	15 min
55 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen		
45 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen		
35 °C	1 sec	-0,1 °C	→99 Zyklen		
4 °C	∞				

Tabelle A3 – PCR-Programme zur Amplifikation der Branched head-Zielregionen von Weizenprotoplasten sowie der anschließenden Amplifikation zur Tiefensequenzierung

Bh-A Proto (CH24+CH26)		Bh-B Proto (CH29+CH31)		Bh-D Proto (CH5+CH6)		→ Bh-NGS (CH161-166)	
98 °C	1 min	98 °C	1 min	98 °C	1 min	95 °C	2 min
98 °C	15 sec	98 °C	15 sec	98 °C	15 sec	95 °C	30 sec
50,8 °C	15 sec	67,4 °C	15 sec	65,9 °C	15 sec	55 °C	30 sec
72 °C	30 sec	72 °C	30 sec	72 °C	1 min	72 °C	30 sec
→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen	
72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min
4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle A4 – PCR-Programme zur Amplifikation der Spl14/Spl17-Zielregionen von Gerstenprotoplasten sowie der anschließenden Amplifikation zur Tiefensequenzierung

Spl14 Exon 3 Proto (CH60+CH63)		Spl14 Exon 3 NGS (CH155+CH156)		Spl17 Exon 3 Proto (CH64+CH66)		Spl17 Exon 3 NGS (CH157+158)	
98 °C	1 min	98 °C	1 min	98 °C	1 min	98 °C	1 min
98 °C	10 sec	98 °C	10 sec	98 °C	10 sec	98 °C	10 sec
59 °C	20 sec	61 °C	20 sec	61 °C	20 sec	67 °C	20 sec
72 °C	30 sec	72 °C	20 sec	72 °C	30 sec	72 °C	20 sec
→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen	
72 °C	2 min	72 °C	2 min	72 °C	2 min	72 °C	2 min
4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle A5 – PCR-Programme zur Genotypisierung der Branched head-Mutanten in Weizen

Bh-A (CH24+CH26)		Bh-B (CH29+CH31)		Bh-D (CH5+CH6)		Bh-ABD (CH96+CH97)	
95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
63,5 °C → -0,5 °C	30 sec	60,5 °C → -0,5 °C	30 sec	68 °C → -0,5 °C	30 sec	55 °C	30 sec
72 °C	1,5 min	72 °C	1,5 min	72 °C	1,5 min	72 °C	1 min
→15 Zyklen		→15 Zyklen		→15 Zyklen		→35 Zyklen	
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	72 °C	5 min
56 °C	30 sec	53 °C	30 sec	60,5 °C	30 sec	4 °C	∞
72 °C	1,5 min	72 °C	1,5 min	72 °C	1,5 min		
→25 Zyklen		→30 Zyklen		→25 Zyklen			
72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min		
4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞		

Tabelle A6 – PCR-Programme zur Genotypisierung der *Spl14/Spl17*-Exon 2-Mutanten in Gerste

<i>Spl14</i> Exon 2		<i>Spl17</i> Exon 2 (OFF)		<i>Vrs4</i> (OFF)	
<i>(CH57+CH58)</i>		<i>(CH142+CH143)</i>		<i>(CH144+CH145)</i>	
95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
59 °C	30 sec	58 °C	30 sec	56 °C	30 sec
72 °C	30 sec	72 °C	30 sec	72 °C	1 min
→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen	
72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min
4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle A7 – PCR-Programme zur Genotypisierung der *Spl14/Spl17*-Exon 3-Mutanten in Gerste

<i>Spl14</i> Exon 3		<i>Spl14</i> Exon 3 Touchdown		<i>Spl17</i> Exon 3	
<i>(CH60+CH63)</i>		<i>(CH60+CH63)</i>		<i>(CH64+CH66)</i>	
95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
61 °C	30 sec	69 °C → -0,5 °C	30 sec	62 °C	30 sec
72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min
→35 Zyklen		→15 Zyklen		→35 Zyklen	
72 °C	5 min	95 °C	30 sec	72 °C	5 min
4 °C	∞	60,5 °C	30 sec	4 °C	∞
		72 °C	1,5 min		
		→25 Zyklen			
		72 °C	5 min		
		4 °C	∞		

Tabelle A8 – PCR-Programme zur Untersuchung auf die Anwesenheit der T-DNA

gRNA (TaU6)		gRNA (OsU3)		<i>cas9</i>-Test		<i>hpt</i>-Test		<i>hpt</i>-Test A	
<i>(TaU6-F+gRNA-R)</i>		<i>(OsU3-F+gRNA-R)</i>		<i>(Bie475+zCas9-R1)</i>		<i>(35S-F2+Hyg-R5)</i>		<i>(IK273+IK274)</i>	
95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min	95 °C	2 min
95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
55 °C	30 sec	52 °C	30 sec	55 °C	30 sec	55 °C	30 sec	60 °C	30 sec
72 °C	30 sec	72 °C	30 sec	72 °C	1 min	72 °C	1¼ min	72 °C	40 sec
→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen		→35 Zyklen	
72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min
4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle A9 – Programm zur Untersuchung der Spezifität der qPCR-Primer und qPCR-Standardprogramm

qPCR-Test		qPCR-Programm	
<i>(qPCR-F+R)</i>		<i>(qPCR-F+R)</i>	
95 °C	2 min	95 °C	10 min
95 °C	30 sec	95 °C	35 sec <i>C_T-Werte</i>
60 °C	30 sec	60 °C	1 min
72 °C	30 sec	→40 Zyklen	
→35 Zyklen		95 °C	15 sec <i>Schmelzkurvenerstellung</i>
72 °C	5 min	60 °C	1 min
4 °C	∞	95 °C	30 sec
		60 °C	15 sec
		4 °C	∞

Tabelle A10 – *Verwendete Barcodes für die Tiefensequenzierung der Protoplastenversuche*

Barcode	Sequenz	Barcode	Sequenz
1	ATCACG	25	ACTGAT
2	CGATGT	26	ATGAGC
3	TTAGGC	27	ATTCCT
4	TGACCA	28	CAAAAG
5	ACAGTG	29	CAACTA
6	GCCAAT	30	CACCGG

Tabelle A11 – *Barcode-Primer Kombination für die Protoplastenexperimente*

Plasmid	Replikat	Gen	Primer F-Barcode	Primer R-Barcode	Plasmid	Replikat	Gen	Primer F-Barcode	Primer R-Barcode		
Weizen											
pCH26	1	Bh-A	CH161-1	CH164-25	pCH27	1	Bh-A	CH163-4	CH165-25		
		Bh-B	CH161-2	CH164-25			Bh-B	CH163-4	CH166-26		
		Bh-D	CH162-3	CH164-25			Bh-D	CH163-4	CH166-27		
	2	Bh-A	CH161-1	CH164-26		2	Bh-A	CH163-5	CH165-25		
		Bh-B	CH161-2	CH164-26			Bh-B	CH163-5	CH166-26		
		Bh-D	CH162-3	CH164-26			Bh-D	CH163-5	CH166-27		
	3	Bh-A	CH161-1	CH164-27		3	Bh-A	CH163-6	CH165-25		
		Bh-B	CH161-2	CH164-27			Bh-B	CH163-6	CH166-26		
		Bh-D	CH162-3	CH164-27			Bh-D	CH163-6	CH166-27		
	Gerste										
	pCH66	1	Spl14	CH155-3		CH156-28	pCH66	1	Spl17	CH157-4	CH158-28
		2	Spl14	CH155-3		CH156-29		2	Spl17	CH157-4	CH158-29
3		Spl14	CH155-3	CH156-30	3	Spl17		CH157-4	CH158-30		

Tabelle A12 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH1

Pflanzen-ID	Auxinbehandlung	Hinweise/Mutationen	T-DNA
WCH1 E01	2,4-D	verstorben	
WCH1 E02	2,4-D	WT	
WCH1 E03	2,4-D	WT	
WCH1 E04	2,4-D	WT	
WCH1 E05	2,4-D	WT	
WCH1 E06	2,4-D	Mutationen im A- und im D-Genom	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E07	2,4-D	WT	
WCH1 E08	2,4-D	WT	
WCH1 E09a	2,4-D	WT	gRNA4, <i>cas9</i>
WCH1 E09b	2,4-D	WT	<i>hpt</i>
WCH1 E10	2,4-D	WT	
WCH1 E11	2,4-D	WT	
WCH1 E12	2,4-D	WT	
WCH1 E13	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E14	2,4-D	WT	
WCH1 E15	2,4-D	verstorben	
WCH1 E16	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E17	2,4-D	verstorben	
WCH1 E18	2,4-D	WT	
WCH1 E19	2,4-D	WT	gRNA4
WCH1 E20	2,4-D	WT	
WCH1 E21	2,4-D	verstorben	
WCH1 E22	2,4-D	WT	
WCH1 E23	2,4-D	WT	
WCH1 E24	2,4-D	WT	
WCH1 E25	2,4-D	WT	
WCH1 E26	2,4-D	WT	
WCH1 E27	2,4-D	WT	
WCH1 E28	2,4-D	WT	
WCH1 E29	2,4-D	WT	
WCH1 E30	2,4-D	verstorben	
WCH1 E31	2,4-D	WT	
WCH1 E32a	2,4-D	Verdacht auf Einzelbasenaustausch im B-Genom	<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E32b	2,4-D	verstorben	
WCH1 E33	2,4-D	WT	gRNA4
WCH1 E34	2,4-D	verstorben	
WCH1 E35	2,4-D	WT	
WCH1 E36	2,4-D	WT	
WCH1 E37	2,4-D	WT	
WCH1 E38	2,4-D	WT	
WCH1 E39a	2,4-D	WT	gRNA4, <i>hpt</i>
WCH1 E39b	2,4-D	WT	gRNA4
WCH1 E40	2,4-D	WT	
WCH1 E41	2,4-D	WT	gRNA5, <i>hpt</i>
WCH1 E42a	2,4-D	verstorben	
WCH1 E42b	2,4-D	WT	
WCH1 E43	2,4-D	WT	
WCH1 E44	2,4-D	WT	
WCH1 E45a	2,4-D	WT	
WCH1 E45b	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E46	2,4-D	WT	
WCH1 E47	2,4-D	WT	
WCH1 E48a	2,4-D	WT	
WCH1 E48b	2,4-D	WT	
WCH1 E49a	2,4-D	WT	
WCH1 E49b	2,4-D	WT	
WCH1 E50	2,4-D	WT	
WCH1 E51	2,4-D	WT	
WCH1 E52	2,4-D	Mutationen im A-, B- und D-Genom	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E53	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E54	2,4-D	verstorben	
WCH1 E55a	2,4-D	WT	
WCH1 E55b	2,4-D	WT	
WCH1 E56	2,4-D	WT	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E57	2,4-D	WT	
WCH1 E58	2,4-D	WT	
WCH1 E59	2,4-D	verstorben	
WCH1 E60	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E61	2,4-D	Verdacht auf Einzelbasenaustausch im B-Genom	gRNA5

Anhang

Pflanzen-ID	Auxinbehandlung	Hinweise/Mutationen	T-DNA
WCH1 E62	2,4-D	WT	
WCH1 E63	2,4-D	WT	
WCH1 E64	2,4-D	WT	
WCH1 E65	2,4-D	WT	
WCH1 E66	2,4-D	WT	
WCH1 E67	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E68	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E69a	2,4-D	verstorben	
WCH1 E69b	2,4-D	Verdacht auf Einzelbasenaustausch im B-Genom	
WCH1 E69c	2,4-D	WT	
WCH1 E70	2,4-D	WT	
WCH1 E71a	2,4-D	WT	<i>cas9</i>
WCH1 E71b	2,4-D	WT	
WCH1 E72	2,4-D	WT	
WCH1 E73	2,4-D	WT	
WCH1 E74	2,4-D	verstorben	
WCH1 E75	2,4-D	WT	
WCH1 E76	2,4-D	WT	gRNA5
WCH1 E77	2,4-D	WT	
WCH1 E78	2,4-D	WT	
WCH1 E79	2,4-D	WT	
WCH1 E80	2,4-D	WT	
WCH1 E81	2,4-D	WT	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E82	2,4-D	WT	
WCH1 E83	2,4-D	WT	
WCH1 E84	2,4-D	verstorben	
WCH1 E85	2,4-D	verstorben	
WCH1 E86a	2,4-D	verstorben	
WCH1 E86b	2,4-D	verstorben	
WCH1 E87	2,4-D	WT	
WCH1 E88	2,4-D	WT	
WCH1 E89	2,4-D	WT	
WCH1 E90	2,4-D	WT	
WCH1 E91	2,4-D	WT	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E92	2,4-D	verstorben	
WCH1 E93	2,4-D	WT	
WCH1 E94	2,4-D	WT	<i>hpt</i>
WCH1 E95	2,4-D	WT	
WCH1 E96	2,4-D	WT	
WCH1 E97	2,4-D	Mutation im B-Genom	gRNA4
WCH1 E98	2,4-D	WT	
WCH1 E99	2,4-D	WT	
WCH1 E100a	2,4-D	WT	
WCH1 E100b	2,4-D	verstorben	
WCH1 E101	2,4-D, Centrophenoxin	Mutation im B-Genom	
WCH1 E102	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E103	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E104	2,4-D, Centrophenoxin	WT	<i>hpt</i>
WCH1 E105	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E106	2,4-D, Centrophenoxin	verstorben	
WCH1 E107	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E108	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E109	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E110	2,4-D, Centrophenoxin	Mutation im A-Genom	
WCH1 E111	2,4-D, Centrophenoxin	Mutation im A-Genom	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E112	2,4-D, Centrophenoxin	Verdacht auf Einzelbasenaustausch im B-Genom	
WCH1 E113	2,4-D, Centrophenoxin	Mutation im B-Genom	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E114	2,4-D, Centrophenoxin	WT	<i>hpt</i>
WCH1 E115	2,4-D, Centrophenoxin	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E116	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E117	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E118	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E119	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E120	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E121	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E122	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E123	2,4-D, Centrophenoxin	WT	gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
WCH1 E124	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E125	2,4-D, Centrophenoxin	WT	gRNA4, <i>hpt</i>
WCH1 E126	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E127	2,4-D, Centrophenoxin	WT	

Pflanzen-ID	Auxinbehandlung	Hinweise/Mutationen	T-DNA
WCH1 E128	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E129	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E130	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E131a	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E131b	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E132a	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH1 E132b	2,4-D, Centrophenoxin	WT	<i>hpt</i>

Tabelle A13 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH2

Pflanzen-ID	Auxinbehandlung	Hinweise/Mutationen	T-DNA
WCH2 E01	2,4-D	verstorben	
WCH2 E02	2,4-D	WT	
WCH2 E03	2,4-D	WT	
WCH2 E04	2,4-D	WT	
WCH2 E05	2,4-D	WT	
WCH2 E06	2,4-D	WT	<i>hpt</i>
WCH2 E07	2,4-D	WT	
WCH2 E08	2,4-D	WT	
WCH2 E09	2,4-D	verstorben	
WCH2 E10	2,4-D	WT	
WCH2 E11a	2,4-D	WT	
WCH2 E11b	2,4-D	verstorben	
WCH2 E11c	2,4-D	WT	
WCH2 E12	2,4-D	WT	<i>gRNA4, cas9, hpt</i>
WCH2 E13	2,4-D	WT	
WCH2 E14	2,4-D	WT	
WCH2 E15	2,4-D	WT	
WCH2 E16	2,4-D	WT	
WCH2 E17	2,4-D	WT	
WCH2 E18	2,4-D	WT	
WCH2 E19	2,4-D	WT	<i>gRNA4, cas9</i>
WCH2 E20	2,4-D	WT	
WCH2 E21	2,4-D	WT	
WCH2 E22	2,4-D	WT	
WCH2 E23	2,4-D	WT	
WCH2 E24a	2,4-D	WT	
WCH2 E24b	2,4-D	WT	
WCH2 E25	2,4-D	WT	<i>gRNA4</i>
WCH2 E26	2,4-D	verstorben	
WCH2 E27	2,4-D	WT	
WCH2 E28	2,4-D	verstorben	
WCH2 E29	2,4-D	WT	
WCH2 E30	2,4-D	WT	
WCH2 E31	2,4-D	verstorben	
WCH2 E32	2,4-D	WT	
WCH2 E33	2,4-D	WT	<i>gRNA4</i>
WCH2 E34	2,4-D	WT	
WCH2 E35	2,4-D	WT	
WCH2 E36	2,4-D	WT	
WCH2 E37	2,4-D	WT	
WCH2 E38	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH2 E39	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH2 E40	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH2 E41	2,4-D, Centrophenoxin	WT	<i>hpt</i>
WCH2 E42	2,4-D, Centrophenoxin	WT	<i>cas9</i>
WCH2 E43	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH2 E44	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH2 E45	2,4-D, Centrophenoxin	WT	

Tabelle A14 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des Transformationsexperimentes WCH3

Pflanzen-ID	Auxinbehandlung	Hinweise/Mutationen	T-DNA
WCH3 E01	2,4-D	WT	
WCH3 E02	2,4-D	WT	
WCH3 E03	2,4-D	WT	
WCH3 E04	2,4-D	WT	
WCH3 E05a	2,4-D	WT	
WCH3 E05b	2,4-D	WT	
WCH3 E06	2,4-D	WT	
WCH3 E07	2,4-D	verstorben	
WCH3 E08	2,4-D	WT	
WCH3 E09	2,4-D	WT	
WCH3 E10	2,4-D	WT	
WCH3 E11	2,4-D	WT	
WCH3 E12	2,4-D	WT	
WCH3 E13	2,4-D	verstorben	
WCH3 E14	2,4-D	WT	
WCH3 E15	2,4-D	WT	
WCH3 E16	2,4-D	WT	
WCH3 E17	2,4-D	verstorben	
WCH3 E18	2,4-D	WT	
WCH3 E19	2,4-D	WT	
WCH3 E20	2,4-D	WT	
WCH3 E21	2,4-D	WT	
WCH3 E22	2,4-D	WT	
WCH3 E23a	2,4-D	WT	gRNA5
WCH3 E23b	2,4-D	WT	
WCH3 E24	2,4-D, Centrophenoxin	verstorben	
WCH3 E25	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E26	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E27	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E28	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E29	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E30	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E31	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E32	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E33	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E34	2,4-D, Centrophenoxin	WT	
WCH3 E35	2,4-D, Centrophenoxin	verstorben	
WCH3 E36	2,4-D, Centrophenoxin	WT	

Anhang

Tabelle A15 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen der Transformationsexperimente WCH4A/1 und /2; *-Pflanze genomspezifisch untersucht wegen Verdacht auf Mutationen

Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA
WCH4A/1 E01	WT		WCH4A/1 E133	WT		WCH4A/1 E265	WT		WCH4A/2 E01	WT	
WCH4A/1 E02	WT		WCH4A/1 E134	tot		WCH4A/1 E266	WT		WCH4A/2 E02	WT	
WCH4A/1 E03	WT		WCH4A/1 E135	WT		WCH4A/1 E267	WT		WCH4A/2 E03	WT	
WCH4A/1 E04	WT		WCH4A/1 E136	WT		WCH4A/1 E268	WT		WCH4A/2 E04	WT	
WCH4A/1 E05	WT		WCH4A/1 E137	WT		WCH4A/1 E269	WT		WCH4A/2 E05	WT	
WCH4A/1 E06	WT		WCH4A/1 E138	WT		WCH4A/1 E270	WT		WCH4A/2 E06	WT	
WCH4A/1 E07	WT		WCH4A/1 E139	WT		WCH4A/1 E271	WT		WCH4A/2 E07	WT	
WCH4A/1 E08	WT		WCH4A/1 E140	WT		WCH4A/1 E272	WT		WCH4A/2 E08	WT	
WCH4A/1 E09	WT		WCH4A/1 E141	WT		WCH4A/1 E273	WT		WCH4A/2 E09	WT	
WCH4A/1 E10	WT		WCH4A/1 E142	WT		WCH4A/1 E274	WT		WCH4A/2 E10	WT	
WCH4A/1 E11	WT	cas9, hpt	WCH4A/1 E143	WT		WCH4A/1 E275	WT		WCH4A/2 E11	WT	cas9, hpt
WCH4A/1 E12	WT		WCH4A/1 E144	WT		WCH4A/1 E276	WT		WCH4A/2 E12	WT	hpt
WCH4A/1 E13	WT		WCH4A/1 E145	WT		WCH4A/1 E277	WT		WCH4A/2 E13	WT	
WCH4A/1 E14	WT		WCH4A/1 E146	WT		WCH4A/1 E278	WT		WCH4A/2 E14	WT	
WCH4A/1 E15	WT		WCH4A/1 E147	WT	cas9	WCH4A/1 E279	WT		WCH4A/2 E15	WT	
WCH4A/1 E16	WT		WCH4A/1 E148	WT		WCH4A/1 E280	WT		WCH4A/2 E16	WT	
WCH4A/1 E17	WT		WCH4A/1 E149	WT		WCH4A/1 E281	WT		WCH4A/2 E17	WT	
WCH4A/1 E18	WT		WCH4A/1 E150	WT		WCH4A/1 E282	WT		WCH4A/2 E18	WT	
WCH4A/1 E19	WT		WCH4A/1 E151	WT		WCH4A/1 E283	WT		WCH4A/2 E19	WT	
WCH4A/1 E20	WT		WCH4A/1 E152	WT		WCH4A/1 E284	WT		WCH4A/2 E20	WT	
WCH4A/1 E21	WT		WCH4A/1 E153	WT		WCH4A/1 E285	WT		WCH4A/2 E21	WT	
WCH4A/1 E22	WT		WCH4A/1 E154	WT		WCH4A/1 E286	WT		WCH4A/2 E22	WT	
WCH4A/1 E23	WT		WCH4A/1 E155	WT		WCH4A/1 E287	WT		WCH4A/2 E23	WT	
WCH4A/1 E24	WT		WCH4A/1 E156	WT*		WCH4A/1 E288	WT		WCH4A/2 E24	WT	
WCH4A/1 E25	WT		WCH4A/1 E157	WT		WCH4A/1 E289	WT		WCH4A/2 E25	WT	
WCH4A/1 E26	WT		WCH4A/1 E158	WT		WCH4A/1 E290	WT		WCH4A/2 E26	WT	
WCH4A/1 E27	WT		WCH4A/1 E159	WT		WCH4A/1 E291	WT		WCH4A/2 E27	WT	
WCH4A/1 E28	WT		WCH4A/1 E160	WT		WCH4A/1 E292	WT		WCH4A/2 E28	WT	
WCH4A/1 E29	WT		WCH4A/1 E161	WT		WCH4A/1 E293	WT		WCH4A/2 E29	WT	
WCH4A/1 E30	WT		WCH4A/1 E162	WT		WCH4A/1 E294	WT		WCH4A/2 E30	WT	
WCH4A/1 E31	WT		WCH4A/1 E163	WT		WCH4A/1 E295	WT		WCH4A/2 E31	WT	
WCH4A/1 E32	WT		WCH4A/1 E164	WT		WCH4A/1 E296	WT		WCH4A/2 E32	WT	
WCH4A/1 E33	WT		WCH4A/1 E165	WT		WCH4A/1 E297	WT		WCH4A/2 E33	WT	
WCH4A/1 E34	WT*		WCH4A/1 E166	WT		WCH4A/1 E298	WT		WCH4A/2 E34	WT	
WCH4A/1 E35	WT		WCH4A/1 E167	WT		WCH4A/1 E299	WT		WCH4A/2 E35	WT	
WCH4A/1 E36	WT		WCH4A/1 E168	WT		WCH4A/1 E300	WT		WCH4A/2 E36	WT	
WCH4A/1 E37	WT	cas9, hpt	WCH4A/1 E169	WT		WCH4A/1 E301	WT		WCH4A/2 E37	WT	
WCH4A/1 E38	WT		WCH4A/1 E170	WT		WCH4A/1 E302	WT		WCH4A/2 E38	WT	
WCH4A/1 E39	WT	cas9, hpt	WCH4A/1 E171	WT		WCH4A/1 E303	WT		WCH4A/2 E39	WT	
WCH4A/1 E40	WT		WCH4A/1 E172	WT		WCH4A/1 E304	WT		WCH4A/2 E40	WT	
WCH4A/1 E41	WT		WCH4A/1 E173	WT		WCH4A/1 E305	WT		WCH4A/2 E41	WT	
WCH4A/1 E42	WT		WCH4A/1 E174	WT		WCH4A/1 E306	WT		WCH4A/2 E42	WT	
WCH4A/1 E43	WT		WCH4A/1 E175	WT		WCH4A/1 E307	WT		WCH4A/2 E43	WT	hpt
WCH4A/1 E44	WT		WCH4A/1 E176	WT		WCH4A/1 E308	WT		WCH4A/2 E44	WT	hpt
WCH4A/1 E45	WT		WCH4A/1 E177	WT		WCH4A/1 E309	WT		WCH4A/2 E45	WT	hpt
WCH4A/1 E46	WT		WCH4A/1 E178	WT		WCH4A/1 E310	WT		WCH4A/2 E46	WT	hpt
WCH4A/1 E47	tot		WCH4A/1 E179	WT		WCH4A/1 E311	WT	cas9	WCH4A/2 E47	WT	
WCH4A/1 E48	WT		WCH4A/1 E180	WT		WCH4A/1 E312	WT	cas9, hpt	WCH4A/2 E48	WT	
WCH4A/1 E49	tot		WCH4A/1 E181	WT		WCH4A/1 E313	WT		WCH4A/2 E49	WT	
WCH4A/1 E50	WT		WCH4A/1 E182	WT		WCH4A/1 E314	WT		WCH4A/2 E50	WT	
WCH4A/1 E51	WT*		WCH4A/1 E183	WT		WCH4A/1 E315	WT		WCH4A/2 E51	WT	
WCH4A/1 E52	tot		WCH4A/1 E184	WT		WCH4A/1 E316	WT		WCH4A/2 E52	WT	hpt
WCH4A/1 E53	WT		WCH4A/1 E185	WT		WCH4A/1 E317	WT		WCH4A/2 E53	WT	cas9, hpt
WCH4A/1 E54	WT		WCH4A/1 E186	WT		WCH4A/1 E318	WT	cas9	WCH4A/2 E54	WT	cas9, hpt
WCH4A/1 E55	WT		WCH4A/1 E187	WT		WCH4A/1 E319	WT		WCH4A/2 E55	WT	hpt
WCH4A/1 E56	WT		WCH4A/1 E188	WT		WCH4A/1 E320	WT		WCH4A/2 E56	WT	
WCH4A/1 E57	WT		WCH4A/1 E189	WT		WCH4A/1 E321	WT		WCH4A/2 E57	WT	
WCH4A/1 E58	WT		WCH4A/1 E190	WT		WCH4A/1 E322	WT		WCH4A/2 E58	WT	
WCH4A/1 E59	WT		WCH4A/1 E191	WT		WCH4A/1 E323	WT		WCH4A/2 E59	WT*	
WCH4A/1 E60	WT		WCH4A/1 E192	WT		WCH4A/1 E324	WT		WCH4A/2 E60	WT*	
WCH4A/1 E61	WT		WCH4A/1 E193	WT		WCH4A/1 E325	WT		WCH4A/2 E61	WT	
WCH4A/1 E62	WT		WCH4A/1 E194	WT		WCH4A/1 E326	WT		WCH4A/2 E62	WT	
WCH4A/1 E63	WT		WCH4A/1 E195	WT		WCH4A/1 E327	WT	cas9, hpt	WCH4A/2 E63	WT	
WCH4A/1 E64	WT		WCH4A/1 E196	WT		WCH4A/1 E328	WT		WCH4A/2 E64	WT	
WCH4A/1 E65	WT		WCH4A/1 E197	WT		WCH4A/1 E329	WT		WCH4A/2 E65	WT	
WCH4A/1 E66	WT		WCH4A/1 E198	WT		WCH4A/1 E330	WT		WCH4A/2 E66	WT	
WCH4A/1 E67	WT*		WCH4A/1 E199	WT		WCH4A/1 E331	WT		WCH4A/2 E67	WT	
WCH4A/1 E68	WT		WCH4A/1 E200	WT		WCH4A/1 E332	WT		WCH4A/2 E68	WT	hpt
WCH4A/1 E69	WT		WCH4A/1 E201	WT		WCH4A/1 E333	WT		WCH4A/2 E69	WT	hpt
WCH4A/1 E70	WT		WCH4A/1 E202	WT		WCH4A/1 E334	WT		WCH4A/2 E70	WT	hpt
WCH4A/1 E71	WT		WCH4A/1 E203	WT		WCH4A/1 E335	WT		WCH4A/2 E71	WT	
WCH4A/1 E72	WT		WCH4A/1 E204	WT		WCH4A/1 E336	WT		WCH4A/2 E72	WT	
WCH4A/1 E73	WT		WCH4A/1 E205	WT		WCH4A/1 E337	WT		WCH4A/2 E73	WT	
WCH4A/1 E74	WT		WCH4A/1 E206	WT		WCH4A/1 E338	WT		WCH4A/2 E74	WT	
WCH4A/1 E75	WT		WCH4A/1 E207	WT		WCH4A/1 E339	WT		WCH4A/2 E75	WT	
WCH4A/1 E76	WT		WCH4A/1 E208	WT		WCH4A/1 E340	WT		WCH4A/2 E76	WT	
WCH4A/1 E77	WT		WCH4A/1 E209	WT		WCH4A/1 E341	WT		WCH4A/2 E77	WT	
WCH4A/1 E78	WT		WCH4A/1 E210	WT		WCH4A/1 E342	WT		WCH4A/2 E78	WT	

Anhang

Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA	Pflanzen-ID	Status	T-DNA
WCH4A/1 E79	WT		WCH4A/1 E211	WT		WCH4A/1 E343	WT		WCH4A/2 E79	WT	
WCH4A/1 E80	WT		WCH4A/1 E212	WT		WCH4A/1 E344	WT		WCH4A/2 E80	WT	
WCH4A/1 E81	WT	<i>cas9, hpt</i>	WCH4A/1 E213	WT		WCH4A/1 E345	WT		WCH4A/2 E81	WT	
WCH4A/1 E82	WT		WCH4A/1 E214	WT		WCH4A/1 E346	WT		WCH4A/2 E82	WT	
WCH4A/1 E83	WT		WCH4A/1 E215	WT		WCH4A/1 E347	WT		WCH4A/2 E83	WT	
WCH4A/1 E84	WT		WCH4A/1 E216	WT		WCH4A/1 E348	WT		WCH4A/2 E84	WT	
WCH4A/1 E85	WT		WCH4A/1 E217	WT		WCH4A/1 E349	WT				
WCH4A/1 E86	WT		WCH4A/1 E218	WT		WCH4A/1 E350	WT				
WCH4A/1 E87	WT		WCH4A/1 E219	WT		WCH4A/1 E351	WT				
WCH4A/1 E88	WT		WCH4A/1 E220	WT		WCH4A/1 E352	WT				
WCH4A/1 E89	WT		WCH4A/1 E221	WT		WCH4A/1 E353	WT				
WCH4A/1 E90	WT		WCH4A/1 E222	WT		WCH4A/1 E354	WT				
WCH4A/1 E91	WT		WCH4A/1 E223	WT		WCH4A/1 E355	WT				
WCH4A/1 E92	WT		WCH4A/1 E224	WT	<i>hpt</i>	WCH4A/1 E356	WT				
WCH4A/1 E93	WT		WCH4A/1 E225	WT		WCH4A/1 E357	WT				
WCH4A/1 E94	WT*		WCH4A/1 E226	WT		WCH4A/1 E358	WT				
WCH4A/1 E95	WT		WCH4A/1 E227	WT		WCH4A/1 E359	WT				
WCH4A/1 E96	WT		WCH4A/1 E228	WT		WCH4A/1 E360	WT				
WCH4A/1 E97	WT		WCH4A/1 E229	WT		WCH4A/1 E361	WT				
WCH4A/1 E98	WT		WCH4A/1 E230	WT		WCH4A/1 E362	WT				
WCH4A/1 E99	WT		WCH4A/1 E231	WT		WCH4A/1 E363	WT				
WCH4A/1 E100	WT		WCH4A/1 E232	WT		WCH4A/1 E364	WT				
WCH4A/1 E101	WT		WCH4A/1 E233	WT		WCH4A/1 E365	WT				
WCH4A/1 E102	WT		WCH4A/1 E234	WT		WCH4A/1 E366	WT				
WCH4A/1 E103	WT		WCH4A/1 E235	WT		WCH4A/1 E367	WT				
WCH4A/1 E104	WT*		WCH4A/1 E236	WT		WCH4A/1 E368	WT				
WCH4A/1 E105	WT		WCH4A/1 E237	WT	<i>hpt</i>	WCH4A/1 E369	WT				
WCH4A/1 E106	WT	<i>cas9, hpt</i>	WCH4A/1 E238	WT		WCH4A/1 E370	WT				
WCH4A/1 E107	tot		WCH4A/1 E239	WT		WCH4A/1 E371	WT				
WCH4A/1 E108	WT		WCH4A/1 E240	WT		WCH4A/1 E372	WT				
WCH4A/1 E109	WT		WCH4A/1 E241	WT		WCH4A/1 E373	WT				
WCH4A/1 E110	WT		WCH4A/1 E242	WT		WCH4A/1 E374	WT				
WCH4A/1 E111	WT		WCH4A/1 E243	WT		WCH4A/1 E375	WT				
WCH4A/1 E112	WT		WCH4A/1 E244	WT		WCH4A/1 E376	WT				
WCH4A/1 E113	WT		WCH4A/1 E245	WT		WCH4A/1 E377	WT				
WCH4A/1 E114	WT		WCH4A/1 E246	WT		WCH4A/1 E378	WT				
WCH4A/1 E115	WT		WCH4A/1 E247	WT*		WCH4A/1 E379	WT				
WCH4A/1 E116	WT		WCH4A/1 E248	WT		WCH4A/1 E380	WT				
WCH4A/1 E117	WT		WCH4A/1 E249	WT		WCH4A/1 E381	WT				
WCH4A/1 E118	WT		WCH4A/1 E250	WT		WCH4A/1 E382	WT				
WCH4A/1 E119	WT		WCH4A/1 E251	WT		WCH4A/1 E383	WT				
WCH4A/1 E120	WT		WCH4A/1 E252	WT		WCH4A/1 E384	WT				
WCH4A/1 E121	WT		WCH4A/1 E253	WT		WCH4A/1 E385	WT*				
WCH4A/1 E122	WT		WCH4A/1 E254	WT		WCH4A/1 E386	WT				
WCH4A/1 E123	WT		WCH4A/1 E255	WT		WCH4A/1 E387	WT				
WCH4A/1 E124	WT		WCH4A/1 E256	WT	<i>cas9, hpt</i>	WCH4A/1 E388	WT				
WCH4A/1 E125	WT		WCH4A/1 E257	WT		WCH4A/1 E389	WT				
WCH4A/1 E126	WT		WCH4A/1 E258	WT		WCH4A/1 E390	WT				
WCH4A/1 E127	WT		WCH4A/1 E259	WT		WCH4A/1 E391	WT				
WCH4A/1 E128	WT		WCH4A/1 E260	WT		WCH4A/1 E392	WT				
WCH4A/1 E129	WT		WCH4A/1 E261	WT		WCH4A/1 E393	WT				
WCH4A/1 E130	WT		WCH4A/1 E262	WT		WCH4A/1 E394	WT				
WCH4A/1 E131	WT		WCH4A/1 E263	WT		WCH4A/1 E395	WT				
WCH4A/1 E132	WT		WCH4A/1 E264	WT							

Tabelle A16 – Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E6 und ausgewählter Nachkommen; rot: keine Kornbildung; ZM: Zielmotiv

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
M1	E6	3/4: Δ 20 bp (ZM4) 1/4: Δ 1 bp (ZM5)	WT	2/8: Δ 15 bp (ZM4) 2/8: Δ 64 bp (ZM5)	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M2	E6-1	Δ 20 bp (ZM4)	Δ 36 bp (ZM4)	WT	
	E6-3	Δ 20 bp (ZM4)	heterozygot/ chimär	Δ 15 bp (ZM4)	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-6	Δ 1 bp (ZM4) Δ 30/+48 bp (ZM5)	heterozygot/ chimär	Δ 64 bp (ZM5)	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M3	E6-3-2	Δ 20 bp	Δ 6 bp	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-4	Δ 20 bp	Δ 36 bp	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-6	Δ 20 bp	heterozygot	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-8	Δ 20 bp	Δ 6 bp	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M4	E6-3-2-2	Δ 20 bp	Δ 6 bp	Δ 15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-4-5	Δ 20 bp	Δ 36 bp	Δ 15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-6-7	Δ 20 bp	Δ 36// Δ 33 bp	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-6-9	Δ 20 bp	Δ 36// Δ 5 bp	Δ 15 bp	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M5	E6-3-2-2-1	Δ 20 bp	Δ 6 bp	Δ 15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E6-3-4-5-10	Δ 20 bp	Δ 36 bp	Δ 15 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

Tabelle A17 – Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E101 und ausgewählter Nachkommen; ZM: Zielmotiv

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
M1	E101	WT	3/9: +1 bp (ZM4)	WT	
M2	E101-1	WT	+1 bp (ZM4)	WT	
	E101-2	WT	heterozygot	WT	
	E101-5	WT	+1 bp (ZM4)	WT	
	E101-9	WT	heterozygot	WT	
M3	E101-1-1	WT	+1 bp	WT	
	E101-2-2	WT	+1 bp	WT	
	E101-5-1	WT	+1 bp	WT	
	E101-9-1	WT	+1 bp	WT	
M4	E101-1-1-1	WT	+1 bp	WT	
M5	E101-1-1-1-2	WT	+1 bp	WT	

Tabelle A18 – Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E111 und ausgewählter Nachkommen sowie DH-Pflanzen; ZM: Zielmotiv

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
M1	E111	6/8: Δ 1 bp (ZM4) 1/8: Δ 1 bp (ZM5)	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M2	E111-1	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-2	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-3	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-4	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M3	E111-1-7	Δ 1 bp	heterozygot/ chimär	WT	gRNA4, gRNA5, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-2-3	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-3-4	Δ 1 bp	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-4-2	Δ 1 bp	WT	WT	
	E111-4-3	WT	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-4-7	Δ 1 bp	heterozygot/ chimär	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E111-4-8	heterozygot/ chimär	WT	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M4	E111-4-2-1	Δ 1 bp	WT	WT	
M5	E111-4-2-1-1	Δ 1 bp	WT	WT	
DH	E111-4-8-DH1	WT	WT	Δ 18/+7 bp	
	E111-4-8-DH3	Δ 1 bp	WT	Δ 18/+7 bp	

Tabelle A19 – Analyse der Mutationen der Einzelpflanze WCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen; ZM: Zielmotiv

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
M1	E113	1/4: Δ 11 bp (ZM4)	WT	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M2	E113-2	WT	WT	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-3	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-4	heterozygot/ chimär	Δ 11 bp (ZM4)	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-7	WT	Δ 11 bp (ZM4)	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
M3	E113-3-1	WT	Δ 39 bp	heterozygot/ chimär	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-3-5	WT	Δ 39 bp	WT	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-7-1	WT	Δ 11 bp	WT	
M4	E113-3-1-2	WT	Δ 39 bp	Δ 1 bp	gRNA4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E113-7-1-1	WT	Δ 11 bp	WT	
	E113-7-1-5				
M5	E113-3-1-2-2	WT	Δ 39 bp	Δ 1 bp	

Anhang

Tabelle A20 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 3 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
F1	97x113-3	WT	heterozygot/ chimär	WT	gRNA4, cas9, hpt
F2	97x113-3-1	WT	$\Delta 10/+13$ bp	WT	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-3-7	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
F3	97x113-3-1-2	WT	$\Delta 10/+13$ bp Δ	WT	cas9, hpt
	97x113-3-1-3	WT	$\Delta 10/+13$ bp	WT	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-3-1-5	heterozygot/ chimär	$\Delta 10/+13$ bp	WT	gRNA4, cas9, hpt
F4	97x113-3-1-2-3	WT	$\Delta 10/+13$ bp	WT	cas9

Tabelle A21 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 4 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen sowie DH-Pflanzen; rot: keine Kornbildung

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
F1	97x113-4	heterozygot/ chimär	WT	WT	gRNA4, cas9, hpt
F2	97x113-4-3	heterozygot/ chimär	$\Delta 24$ bp heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-8	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	WT	
F3	97x113-4-3-1	heterozygot/ chimär	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 1$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-2	$\Delta 1$ bp	heterozygot/ chimär	$\Delta 1$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-3	WT	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 1$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-4	$\Delta 129/+17$ bp	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 1$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-5	$\Delta 1$ bp	$\Delta 9/+13$ bp	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-6	heterozygot/ chimär	$\Delta 24$ bp	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-7	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-8	heterozygot/ chimär	$\Delta 5/+31$ bp	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-9	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-10	heterozygot	$\Delta 24$ bp	+1 bp	gRNA4, cas9, hpt
F4	97x113-4-3-6-4	$\Delta 1$ bp	$\Delta 24$ bp	$\Delta 32$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-6-5	$\Delta 14$ bp	$\Delta 24$ bp	$\Delta 32$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-6-6	$\Delta 14$ bp	$\Delta 24$ bp	heterozygot/ chimär	gRNA4, cas9, hpt
F5	97x113-4-3-6-6-9	$\Delta 14$ bp	$\Delta 24$ bp	$\Delta 1$ bp	gRNA4, cas9, hpt
DH	97x113-4-3-DH4	$\Delta 14$ bp	$\Delta 5/+31$ bp	+1 bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-DH5	+1 bp	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 2$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-DH8	$\Delta 1$ bp	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 8/+2$ bp	gRNA4, cas9, hpt
	97x113-4-3-DH10	+1 bp	$\Delta 5/+31$ bp	$\Delta 24$ bp	gRNA4, cas9, hpt

Tabelle A22 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 5 aus der Kreuzung WCH1-E97xWCH1-E113 und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
F1	97x113-5	WT	WT	heterozygot/chimär	gRNA4
F2	97x113-5-3	WT	WT	$\Delta 11/+1$ bp	
	97x113-5-5	WT	WT	$\Delta 11/+1$ bp	
F3	97x113-5-3-1	WT	WT	$\Delta 11/+1$ bp	
F4	97x113-5-3-1-1	WT	WT	$\Delta 11/+1$ bp	

Tabelle A23 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 3 aus der Kreuzung C2/A (WCH1-E111-4-2x(WCH1-E97xWCH1-E113)-5-5) und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D
BC-F1	C2/A-3	WT// $\Delta 1$ bp	WT	WT// $\Delta 11/+1$ bp
BC-F2	C2/A-3-2	$\Delta 1$ bp	WT	WT// $\Delta 11/+1$ bp
	C2/A-3-5	WT// $\Delta 1$ bp	WT	$\Delta 11/+1$ bp
BC-F3	C2/A-3-2-8	$\Delta 1$ bp	WT	$\Delta 11/+1$ bp

Tabelle A24 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 1 aus der Kreuzung C3/A (WCH1-E101-9-1x(WCH1-E97xWCH1-E113)-5-3) und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D
BC-F1	C3/A-1	WT	WT//+1 bp	WT// $\Delta 11/+1$ bp
BC-F2	C3/A-1-2	WT	+1 bp	$\Delta 11/+1$ bp
	C3/A-1-7	WT	+1 bp	$\Delta 11/+1$ bp
BC-F3	C3/A-1-2-1	WT	+1 bp	$\Delta 11/+1$ bp

Tabelle A25 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 4 aus der Kreuzung C4/A (WCH1-E101-1-1xWCH1-E111-4-2) und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D
BC-F1	C4/A-4	WT// $\Delta 1$ bp	WT//+1 bp	WT
BC-F2	C4/A-4-9	$\Delta 1$ bp	WT//+1 bp	WT
	C4/A-4-10	WT// $\Delta 1$ bp	+1 bp	WT
BC-F3	C4/A-4-9-4	$\Delta 1$ bp	+1 bp	WT

Tabelle A26 – Analyse der Mutationen der Tochterpflanze 1 aus der Kreuzung C6/A (Bobwhite x WCH1-E6-3-8) und ausgewählter Nachkommen

Generation	Pflanzen-ID	Bh-A	Bh-B	Bh-D	T-DNA
BC-F1	C6/A-1	WT// $\Delta 20$ bp	WT// $\Delta 6$ bp	WT// $\Delta 15$ bp	gRNA4, gRNA5, cas9, hpt
BC-F2	C6/A-1-15	WT// $\Delta 20$ bp	$\Delta 6$ bp	WT	
	C6/A-1-17	$\Delta 20$ bp	WT	WT// $\Delta 15$ bp	
	C6/A-1-19	$\Delta 20$ bp	$\Delta 6$ bp	$\Delta 15$ bp	gRNA4, gRNA5, cas9, hpt
	C6/A-1-20	$\Delta 20$ bp	WT// $\Delta 6$ bp	WT// $\Delta 15$ bp	
BC-F3	C6/A-1-15-15	WT	$\Delta 6$ bp	WT	
	C6/A-1-15-13	$\Delta 20$ bp	$\Delta 6$ bp	WT	
	C6/A-1-17-16	$\Delta 20$ bp	WT	$\Delta 15$ bp	
	C6/A-1-20-5	$\Delta 20$ bp	WT	WT	
	C6/A-1-20-6	$\Delta 20$ bp	WT// $\Delta 6$ bp	$\Delta 15$ bp	
	C6/A-1-20-8	$\Delta 20$ bp	$\Delta 6$ bp	WT// $\Delta 15$ bp	

Tabelle A27 – Aufschlüsselung der mittels Antherenkultur erzeugten DH-Regenerate nach Linien, eingesetzten Antheren, Ploidiestatus und Fertilität

Pflanzen-ID	Anzahl Ähren aus denen Antheren isoliert wurden	Anzahl der Regenerate (fertile/sterile/tote Pflanzen)			
		Gesamt	allohexaploid	trihaploid	nonaploid
E6-3-2	5	2	2 (2/0/0)		
E6-3-4	3	1	1 (0/1/0)		
E101-2-2	4	9	9 (3/6/0)		
E111-1-7	4	13	5 (1/2/2)	8 (0/3/5)	
E111-1-8	7	-			
E111-4-3	5	1	1 (0/0/1)		
E111-4-7	5	17	14 (13/1/0)	3 (0/0/3)	
E111-4-8	5	14	5 (4/1/0)	9 (1/2/6)	
E113-3-1	8	11	2 (2/0/0)	9 (1/3/5)	
E113-3-5	5	1	1 (1/0/0)		
E113-4-3	3	-			
97x113-3-1	4	-			
97x113-3-7	6	-			
97x113-4-3	7	10	5 (2/3/0)	5 (0/1/4)	
97x113-4-8	5	3	2 (2/0/0)	1 (0/0/1)	

Tabelle A28 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit *Spl14-gRNA2-1/Cas9*-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes (BG769)

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG769 E01	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E02	mutiert, chimär	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E03	mutiert, heterozygot, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E04	mutiert, chimär	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E05	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion und Deletion	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E06	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E07	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E08	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E09	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E10	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E11	mutiert, chimär, 1 bp Insertionen	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E12	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E13	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E14	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E15	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E16	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E17	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769 E18	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E01	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E02	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E03	mutiert, heterozygot, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E04	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E05	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E06	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E07	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E08	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E09	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E10	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E11	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E12	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E13	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E14	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E15	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E16	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E17	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG769/A E18	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E19	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E20	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E21	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E22	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E23	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E24	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E25	WT	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E26	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E27	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E28	mutiert	<i>gRNA2-1, cas9</i>
BG769/A E29	nicht auswertbar	<i>gRNA2-1, cas9</i>

Tabelle A29 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit *Spl14-gRNA2-4/Cas9*-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes (BG770)

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG770 E01	mutiert, heterozygot, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E02	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E03	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E04	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E05	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E06	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E07	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E08	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E09	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E10	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E11	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E12	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E13	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E14	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E15	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E16	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E17	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E18	WT	
BG770 E19	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E20	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E21	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E22	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E23	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E24	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E25	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E26	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E27	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E28	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E29	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E30	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E31	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E32	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E33	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E34	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E35	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E36	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E37	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E38	mutiert, biallelisch, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E39	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E40	nicht auswertbar	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E41	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E42	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E43	mutiert, chimär, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>
BG770 E44	mutiert, homozygote, 1 bp Insertion	<i>gRNA2-4, cas9</i>

Tabelle A30 – Analyse der Einzelpflanze 11 der mit dem *Spl14*-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen; *-Weiterführung in M3-Generation

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	T-DNA
M1	E11	+1 bp (T)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
M2	E11-2	+1 bp (T)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E11-5	+1 bp (T)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E11-6	+1 bp (T)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E11-7	+1 bp (T)	
	E11-8*	+1 bp (T)	

Tabelle A31 – Analyse der Einzelpflanze 12 der mit dem *Spl14*-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen; *-Weiterführung in M3-Generation

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	T-DNA
M1	E12	+1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
M2	E12-1	+1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E12-5	+1 bp (A)	
	E12-6	+1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E12-7*	+1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

Tabelle A32 – Analyse der Einzelpflanze 20 der mit dem *Spl14*-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen; *-Weiterführung in M3-Generation

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	T-DNA
M1	E20	+1 bp (T/A)	gRNA2-4, <i>cas9</i>
M2	E20-1	+1 bp (T)//+1 bp (A)	
	E20-2	+1 bp (T)//+1 bp (C)	
	E20-3	+1 bp (T)//+1 bp (A)	<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E20-4	+1 bp (T)	<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E20-6	+1 bp (T)//+1 bp (A)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E20-7*	+1 bp (T)//+1 bp (A)	<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E20-8	+1 bp (T)//+1 bp (A)	<i>cas9</i> , <i>hpt</i>
	E20-9	+1 bp (T)	<i>hpt</i>
	E20-10	+1 bp (C)	gRNA2-4, <i>cas9</i> , <i>hpt</i>

Tabelle A33 – Relative Expression $2^{-(\Delta CT)}$ von *Spl14* und *Vrs*-Genen in *Spl14*-KO-Pflanzen (mit *Spl14*-gRNA2-4/Cas9-Konstrukt transformiert); (\pm)-Standardabweichung

Gen	Pflanzenfamilie E18 (WT)	Pflanzenfamilie E11-8	Pflanzenfamilie E12-7
<i>Spl14</i>	0,0278 (\pm 0,0144)	0,0076 (\pm 0,0044)	0,0088 (\pm 0,0014)
<i>Vrs1</i>	0,1704 (\pm 0,0042)	0,0745 (\pm 0,0374)	0,0873 (\pm 0,0206)
<i>Vrs2</i>	0,0463 (\pm 0,0002)	0,0489 (\pm 0,0065)	0,0638 (\pm 0,0014)
<i>Vrs3</i>	0,0085 (\pm 0,0074)	0,0065 (\pm 0,0026)	0,0084 (\pm 0,0001)
<i>Vrs4/Ramosa2</i>	0,0136 (\pm 0,0008)	0,0065 (\pm 0,0024)	0,0122 (\pm 0,0029)
<i>Vrs5/IntC</i>	0,0037 (\pm 0,0018)	0,0013 (\pm 0,0001)	0,0008 (\pm 0,0000)

Tabelle A34 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit *Spl14-gRNA3-2A/Cas9*-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes (BG766)

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG766 E01	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl14</i>	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E02	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E03	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E04	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E05	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E06	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E07	heterozygot mutiert (2 bp Deletion) in <i>Spl14</i>	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E08	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E09	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E10	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E11	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E12	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E13	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E14	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E15	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E16	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E17	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E18	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E19	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E20	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766 E21	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E01	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E02	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E03	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E04	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E05	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
BG766/A E06	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>

Tabelle A35 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit *Spl14-gRNA3-2G/Cas9*-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes (BG767)

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG767 E01	homozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl14</i> , chimär in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E02	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E03	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E04	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E05	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E06	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E07	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E08	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E09	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E10	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E11	heterozygot mutiert (1 bp Deletion) in <i>Spl14</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E12	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E13	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E14	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E15	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E16	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E17	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E18	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E19	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E20	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E21	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767 E22	WT	<i>cas9</i>
BG767 E23	biallelisch mutiert in <i>Spl14</i> , heterozygot mutiert in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E01	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E02	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E03	heterozygot mutiert (30 bp Deletion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E04	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E05	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E06	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG767/A E07	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E08	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E09	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E10	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
BG767/A E11	WT	<i>gRNA3-2G, cas9</i>

Tabelle A36 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen des mit *Spl14-gRNA3-2o1/Cas9*-Konstrukt durchgeführten Transformationsexperimentes (BG768)

Pflanzen-ID	Hinweise/Mutationen	T-DNA
BG768 E01	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E02	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E03	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E04	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E05	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E06	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E07	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E08	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E09	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E10	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E11	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E12	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E13	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E14	heterozygot mutiert (1 bp Insertion) in <i>Spl17</i>	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E15	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E16	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E17	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E18	WT	
BG768 E19	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768 E20	WT	
BG768/A E01	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E02	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E03	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E04	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E05	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E06	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E07	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E08	WT	<i>cas9</i>
BG768/A E09	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
BG768/A E10	WT	<i>cas9</i>
BG768/A E11	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>

Tabelle A37 – Analyse der Einzelpflanze 1 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E1	+1 bp (A)	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
M2	E1-11	+1 bp (A)	WT	
	E1-16	+1 bp (A)	WT	<i>gRNA3-2A, cas9, hpt</i>
M3	E1-11-1	+1 bp (A)	WT	

Tabelle A38 – Analyse der Einzelpflanze 7 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E7	Δ 2 bp	WT	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
M2	E7-16	Δ 2 bp	WT	
	E7-17	Δ 2 bp	WT	<i>gRNA3-2A, cas9, hpt</i>
	E7-18	Δ 2 bp	WT//+1 bp (A)	<i>gRNA3-2A, cas9, hpt</i>
M3	E7-16-3	Δ 2 bp	WT	
	E7-17-1	Δ 2 bp	WT	<i>gRNA3-2A, cas9, hpt</i>

Tabelle A39 – Analyse der Einzelpflanze 12 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2A/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E12	WT	+1 bp (C)	<i>gRNA3-2A, cas9</i>
M2	E12-14	WT//+1 bp (T)	WT	
	E12-17	WT	WT//+1 bp (C)	
M3	E12-17-1	WT	+1 bp (C)	

Tabelle A40 – Analyse der Einzelpflanze 1 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2G/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E1	+1 bp (A)	+1 bp (T/A)	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
M2	E1-11	+1 bp (A)	+1 bp (T)	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>
	E1-15	+1 bp (A)	+1 bp (T)	
	E1-16	+1 bp (A)	WT	
	E1-17	+1 bp (A)	+1 bp (T)	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>

Tabelle A41 – Analyse der Einzelpflanze 23 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2G/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E23	+1 bp (A)/ Δ 19 bp	+1 bp (A)	<i>gRNA3-2G, cas9</i>
M2	E23-13	Δ 1 bp	WT//+1 bp (A)	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>
	E23-14	WT	+1 bp (A)	
	E23-17	Δ 1// Δ 2 bp	WT	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>
M3	E23-14-1	WT	+1 bp (A)	
	E23-17-3	Δ 2 bp	WT	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>
	E23-17-4	Δ 1 bp	WT	<i>gRNA3-2G, cas9, hpt</i>

Tabelle A42 – Analyse der Einzelpflanze 2 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E2	WT	+1 bp (A)	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
M2	E2-17	WT	+1 bp (A)	<i>gRNA3-2o1</i>
M3	E2-17	WT	+1 bp (A)	

Tabelle A43 – Analyse der Einzelpflanze 7 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E7	WT	+1 bp (T)	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
M2	E7-11	WT	heterozygot/ chimär	
	E7-12	WT	+1 bp (A)	<i>gRNA3-2o1, cas9, hpt</i>
M3	E7-11-1	WT	+1 bp (T)	
	E7-11-5	WT	Δ 28 bp	

Tabelle A44 – Analyse der Einzelpflanze 14 der mit dem *Spl14/17-gRNA3-2o1/Cas9*-Konstrukt transformierten Gerstenpflanzen

Generation	Pflanzen-ID	<i>Spl14</i>	<i>Spl17</i>	T-DNA
M1	E14	WT	+1 bp (T)	<i>gRNA3-2o1, cas9</i>
M2	E14-13	WT//+1 bp (T)	WT	<i>gRNA3-2o1, cas9, hpt</i>

Tabelle A45 – Genotypisierung der regenerierten Pflanzen der mit *Spl14-gRNA3-1* bzw. *3-3/APOBEC1-nCas9-UGI-Konstrukten* durchgeführten Transformationsexperimente (BG811/BG812)

Pflanzen-ID	Mutationen	T-DNA	Pflanzen-ID	Mutationen	T-DNA
BG811 E01	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E01	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E02	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E02	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E03	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E03	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E04	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E04	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E05	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E05	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E06	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E06	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E07	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E07	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E08	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E08	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E09	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E09	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E10	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E10	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E11	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E11	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E12	WT		BG812 E12	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E13	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E13	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E14	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E14	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E15	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E15	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E16	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E16	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E17	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E17	WT	<i>gRNA3-3</i>
BG811 E18	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E18	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E19	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E19	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E20	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E20	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E21	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E21	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E22	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E22	WT	
BG811 E23	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E23	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E24	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E24	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E25	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E25	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E26	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E26	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E27	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E27	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E28	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E28	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E29	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E29	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E30	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E30	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E31	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E31	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E32	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E32	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E33	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E33	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E34	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E34	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E35	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E35	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E36	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E36	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E37	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E37	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E38	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E38	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E39	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E39	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E40	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E40	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E41	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E41	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E42	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E42	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E43	WT	<i>gRNA3-1</i>	BG812 E43	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E44	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E44	WT	<i>gRNA3-3</i>
BG811 E45	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E45	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E46	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E46	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E47	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E47	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E48	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E48	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E49	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E49	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E50	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E50	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
BG811 E51	WT	<i>gRNA3-1, ncas9</i>	BG812 E51	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E52	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E53	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E54	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E55	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E56	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E57	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E58	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E59	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>
			BG812 E60	WT	<i>gRNA3-3, ncas9</i>

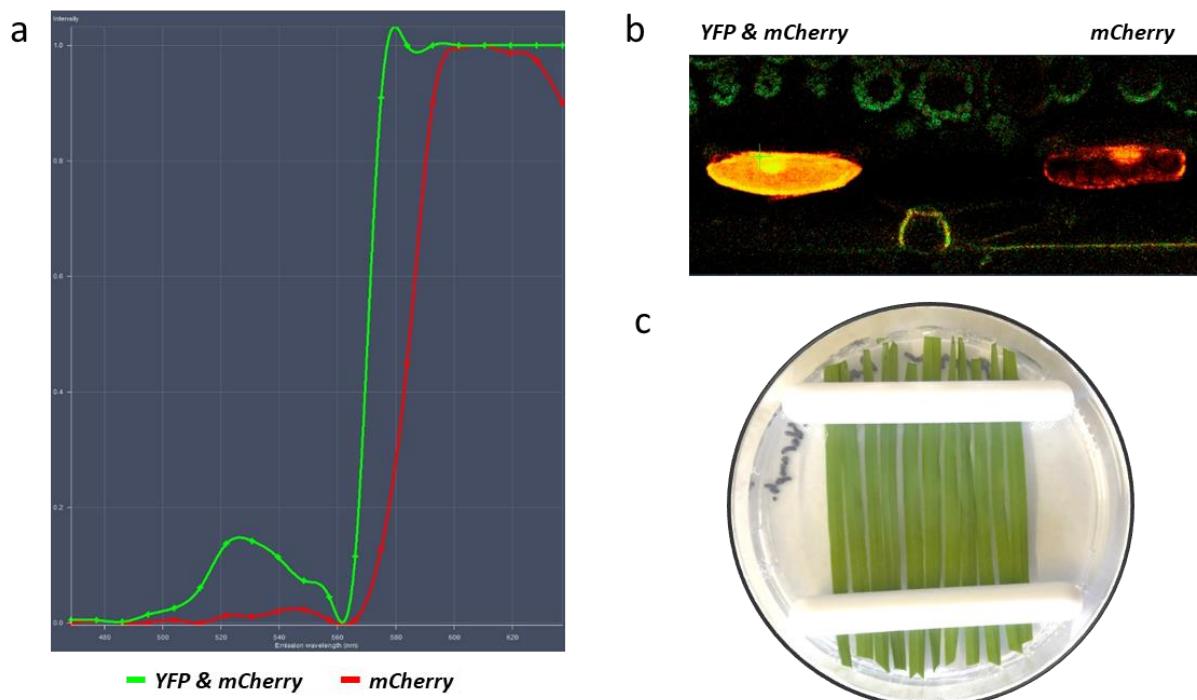
II) Ergänzende Abbildungen

Abbildung A1 – Ballistischer gRNA-Aktivitätstest in Epidermiszellen der Unterseite von Weizenblättern; (a) Signaldiagramm des CLSM-Lambda-Scans mit Anregung bei 488 nm und 561 nm, grüne Kurve von Zellen mit YFP und mCherry, rote Kurve von Zellen mit mCherry; (b) Mikroskopische Darstellung von Zellen mit YFP- und mCherry-Signal (links) oder nur mCherry-Signal (rechts); (c) Vorbereitete Platte mit Weizenblättern, die so fixiert sind, dass die Unterseiten in Richtung Kanone ausgerichtet sind

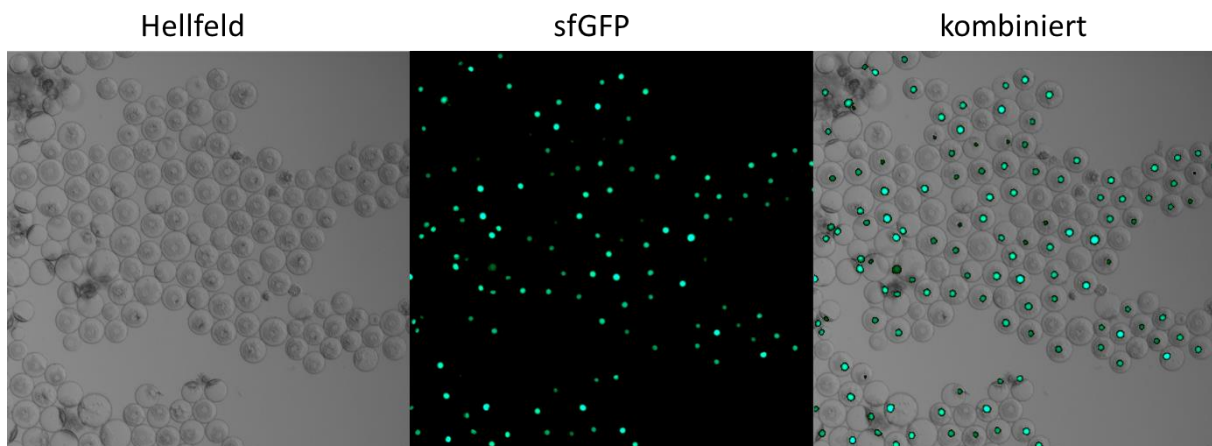


Abbildung A2 – Kontrolle der Transfektionseffizienz von Weizenprotoplasten mittels sfGFP; Hellfeldaufnahme der Weizenprotoplasten (links), kernlokalisierendes GFP-Signal (mitte) und deren Kombination (rechts)

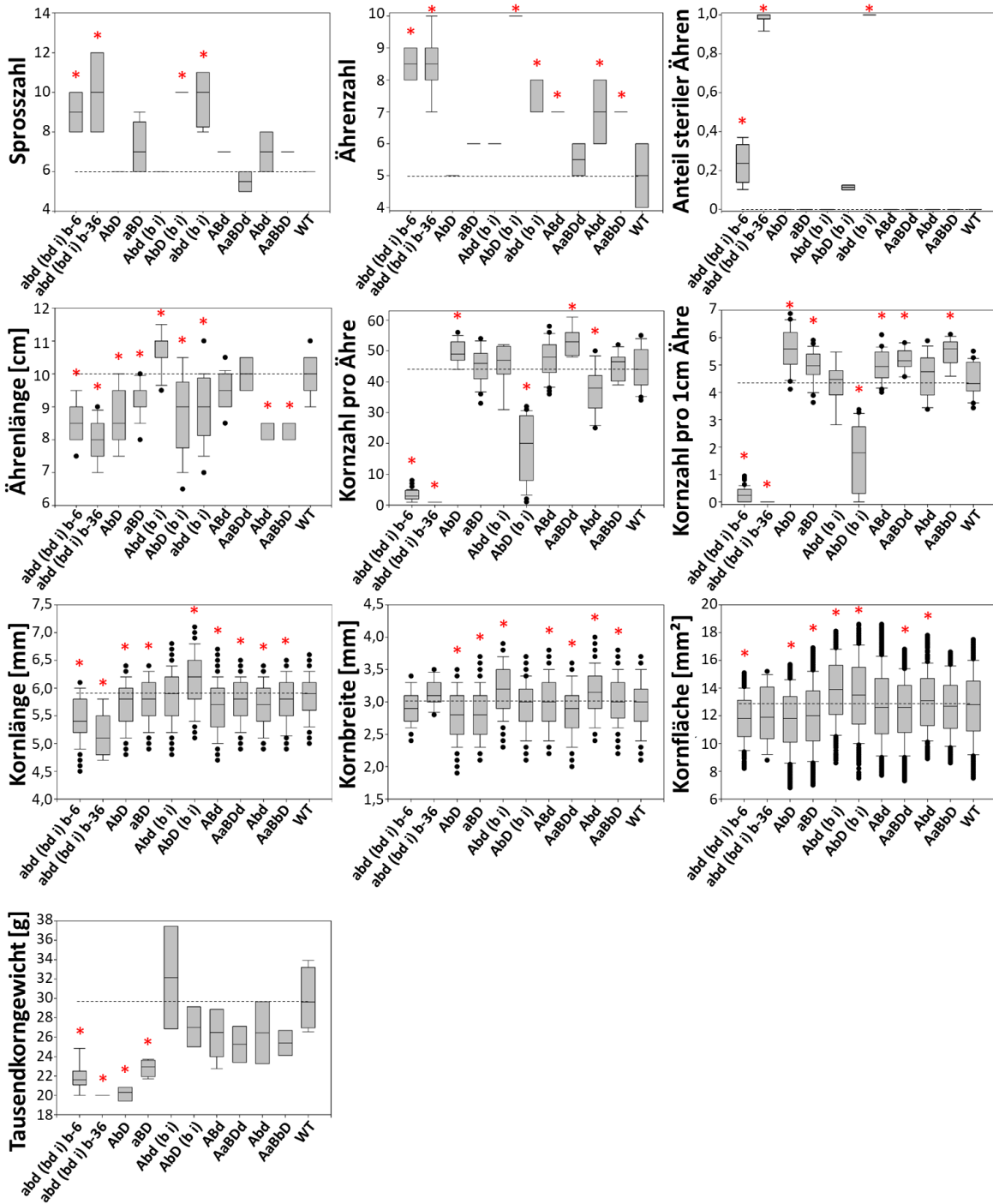


Abbildung A3 – Untersuchung Pflanzenarchitektur-bezogener und ertragsrelevanter Parameter von Pflanzen der M5-, F4- und BC-F2-Generation mit Mutationen in *Branched head*; A/B/D: *Branched head* (*Bh*) Homoeoallele; a/b/d: mutierte *bh*-Allele; i: Mutationen ohne Leserahmenverschiebung in den vorangestellten *Bh*-Homoeoallelen; WT: E108; *aBD*: E111-4-2; *AbD*: E101; *AbD (b i)*: 97x113-3; *Abd*: 97x113-5; *AaBbD*: C4 mit heterozygoten Mutationen; *AaBDd*: C2 mit heterozygoten Mutationen; *Abd*: C3; *Abd (b i)*: E113; *abd (b i)*: 97x113-4; *abd (bd i) b-6*: E6-3-2; *abd (bd i) b-36*: E6-3-4; rote Asteriske repräsentieren signifikanten Unterschied zum Wildtyp (WT); gestrichelte Linie repräsentiert Wildtyp-Median

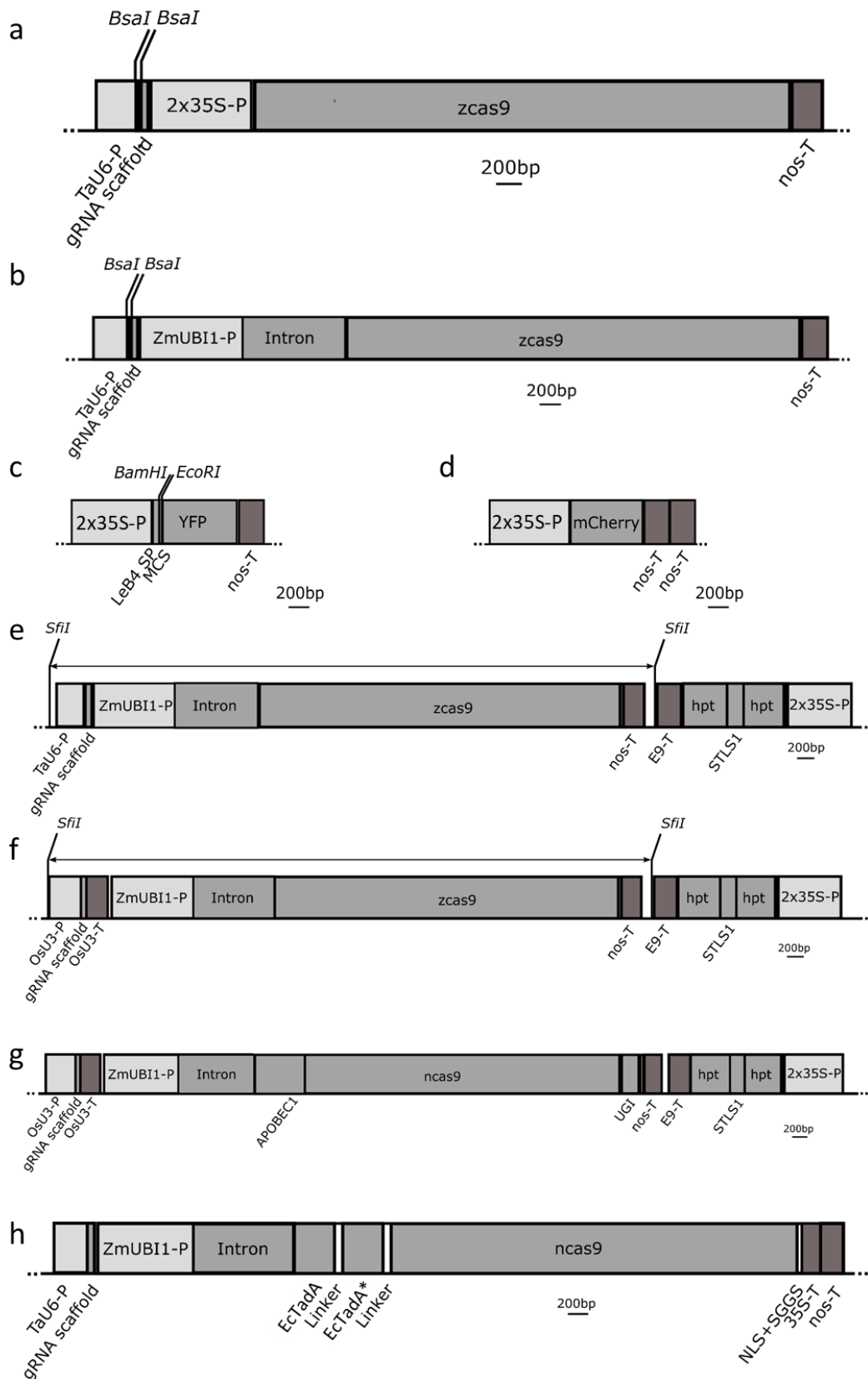


Abbildung A4 – Schematische Darstellung der Expressionskassetten der verwendeten Konstrukte; (a,b) intermediäre gRNA/cas9-Konstrukte (a) pSH179 und (b) pNB38; (c) generischer Zielvektor pNB1; (d) Kontrollvektor pNB2; (e,f) Binärvektoren im p6i-Hintergrund mit gRNA- und cas9-Expressionseinheiten für (e) Weizen und (f) Gerste; (g) Binärvektor im p6i-Hintergrund mit gRNA- und Cytidin-Deaminase-Expressionseinheit *APOBEC1-ncas9-UGI*; (h) Intermediärvektor mit gRNA- und Adenosin-Deaminase-Expressionseinheit *ecTadA-ecTadA**; TaU6-P: Promotor des Weizen *U6*-Gens, OsU3-P: Promotor des Reis *U3*-Gens, gRNA scaffold: Zielmotiv-

unspezifischer 3'-Teil der gRNA, OsU3-T: Terminator des Reis *U3*-Gens, ZmUBI1-P und Intron: Mais *UBIQUITIN1* Promotor und 5'UTR mit ersten Intron, 2x35S-P: doppelt-verstärkter Promotor des Blumenkohlmosaikvirus 35S-Gens, zcas9: für Mais Codon-optimierte *Spcas9*-Gen, LeB4-SP: DNA-Sequenz des Legumin-B4-Speicherprotein-Signalpeptids (Bäumlein et al., 1986), MCS: Klonierungsstelle ,*multiple cloning site*'; YFP: gelb fluoreszierendes Protein-Gen; mCherry: rot fluoreszierendes Protein-Gen *mCherry*, APOBEC1: Ratten-Cytidin-Deaminase APOBEC1 (Zong et al., 2017), ecTadA-Linker-ecTadA: tRNA Adenosin-Deaminase ecTadA-ecTadA* mit Zwischensequenz (Li et al., 2018a), ncas9: Mais codon-optimierte *Spcas9* mit A29C-Mutation (resultiert in D10A-Aminosäuretausch in Nuklease-Domäne RuvC und resultierender Nickase-Funktion), UGI: Uracil-Glykosylase-Inhibitor (Zong et al., 2017), nos-T: Terminator des *nopalinsynthase*-Gens aus *Agrobacterium*, 35S-T: Terminator des Blumenkohlmosaikvirus 35S-Gens, E9-T: Terminator des Erbsen *rbcs-E9*-Gens, hpt: *hygromycinphosphotransferase*-Gen, STLS1: portables Intron 2 (PIV2) des Kartoffelgens *ST-LS1* (Vancanneyt et al., 1990), NLS+SGGS: Kernlokalisierungssignal und SGGS-Zwischensequenz; BsaI-Schnittstellen zum Einsetzen des genspezifischen Teils der gRNA; BamHI/EcoRI-Schnittstellen zum Einsetzen des Zielmotivs; SfiI-Schnittstellen zum gerichteten Einsetzen der gRNA/*cas9*-Expressionseinheiten; schwarzer Balken entspricht 200 bp

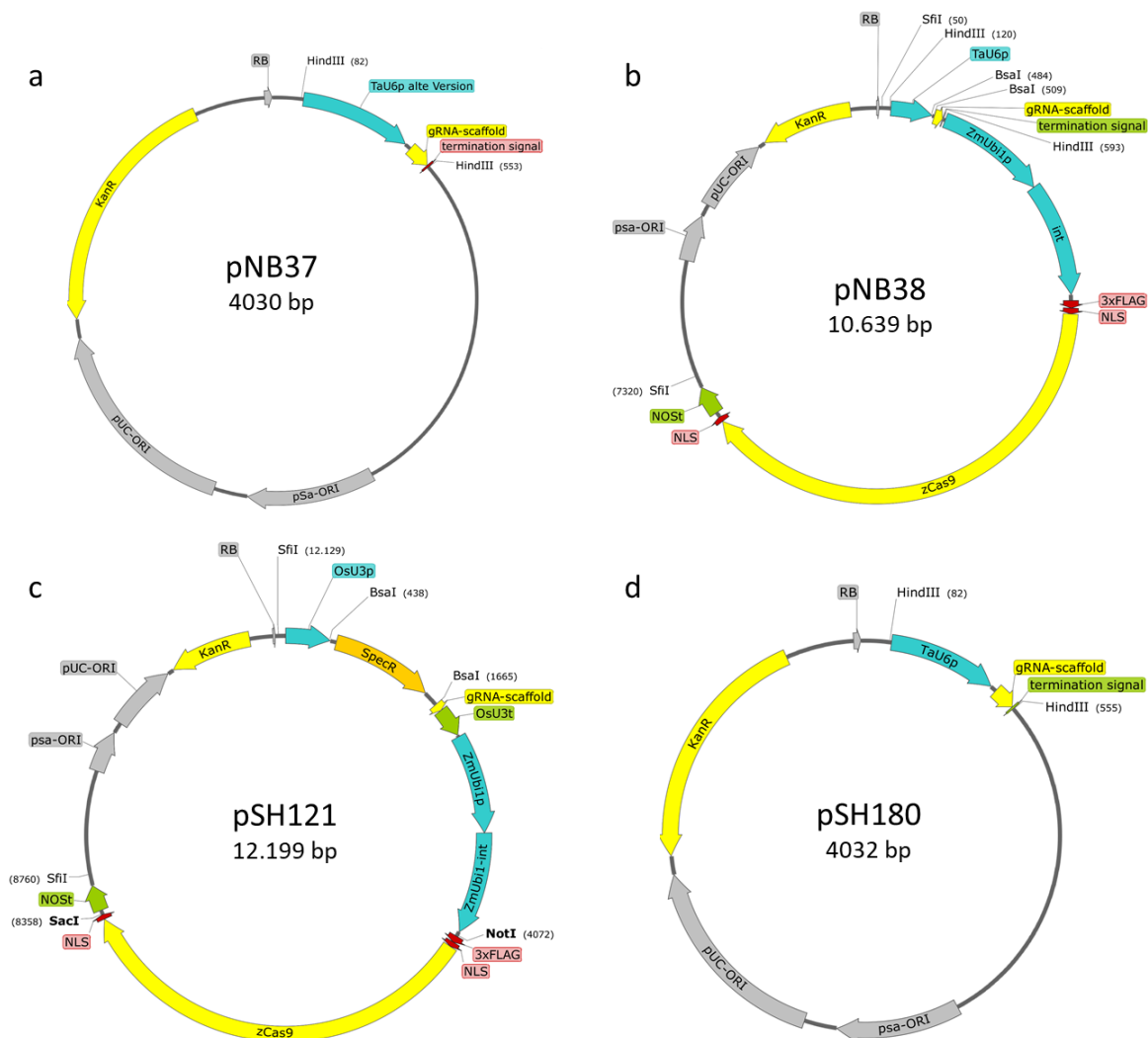


Abbildung A5 – Plasmidkarten generischer Vektoren zum Austausch des *TaU6*-Promotors; (a) pNB37 mit altem *TaU6*-Promotor; (b) pNB38 mit neuem *TaU6*-Promotor und *cas9*-Expressionskassette; (c) pSH121 mit *OsU3*-Promotor und *cas9*-Expressionskassette; (d) pSH180 mit neuem *TaU6*-Promotor

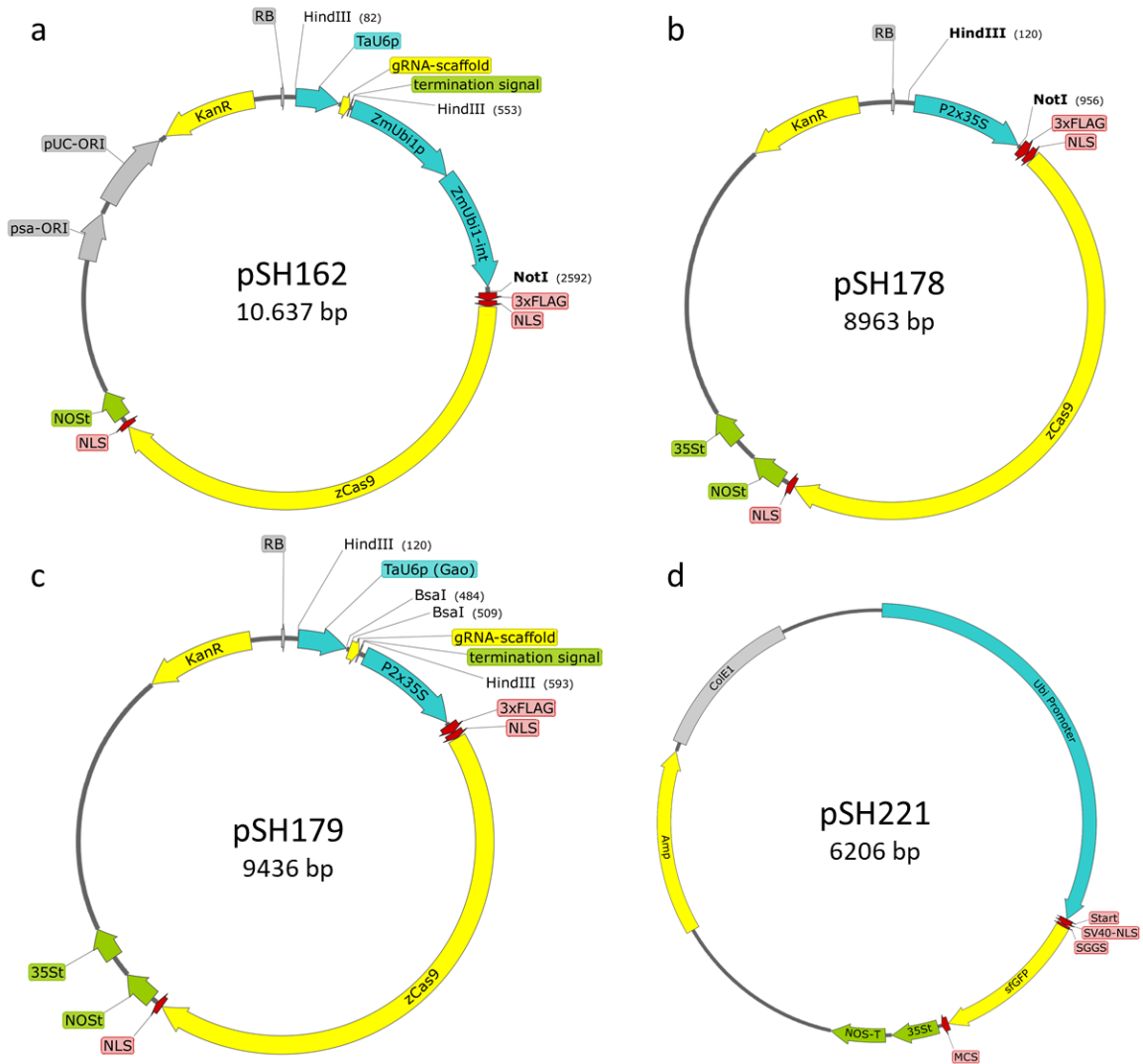


Abbildung A6 – Plasmidkarten generischer Vektoren zum Austausch des Promotors für *cas9* und *sfGFP*-Konstrukt; (a) pSH162 mit *cas9* und Plasmidrahmen; (b) pSH178 mit doppelt-verstärkten 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus; (c) pSH179 mit neuem *TaU6*-Promotor und *2x35S::cas9*-Expressionskassette; (d) pSH221 mit *sfGFP*-Expressionskassette

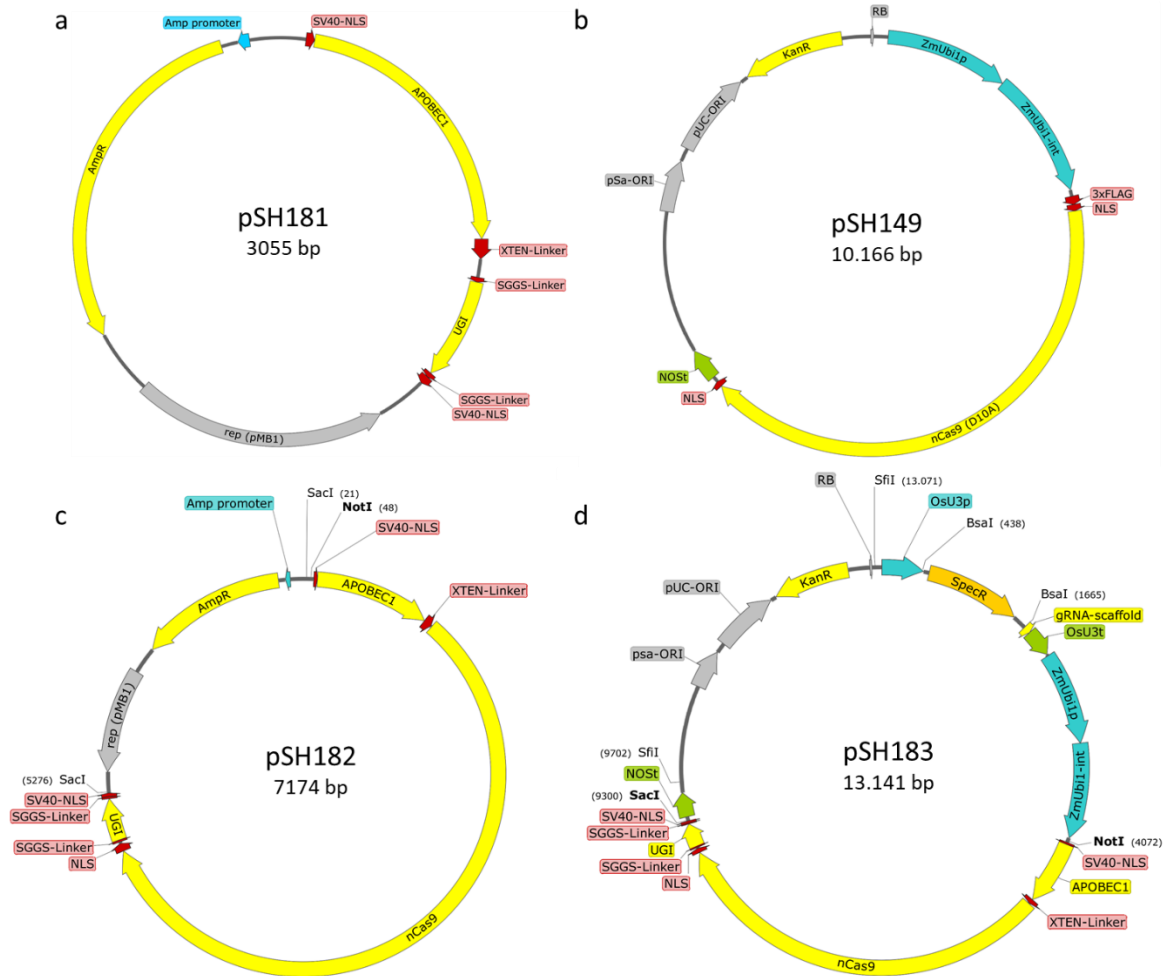


Abbildung A7 – Plasmidkarten generischer Vektoren zur Erstellung der Cytidin-Deaminase-Konstrukte; (a) pSH181 mit *APOBEC1* und *UGI*-Sequenzen; (b) pSH149 mit *ncas9* (D10A)-Expressionskassette; (c) pSH182 mit *APOBEC1-ncas9*(D10A)-*UGI*-Sequenz; (d) pSH183 mit *OsU3*-Promotor und vollständiger Cytidin-Deaminase-Expressionskassette

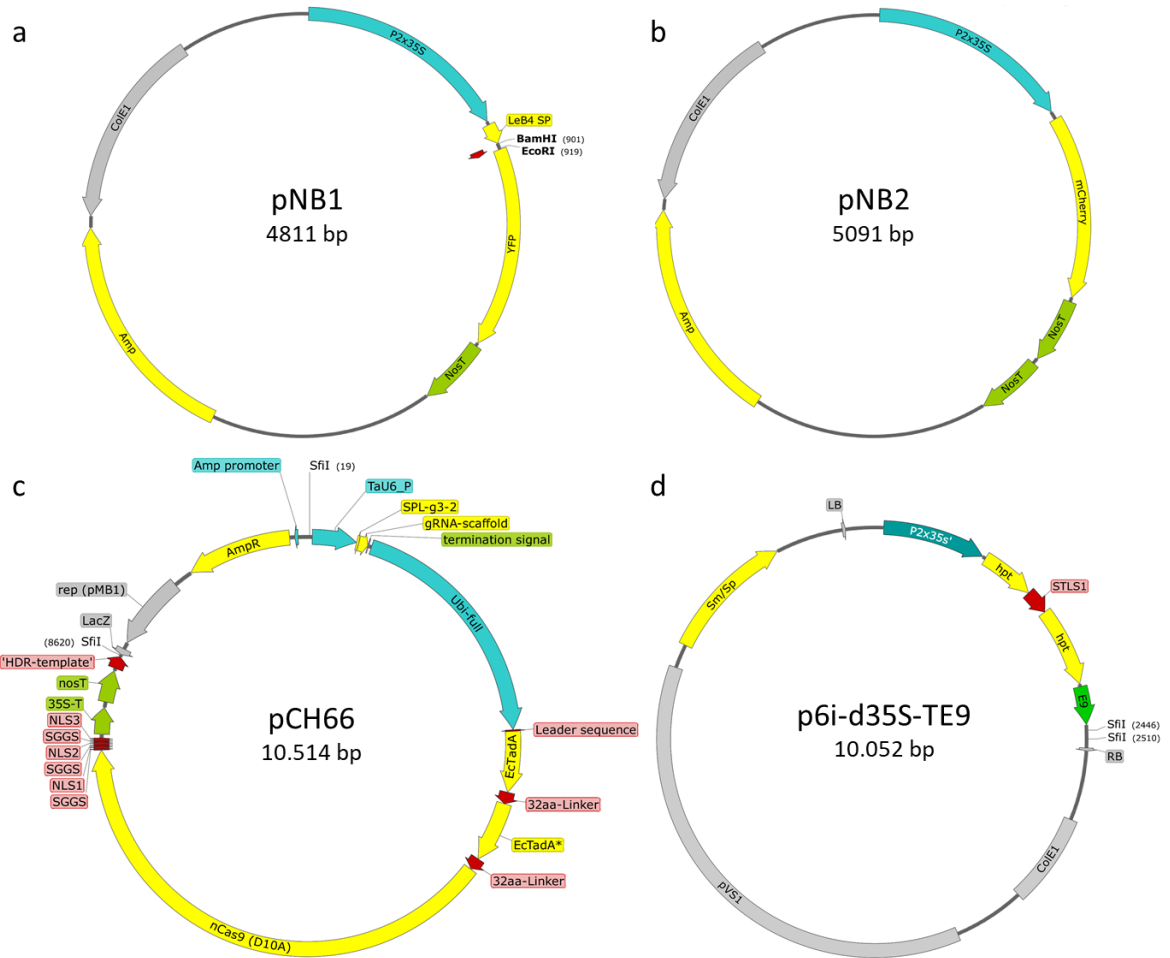


Abbildung A8 – Plasmidkarten weiterer Konstrukte; (a) pNB1 mit YFP als Zielvektor für Aktivitätstest von gRNAs in Blattepidermiszellen; (b) pNB2 mit mCherry für Transformationskontrolle und 35S-Promotor-Klonierung; (c) pCH66 finaler Adenosin-Deaminase-Vektor; (d) p6i-d35S-TE9 als generischer Binärvektor; LB - Left border; RB - Right Border

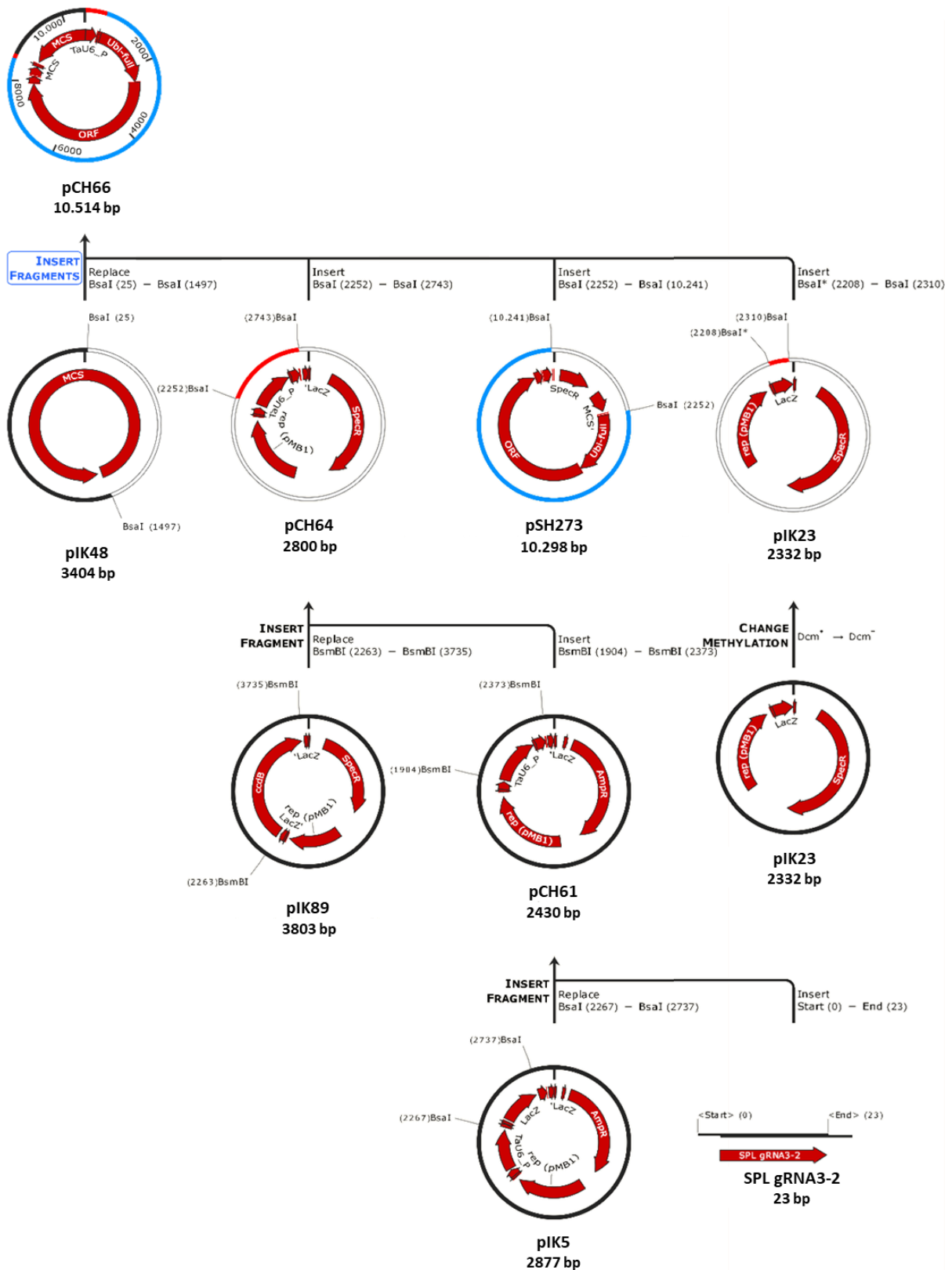


Abbildung A9 – Klonierungsschritte für Adenosin-Deaminase-Konstrukt pCH66 mit CasCADE Vektorsystem (Hoffie et al., 2023); von unten nach oben; pIK5: gRNA-Modulvektor, SPL gRNA3-2: Hybrid der gRNA-Oligonukleotide mit Überhängen, pIK89: gRNA-Assemblierungsvektor für ein Modul, pCH61: SPL gRNA3-2 in pIK5, pIK48: finaler Assemblierungsvektor, pCH64: SPL gRNA3-2 in pIK89, pSH273: Adenosin-Deaminase-ncas9-Modulvektor, pIK23: Dummy-Modulvektor, pCH66: finales Konstrukt mit SPL gRNA3-2

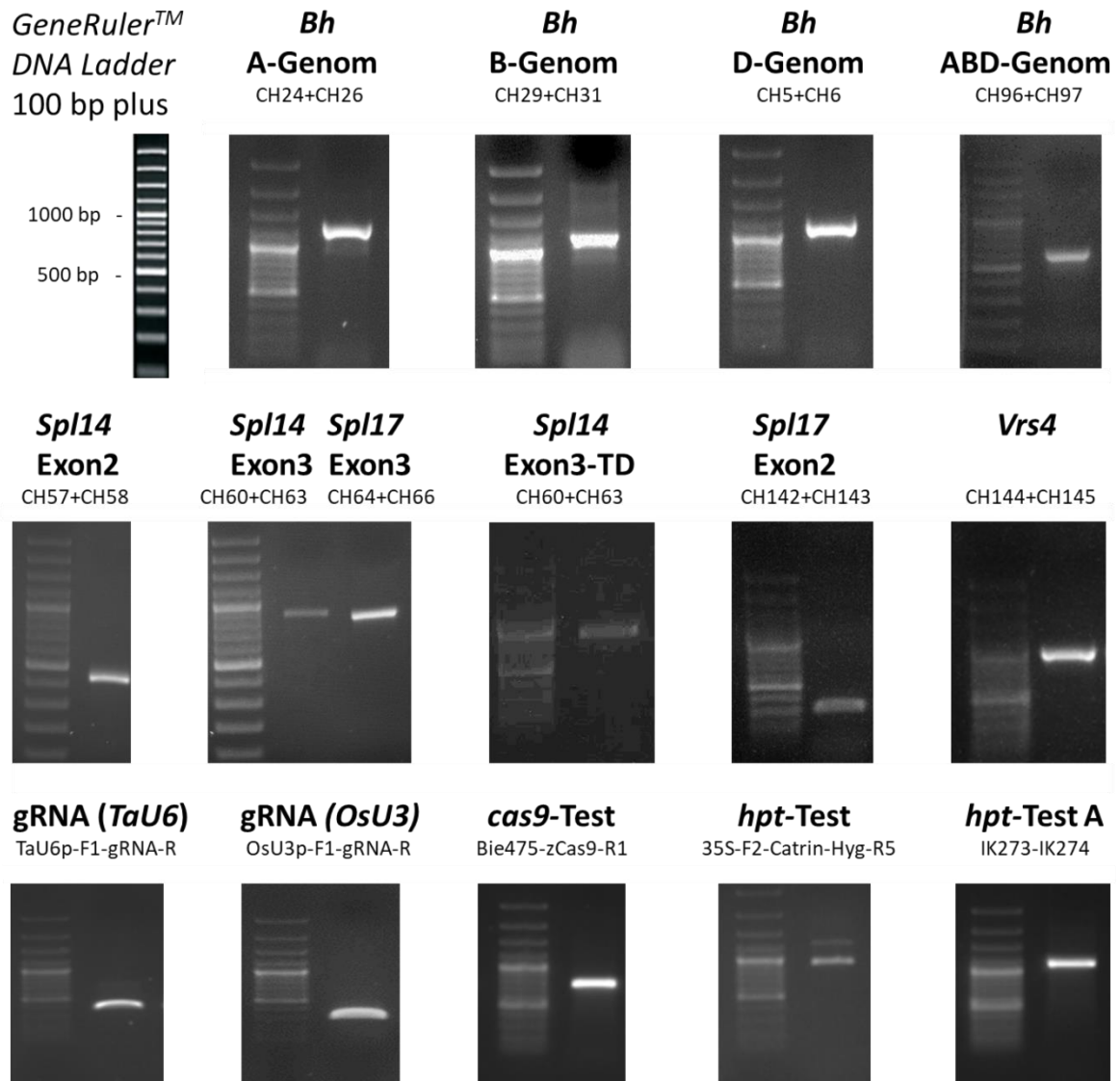


Abbildung A10– Mittels Polymerasekettenreaktion erstellte Amplifikate der Zielregionen von *Branched head* (*Bh*) und *Squamosa-Promotor binding protein-like 14* und *17* (*Spl14/Spl17*) sowie von *Six-rowed spike 4* (*Vrs4*) und der T-DNA-Fragmente; oben: Genom-spezifische PCR-Produkte für die A-, B- und D-Kopie von *Bh*, gemeinsames PCR-Produkt aller drei Kopien von *Bh* (ABD); mitte: PCR-Produkte für *Spl14* und *Spl17* der Exons 2 und 3 sowie von *Vrs4*; unten: T-DNA-Analyse der gRNAs (*TaU6* und *OsU3*), *cas9* und *hpt*; TD-Touchdown-PCR; in allen Fällen Verwendung des DNA-Markers GeneRuler™ DNA Ladder 100 bp plus

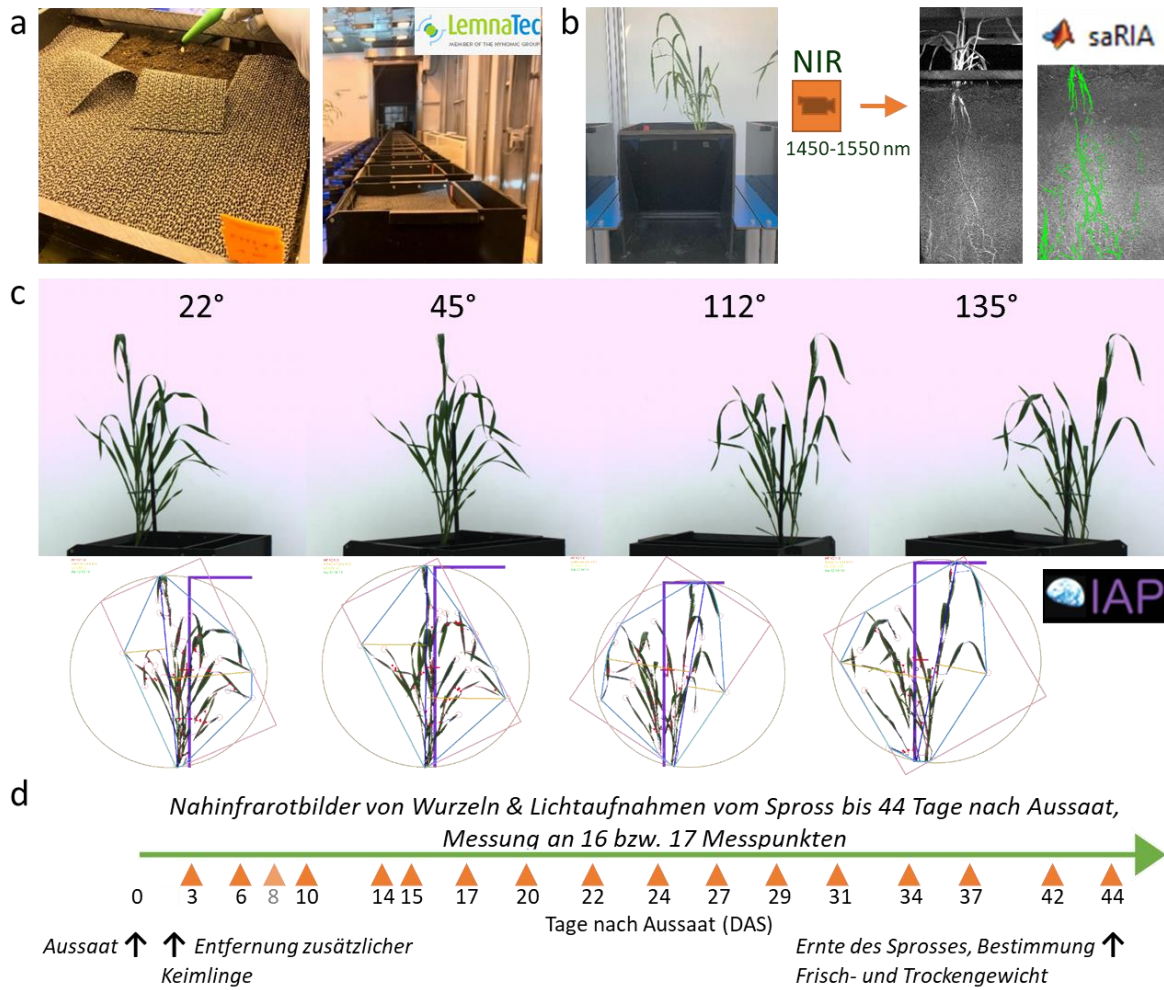


Abbildung A11 – Untersuchung des Wurzel- und Sprossphänotyps *Bh*-mutierter Pflanzen; (a) Aussaat und Phänotypisierungsanlage; (b) Wurzeldokumentation mit Nahinfrarotlicht und Auswertung mit saRIA (Narisetti et al., 2019); (c) Sprossphänotypisierung im sichtbaren Licht mit vier seitlichen Aufnahmen bei 22, 45, 112 und 135° und Auswertung mit IAP-Software (Klukas et al., 2014); (d) Schematische Darstellung der Messpunkte und des experimentellen Ablaufs, 8. Tag nach Aussaat (Day after sowing, DAS) nur für Sprossphänotypisierung verwendet (grau)

Bh-A1

ATGAGCTCTCGCAGCAGCAGCGGGCGGGCGGTGCCTCCAGATGATGGCCTTCTCGGAGCATTCGCTGCCGAAGCCGAT 80
 CGCCGGTACCCGCAGCCGAGCCGTCCCGCGTTCGTCGCCGAGCGAGCGGGCGGGCGCGGCAGGCGGGCGCGC 160
 AGGAGCCCGGG**CGCTTCTGGGCGTGC**CCGGCGGCCGTGGGGCCGGTACGCGGCCGAGATAC**GCGACCCGACCACCAAG** 240
 ZM4
 ZM4 AP2-Domäne
GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAGGAGGCCCTGGCCTACGACCGCGCGCTCTCCATGAAGGG 320
 ZM5 Target 1 (Du et al., 2021)
CGCGCAGGGCGGCACCAACTTCGTCTACGCGCACG**CCGCCTACAACA**ACTACCGGCCCT**CTCGCGCGGTTC**CACGCGC 400
AGCACCAGCCCGCCCTACGCGCGTCTCGGCCATGCCGTACGGCGGCCAGCAGCAGCACGCGGGCGGGGCGCGCCG 480
 Target 2 (Du et al., 2021)
 CACATTGGCAGCTCGTACCACCACGGCCACG**GCTACCACCAGCAGGGCCCGG**CGAGTGTCCATGCCGGTGCCAGTGC 560
 CGCGGATCACGGCGCCAGCGGCCGATGGACGTGCGCGGCAGCAGCGGCCACGACTTCTCTTCCCCAGCGCCGACGACA 640
 ACTCCGGGTACTGAGCAGCGTGGTGC GGAGAGCTGCCTCCGGCCCCGCGGGCGACCTGCAGGACGCGGGCGCTAC 720
 TCCGTGTCCGACGCCGACCGCTACGGGCTGGGCTCCGGGAGGACGTGGACGACCTGGCGACGATGGTGGCCGGCTTCTG 800
 GGGCGGGCGCGACGCGCGTACGGCGGGCCACGACATGGTGCCTCGTCGAGGGCTCGGACAACGGCTACTCCCCCT 880
 TCAGCTTCTCTCCCACTGA 900

Bh-B1

ATGAGCTCTCGCAGCAGCAGCGGGCGGGCCAGGCCCTCCAGATGATGGCCTTCTCGGAGCATTCGCTGCCGAAGCCGAT 80
 CGCCGGCCACCCGCAGCCGAGCCGTCCCGCGTTCGTCGCCGAGCGAACGGCCGGCGCTCGCGGCAGGCGGGCGCGC 160
 AGGAGCCCGGG**CGCTTCTGGGCGTGC**CCGGCGGCCGTGGGGCCGGTACGCGGCCGAGATAC**GCGACCCGACCACCAAG** 240
 ZM4
 ZM4 AP2-Domäne
GAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAGGAGGCCCTGGCCTACGACCGTCCCGCGCTCTCCATGAAGGG 320
 ZM5 Target 1 (Du et al., 2021)
CGCGCAGGGCGGCACCAACTTCGTCTACGCGCACG**CCGCCTACAACA**ACTACCGGCCCT**CTCGCGCGGTTC**CACGCGC 400
AGCAGCAGCCCGCCCTACGCGTCTCCACCATGCCGTACGGCGGGCAACAGCGCGGGCGGGCGGGCGCCGCACATT 480
 Target 2 (Du et al., 2021)
 GGCAGCTCGTACCACGGCCACG**GCTACCACCAGCAGGGCCCGG**CGCCGGCGGGCGAGTGTCCATGCCGGTGTCAA 560
 TGCCCGGATCACGGCGCCAGCAGCCGATGGACGTGCGCGGCAGCGGGCCACGACATCTCTTCCCCAGCGCCGACG 640
 ACAACTCCGGGTACTGAGCAGCGTGGTGC GGAGAGCTGCCTCCGGCCCCGCGGGCGACCTGCAGGACGCGGGCGC 720
 TACTCCGTGTCCGACGCCGACCGCTACGGGCTGGGCTCCGGGAGGACGTGGACGACCTGGCGTTGATGGTGGCCGGCTT 800
 CTGGGGCGGGCCGACGCGCGTACGGCGGGTTCGCCCCCGAACGGCGGGCCACGACATGGTGCCTCGTCGCAGG 880
 GCTCCGACAACGGCTACTCCCCCTCAGCTTCTCTCACACTGA 924

Bh-D1

ATGAGCATCCGAGCAGCAGCGGGCGGCGAGCGGGCGGCCATGCCTCCAGATGATGGCGTTCTCGGAGCATTCGCTGCC 80
 GAAGCCGATCGCCGGCCACCCGCAGCCGAGCCGTCCCGCGTTCGTCGCCGAGCAGAGGCCGGCGCGCGTGGCAGGC 160
 GGC CGCGCAGGAGCCCGGG**CGCTTCTGGGCGTGC**CCGGCGGCCGTGGGGCCGGTACGCGGGGAGATAC**GCGACCCG** 240
 ZM4
 ZM4 AP2-Domäne
ACCACCAAGGAGCGGCACTGGCTCGGCACCTTCGACACGGCGCAGGAGGCCCTGGCCTACGACCGCGCCGCGCTCTC 320
 ZM5 Target 1
CATGAAGGGCGCGCAGGGCGCACCAACTTCGTCTACGCGCACG**CCGCCTACAACA**ACTACCGGCCCT**CTCGCGCGGT** 400
 Target 1 (Du et al., 2021)
TCCACGCGCAGCAGCAGCCCGCCCTACGCGTCTCGACCATGCCGTACGCCGGCCAGCAGCACGCGGGCGCCGACATT 480
 Target 2 (Du et al., 2021)
 GGCAGCTCGTACCACCAGGCCACGGCCACGGCGGCTCG**GCTACCACCAGCAGGGCCCGG**CGCCGGCGGGCGAGTG 560
 CTCCATGCCGGTGCCCAATGCCCGGATCACGGCGCCAGCAGCCGATGGACGTGCGCGGCAGCAGCGGCCACGACTTCC 640
 TCTTCCCCAGCGCCGACGACA ACTCCGGGTACTGAGCAGCGTGGTGC GGAGAGCTGCCTCCGGCCCCGCGGGCGGAC 720
 CTGCAGGACGCGGGCGCTACTCCGTGTCCGACGCCGACCGCTACGGGCTGGGCTCCGGGAGGACGTGGACGACCTGGC 800
 GTCCATGGTGGCCGGCTTCTGGGGCGGGCCGACGCGGGTACGGCGGGTTCGCCCCCGAACGGCGGGCCACGACA 880
 TGGTCGCTCGTCGAGGGCTCCGACAACGGCTACTCCCCCTCAGCTTCTCTCCCACTGA 942

Abbildung A12 – Kodierende Sequenzen der Homoeallele von *Branched head*; blau: AP2-Domäne; grün: verwendete Zielmotive ZM4 und ZM5; rot: verwendete Zielmotive aus Du et al., 2021; PAM unterstrichen

Anhang

Spl14

ATGGAGATTGGCAGCGGTGGCTGCGGCGGGCGGAGCGGCGGGAGGGGCCGGGGACGACCCGAGCGCCACGGGCTCAA 80

GTTCGGCAAGAAGATCTACTTCGAGGACGCCACGGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCAATGCGTTCGTCGTC 160

AGCCGCCCGGGGCGGGAGGAAGGGGAAGGCCGCGGGCCCGGGGGGACGTCGGCTCCGCGCCCGCGGTGCCAG 240

GTGGAGGGGTGCGACGTGGATCTGAGCGGCGTCAAGCAATACTACAGCCGCCACAAGGTGTGCTGCATGCACCTCCAAGGC 320

SBP-Domäne

GCCCCACGTTCGTCGTCGCCGGCCTCGAGCAGCGATTCTGCCAGCAGTGCAGCAGGTTCCACCAGCTGCCTGAATTCGATC 400

AAGGAAAACGCAGCTGCGCAGGCGTCTGGCGGGCCACAACGAGCGCCGGAGGAAGCCG **ZM2-1 >>>** CCTCCCGCCCTCTGGCATCA 480

CGCTACGGGCGACTCGCCGCATCGTTTGAAGAACCCGGCAGGTTCAGAAGCTACCTGCTGGATTCTCTACCCAAGGGT 560

ZM2-4 >>>

TCCAAGCAGCGTGCGGGATGCATGGCCGGGGCTCGGCCAGGCTACCGGATGCCCGGTGAAATCCAGTGGCAAGGGAACC 640

TAGACCTGCGTCTCACACGGGTGCAGCCACGGGATACCACGGCCCCAGCCCACCATGCATACAGCGGCCACGGCGGC 720

<<< ZM3-1 ZM3-3

GGCTTCCCCGGCCAGAGATCCCTCCAGGTGGGTGTCTCGCAGGGTTCGCGCCGACTCCAGCTGTGCTCTCTCTCTCTCT 800

ZM3-3 >>> **<<< ZM3-2**

GTCAACTCAGCCATGGGACAACACACCCCATGGTGCCAGCCACCACCATCATCGGTGCGCGGCCATGTCCCGCCGCGGGG 880

GCTTCAATGGCAACCCACCTGTGGGAGTGTACCCCTCCATCATGGCGAGTAACTACATGCCGCGCCGGGAGCCCCCTGG 960

AGTGCCTCCAGGGCCATGAAGGTGGGCGGAACGCGCCACACCAGCAGCTGCCACATGACGTCGCCGTCACAGAGGTGCA 1040

CCACCCAGCAGGCTCTAGCCAGCATGGTCACTTCTCAGGCGAACTCGAGCTCGCCCTGCAAGGGAACAGGCCGCGCCCTG 1120

GGCCGCGGGCGATCACGGGCGGGCGGCTTCGACCACCCGGCAGCTCGTCCAACCTGGTCCCTGTAG 1188

Spl17

ATGGAGACCGGGAGCAGCGGCGGGGAGAGGGCCCCGGGGACGAGCTCCACGGGCTCCACTTCGGCAAGAAGATCTACTT 80

CGAGCAGGACGTGGCCGGGGAGCGGCTCCTCCTCCTCCGCTCCGGTGGCAGGAGGGGCAGGGGCCCCGCTGGGCCAG 160

GAGGAGGGGGAGGTGGTGGTGGCGGTGGCGGTGGCGGCGGGAGGAGGAGCCTCCACCCCGCGGCCGCGGCAGC 240

GCCTCGCAGTCGAGCAGCCGAGGTGCCAGGTGGAGGGGTGCGGCGTGGATCTGAGCGGCGGCAAGACCTACTACTGCCG 320

SBP-Domäne

CCACAAGGTGTGCTCCATGCACCTCAAGGCGCCGCTCGTCTGTCGCGCCGATCGAGCAGCGCTTCTGCCAGCAGTGCA 400

GCAGGTTCCACCAGCTACCTGAATTTGACCAAGGAAAACGAAGCTGCCCGCCAGCCTCGCGGGTCACAATGAGCCCGCG 480

x x x ZM2-1 >>>

AGGAAGCCGCGCCCGACCTATGTGACACGCTATGGCCGGCTTGCTGCGTCTTCAACGAAGATCCAGGCAGGTTTCAG 560

>>> **x x ZM2-4**

AAGCTTCTGCTGGATTCTCGTACCCGAGGGCCCCGCGCGGTGAGGGACCCGTGGCCGGCCGTTTCAGCCGGCGACC 640

ACCGCATGCCTGGCACCACCCACTGGCAGGGCCAGGGCAGCCATCATGAACAACACCACGCTCATCGCAGTGCAGTTGCG 720

GGATACGGCGACCACCACGCGTACAACGGCCAGGGCAGCAGCTCGGGGGGAGGCGGGGCGCCGATGATCCCGCGGGCTT 800

<<< ZM3-1 ZM3-3

CGAGCTCCCCTCGGACGAATGTATGGCGGGCGTCCCGCCGACTCCAGCTGTGCTCTCTCTCTCTCTGTCACTCAGCCAT 880

>>> **<<< ZM3-2**

GGGATAGTAGTGCCACAGCTCCAGCCACATCCGGTCCCCGCAATGTGCAGGGCCAGCGCCTTCCAGGGCAGCCCGGTG 960

GCGCCCTCCGTCATGGCCAGCAACTACATGGCGGGCGGAGCAGCAGCGGCTCCTGGGGTAGCCCCGGGGCGCCAGGAG 1040

CATGCAGCAGCAGCACCACCACCATCACATGCAGCATGACACGGTGTGAACGAGGTCCATCCGAGCTCGGTTACCACG 1120

GGCAGTTCGGCGAGCTCGAGCTGGCGTGCAGCAGGGGAGGGCCACGCCGAACCCGCGCACGCCGAGCAGGGGCCTTC 1200

AGCCACTCCAGCAACGCGATGAACTGGTCTCTGTAG 1236

Abbildung A13 – Kodierende Sequenzen von *Spl14* und *Spl17*; rot unterstrichen: Exon 1, blau unterstrichen: Exon 2, orange unterstrichen: Exon 3; blau: SBP-Domäne; grüner Hintergrund und schwarze Linie: verwendete Zielmotive, Pfeile markieren PAM und Orientierung, x markiert Fehlpaarungen in *Spl17*-Motiven; rot: *miR156*-Bindemotiv

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Wolfgang Hertig
Geburtsdatum: 01.03.1988
Geburtsort: Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Ausbildung/ wissenschaftlicher Werdegang

Seit 2021 Eingeschriebener Doktorand an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Seit 2016 Doktorand am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie

2013-2016 Master-Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Schwerpunkten Pflanzenphysiologie, Hefegenetik und Entwicklungsgenetik sowie Pflanzengenetik
Master-Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AGs Heterosis, Pflanzliche Baupläne und Samenentwicklung
„Characterization and interaction studies of two-component signaling system components expressed in barley endosperm transfer cells“
Abschluss: Master of Science (sehr gut)

2010-2013 Bachelor-Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Schwerpunkten Entwicklungsbiologie und Molekularer Pflanzengenetik
Bachelor-Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AG Samenentwicklung
„Interaktionsstudien von Elementen des Zweikomponenten-Signalsystems (TCS) aus Gerste mittels Fluoreszenzkomplementation (BiFC)“
Abschluss: Bachelor of Science (gut)

2007-2010 Ausbildung zum Veterinärmedizinisch-technischen Assistenten (VMTA) am IFBE Med.-techn. Bildungszentrum, Zwickau
Abschluss: Staatliche geprüfter VMTA (gut)

1998-2006 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Schwarzenberg/Erzg.
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (gut)

Berufliche Laufbahn

Seit 2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie

2014-2016 Wissenschaftliche Hilfskraft am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AGs Heterosis & Pflanzliche Baupläne

2013 Studentische Hilfskraft am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, AG Samenentwicklung

2006-2007 Zivildienst am Helios-Klinikum Aue

Veröffentlichungen in anerkannten wissenschaftlichen Zeitschriften während der Doktorandenzeit (* beteiligt an geteilter Erstautorschaft)

- Gerasimova, S. V., A. M. Korotkova, C. Hertig, S. Hiekel, R. Hoffie, N. Budhagatapalli, I. Otto, G. Hensel, V. K. Shumny, A. V. Kochetov, J. Kumlehn und E. K. Khlestkina. **2018**. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilov J. Genet. Breed.* 22, 1033-1039. <https://doi.org/10.18699/VJ18.447>
- Koepfel, I.*, C. Hertig*, R. Hoffie* und J. Kumlehn. **2019**. Cas Endonuclease Technology—A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2647. <https://doi.org/10.3390/ijms20112647>
- Beier, S., C. Ulpinnis, M. Schwalbe, T. Münch, R. Hoffie, I. Koepfel, C. Hertig, N. Budhagatapalli, S. Hiekel, K. M. Pathi, G. Hensel, M. Grosse, S. Chamas, S. Gerasimova, J. Kumlehn, U. Scholz und T. Schmutzer. **2020**. Kmasker plants - a tool for assessing complex sequence space in plant species. *Plant J.* 102, 631-642. <https://doi.org/10.1111/tpj.14645>
- Hertig, C., M. Melzer, T. Rutten, S. Erbe, G. Hensel, J. Kumlehn, W. Weschke, H. Weber und J. Thiel. **2020**. Barley HISTIDINE KINASE 1 (HvHK1) coordinates transfer cell specification in the young endosperm. *Plant J.* 103, 1869-1884. <https://doi.org/10.1111/tpj.14875>
- Gerasimova, S.V.*, C. Hertig*, A. M. Korotkova, E. V. Kolosovskaya, I. Otto, S. Hiekel, A. V. Kochetov, E. K. Khlestkina und J. Kumlehn. **2020**. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene. *BMC Plant Biology* 20, 255. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02454-9>
- Thiel, J., R. Koppolu, C. Trautewig, C. Hertig, S. M. Kale, S. Erbe, M. Mascher, A. Himmelbach, T. Rutten, E. Esteban, A. Pasha, J. Kumlehn, N. J. Provart, S. Vanderauwera, C. Froberg und T. Schnurbusch. **2021**. Transcriptional landscapes of floral meristem fates in barley. *Science Advances* 7, 18, eabf0832. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf0832>
- Michalski, K., C. Hertig, D. R. Mańkowski, J. Kumlehn, J. Zimny und A. M. Linkiewicz. **2021**. Functional Validation of cas9/guideRNA Constructs for Site-Directed Mutagenesis of Triticale ABA8'OH1 loci. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 7038. <https://doi.org/10.3390/ijms22137038>

Konferenzbeiträge (Vorträge)

- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Postervortrag: Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *EMBO Workshop Plant Genome Stability and Change, Gatersleben, 03.-06.06.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *Plant Science Student Conference, Gatersleben, 19.-22.06.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Ata, Y., Jacobi, A., Kumlehn, J., Schnurbusch, T. **2019**. OSIRIS – Exploring the yield potential of novel spike architecture in hexaploid wheat by genome wide association mapping and targeted mutagenesis using RNA-guided Cas endonuclease. *PLANT 2030 Statusseminar, Potsdam, 13.-15.03.2019*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Kumlehn, J., Schnurbusch, T. **2019**. AP07-OSIRIS – Exploring the yield potential of novel spike architecture in hexaploid wheat by genome wide association mapping and targeted mutagenesis using RNA-guided Cas endonuclease. *4th International Wheat Yield Partnership (IWYP) Program Conference, Ciudad Obregon (Mexiko), 01.-04.04.2019*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *Plant Science Student Conference, Halle (Saale), 18.-21.06.2019*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *VISCEA Plant Transformation & Biotechnology V, Wien (Österreich), 03.-04.07.2019*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *VISCEA Plant Genome Editing & Genome Engineering II, Wien (Österreich), 05.-06.07.2019*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *Workshop Molekulare Züchtung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, Geisenheim, 05.-06.09.2019*
- Hertig, C., Marthe, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Junker, A., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2021**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike and

root architecture. *PlantGen 2021 – 6th International Scientific Conference, Novosibirsk (Russland), virtuelle Teilnahme, 14.-17.06.2021*

- Hertig, C., Kumlehn, J. **2021**. Engineering of cereal spike architecture – Site directed mutagenesis of wheat BRANCHED HEAD and barley SQUAMOSIA PROMOTOR BINDING PROTEIN-LIKE 14. *Workshop Molekulare Züchtung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, virtuelle Teilnahme, 06.-07.09.2021*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Koppolu, R., Junker, A., Khosravi, S., Thiel, J., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2021**. Engineering of cereal spike architecture by site directed mutagenesis. *6th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, Budapest (Ungarn), virtuelle Teilnahme, 03.-05.11.2021*
- Hertig, C., Marthe, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Junker, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2021**. Postervortrag: Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike and root architecture. *EMBO Workshop Plant Genome Stability and Change, Leiden (Belgien), virtuelle Teilnahme, 05.-08.12.2021*

Konferenzbeiträge (Poster, Erstautor)

- Hertig, C., Poursarebani, N., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2017**. Modification of barley and wheat spike architecture by gene-specific mutagenesis. *Plant Science Student Conference, Halle (Saale), 06.-09.06.2017*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2017**. Modification of barley and wheat spike architecture by gene-specific mutagenesis. *Workshop Molekulare Züchtung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, Braunschweig, 03.-04.08.2017*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *VIB conference Genome Engineering and Synthetic Biology, Bruges (Belgien), 25.-26.01.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *PLANT 2030 Statusseminar, Potsdam, 05.-07.02.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *EMBO Workshop Plant Genome Stability and Change, Gatersleben, 03.-06.06.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *Symposium Modern Agriculture without chemical pesticides der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, Neustadt a.d. Weinstraße, 03.-04.09.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2018**. Improving the yield potential of temperate cereals by modification of spike architecture. *InnoPlanta Forum, Quedlinburg, 30.11.2018*
- Hertig, C., Poursarebani, N., Marthe, C., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. OSIRIS: Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *PLANT 2030 Statusseminar, Potsdam, 13.-15.03.2019*
- Hertig, C., Marthe, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Jacobi, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2019**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike architecture. *InnoPlanta Forum, Quedlinburg, 06.12.2019*
- Hertig, C., Marthe, C., Poursarebani, N., Budhagatapalli, N., Hiekel, S., Junker, A., Schnurbusch, T., Kumlehn, J. **2021**. Targeted mutagenesis of BRANCHED HEAD homoeoalleles causes alterations of wheat spike and root architecture. *EMBO Workshop Plant Genome Stability and Change, Leiden (Belgien), virtuelle Teilnahme, 05.-08.12.2021*
- Hertig, C., Kumlehn, J. **2022**. Validation of the role of vernalization (Vrn) genes for the switch to generative development of winter cereals. *26th International Conference on Sexual Plant Reproduction, Prag (Tschechien), 20.-24. Juni 2022*

Sprachen

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (fließend)
- Französisch (Grundkenntnisse)
- Persisch (Grundkenntnisse)

Danksagungen

Zunächst gilt mein Dank an Dr. Jochen Kumlehn für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung exzellenter Arbeitsbedingungen und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge und Diskussionen in den vergangenen Jahren.

Ich möchte mich zudem bei Prof. Dr. Jens Boch und bei Prof. Dr. Thomas Debener für die Übernahme der Tätigkeit als Referent bzw. Koreferent meiner Arbeit bedanken sowie bei Prof. Dr. Traud Winkelmann, die sich bereit erklärt hat, den Prüfungsvorsitz während meiner Verteidigung zu führen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Thorsten Schnurbusch und bei Dr. Naser Poursarebani sowie bei Dr. Andreas Jacobi und Dr. Andreas Benke von Strube Research für die gemeinsame Umsetzung des OSIRIS-Projektes sowie wie für viele wichtige Hinweise und Diskussionen. Danke auch an das Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Finanzierung des OSIRIS-Projektes.

Ein großer Dank geht an Cornelia Marthe für die technische Unterstützung während der Weizentransformation, der Kreuzungen und der Erstellung doppelhaploider Pflanzen. Des Gleichen danke ich Sybille Freist für die durchgeführten Transformationen von Gerste.

Ich danke Ingrid Otto und Carola Bollmann für die Unterstützung bei der Ploidiebestimmung und Colchizinierung der doppelhaploiden Weizenpflanzen. Des Weiteren danke ich Nicole Schäfer für die Unterstützung bei der Genotypisierung der mutierten Pflanzen.

Dr. Nagaveni Budhagatapalli und Stefan Hiekel danke ich für viele wichtige Ratschläge für Klonierungen, die Bereitstellung verschiedener Konstrukte, viele fruchtbare Diskussionen und auch für die gute Bürogemeinschaft, die wir lange miteinander hatten. Dr. Diaa Daghma danke ich für die Hilfe bei der Bearbeitung meiner Abbildungen und für seine fachkundige Meinung sowie zahlreiche Diskussionen.

Ein großer Dank geht an Dr. Astrid Junker und Ingo Mücke für die inhaltliche und technische Unterstützung der automatischen Phänotypisierung des Wurzel- und Sprosswachstums. Dankeschön an Dr. Ravi Koppolu und Dr. Johannes Thiel für die Unterstützung bei der Charakterisierung der *spi*-Mutanten.

Ein besonderer Dank geht an das gesamte Gärtnerteam um Enk Geyer und Kerstin Jacobs, welches mich in allen Jahren unterstützt und meine Pflanzen gepflegt hat.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie für die Hilfsbereitschaft, die gute Atmosphäre, zahlreiche Kochabende und manchmal abenteuerliche Ausflüge bedanken.

Den ehemaligen Kollegen des PhD Student Boards, vor allem Daniela Impe, Vanessa Paffrath und Robert Hoffie, möchte ich für die langjährige gute Zusammenarbeit bei der Organisation von Veranstaltungen und der Verbesserung der Betreuung von IPK-Doktoranden danken.

Ich bedanke mich bei allen Freunden und Bekannten für die Abwechslung vom Laboralltag und für die gemeinsame Zeit, die unter anderem durch viel Musik oder politische Diskussionen geprägt war.

Meinen Eltern, Brüdern und Großeltern danke ich für die jahrelange Unterstützung und das Vertrauen, dass sie mir in all den Jahren geschenkt haben. Danke für diesen großen Zusammenhalt. Ihr seid eine große Stütze für mich.

Zuletzt danke ich meiner lieben Solmaz für die Unterstützung in all den Jahren, für die Hilfe bei der Expressionsanalyse, für so manche Persisch-Lektion, für wunderschöne gemeinsame Reisen und vor allem für das größte Geschenk, unsere kleine Anita Sophie. Dir Anita danke ich für so viele glückliche Momente, die du mir in deinem bisherigen noch jungen Leben geschenkt hast. Auch Solmaz Familie möchte ich für viele schöne Momente danken, in denen ich den Hauch des Orients spüren durfte.